

Marcadores biológicos en adenocarcinomas gástricos

Biological markers in gastric adenocarcinomas

M. DÍEZ ALONSO, J. M. MUGÜERZA HUGUET y A. MARTÍN DUCE

Servicio de Cirugía General. Departamento de Ciencias Morfológicas y Cirugía. Hospital «Príncipe de Asturias». Universidad de Alcalá de Henares. Madrid.

RESUMEN

En los últimos años se ha dedicado un gran esfuerzo al estudio de las bases biomoleculares del adenocarcinoma gástrico. Se han estudiado oncogenes, genes reparadores, genes supresores, factores de crecimiento, marcadores de proliferación, moléculas reguladoras del ciclo celular, moléculas de adhesión celular, enzimas de la matriz extracelular. Los datos publicados no han identificado con claridad la existencia de relación inequívoca entre una determinada alteración y curso clínico evolutivo, y por tanto no se ha descrito una utilidad clínica predictiva. Sí se ha avanzado en el conocimiento de los procesos de desarrollo y progresión de los tumores gástricos. Los datos publicados indican que la frecuencia de alteraciones en la mayoría de los marcadores biológicos es diferente en los tumores de tipo intestinal que en los de tipo difuso. Parece que existe un soporte genético que sustenta esas diferencias.

Palabras clave: Adenocarcinoma gástrico. Marcadores tumorales. Pronóstico. Recidiva. Supervivencia.

SUMMARY

In recent years, much efforts has been dedicated to the study of the biomolecular bases of gastric adenocarcinoma. Oncogenes, reparative genes, suppressor genes, growth factors, proliferation markers, cellular cycle regulator molecules, cellular adherence molecules, and enzymes of the extracellular matrix have been studied. The data published has not clearly identified the existence of an unmistakable relationship between a certain al-

teration and evolutive clinical course and thus, a predictive clinical utility has not been described. Advance has been made in the knowledge of the processes of development and progression of the gastric tumors. The data published indicate that the frequency of alterations in most of the biological markers is different in the intestinal type tumors than in the diffuse type. It seems that there is a genetic support that maintains these differences.

Key words: Gastric adenocarcinoma. Tumoral markers. Prognosis. Relapse. Survival.

INTRODUCCIÓN

La supervivencia de los pacientes con adenocarcinoma gástrico no ha mejorado significativamente en la última década. La probabilidad de permanecer con vida a los 5 años tras una intervención quirúrgica es 20-40%. Para estos cálculos hay que excluir las dos situaciones especiales que constituyen el cáncer inicial (*early cancer*) (supervivencia 85-90% a los cinco años) y el cáncer gástrico en Japón (supervivencia global 70%). Además, la incidencia en Europa de estos tumores se mantiene en 20-30 casos por 100.000 habitantes, el tercer tumor en cuanto a tasas de mortalidad^{1,2}. El cáncer gástrico continúa representando un grave problema sanitario. Contribuyen, también, su diagnóstico tardío y la limitación de las terapias médico-quirúrgicas disponibles. Se necesita mejorar el conocimiento sobre los factores que determinan el pronóstico individual y la aplicación de nuevas terapias.

Los factores pronósticos en oncología están especialmente enfocados a la identificación de subgrupos de pacientes según el riesgo de recidiva. En tumores en los que ha demostrado la eficacia de las medidas adyuvantes, las variables pronósticas ayudan a clasificar a los enfermos en grupos terapéuticos. En el

Correspondencia:

Antonio Martín Duce
Serv. Cirugía General
Hospital Príncipe de Asturias
Crta. Alcalá Meco, s/n
28805 Alcalá de Henares (Madrid)

cáncer de mama o en los tumores colorrectales, la quimioterapia y la radioterapia han demostrado eficacia en grupos bien definidos y ciertos marcadores ayudan a orientar el tratamiento. Los factores predictivos descritos en el cáncer gástrico hasta ahora no han alcanzado ese objetivo. Por el momento, saber que un marcador determinado se encuentra alterado, no proporciona una información terapéuticamente relevante. Además, la quimioterapia adyuvante no ha demostrado poder ofrecer beneficio significativo³. No se han identificado criterios de selección de pacientes subsidiarios de tratamiento complementario. Pero la situación puede empezar a cambiar próximamente. En los últimos años se han superado algunos problemas que afectaban a aspectos básicos del manejo de estos tumores. Ahora hay uniformidad en las clasificaciones de estadios tumorales, se han unificado criterios quirúrgicos y se ha conseguido homogeneidad en la técnica operatoria^{4,6}.

ESTADIO TUMORAL

La cirugía es el tratamiento de elección en el cáncer gástrico, pero aproximadamente un tercio de los pacientes susceptibles de resección quirúrgica con intención curativa sufrirán una recidiva. El estadio tumoral es el factor pronóstico más importante y decisivo⁶. Refleja una información global sobre la extensión de la infiltración parietal del tumor, invasión locorregional, presencia de adenopatías, su localización y número de éstas^{4,5}. Aporta una medida objetiva para la estratificación de los pacientes según el riesgo de recidiva y fallecimiento, sirve de guía para la selección del tratamiento y facilita la clasificación y el análisis de resultados. Sin embargo, el estadio tumoral no es un parámetro perfecto. Las estimaciones sobre el pronóstico evolutivo tras una intervención quirúrgica poseen ciertas limitaciones. Se trata de un sistema válido para obtener predicciones globales, pero es muy limitado para predecir individualmente la evolución más probable.

Punto clave 1

El estadio tumoral es el factor pronóstico más importante y decisivo. Refleja una información global sobre la extensión de la infiltración parietal del tumor, invasión locorregional, presencia de adenopatías, su localización y número de éstas.

Cada vez es más evidente que, además del estadio tumoral y del tratamiento quirúrgico a que se sometían estos pacientes, la evolución final obedece a una serie de propiedades o características biológicas de las células tumorales. Si pudiéramos saber la causa de que ciertos tumores sean más propensos a metastatizar que otros podríamos predecir la evolución en cada paciente. Se han analizado nuevos marcadores

biológicos, con la intención de complementar la estimación pronóstica basada en el estadio tumoral y para obtener una descripción de la agresividad biológica tumoral^{6,7}. La caracterización de las propiedades de cada tumor proporcionará una clasificación más acorde con su comportamiento y contribuirá a una selección del tratamiento más apropiada.

Punto clave 2

Cada vez es más evidente que, además del estadio tumoral y del tratamiento quirúrgico a que se sometían estos pacientes, la evolución final obedece a una serie de propiedades o características biológicas de las células tumorales.

FACTORES BIOLÓGICOS

La transformación de epitelio normal a neoplasia es un proceso complejo, que está asociado a la acumulación de anormalidades genéticas, adquiridas y/o heredadas (tabla 1). El resultado final es la proliferación celular descontrolada, invasión y metástasis. El cáncer gástrico no es una excepción. Se ha comunicado la participación de genes encargados de la codificación de factores de crecimiento, citokinas, moléculas reguladoras del ciclo celular, factores supresores, moléculas de adhesión celular y factores de inestabilidad genética^{6,7}. En conjunto, los marcadores o genes involucrados en los adenocarcinomas gástricos son similares a los que menciona habitualmente al hablar de la oncogénesis en el cáncer colorrectal, aunque varía la frecuencia con se detecta alteración de cada uno de los marcadores. Posiblemente ambos tipos de tumores del aparato digestivo se desarrollen siguiendo vías genéticas similares⁶⁻⁸.

Punto clave 3

La transformación de epitelio normal a neoplasia es un proceso complejo, que está asociado a la acumulación de anormalidades genéticas, adquiridas y/o heredadas. El resultado final es la proliferación celular descontrolada, invasión y metástasis.

VÍAS DE CARCINOGENÉISIS

En los adenocarcinomas gástricos se reconocen dos vías de carcinogénesis principales. La primera y la más común (modelo supresor), que afecta al 80% de los casos, se caracteriza por la acumulación progresiva de alteraciones genéticas, que tiene lugar paralelamente a la evolución de la alteración histológica (gastritis-metaplasia-displasia-cáncer)^{6,7,9}. Incluye, de forma característica, la anulación funcional de genes supresores, como APC, p53 o DCC y la

TABLA 1 Progresión tumoral, invasión y metástasis. Factores biológicos representativos de cada estadio

| Estadio del tumor | Marcadores potenciales |
|--|--|
| Tumor primario | — Inductores de estroma/angiogenesis: inhibidores de proteasas, VEGF — Crecimiento y proliferación: receptores tirosin-quinasa (c-erbB-2, c-met), factores de crecimiento y receptores (EGF, TGF alfa, PDGF), transductores de la señal de activación (ras), reguladores ciclo celular (p21 WAF, p27, ciclinas G1 y G2, CDKs, MTS1), genes supresores mutados (p53, APC, DCC, nm23), controladores de apoptosis (bcl-2), mutación factores de estabilidad genética (hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, GTBP), antígenos tumorales (CEA, CA 72.4) |
| Separación de células del tumor primario | Pérdida de moléculas de adhesión (E-cadherina, Catenina, CD44), proteasas/inhibidores |
| Infiltración de tejidos vecinos | Desequilibrio de proteasas/inhibidores (sistema uPA, MMPs, catepsinas) |
| Invasión de vasos sanguíneos | Desequilibrio de proteasas/inhibidores |
| Diseminación sistémica | Detección de partículas celulares diseminadas (CK18, CEA, CA 72.4) |
| Adhesión al endotelio y extravasación | Sobreexpresión de moléculas de adhesión, desequilibrio proteasas/Inhibidores |
| Progresión de un grupo celular metastático | — Interacción con el microambiente: proteasas/inhibidores, moléculas de adhesión, pérdida de MHC como escape inmunológico — Inducción del estroma/angiogenesis — Crecimiento y proliferación |

PAI: inhibidor de la activación del plasminógeno; TIMP: inhibidor tisular de las metaloproteinasas; EGF: factor epidérmico de crecimiento; CDK: ciclina dependiente de quinasa; UPA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa; MMP: metaloproteinasas de la matriz extracelular; CK: citoqueratina; MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; VEGF: factor de crecimiento vascular; PDGF (factor de crecimiento plaquetario).

activación de oncogenes como ras o myc. Los tumores originados a través de esta vía muestran una marcada inestabilidad cromosómica, son frecuentes las anormalidades citogenéticas, aneuploidia y pérdida de alelos. La vía alternativa (modelo mutador o RER) se caracteriza por la aparición de mutaciones diseminadas por todo el genoma. La señal distintiva de esta vía es la alteración de la longitud y composición de pequeñas secuencias de bases del ADN (microsatélites). La presencia de una elevada incidencia de alteraciones de los microsatélites (inestabilidad de los microsatélites) se debe a un defecto en el sistema de genes reparadores del ADN (hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2, GTBP). La mutación de alguno de ellos origina una desestabilización que finalmente conduce a mutaciones generalizadas en todo el genoma.

Punto clave 4

La vía de carcinogénesis del «modelo supresor o LOH» afecta al 80% de los casos, se caracteriza por la acumulación progresiva de alteraciones genéticas, que tiene lugar paralelamente a la evolución de la alteración histológica adenoma-cáncer. Incluye, de forma característica, la anulación funcional de genes supresores, como APC, p53 o DCC, también ocurre la activación de oncogenes como ras o myc. Los tumores originados a través de esta vía muestran una marcada inestabilidad cromosómica, son frecuentes las anormalidades citogenéticas y pérdida de alelos.

Punto clave 5

La vía de carcinogénesis «modelo mutador o RER» se caracteriza por la aparición de múltiples mutaciones diseminadas por todo el genoma. Algunas de estas mutaciones ocurren en regiones que codifican genes implicados en el ciclo celular y en la progresión tumoral. La señal distintiva de esta vía es la alteración de la longitud y composición de pequeñas secuencias de bases del ADN (microsatélites). El defecto genético causante es la inactivación del sistema de genes reparadores del ADN (hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2, GTBP).

Se sabe que, clínica y epidemiológicamente, los adenocarcinomas gástricos no son un grupo uniforme. Existen marcadas diferencias de comportamiento entre los dos grandes tipos histológicos tumorales: el intestinal y el difuso^{9,10,11}. Parece que existe un soporte genético o biológico que sustenta esas diferencias. La frecuencia de alteraciones de la mayoría de los marcadores biológicos es diferente en ambos tumores (tabla 2). En una elevada proporción de los tumores de tipo difuso y pobremente diferenciados se detecta inestabilidad de los microsatélites, además la frecuencia de amplificación de factores de crecimiento como c-met o K-sam es mayor, la frecuencia con se encuentran mutaciones en el gen p53 es muy inferior, no se suele observar pérdida de función de los genes APC y DCC que actúan como moléculas de adhesión y frecuentemente hay disminución de la expresión de cadherina

TABLA 2 Adenocarcinoma gástrico. Diferencias genéticas entre tumores de tipo intestinal y de tipo difuso

| Gen (alteración genética detectada) | Tipo difuso | Tipo intestinal |
|-------------------------------------|-------------|-----------------|
| K-ras (mutación) | — | 10% |
| C-met (amplificación) | 40% | 10% |
| K-sam (amplificación) | 33% | — |
| C-erbB-2 (amplificación) | — | 20% |
| Bcl-2 (LOH)* | — | 43% |
| p53 (LOH)* | 26% | 60% |
| APC (LOH)* | — | 60% |
| DDC (LOH)* | — | 50% |
| CD44 (transcripción anormal) | 90% | 90% |
| Cadherina, catenina (delección) | 50% | — |
| Genes reparadores (mutación) | 64% | 17% |

*LOH = Pérdida del estado heterocigótico (mutación de uno de los dos alelos del gen y delección del otro).

y cateninas de la matriz extracelular, también la actividad de enzimas proteolíticos de la matriz extracelular está significativamente elevada¹²⁻¹⁶. Por el contrario, en los tumores de tipo intestinal la frecuencia de alteración de microsátélites es muy inferior, no se suele detectar alteraciones en la expresión de factores de crecimiento, sin embargo son muy frecuentes mutaciones en los genes p53, DCC y APC, a menudo hay sobreexpresión de cadherina y cateninas.

Punto clave 6

Se sabe que clínica y epidemiológicamente los adenocarcinomas gástricos no son un grupo uniforme. Existen marcadas diferencias de comportamiento entre los dos grandes tipos histológicos tumorales: el intestinal y el difuso. Parece que existe un soporte genético o biológico que sustenta esas diferencias.

Los tumores de tipo intestinal bien diferenciados parecen seguir un patrón genético diferente que los tumores de tipo difuso y pobremente diferenciados⁶⁻⁸. Se ha propuesto que la inestabilidad genética juega un papel crítico en el desarrollo de los tumores poco diferenciados, que frecuentemente se desarrollan sobre mucosa no metaplásica en poblaciones más jóvenes. Por el contrario, en los tumores de tipo intestinal parece tener un mayor peso el modelo genético supresor y la acumulación progresiva de mutaciones en protooncogenes y pérdida de función de genes supresores. El esquema recuerda en gran medida a lo que sucede en los tumores colorrectales. Los tumores RER tienden a estar localizados proximalmente y muestran escaso grado de diferenciación, suelen ser de tipo mucinoso y poseen marcado infiltrado linfoplasmocitario peritumoral. Suelen ser tumores de crecimiento infiltrativo. Son más frecuentes las metástasis linfáti-

cas regionales que las metástasis a distancia. Parece que estos tumores poseen menor facilidad de diseminación metastásica y que predomina la agresividad local y la recidiva locorregional y peritoneal.

Punto clave 7

Los tumores de tipo intestinal bien diferenciados parecen seguir un patrón genético diferente que los tumores de tipo difuso y pobremente diferenciados. Se ha propuesto que la inestabilidad genética juega un papel crítico en el desarrollo de los tumores poco diferenciados, que frecuentemente se desarrollan sobre mucosa no metaplásica en poblaciones más jóvenes. Por el contrario, en los tumores de tipo intestinal parece tener un mayor peso el modelo genético supresor y la acumulación progresiva de mutaciones en protooncogenes y pérdida de función de genes supresores.

FACTORES DE CRECIMIENTO Y RECEPTORES DE MEMBRANA

Los factores de crecimiento son proteínas que participan en la regulación de las relaciones intercelulares y en las relaciones entre células y estroma. Funcionan como moduladores de la proliferación de forma autocrina (actuando sobre la misma célula que sintetiza la proteína) o paracrina (actuando sobre las inmediatamente vecinas)¹⁷. Los factores de crecimiento actúan sobre receptores de membrana específicos, con actividad tirosin quinasa. Éstos reciben la señal y la transmiten al interior de la célula, iniciando la cadena para la activación de la transcripción de ADN y la proliferación.

Punto clave 8

Los factores de crecimiento son proteínas que participan en la regulación de las relaciones intercelulares y en las relaciones entre células y estroma. Funcionan como moduladores de la proliferación de forma autocrina (actuando sobre la misma célula que sintetiza la proteína) o paracrina (actuando sobre las inmediatamente vecinas).

C-met se ha visto frecuentemente amplificado en carcinomas gástricos en carcinomas poco diferenciados y en los de tipo difuso¹³. Se ha indicado que existe una correlación significativa entre amplificación de c-met con estadio tumoral, invasión linfática y profundidad de la invasión tumoral en la pared gástrica. La sobreexpresión se asocia a estadios avanzados de la enfermedad, metástasis y menor supervivencia. Sin embargo, no se ha comprobado que este factor proporcione valor pronóstico.

Se posee más datos sobre factor NEU, también conocido como c-erbB-2. Se ha observado la amplificación de c-erbB-2 preferentemente en carcinomas gá-

tricos poco diferenciados¹⁸. En algunos estudios indican que este marcador se relaciona con la supervivencia. En un estudio con 260 tumores gástricos se encontró relación entre la expresión inmunohistoquímica de la proteína codificada (p185) y el tipo histológico, afectación ganglionar e invasión de serosa y se indicó que los tumores p185 positivos mostraron una menor supervivencia¹⁹. Otro estudio con 108 pacientes confirmó estos hallazgos²⁰. La supervivencia a los 10 años en tumores p185 positivos fue de 37%, significativamente inferior que 91% encontrada en tumores p185 negativos. Además, la expresión de p185 se comportó como un parámetro predictivo independiente.

También disponemos de varias publicaciones sobre el papel de EGF y TGF en el adenocarcinoma gástrico. Parece que la sobreexpresión de estos factores se correlaciona con el grado de malignidad biológica. EGF estimula, de forma autocrina, el crecimiento tumoral y la división celular²¹. Sin embargo, se necesitan más estudios para poder determinar el valor predictivo independiente en análisis multivariante.

REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR. GEN p53

Se han detectado mutaciones del gen p53 en casi todos los tumores. Parece que la incidencia y el tipo de mutación son diferentes en cada tipo de neoplasia. Debido a su función como «vigilante» de la aparición de daño genético y como promotor de la respuesta en las células dañadas (mediante reparación del ADN y supervivencia, o en caso contrario induciendo la muerte de la célula) a este gen se le ha llamado «guardián del genoma»²². Actúa como controlador del ciclo celular, iniciador de la apoptosis, preservador de la estabilidad genética y promotor de la diferenciación celular. Codifica una fosfoproteína de 53 kd (proteína p53) que actúa como factor de transcripción, regulador positivo o negativo de la expresión de diversos genes secundarios (tabla 3). La proteína

codificada por un gen p53 que ha sufrido una mutación posee una secuencia de aminoácidos diferente y es inactiva, ya que no se puede acoplar a la secuencia específica complementaria en el ADN. En caso de mutación del gen p53, la célula es incapaz de detener el ciclo celular. La ausencia del freno biológico permite mayor probabilidad de que el ADN dañado sea replicado, perpetuando y multiplicando los defectos genéticos^{23,24}.

Punto clave 9

El gen p53 actúa como controlador del ciclo celular, iniciador de la apoptosis, preservador de la estabilidad genética y promotor de la diferenciación celular. Cuando existe una mutación del gen p53, la célula es incapaz de detener el ciclo celular. La ausencia del freno biológico permite mayor probabilidad de que el ADN dañado sea replicado, perpetuando y multiplicando los defectos genéticos.

La proteína p53 codificada por el gen que ha sufrido una mutación posee una vida media prolongada y se acumula en las células neoplásicas, por lo que es fácilmente detectable mediante inmunohistoquímica. Esta técnica es sencilla, barata y es fácilmente utilizable en la práctica clínica. Las técnicas de estudio directo del gen, como la secuenciación de ADN o PCR son más laboriosas e impracticables, por el momento, en la rutina hospitalaria.

Se sabe que el 40% de los adenocarcinomas gástricos presentan sobreexpresión en el núcleo celular de la proteína p53^{24,26}. Estas alteraciones están involucradas en la evolución desde displasia severa a carcinoma, ya que la sobreexpresión de p53 se detecta en 20% de los casos de adenomas gástricos y en el 10% de los casos de metaplasia intestinal. También están involucradas en la progresión tumoral, pues se ha observado que en tumores gástricos, la presencia de mutación en el gen p53 o la sobreexpresión de la proteína codificada, se asocian a un mayor grado de invasión local, estadio más avanzado, presencia de afectación ganglionar y localización en tercio proximal de estómago²⁵⁻²⁸. Los carcinomas de tipo intestinal presentan con mayor frecuencia sobreexpresión de proteína p53 que los difusos. Así mismo, las neoplasias con elevado índice de proliferación y aneuploidia presentan de mayor frecuencia de positividad a p53. Por otra parte, en pacientes sometidos a una resección tumoral curativa, la frecuencia de recidiva es mayor en los casos con tumores p53 positivos y el intervalo libre de enfermedad es menor. También la supervivencia es menor²⁹⁻³³. Según algunas publicaciones el valor predictivo se mantiene en el análisis multivariante. Ello significa que la información predictiva proporcionada no es un simple reflejo de la masa tumoral, estadio o tipo histológico, sino que posee valor por sí misma.

TABLA 3 Algunos de los genes en cuya regulación intervienen el gen P53

| Genes activados | Genes inhibidos |
|--|--|
| p21 (regulado de ciclo celular) | Bcl-2 (inhibidor de apoptosis) |
| Ciclina G (proteína del ciclo celular) | c-myc (oncoproteína celular) |
| GADD45 (reparación de ADN) | FGF (Fibroblast Growth Factor) |
| MDM2 (regulador <i>feed-back</i> de p53) | IL-6 (promotor diferenciación celular) |
| Bax (inductor de apoptosis) | PCNA (síntesis de ADN) |
| | MDR-1 (transportador de membrana) |

Punto clave 10

Se sabe que el 40% de los adenocarcinomas gástricos presentan sobreexpresión en el núcleo celular de la proteína p53. En pacientes sometidos a una resección tumoral curativa, la frecuencia de recidiva es mayor entre los casos con tumores p53 positivos.

Existen datos para poder pensar que el conocimiento del estado funcional del gen p53 puede ser un indicativo para predecir la respuesta a la quimioterapia o radioterapia. Estudios básicos han mostrado que la inducción de apoptosis por los agentes utilizados habitualmente en el tratamiento del cáncer (quimioterapia o radiaciones ionizantes) es dependiente en gran medida de la función normal del gen p53. Las mutaciones en el gen provoca que las células sean resistentes a estos tratamientos. Se ha comunicado la asociación entre ausencia de sobreexpresión de p53 y radio-quimiosensibilidad²².

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR

Para que las células neoplásicas puedan invadir tejidos adyacentes, deben desprenderse del tumor primario. En el adenocarcinoma gástrico se observa frecuentemente alteración en la expresión de las moléculas de adhesión celular³⁴. Se trata de glucoproteínas localizadas en la superficie de las células, codificadas por genes supresores, participan en la formación del citoesqueleto y en el anclaje de la célula a E-cadherina y Beta-catenina de la matriz extracelular. La alteración afecta, entre otros, a los genes APC y DDC. Las proteínas codificadas por estos genes se detectan en la mucosa gástrica normal, pero su expresión disminuye o está anulada en los carcinomas. Parece probable que la alteración del reconocimiento de señales extracelulares, tanto de la interacción célula-célula como célula-matriz intercelular, que se produce por la disfunción de estos genes puede llevar a la pérdida del control de crecimiento normal y puede ser, en parte, responsable de algunas de las características de las neoplasias (invasión, movilidad y metástasis). Se observa pérdida de función de los genes APC y DDC en el 60% de los carcinomas bien diferenciados y excepcionalmente en los de tipo difuso. Además, su funcionamiento también está alterado en 25% de los adenomas gástricos y 10% de pólipos gástricos hipertróficos. Por contra, en los carcinomas indiferenciados y en los de tipo difuso se detecta disminución de la expresión de cadherina y cateninas^{12,35-37}. Sin embargo, todavía no ha sido suficientemente analizado si este hallazgo posee significación predictiva. Algunos autores asocian la reducción de moléculas de adhesión con un pobre curso evolutivo.

Punto clave 11

Para que las células neoplásicas puedan invadir tejidos adyacentes, deben desprenderse del tumor primario. En el adenocarcinoma gástrico se observa frecuentemente alteración en la expresión de las moléculas de adhesión celular. Se trata de glucoproteínas localizadas en la superficie de las células, codificadas por genes supresores, participan en la formación del citoesqueleto y en el anclaje de la célula a la matriz extracelular.

En el adenocarcinoma gástrico también se observa alteración en la expresión de la proteína CD44¹⁴. Ésta es una familia de moléculas involucradas en la adhesión intercelular y con la matriz extracelular. En el cáncer gástrico hay una sobreexpresión de isoformas alteradas de CD44. Parece que este hecho es importante para que una neoplasia adquiera la propiedad de infiltrar. Los niveles elevados de CD44 facilitan la migración de las células tumorales e incrementan la adherencia a la sustancia extracelular.

MARCADORES DE PROLIFERACIÓN

El índice de proliferación celular tumoral ha sido extensamente empleado como indicador biológico. Se trata de cuantificar la proporción de células tumorales que se encuentran en fase de división. Cuanto mayor sea la proporción de células que proliferan, mayor será la agresividad del tumor. Se han utilizado métodos directos (cuantificación de células en mitosis) y marcadores indirectos. Estos últimos utilizan anticuerpos que reconocen proteínas nucleares involucradas o alteradas durante el ciclo celular. Uno de los más estudiados es el PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). Esta proteína se sintetiza en la fase G1 del ciclo celular y se acumula en la fase S. Se trata de una proteína accesoria de la ADN polimerasa, que forma complejo con la ciclina D y la Quinasa de ciclina. Ki-67 es otro anticuerpo que detecta un antígeno que aparece durante todo el ciclo celular excepto en la fase G0. Ambos se determinan por inmunohistoquímica. Se han publicado varios estudios, aunque no hay acuerdo unánime, parece que los carcinomas gástricos con elevada reactividad PCNA en el margen tumoral invasivo muestran un comportamiento más agresivo. Existe una fuerte correlación entre aumento de la expresión inmunohistoquímica y menor grado de diferenciación, presencia de metástasis ganglionar, presencia de invasión vascular y de metástasis hepáticas³⁶⁻³⁸.

ANGIOGÉNESIS/METÁSTASIS/INVASIÓN

VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) y PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) son glicoproteínas que promueven la angiogénesis. VEGF y PDGF regulan

la diferenciación, multiplicación y quimiotaxis de las células endoteliales, así como la maduración y reestructuración de los neovasos. Un tumor es una estructura tisular compleja, compuesta por células neoplásicas sustentadas por una matriz extracelular, en la que la estructura vascular es una parte esencial. Para mantener su crecimiento, el tumor debe conseguir un aporte suficiente de nutrientes. Para ello precisa la formación de neovasos. La angiogénesis es un complejo proceso que implica degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular por enzimas proteolíticas, proliferación de células endoteliales, migración de las células endoteliales y formación de cordones celulares vasculares. El interés en estudiar la angiogénesis se ha visto alentado ante la posibilidad de utilizar terapia antiangiogénica para combatir la progresión tumoral⁶⁻⁸.

La angiogénesis se encuentra regulada por factores activadores e inhibidores, entre los cuales existe un equilibrio. La activación de las células endoteliales en la angiogénesis tumoral procede de factores promotores elaborados por el propio tumor (autocrino), pero también por las células del estroma tumoral reclutados por las células tumorales, así como de factores angiogénicos secuestrados en la matriz extracelular (paracrino). En varios estudios se ha analizado la expresión inmunohistoquímica de VEGF en el cáncer gástrico³⁹⁻⁴¹. Se ha visto que la sobreexpresión de VEGF se asocia con estadio tumoral avanzado, con disminución de la supervivencia y menor intervalo libre de recidiva. También se ha estudiado la concentración de VEGF en sangre mediante ELISA. Los casos con elevada concentración de VEGF muestran un peor curso evolutivo.

Punto clave 12

Para mantener su crecimiento, el tumor debe conseguir un aporte suficiente de nutrientes. Para ello precisa la formación de neovasos. La angiogénesis es un complejo proceso que implica degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular por enzimas proteolíticas, proliferación, migración de las células endoteliales y formación de cordones celulares vasculares. El interés en estudiar la angiogénesis se ha visto alentado ante la posibilidad de utilizar terapia antiangiogénica para combatir la progresión tumoral.

ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Las enzimas proteolíticas desarrollan un papel decisivo para que las células tumorales adquieran capacidad de infiltrar los tejidos vecinos. La membrana basal está compuesta por glucoproteínas y proteoglicanos y descansa sobre la matriz extracelular, que es un enrejado de fibras de colágeno y elastina embebidas también en proteoglicanos y glucoproteínas. La

degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular es posible gracias a una serie de enzimas proteolíticas que son secretadas al medio extracelular en forma de proenzimas, tanto por las células tumorales, como por las células del tejido conectivo. Hasta el momento se han identificado varias familias de proteasas, que se clasifican según sus componentes y el sustrato sobre el que actúan: Serín proteasas (activadores del plasminógeno-[uPA] o activador del plasminógeno de la urocinasa y tPA o activador tisular del plasminógeno), cisteinil proteasas (catepsinas B,L,O), aspartil proteasas (catepsina D, pepsinógeno C, PSA), metaloproteasas (MMP). En condiciones normales hay un equilibrio entre factores activadores e inhibidores. Este equilibrio se rompe para desarrollar los procesos fisiológicos de remodelación tisular, cicatrización, angiogénesis, reabsorción ósea. En el tejido tumoral la expresión de la mayoría de estas enzimas está alterada. Parece que alguno de estos sistemas de proteasas está sobreexpresado en los tumores gástricos y que los tumores con elevada actividad proteolítica poseen mayor capacidad invasiva. Esto se ha observado especialmente con el Activador del Plasminógeno de la Urocinasa. Su expresión inmunohistoquímica se ha asociado con recidiva y menor supervivencia. Sin embargo, la sobreexpresión de enzimas no siempre implica un pronóstico adverso, ya que factores como el activador tisular del plasminógeno (tPA), el antígeno prostático específico o el pepsinógeno C, se han asociado con una evolución más favorable. El efecto final de la actuación de las enzimas proteolíticas dependerá en gran medida del balance con sus inhibidores naturales, producidos por las células tumorales para coordinar su acción invasiva, o bien por las propias células estromales como mecanismo de defensa ante la progresión tumoral. Existen datos recientes que indican que la utilización de inhibidores sintéticos de las enzimas proteolíticas puede ser una nueva y prometedora alternativa terapéutica en estos tumores⁴²⁻⁴⁶.

Punto clave 13

Las enzimas proteolíticas desarrollan un papel decisivo para que las células tumorales adquieran capacidad de infiltrar los tejidos vecinos. La degradación tanto de la membrana basal como de la matriz extracelular, es posible gracias a una serie de enzimas proteolíticas que son secretadas al medio extracelular en forma de proenzimas, tanto por las células tumorales, como por las células del tejido conectivo.

ENFERMEDAD TUMORAL RESIDUAL MÍNIMA

Se ha propuesto una nueva variable biológica, denominada enfermedad tumoral residual mínima. Fue descrita inicialmente en neoplasias hematológicas,

pero puede ser también aplicada en tumores sólidos. Se trata de la detección de células tumorales aisladas o material celular en el examen de material orgánico obtenido de zonas anatómicas alejadas del tumor primario: médula ósea, líquido de lavado peritoneal o ganglios linfáticos⁴⁷. Incluso en estadios iniciales de la enfermedad neoplásica es posible detectar en esas localizaciones, mediante microscopía óptica, tinción inmunohistoquímica para citoqueratina CK-18 o CEA, o PCR, material procedente de células tumorales. No se conoce con precisión el significado biológico de este hallazgo. Es preciso señalar que la simple presencia de células o restos celulares no implica necesariamente que se trate de células viables; aunque así lo fueran, tampoco implica la progresión futura a metástasis. El anclaje de un grupo celular desprendido del tumor primario y posterior desarrollo como foco de metástasis no es un proceso simple, sino que se precisa de unos mecanismos moleculares e inmunológicos complejos. Hipotéticamente pudiera ser que esa diseminación microscópica fuera el origen de una recurrencia, meses o años después de una aparente resección curativa. En varias publicaciones se ha indicado que la detección en el momento de la operación de células diseminadas se asocia significativamente a una mala evolución clínica⁴⁷. En un estudio se detectó la presencia de enfermedad tumoral residual mínima en la médula ósea antes de la cirugía en 109 de 217 pacientes a los que se resecó un cáncer gástrico⁴⁸. En otro estudio se detectaron células diseminadas en médula ósea y en lavado peritoneal en 25 de 48 pacientes⁴⁹. Aunque, sin embargo, no se comportó como parámetro pronóstico independiente.

Punto clave 14

Incluso en estadios iniciales de la enfermedad neoplásica es posible detectar, en localizaciones alejadas del tumor primario, material procedente de células tumorales. No se conoce con precisión el significado biológico de este hallazgo. El anclaje de un grupo celular desprendido del tumor y su posterior desarrollo como foco de metástasis no es un proceso simple, sino que se precisa unos mecanismos moleculares e inmunológicos complejos.

En un estudio se tomaron aspiraciones de médula ósea secuencialmente durante el seguimiento postoperatorio de 78 pacientes. El resultado se correlacionó significativamente con el curso clínico evolutivo, de tal forma que el 90% de los pacientes que recidivaron mostraron incremento o persistencia de las células en la médula ósea, mientras que en los pacientes que no recidivaron se observó reducción o eliminación del número de células⁴⁹. También se ha intentado caracterizar el potencial tumoral agresivo de esos grupos celulares detectados en la médula ósea mediante

tinción inmunohistoquímica frente a los antígenos del sistema de proteasas uPA^{50,51}. Los casos en los que se detectó presencia de células con reactividad frente a esos antígenos mostraron un peor curso evolutivo.

CUANTIFICACIÓN DE ADN POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una técnica que permite analizar, con alta precisión y de forma rápida, estructuras celulares, partículas o antígenos marcados. La aplicación que ha conseguido mayor difusión en la clínica ha sido para la cuantificación del contenido de ADN (ploidia) y en la identificación y estudio de las distintas fases del ciclo de división celular^{52,53}. En condiciones normales más del 90% de las células se encuentran en fase de reposo, no replican activamente su ADN y tienen un contenido diploide ($2n$) (Fase G_0/G_1). Las células que replican el ADN se encuentran en fase de síntesis (fase S) y tienen un contenido de ADN superior ($2n$ o $4n$). Tras la replicación del ADN (fase G_2) y antes de la mitosis, las células tienen el ADN duplicado ($4n$). La citometría de flujo cuenta el número de células en cada fase del ciclo celular y cuantifica su ADN (fig. 1).

Para la realización de este tipo de estudios, se obtiene una suspensión celular mediante la dispersión mecánica y homogenización de un fragmento del tumor. Se tiñe el ADN con un colorante fluorescente y se elimina el resto de los componentes celulares mediante detergentes celulares y proteasas. A continuación, se hacen pasar los núcleos ante un rayo láser que excita al colorante a una determinada longitud de onda. La señal emitida es proporcional a la cantidad de ADN.

Evaluación del grado de ploidia

El grado de ploidia se obtiene a partir de la relación entre ADN estudiado y ADN normal de referencia (índice de ADN). La aneuploidia es un estado de

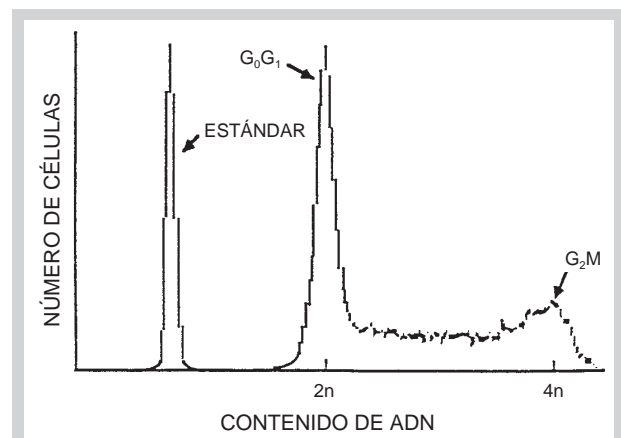


FIGURA 1 Histograma de una muestra tumoral con ADN euploide.

anormalidad en el que el contenido celular total de ADN difiere del propio de la especie del individuo. Habitualmente todos los tumores son heterogéneos y pueden reunir a clones diferentes. El contenido de alguna de estas líneas celulares puede ser aneuploide. El citómetro nos proporciona una representación gráfica de la distribución de las células de un tejido según su cantidad de ADN y fase del ciclo celular en que se encuentran. La presencia de una línea celular aneuploide se caracteriza por la existencia de un segundo pico G0/G1, independiente de pico G0/G1 diploide y conteniendo al menos 10% de las células contadas y que muestra su correspondiente pico G2/M (fig. 2). A esta situación se llega mediante la pérdida o adición de un número variable de cromosomas o fragmentos cromosómicos.

Punto clave 15

El grado de ploidía se obtiene a partir de la relación entre ADN estudiado y ADN normal de referencia (índice de ADN). La aneuploidía es un estado de anormalidad en el que el contenido celular total de ADN difiere del propio de la especie del individuo. La aneuploidía es una característica frecuente en todo tipo de tumores. Sin embargo, hay que tener presente que la euploidía no implica una estructura cromosómica y un funcionamiento genético normal. El grado de ploidía es un dato global, indicativo de la cantidad de ADN presente, que no informa sobre la situación específica de ningún gen.

La aneuploidía es una característica frecuente en todo tipo de tumores. Sin embargo, hay que tener presente que la euploidía no implica una estructura cromosómica y un funcionamiento genético normal. El grado de ploidía es un dato global, indicativo de la cantidad de ADN presente, que no informa sobre la situación específica de ningún gen. De hecho, la pérdida de un fragmento o alelo puede estar compensada por traslocaciones, de tal forma que el contenido total sea normal. Las mutaciones pueden producir cambios profundos en el ADN, pero puede no haber un cambio en el contenido total de ADN. Si existe gran relación entre la existencia de amplificación o aumento del número de copias de un gen con la presencia de aneuploidía.

Por otra parte, la comprobación de que una muestra tisular posee un contenido aneuploide de ADN no posee valor diagnóstico. El estado diploide no debe considerarse como signo de benignidad, ni la aneuploidía como malignidad. Hay tumores exactamente diploides altamente agresivos. La ploidía se debe interpretar como un epifenómeno de las alteraciones genéticas tumorales. Por otra parte, la aneuploidía es frecuente en lesiones premalignas. El 10-30% de las lesiones premalignas del aparato digestivo (esófago de Barret, pólipos adenomatosos). La incidencia aumen-

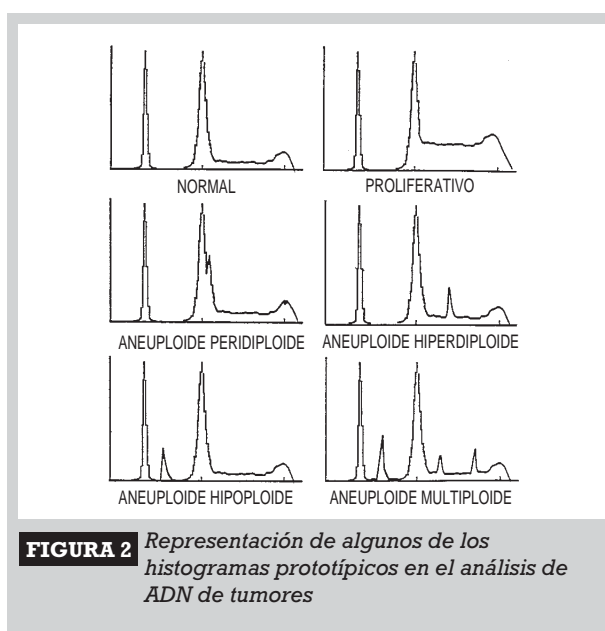


FIGURA 2 Representación de algunos de los histogramas prototípicos en el análisis de ADN de tumores

ta en relación directa con el grado de displasia y es un signo inicial de transformación cancerosa. Parece existir el acuerdo de que la detección de aneuploidía en una lesión precancerosa es un signo que debe apoyar la extirpación quirúrgica de dicha lesión^{37,54,55}.

El 40% de los adenocarcinomas gástricos presentan clones celulares aneuploides. En estos casos la presencia de aneuploidía se ha relacionado con la localización tumoral (los tumores de cardias son más frecuentemente aneuploides que los de antro y cuerpo gástrico) (39% frente a 20%). La invasión ganglionar linfática es más frecuente en tumores aneuploides que en diploides (91% frente a 65%). La presencia de metástasis a distancia es más frecuente en tumores aneuploides (37% frente a 19%). Además la presencia de aneuploidía posee valor pronóstico. Los tumores con clones celulares aneuploides se comportan de forma más agresiva. Esta condición se asocia a una menor supervivencia postoperatoria tras la resección quirúrgica^{37,54,55}.

Punto clave 16

El 40% de los adenocarcinomas gástricos presentan clones celulares aneuploides. Los tumores aneuploides se comportan de forma más agresiva, ya que esta condición se asocia a una menor supervivencia postoperatoria tras la resección quirúrgica.

Evaluación de la proporción de células en fase S

La citometría de flujo también se ha utilizado para analizar la actividad proliferativa de un tumor. La fase S del ciclo celular incluye a las células contenidas entre los picos G0/G1 y G2 del espectro proporcion-

do por el citómetro. Su determinación proporciona una medida del compartimiento celular en fase de proliferación. Muestra el tanto por ciento de células, sobre la población total, que replican activamente el ADN. Se trata de un parámetro independiente de la ploidia, pero que se obtiene simultáneamente a partir de la misma muestra biológica. En el adenocarcinoma gástrico la fracción S incluye habitualmente el 13% de las células. Los valores más elevados se detectan en tumores pobremente diferenciados. La presencia de más de un 10% de células en fase S tiene valor pronóstico pues se asocia a menor supervivencia^{37,54,55}.

ANTÍGENOS TUMORALES

CA 72.4

Se trata de un marcador basado en la determinación de una glicoproteína tipo mucina, de elevado peso molecular, TAG-72, mediante la combinación de dos anticuerpos monoclonales (CC49 y B72.3). Este antígeno se expresa en la mayoría de los adenocarcinomas en humanos y ciertos tejidos fetales, pero no en el tejido adulto normal.

El campo de aplicación principal de CA 72.4 es el adenocarcinoma gástrico. Aquí CA 72.4 ofrece significativamente mejores resultados que CEA o CA19.9. Suele ser determinado conjuntamente conjunta con dichos marcadores, ya que se ha observado que la combinación mejora el rendimiento clínico. Se detectan concentraciones de CA72.4 en suero superiores al valor normal (6 U/ml) en el 30-40% de los casos. La frecuencia con la que se detectan niveles elevados es significativamente mayor en estadios tumorales avanzados, de tal modo que existe relación directa entre nivel de marcador y estadio tumoral. Se detecta mayor frecuencia de positividad del test en casos con invasión tumoral en la pared gástrica, con la presencia de invasión linfática, presencia de metástasis peritoneal y metástasis hepática.

Además, la presencia de niveles elevados de CA 72.4 se asocia con el desarrollo de un curso evolutivo negativo en pacientes sometidos a una resección tumoral curativa. La frecuencia de recidiva es mayor y el intervalo libre de enfermedad es menor. Además, se comporta como un factor pronóstico, asociado a mayor riesgo de recidiva. Algunos estudios afirman que el valor predictivo se mantiene en el análisis multivariante, independiente del estadio tumoral. La elevación de CA 72.4 durante el seguimiento es un índice de recidiva. En el 80% de los pacientes que desarrollan recidiva tras la cirugía presentan niveles elevados del marcador⁵⁷⁻⁶¹.

ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNARIO

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es un producto normal de las células de las mucosas, fundamentalmente bronquial e intestinal. Es una glicopro-

teína que pertenece a la familia de las moléculas de adhesión. Participa en el reconocimiento intercelular y en el anclaje de la célula. La alteración de su regulación que se produce en las células tumorales, facilita la diseminación y metastatización. Se ha comprobado que las células que expresan CEA se agregan y que se facilita la diseminación metastásica al fijarse las células a receptores vasculares específicos. A pasar del grado de conocimiento actual sobre la biología molecular y el gran número de potenciales marcadores biológicos que se han descrito, CEA sigue siendo el marcador tumoral sérico «patrón» en neoplasias gastrointestinales.

Punto clave 17

A pasar del grado de conocimiento actual sobre la biología molecular y el gran número de marcadores biológicos que se han descrito, CEA sigue siendo el marcador tumoral sérico «patrón» en neoplasias gastrointestinales. La utilidad de CEA deriva de que su concentración sérica refleja la masa tumoral residual.

Su baja sensibilidad y especificidad no permiten recomendarlo como test de *screening*, ni como prueba de diagnóstico. El valor normal habitualmente utilizado como nivel de normalidad es 5 ng/ml. En 30-50% de los pacientes con tumores gástricos se detectan niveles preoperatoriamente elevados. Hay una gran correlación entre el nivel sérico y el estadio tumoral. CEA está elevado en el 7% de los pacientes en estadio I, 23% de II, 35% de III y 48% de IV. También, la frecuencia de alteración de CEA es mayor en tumores bien diferenciados, aunque hasta el 30% de los tumores poco diferenciados presentan CEA elevado⁵⁷⁻⁶¹.

La elevación de CEA antes de la intervención quirúrgica inicial se asocia con mayor frecuencia de recidivas y mayor mortalidad. Un valor preoperatorio elevado es un dato indicativo de la existencia de un riesgo mayor de recidiva. Parece existir acuerdo en que su valor como factor pronóstico desaparece en los análisis multivariantes, cuando se tiene en cuenta el peso predictivo del estadio tumoral^{37,55,56}.

La determinación de CEA en suero forma parte de los programas habituales de seguimiento en el cáncer gástrico para la detección de recidivas tumorales. Los dos factores principales que determinan la sensibilidad de CEA para la detección de recidivas son la localización de esta y el nivel preoperatorio de marcador. La mitad de los pacientes intervenidos con intención curativa fallecen por desarrollar metástasis. En cáncer gástrico se detectan metástasis hepáticas en el 40% de los casos y peritoneales en el 80%. La sensibilidad global de CEA para la detección de recidivas es de 70%. El rango varía ampliamente de acuerdo con los dos factores mencionados. Así se si-

túa en 60% entre los pacientes que tienen nivel preoperatorio bajo y 95% entre aquellos que lo presentan elevado. La sensibilidad también varía según la localización de la recidiva: 80-100% en caso de metástasis hepática y 20% en caso de recidiva locorregional. La utilidad principal de CEA en el seguimiento postoperatorio es la detección de metástasis hepáticas. Pero existe un elevado número de falsos positivos de 30% (rango 10-70%), debido a errores puntuales de la técnica y también se eleva en enfermedades benignas (broncopatías crónicas, hepatopatías, nefropatías, enfermedad intestinal inflamatoria) y otros tumores (mama, pulmón, páncreas, tiroides, riñón, hígado). El CEA sérico se eleva también en pacientes tratados con quimioterapia adyuvante postoperatoria.

CONCLUSIÓN

El mecanismo biomolecular sobre el que se desarrollan los tumores gástricos todavía no es bien conocido. La aparición y el desarrollo de un tumor son procesos complejos y multifactoriales; además, las características biológicas, genéticas y clínicas de estos tumores son heterogéneos, lo que dificulta la identificación de una posible relación entre marcadores biológicos y comportamiento tumoral. Los datos publicados no han identificado con claridad una utilidad clínica predictiva. El estadio tumoral es el principal factor pronóstico en pacientes con cáncer gástrico y debe continuar siéndolo en el futuro.

Pero probablemente un análisis conjunto de factores genéticos, enzimáticos y angiogénicos podría ayudar a la creación de un perfil biológico pronóstico. Por otra parte, los dos subtipos descritos en la clasificación histológica de Lauren, intestinal y difuso, presentan rasgos clínicos y biológicos particulares. Los datos publicados indican que la frecuencia de alteraciones de la mayoría de los marcadores biológicos es diferente en los tumores de tipo intestinal que en los de tipo difuso. Parece que existe un soporte genético que sustenta esas diferencias.

BIBLIOGRAFÍA

- López-Abente G, Pollán M, Ruiz M. El cáncer, un problema de salud prioritario. *Boletín Epidemiológico Semanal*. 1995;3:81-4.
- Berrino F, Sant M, Verdecchia A, Capocaccia R, Hakulinen T, Esteve J. Survival of cancer patients in Europe: The EURO CARE Study. IARC Scientific Publications n.º 132. Lyon, 1995.
- Hermans J, Bonenkamp JJ, Boon MC, Bunt AMG, Ohyama S, Sasako M, et al. Adjuvant therapy after curative resection for gastric cancer: meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol* 1993;11:1441-7.
- Siewert JR, Böttcher K, Roder JD, Busch R, Hermanek P, Meyer HJ. Prognostic relevance of systematic lymph node dissection in gastric carcinoma. *Br J Surg* 1993; 80:1015-8.
- Siewert JR, Böttcher K, Stein H, Roder J. Relevant Prognostic Factors in Gastric Cancer. Ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Ann Surg* 1998; 228:449-61.
- Haugstvedt TK, Visto A, Eide GE, Soreide O. Norwegian Stomach Cancer Trial. Norwegian multicenter study of survival and prognostic factors in patients undergoing curative resection for gastric carcinoma. *Br J Surg* 1993;80:475-80.
- Tahara E. Molecular biology of gastric cancer. *World J Surg* 1995;19:484-90.
- Allgayer H, Heiss MM, Schildberg FW. Prognostic factors in gastric cancer. *Br J Surg* 1997;84:1651-64.
- Uchino S, Noguchi M, Ochiai A, Saito T, Kobayashi M, Hirohashi S. P53 mutation in gastric cancer: a genetic model for carcinogenesis is common to gastric and colorectal cancer. *Int J Cancer* 1993;54:759-64.
- Manzoni G, Tomezzoli A, Di Leo A, Moore PS, Talamini G, Scarpa A. Clinical significance of mutator phenotype and chromosome 17p and 18q allelic loss in gastric cancer. *Br J Surg* 2001;88:419-25.
- Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE, Belli J, Stemmermann GN. Pathologic and phenotypic features of gastric cancer. *Semin Oncol* 1996;23:292-306.
- Nakatsuru S, Yanagisawa A, Ichii S, Tahara E, Kato Y, Nakamura Y, et al. Somatic mutation of the APC gene in gastric cancer: frequent mutations in very well differentiated adenocarcinoma and signet-ring cell carcinoma. *Human Molecular Genetics* 1992;1:559-63.
- Kuniyasu H, Yasui W, Yokozaki H, Kitadai Y, Tahara E. Aberrant expression of c-met mRNA in human gastric carcinomas. *Int J Cancer* 1993;55:72-5.
- Washington K, Gottfried MR, Telen MJ. Expression of the cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinomas. *Hum Pathol* 1995;25:1043-49.
- Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y, Park JG, Nakamura Y. Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res* 1993; 53:5087-9.
- Artunedo P, Moreno M, Alonso A, Fernandez-Peralta A, Gonzalez J. Prognostic significance of high microsatellite instability in a series of gastric adenocarcinomas. *Anticancer Res* 2000;20(5C):4009-15.
- Tahara E. Growth factors and oncogenes in human gastrointestinal carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 1990;116:121-31.
- Jaehne J, Cordon-Cardo C, Albino A, Meyer H, Pichlmayr R. Pathogenic and prognostic relevance of Her2/neu in gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 1994; 20:362-7.
- Yonemura Y, Ninomiya I, Yamaguchi A, et al. Evaluation of immunoreactivity for c-erbB-2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. *Cancer Res* 1991;51:1034-8.
- Uchino S, Tsuda H, Muruyama K, et al. Overexpression of c-erbB-2 protein in gastric cancer. Its correlation with long-term survival of patients. *Cancer* 1993;72: 3179-84.
- Tokunaga A, Onda M, Okuda T. Clinical significance of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor, and c-erbB-2 in human gastric cancer. *Cancer* 1995; 75(6 Suppl):1418-25.

22. Velculescu V, El-Deiry W. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin Chem* 1996;42:858-68.
23. Gomyo Y, Ikeda M, Osaki M, Tatebe S, Tsujitani S, Ikeguchi M, Kaibara N, et al. Expression of p21 (waf1/cip1/sdi1), but not p53 protein, is a factor in the survival of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* 1997;79:2067-72.
24. Noda H, Maehara Y, Irie K, Kakeji Y, Yonemura T, Sugimachi K. Growth pattern and expression of cell regulator proteins p53 and p21 WAF/CIP1 in early gastric cancer. *Cancer* 2001;92:1828-35.
25. Brito MJ, Williams GT, Thompson H, Filipe MI. Expression of p53 in early (t1) gastric carcinoma and precancerous adjacent mucosa. *Gut* 1994;1697-700.
26. Fukunaga M, Monden T, Nakanishi H, Ohue M, Fukuda K, Tomita N, et al. Immunohistochemical study of p53 in gastric carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1994;101:177-80.
27. Gabbert HE, Müller W, Schneiders A, Meier S, Hommel G. The relationship of p53 expression to the prognosis of 418 patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1995;76:720-6.
28. Kajeki Y, Korenaga D, Tsujitani S, Baba H, Anai H, Maehara Y, et al. Gastric cancer with p53 overexpression has high potential for metastasising to lymph nodes. *Br J Cancer* 1993;67:589-93.
29. Yonemura Y, Fushida S, Tsugawa K, Ninomiya I, Fonseca L, Yamaguchi A. Correlation of p53 expression and proliferative activity in gastric cancer. *Anal Cell Pathol* 1993;5:277-88.
30. Joypaul BV, Hopwood D, Newman EL, Qureshi S, Grant A, Ogston SA, et al. The prognostic significance of the accumulation of p53 tumour-suppressor gene protein in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1994;69:943-6.
31. Martin HM, Filipe MI, Morris R, Lane DP, Silvestre F. P53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1992;50:859-62.
32. Victorzon M, Nordling S, Haglund C, Lundin J, Roberts PJ. Expression of p53 protein as a prognostic factor in patients with advanced gastric cancer. *Eur J Cancer* 1996;32A:215-20.
33. Starzynska T, Markiewski M, Domagala W, Marlics K, Mietkiewski J, Roberts SA, et al. The clinical significance of p53 accumulation in gastric carcinoma. *Cancer* 1996;77:2005-12.
34. Peifer M. Cancer, catenins, and cuticle pattern: a complex connection. *Science* 1993;262:1667-8.
35. Gröttinger C, Kneifel J, Patschan D, Schnoy N, Anagnostopoulos I, Faiss S, et al. LI-cadherin: a marker of gastric metaplasia and neoplasia. *Gut* 2001;49:73-81.
36. Amadori D, Maltoni M, Volpi A, Nanni O, Scarpi E, Renault B, et al. Gene amplification and proliferative kinetics in relation to prognosis of patients with gastric cancer. *Cancer* 1997;79:226-32.
37. Russo A, Bazan V, Miglivacca M, Tubiolo C, Macaluso M, Zanna I, et al. DNA aneuploidy and high proliferative activity but not k-ras-2 mutations as independent predictors of clinical outcome in operable gastric carcinoma. *Cancer* 2001;92:294-302.
38. Schwartz GK, Wang H, Lampen N, Altotorki N, Kelsen D, Albino A. Defining the invasive phenotype of proximal gastric cancer cells. *Cancer* 1994;73:22-7.
39. Tomoda M, Maehara Y, Kakeji Y, Ohno S, Ichiyoshi Y, Sugimachi K. Intratumoral neovascularization and growth pattern in early gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 85:2340-6.
40. Nekkarda H, Schmitt M, Ulm K, et al. Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res* 1994;54:2900-7.
41. Hollas W, Blasi F, Boyd D. Role of the urokinase receptor in facilitating extracellular matrix invasion by cultured colon cancer. *Cancer Res* 1991;3690-5.
42. Heiss MM, Babic R, Allgayer H, et al. The prognostic impact of the urokinase-type plasminogen activator system is associated with tumor differentiation in gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 1996;22:74-7.
43. Heiss M, Babic R, Allgayer H, et al. Tumor-associated proteolysis and prognosis: new functional risk factors in gastric cancer defined by the urokinase-type plasminogen activator system. *J Clin Oncol* 1995;13: 2084-93.
44. Ikeguchi M, Fukuda K, Oka S, Yamaguchi K, Hisamitsu K, Tsujitani T, et al. Clinicopathological significance of cathepsin D expression in gastric adenocarcinoma. *Oncology* 2001;61:71-8.
45. Yonemura Y, Fushida S, Bando E, Kinoshita K, Miwa K, Endo Y, et al. Lymphangiogenesis and the vascular endothelial growth factor (VEGFR)-3 in gastric cancer. *Eur J Cancer* 2001;37:918-23.
46. Yamamoto S, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Haruma K, Kakiyama E. Expression of vascular endothelial growth factor in human gastric carcinomas. *Pathol Int* 1998;48:499-506.
47. Kienle P, Koch M. Minimal Residual Disease in Gastrointestinal Cancer. *Semin Sur Oncol* 2001;20:282-93.
48. Jauch KW, Heiss MM, Grütznert U, et al. The prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. *J Clin Oncol* 1996;14: 1810-7.
49. Juhl H, Stritzel M, Wroblewski A, et al. Immunocytological detection of micrometastatic cells: comparative evaluation of findings in the peritoneal cavity and the bone marrow of gastric, colorectal and pancreatic cancer patients. *Int J Cancer* 1994;57:330-5.
50. Allgayer H, Heiss M, Riesenberger R, et al. Urokinase plasminogen activator receptor (uPA-R). One potential characteristics of metastatic phenotypes in minimal residual tumor disease. *Cancer Res.* 1997;57:1394-9.
51. Kaneko K, Yano M, Yamano T, Tsujinaka T, Miki H, Akiyama Y, et al. Detection of peritoneal micrometastases of gastric carcinoma by fluorescent protein and carcinoembryonic antigen promoter. *Cancer Res* 2001; 61:5570-4.
52. Rew DA. Significance of aneuploidy. *Br J Surg* 1994; 81:1416-22.
53. Ellis CN, Burnette J, Sedlak R, Dyas C, Blakemore W. Prognostic applications of DNA analysis in solid malignant lesions in humans. *Surg Gynecol Obstet* 1991; 173:329-42.
54. Johnson H, Belluco C, Masood S, Abou-Azama A, Kahn L, Wise L. The value of flow cytometric analysis in patients with gastric cancer. *Arch Surg* 1993;128:314-7.
55. Lee K, Shin J, Suh C, et al. DNA flow cytometry of stomach cancer. Prospective correlation with clinicopathologic findings. *Cancer* 1993;72:1819-26.
56. Nakane Y, Okamura S, Akehira K, Boku T, Okusa T, Tanaka K, et al. Correlation of preoperative carcinoembryonic antigen levels and prognosis of gastric can-

- cer patients. *Cancer* 1994;73:2703-8.
57. Reiter W, Stiber P, Reuter C, Nagel D, Cramer C, Pahl H, et al. Prognostic value of preoperative serum levels of CEA, CA 19.9 and CA 72.4 in gastric carcinoma. *Anticancer Res* 1997;17:2903-6.
 58. Marrelli D, Roviello F, De Stefano A, Farnetani M, Garosi L, Messano A, et al. Prognostic significance of CEA, CA 19.9 and CA 72.4 preoperative serum levels in gastric carcinoma. *Oncology* 1999;57:55-62.
 59. Ikeguchi M, Katano K, Saitou H, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N. Preoperative serum levels of CA 72.4 in patients with gastric adenocarcinoma. *Hepatogastroenterology* 1997;44:866-71.
 60. Gaspar MJ, Arribas I, Coca MC, Díez M. Prognostic value of CEA, CA19.9 and CA72.4 in gastric carcinoma. *Tumor Biology* 2001;22:318-22.
 61. Kodama I, Koufuji K, Kawata S, Tetsu S, Tsuji Y, Takeda J, et al. The clinical efficacy of CA 72.4 as serum marker for gastric cancer in comparison with CA 19.9 and CEA. *Int Surg* 1995;80:45-8.