

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Caracterización molecular del cáncer gástrico HER2 positivo
y su aplicabilidad práctica para el tratamiento personalizado
del cáncer gástrico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Asunción Díaz Serrano

Directores

Carlos Jesús Gómez Martín
Luis Gonzaga Paz-Ares Rodríguez

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER GÁSTRICO
HER2 POSITIVO Y SU APLICABILIDAD PRÁCTICA PARA EL
TRATAMIENTO PERSONALIZADO DEL CÁNCER GÁSTRICO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

ASUNCIÓN DÍAZ SERRANO

Directores:

Dr. D. Carlos Jesús Gómez Martín

Dr. D. Luis Gonzaga Paz-Ares Rodríguez

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER GÁSTRICO
HER2 POSITIVO Y SU APLICABILIDAD PRÁCTICA PARA EL
TRATAMIENTO PERSONALIZADO DEL CÁNCER GÁSTRICO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

ASUNCIÓN DÍAZ SERRANO

Madrid, 2016





D. CARLOS JESÚS GÓMEZ MARTÍN, Doctor en Medicina por la Universidad Autónoma de Madrid y Profesor Contratado Doctor en la Universidad CEU San Pablo

D. LUIS GONZAGA PAZ-ARES RODRÍGUEZ, Doctor en Medicina por la Universidad Autónoma de Madrid, Jefe del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario 12 de Octubre y Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN

Que **D.^a ASUNCIÓN DÍAZ SERRANO** ha desarrollado bajo su dirección el proyecto de Tesis Doctoral titulado “Caracterización molecular del cáncer gástrico HER2 positivo y su aplicabilidad práctica para el tratamiento personalizado del cáncer gástrico” en el Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, que presenta a superior juicio del Tribunal que designe la Universidad Complutense de Madrid para optar al Grado de Doctor en Medicina.


VºBº del Director
D. Carlos Jesús Gómez Martín


VºBº del Director
D. Luis Gonzaga Paz-Ares Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

En las próximas líneas quiero mostrar mi gratitud a todas aquellas personas sin cuya ayuda no hubiera sido posible la realización de esta Tesis Doctoral.

Al Dr. Carlos Gómez Martín, director de esta tesis, por haber confiado en mí desde un principio, por su generosidad, entusiasmo, perseverancia y rigurosidad, fundamentales en la realización de este trabajo; por su profesionalidad y apoyo, siendo estímulo y guía para seguir crecimiento en el día a día. Gracias por todo.

Al Dr. Luis Paz-Ares Rodríguez, co-director de esta tesis, por creer en mí y apoyarme en la realización de este trabajo. Por ser un ejemplo de dedicación, calidad profesional y personal, gracias por haberme dejado ser partícipe de ello en los últimos años y ser estímulo para seguir formándome en el ámbito clínico e investigacional.

Al Dr. Carlos Lumbreras Bermejo, tutor de esta tesis, por su inestimable ayuda, su calidad docente y humana, dispuesto a colaborar en cualquier momento durante el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario 12 de Octubre, por haberme permitido aprender de cada uno de ellos, prestarme su apoyo y acompañarme en este camino.

A los pacientes oncológicos y sus familias, por ser modelo de lucha y amor, por ayudarme a mejorar día a día, darme su cariño y ser motor para continuar estudiando y emprender nuevos retos.

A Antonio, por ese entusiasmo y optimismo que siempre me impulsa a seguir adelante, por ser un pilar fundamental en mi vida. Gracias por comprenderme y quererme con mis virtudes y defectos.

A mis padres, Asun y Pepe, por su paciencia, apoyo incondicional y amor, no sería quien soy sin vosotros. Os quiero.

A mis hermanos, Pepe e Irene, por ser cómplices de buenos y malos momentos, apoyarme y quererme tal como soy, escucharme, reír y llorar conmigo, ser consejeros y amigos. Sea cual sea la distancia, siempre estaremos juntos.

A mis abuelos, Paquita y Antonio, Lola y Pedro, por ser la semilla de esta gran familia y estar siempre ahí. Estéis donde estéis siempre os querré.

*“El camino es el que nos enseña la mejor forma de llegar
y nos enriquece mientras lo estamos cruzando”*

(Paulo Coelho)

ABREVIATURAS

ADDC: Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AEM: Agencia Española del Medicamento.

Ag-Ac: Antígeno-Anticuerpo.

AJCC: American Joint Committee on Cancer.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ASCO: American Society of Clinical Oncology.

CDDP: Cisplatino.

CDK: Ciclinas Dependientes de Quinasas.

CEA: Antígeno Carcinoembrionario.

CF: Cisplatino, 5-Fu.

CG: Cáncer gástrico.

CGP: Cáncer Gástrico Precoz.

CGDH: Cáncer Gástrico Difuso Hereditario.

CGH: Comparison Genomic Hybridation.

CIMP: Fenotipo Metilador de Islotes CpG.

CIN: Cromosómicamente inestable.

CISH: Hidridación *In Situ* Cromogénica.

CNV: Cambios en el Número de Copias.

CPT11: Irinotecán.

CTLA: Antígeno asociado al Linfocito T Citotóxico.

DC: Docetaxel, Cisplatino.

dc-CISH: dual color-Cromogenic *In Situ* Hidrydation.

DCF: Docetaxel, Cisplatino, 5-Fu.

dc-SISH: dual color-Silver-*In Situ* Hidrydation.

DHFU: Dihidro-Fluoruracilo.

DPD: Dihidro-Pirimidin-Deshidrogenasa.

ECF: Epirrubicina, Cisplatino, 5-Fu.

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

ECX: Epirrubicina, Cisplatino, Capecitabina.

EE: Enfermedad estable.

EGC-JGES: Clasificación de Cáncer Gástrico Precoz de la Sociedad Japonesa de Gastroenterología Endoscópica.

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor.

ELF: 5-Fu, Leucovorin, Etopósido.

EMEA: European Medicines Agency.

EMR: Resección Mucosa Endoscópica.

EOC: Epirrubicina, Oxaliplatino, 5-Fu.

EORTC: European Organization for Research and Treatment of Cancer.

EOX: Epirrubicina, Oxaliplatino, Capecitabina.

ESD: Disección Endoscópica Submucosa.

FAM: 5-Fu, Adriamicina y mitomicina C.

FAMTX: 5-Fu, Adriamicina, Metotrexate a altas dosis.

FDA: Food and Drug Administration.

FGFR: Fibroblastic Growth Factor Receptor.

FIGC: Síndrome de Cáncer Gástrico Familiar de tipo Intestinal.

FISH: Hibridación *In Situ* Fluorescente.

FOLFIRI: 5-Fu, Irinotecán.

FOLFOX: 5-Fu, Oxaliplatino.

5-Fu: 5-Fluoruracilo.

GAPPS: Síndrome de Adenocarcinoma Gástrico y Poliposis Proximal del Estómago.

GS: Genómicamente Estable.

HER2: Human Epidermal Growth Factor 2.

HGF: Hepatocyte Growth Factor.

HNPCC: Cáncer de Colon Hereditario No Polipósico.

H.pylori: Helicobacter Pylori.

HR: Hazard Ratio.

IARC: International Agency for Research Cancer.

IC: Intervalo de confianza.

ICGC: The International Cancer Genome Consortium.

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina.

IGCLC: International Gastric Cancer Linkage Consortium.

IHQ: Inmunohistoquímica.

IL: Interleuquina.

ILVN: Invasión linfática, vascular y perineural.

IMC: Índice de Masa Corporal.

iNOS: Sintetasa de Óxido Nítrico Inducible.

JGCA: Japan Gastric Cancer Association.

JCGC: Japanese Clasification of Gastric Cancer.

JRSGC: Japenese Research Society for Gastric Cancer.

lncARN: ARN largo no codificante.

MALT: Linfoma T asociado a mucosas.

miARN: microARN.

MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification.

MMPS: Metaloproteasas de la Matriz Extracelular.

MMR: Mismatch Repair Genes.

MRC: British Medical Research Council.

MSI: Inestabilidad de Microsatélites.

MSKCC: Memorial Sloan Kettering Cancer Center.

MTHFR: Metilen-tetrahidrofolato reductasa.

NA: No alcanzado.

ND: No Determinado.

NF- κ B: Factor de Transcripción Nuclear κ B.

NGS: Nex-Generation Sequencing.

NICE: National Institute for Health and Care Excellence.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OR: Odds Ratio.

PARP: Poli-ADP-polimerasa.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerada.

PD: Receptor de Muerte Programada.

PD-L: Ligando del Receptor de Muerte Programada.

PE: Progresión de la enfermedad.

PELF: Cisplatino, 5-Fu, leucovorin, etopósido.

PF: Cisplatino, 5-Fu.

PGF: Placental Growth Factor.

PGM: Personal Genome Machine.

PI3K/AKT/mTOR: Fosfatidilinositol-3-quinasa/proteína quinasa B/mammalian target of rapamycin.

PSCA: Prostate Stem Cell Antigen.

Q-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerada en Tiempo Real.

RC: Respuesta Completa.

RP: Respuesta Parcial.

RPPA: Arrays de Proteínas en Fase Reversa.

RTK: Receptores Tirosina Quinasa.

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerada por transcriptase Reversa.

SEAP: Sociedad Española de Anatomía Patologica.

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica.

SG: supervivencia global.

SISH: Hibridación In Situ Argéntica.

SLE: supervivencia libre de enfermedad.

SLP: supervivencia libre de progresión.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SNP: Polimorfismos de Nucleótido Único.

SWOG: Southwest Oncology Group.

TCGA: The Cancer Genome Atlas.

T-DM1: Trastuzumab-emtansina.

TGF: Factor de Crecimiento Transformante.

TIL: Linfocitos Infiltrantes de Tumor.

TP: Timidilato Fosforilasa.

TS: Timidilato Sintetasa.

UE: Unión Europea.

UICC: International Union Against Cancer.

UGE: Unión Gastroesofágica.

VEB: Virus de Epstein-Barr.

VEGFR: Vascular Endotelial Growth Factor Receptor.

XELOX: Capecitabina, Oxaliplatino

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	7
SUMMARY	13
I. INTRODUCCIÓN	19
1. EPIDEMIOLOGÍA	20
2. ETIOLOGÍA	22
3. HISTOLOGÍA	30
4. CLASIFICACIÓN EN ESTADIOS DEL CÁNCER GÁSTRICO	37
5. PERFILES DE EXPRESIÓN GENÓMICA Y NUEVAS CLASIFICACIONES MOLECULARES DEL CÁNCER GÁSTRICO	42
6. FACTORES PRONÓSTICOS EN CÁNCER GÁSTRICO	52
7. FACTORES PREDICTIVOS EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER GASTRICO	67
8. TRATAMIENTO DEL CÁNCER GÁSTRICO	80
9. MÉTODOS DE ESTUDIO MOLECULAR DEL CÁNCER GÁSTRICO	111
II. HIPÓTESIS	134
III. OBJETIVOS	136
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	138
1. SELECCIÓN DE CASOS	139
2. ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN MASIVA	146
3. ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS	150
4. ALMACENAMIENTO DE LOS DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	152
V. RESULTADOS	155
1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS	156
2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	159
3. RELACIÓN ENTRE LAS ALTERACIONES MOLECULARES Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	166
4. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL	169
5. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN	180
6. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO	191

VI. DISCUSIÓN	194
1. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y ANATOMOPATOLÓGICA DEL CÁNCER GÁSTRICO HER2 POSITIVO	195
2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER GÁSTRICO HER2 POSITIVO.....	200
3. RELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y MOLECULARES.....	221
4. ALTERACIONES MOLECULARES COMO FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS EN CÁNCER GÁSTRICO HER2 POSITIVO.....	224
5. IMPLICACIONES PRÁCTICAS	231
6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	233
VII. CONCLUSIONES	236
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	239
IX. ANEXOS.....	302

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores de riesgo adquiridos asociados a CG.....	23
Tabla 2. Clasificación de la OMS de los tumores del estómago.....	35
Tabla 3. Definición T, N y M de la AJCC/UICC 7ª edición (2010).....	39
Tabla 4. Clasificación TNM del cáncer gástrico AJCC/UICC 7ª edición (2010).....	40
Tabla 5. Comparación entre 6ª y 7ª edición de la clasificación TNM del cáncer gástrico.....	40
Tabla 6. Interpretación de los resultados de IHQ según las guías SEOM/SEAP.....	115
Tabla 7. Listado de centros hospitalarios participantes.....	139
Tabla 8. Genes incluidos en el panel <i>Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2</i>	148
Tabla 9. Características clínico-patológicas de los pacientes del estudio.....	156
Tabla 10. Variaciones en el número de copias génicas.....	162
Tabla 11. Relación entre activación de PI3K/Akt/mTOR y características clínico-patológicas.....	167
Tabla 12. Relación entre amplificación de RTK y características clínico-patológicas.....	168
Tabla 13. Análisis univariante de la supervivencia global según la clasificación de Laurén.....	172
Tabla 14. Análisis univariante de la supervivencia global según el grado de diferenciación.....	172
Tabla 15. Análisis univariante de regresión de Cox según la localización de las metástasis.....	175
Tabla 16. Análisis univariante de riesgos proporcionales de Cox para la supervivencia global.....	179
Tabla 17. Modelo multivariante explicativo de la supervivencia global según la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR.....	179
Tabla 18. Análisis de la supervivencia libre de progresión según la clasificación de Laurén.....	183
Tabla 19. Análisis de la supervivencia libre de progresión según el grado de diferenciación.....	183
Tabla 20. Análisis univariante de regresión de Cox según la localización de las metástasis.....	186
Tabla 21. Análisis univariante de riesgos proporcionales de Cox para la supervivencia libre de progresión.....	190
Tabla 22. Modelo multivariante explicativo de la supervivencia global según la activación de PI3K/Akt/mTOR.....	202
Tabla 23. Respuesta a la quimioterapia de 1ª línea.....	191
Tabla 24. Análisis de la relación entre la respuesta objetiva al tratamiento con trastuzumab y las características clínico-patológicas.....	192
Tabla 25. Respuesta a Trastuzumab y activación de PI3KCA.....	193
Tabla 26. Respuesta a Trastuzumab y amplificación de genes codificantes de RTK.....	193
Tabla 27. Biomarcadores y fármacos dirigidos contra dianas moleculares en CG avanzado.....	232

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. a) Clasificación de Borrmann para CG avanzado y b) Clasificación Japonesa para CGP.....	31
Figura 2. Clasificación de Siewert-Lend (1998).....	38
Figura 3. Principales características de los 4 subtipos moleculares de CG.....	46
Figura 4. Descripción molecular del CG según la clasificación de TCGA.....	50
Figura 5. Estaciones ganglionares definidas por el JCGC.....	84
Figura 6. Algoritmo para la selección de pacientes candidatos a Trastuzumab en CG.....	114
Figura 7. Tinciones inmunohistoquímicas de HER2 en cáncer gástrico.....	115
Figura 8. Tipos de sondas para FISH.....	116
Figura 9. FISH <i>HER2</i> /CEP17 no amplificado (100x).....	119
Figura 10. FISH <i>HER2</i> /CEP17 amplificado (100x).....	119
Figura 11. FISH <i>HER2</i> /CEP17 no amplificado. Polisomía Cromosoma 17 (100x).....	119
Figura 12. a) dc-SISH <i>HER2</i> /CEP17 no amplificado. b) dc-SISH <i>HER2</i> /CEP17 amplificado (40x).....	122
Figura 13. Pasos de una reacción PCR/RT-PCR.....	123
Figura 14. Plataforma de microarrays.....	125
Figura 15. Pasos en el análisis de microarrays de ADN.....	126
Figura 16. Plataforma de microarrays de cADN.....	127
Figura 17. Plataformas de secuenciación masiva en paralelo.....	129
Figura 18. Preparación de la librería.....	130
Figura 19. Plataformas de secuenciación de molécula única.....	132
Figura 20. Diagrama de flujo de los pacientes del estudio.....	140
Figura 21. Figura 21. Muestra de adenocarcinoma gástrico con sobreexpresión de HER2 y MET.....	163
Figura 22. Principales vías de señalización intracelular de receptores tirosina quinasa.....	216
Figura 23. Alteraciones moleculares potenciales dianas terapéuticas en CG HER2 positivo.....	231

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Esquemas de tratamiento en primera línea y porcentaje de pacientes.....	157
Gráfico 2. Gráfico de caja del número de ciclos de Trastuzumab en 1ª línea.....	158
Gráfico 3. Resultados del análisis de secuenciación masiva.....	160
Gráfico 4. Mutaciones: Frecuencias absolutas (porcentaje).....	161
Gráfico 5. Prevalencia de las alteraciones implicadas en la activación de PI3K/Akt/mTOR.....	164
Gráfico 6. Prevalencia de amplificación de RTK.....	165
Gráfico 7. Supervivencia global (curva de Kaplan-Meier).....	169
Gráfico 8. Diagrama de caja: supervivencia global.....	170
Gráfico 9. Diagrama de caja: duración del seguimiento para el cálculo de la supervivencia global.....	170
Gráfico 10. Supervivencia global según ECOG.....	171
Gráfico 11. Supervivencia global según localización de tumor primario.....	173
Gráfico 12. Supervivencia global según debut metastásico de la enfermedad.....	174
Gráfico 13. Supervivencia global según la presencia de metástasis hepáticas.....	175
Gráfico 14. Supervivencia global según la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR.....	176
Gráfico 15. Supervivencia global según la amplificación de RTK.....	177
Gráfico 16. Supervivencia global según la activación de PI3K/Akt/mTOR. Análisis por subgrupos según la amplificación de RTK.....	178
Gráfico 17. Supervivencia libre de progresión (curva de Kaplan-Meier).....	180
Gráfico 18. Diagrama de caja: supervivencia libre de progresión a la 1ª línea.....	181
Gráfico 19. Diagrama de cajas: duración del seguimiento para el cálculo de la supervivencia libre de progresión.....	181
Gráfico 20. Supervivencia libre de progresión según ECOG.....	182
Gráfico 21. Supervivencia libre de progresión según la localización de tumor primario.....	184
Gráfico 22. Supervivencia libre de progresión según metástasis hepáticas.....	185
Gráfico 23. Supervivencia libre de progresión según carcinomatosis peritoneal.....	186
Gráfico 24. Supervivencia libre de progresión según activación de PI3K/Akt/mTOR.....	187
Gráfico 25. Supervivencia libre de progresión según la amplificación de RTK.....	188
Gráfico 26. Supervivencia libre de progresión según la activación de PI3K/Akt/mTOR. Análisis por subgrupos según amplificación de RTK.....	189
Gráfico 27. Diagrama de sectores: Respuesta a Trastuzumab.....	191

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico es el 5º tipo más frecuente de cáncer y la 3º causa de muerte por cáncer en ambos sexos a nivel mundial, con casi un millón de nuevos casos diagnosticados cada año y una supervivencia global inferior al 30% a los 5 años. Este pronóstico infausto se debe a que un elevado porcentaje de pacientes son diagnosticados en estadios avanzados de la enfermedad, y a un aumento relativo de los adenocarcinomas localizados en la unión gastroesofágica, de más difícil manejo quirúrgico. En países occidentales, en un 50% de los pacientes la enfermedad debuta en un estadio metastásico, y del 50% restante sólo la mitad de los pacientes alcanzan una resección quirúrgica potencialmente curativa. En el caso de los estadios avanzados la supervivencia global es inferior al 5% a los 5 años, con medianas de supervivencia que continúan siendo inferiores al año a pesar de las mejoras introducidas en el tratamiento con esquemas de poliquimioterapia. La única excepción a esta falta de mejora en términos de supervivencia global la constituyen los tumores con sobreexpresión y/o amplificación del oncogén *HER2* tratados con Trastuzumab. En estos casos, la adición al tratamiento quimioterápico de Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal específicamente dirigido frente al receptor de membrana celular codificado por este oncogen, ha logrado aumentar la supervivencia hasta lograr medianas de 13-16 meses. Sin embargo, la supervivencia de estos pacientes aún continúa siendo pobre y existen múltiples preguntas todavía sin contestar, tales como cuáles son los mecanismos de resistencia a la terapia dirigida frente a *HER2* y qué hacer en el momento de la progresión a una primera línea de quimioterapia en combinación con Trastuzumab en los pacientes *HER2* positivos, los cuales representan entre el 7 y el 34% de los cánceres gástricos según la localización y la histología.

Actualmente, la combinación de las plataformas de secuenciación masiva con técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, permite un estudio amplio de diferentes alteraciones moleculares como potenciales dianas terapéuticas o de factores predictivos de sensibilidad o resistencia a los tratamientos disponibles. En los últimos años se han comunicado multitud de estudios dirigidos a la determinación de alteraciones genéticas que permitan seleccionar un tratamiento específico en pacientes con adenocarcinoma gástrico. Sin embargo, existen pocos datos sobre la simultaneidad de estas alteraciones y las posibles interrelaciones entre las diferentes vías oncogénicas en tumores *HER2* positivos, que puedan condicionar la respuesta a la terapia dirigida frente a *HER2*.

HIPÓTESIS

El conocimiento de las alteraciones moleculares concurrentes con la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* en pacientes con adenocarcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica en estadio avanzado tratados con Trastuzumab, puede ayudar a establecer nuevos factores predictivos y/o pronósticos, así como facilitar el hallazgo de terapias personalizadas para estos pacientes. En concreto en el caso de los tumores *HER2* positivos, el estudio de la activación simultánea de otras vías mediadas por receptores con actividad tirosina quinasa y de la ruta PI3K/Akt/mTOR puede ser esencial para la selección de los pacientes idóneos para terapias dirigidas frente a *HER2*.

OBJETIVOS

1. Caracterizar molecularmente los adenocarcinomas gástricos con sobreexpresión y/o amplificación de *HER2*.
2. Determinar las posibles relaciones entre las alteraciones moleculares halladas y las diferentes características clínicas y patológicas de los pacientes con cáncer gástrico *HER2* positivo.
3. Determinar el papel pronóstico en términos de supervivencia global y supervivencia libre de progresión de las alteraciones moleculares encontradas en esta población.
4. Determinar el valor predictivo de la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR en los adenocarcinomas gástricos *HER2* positivos tratados con Trastuzumab.
5. Determinar el valor predictivo de la amplificación de los genes codificantes de receptores de membrana con actividad tirosina quinasa en los adenocarcinomas gástricos *HER2* positivos tratados con Trastuzumab.
6. Identificar subgrupos de pacientes con adenocarcinoma gástrico con sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* subsidiarios de un tratamiento personalizado mediante fármacos dirigidos a dianas moleculares en base a su perfil genómico, en combinación o secuencialmente con Trastuzumab.

MATERIAL Y MÉTODOS

De un total de 90 muestras de adenocarcinoma gástrico HER2 positivo por criterios locales se seleccionaron 42 muestras de pacientes con adenocarcinoma gástrico HER2 positivo por criterios centrales (IHQ 3+ o IHQ 2+ y amplificación por hibridación *in situ*) en estadio metastásico diagnosticados y tratados entre los años 2007 y 2012 en 10 centros hospitalarios españoles, que hubieran recibido tratamiento de 1ª línea con quimioterapia basada en Trastuzumab. Se realizó secuenciación genómica masiva de dichas muestras mediante la plataforma Ion Torrent Personal Genome Machine, basada en un panel de 50 genes. Como estudios complementarios se realizó análisis inmunohistoquímico de la expresión proteica de PTEN y MET. Asimismo se recogieron los datos de diversas variables clínicas y anatomopatológicas, incluyendo supervivencia global, supervivencia libre de progresión y respuesta al tratamiento. Se realizó el análisis estadístico mediante la plataforma Stata/IC 13.1.

RESULTADOS

En el análisis de secuenciación masiva, el 88.1% de los pacientes presentan al menos una alteración genómica. El número medio de alteraciones genómicas por paciente, sin considerar *HER2*, es de 3.62. El 85.7% de los pacientes presenta alguna mutación en al menos uno de los 50 genes analizados, con una media de 1.24 por muestra. El gen mutado con más frecuencia es *TP53* (73.8%), seguido de *PIK3CA* (11.9%). El 85.7% de las muestras tumorales analizadas presenta al menos un cambio en el número de copias de los genes analizados, con una media de 2.38. El gen amplificado con más frecuencia es *FGFR* (31%), seguido de *PIK3CA* (23.8%) y *EGFR* (21.4%). El 52.38% de nuestros pacientes presentan activación de la vía PI3K/Akt/mTOR definida como pérdida de expresión de PTEN y/o amplificación de *PIK3CA* y/o mutación de *PI3KCA*. El 38.1% de los pacientes presentan amplificación de genes codificantes de RTK (*EGFR*, *FGFR* y/o *MET*). No se evidencia relación entre las diferentes características clínicas y patológicas con las características moleculares.

La mediana de supervivencia global estimada para los pacientes con cáncer gástrico avanzado HER2 positivo tratada con Trastuzumab es de 15.69 meses (IC95% 13.0-21.5 meses). El análisis de regresión de Cox univariante muestra diferencias estadísticamente

significativas en supervivencia global según el ECOG, la localización del tumor primario, la presencia de metástasis hepáticas y el estado de activación de la vía PI3K/Akt/mTOR. No se evidencian diferencias estadísticamente significativas para el resto de características clínicas y patológicas ni para la amplificación de genes codificantes de receptores con actividad tirosina quinasa. El análisis de la supervivencia global según la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR, estratificado por el estado de amplificación de genes codificantes de receptores tirosina quinasa, refleja diferencias estadísticamente significativas solamente en el subgrupo sin amplificación de genes codificantes de receptores tirosina quinasa. El modelo multivariante de la supervivencia global indica que los sujetos que presentan activación de la vía de PI3K/Akt/mTOR tienen un riesgo de muerte 3.28 veces mayor que aquellos sin activación de la vía.

La mediana de supervivencia libre de progresión estimada para la primera línea de tratamiento es de 10.35 meses (IC95% 7.75-12.75 meses). El análisis de regresión de Cox univariante evidencia diferencias estadísticamente significativas en supervivencia libre de progresión según el ECOG, el tipo histológico de Laurén, la presencia de metástasis hepáticas y el estado de activación de la vía PI3K/Akt/mTOR. Las diferencias no son significativas para el resto de variables clínicas, patológicas o moleculares analizadas. El modelo multivariante determina que los pacientes con activación de PI3K/Akt/mTOR presentan un riesgo de progresión 2.04 veces mayor que aquellos sin activación, de forma estadísticamente significativa. El análisis de la supervivencia libre de progresión según la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR, estratificado por el estado de amplificación de genes codificantes de receptores tirosina quinasa, refleja diferencias solamente en el subgrupo sin amplificación de genes codificantes de receptores tirosina quinasa, en el límite de la significación estadística.

El 90.5% de los pacientes presentaron algún grado de beneficio clínico con el tratamiento con Trastuzumab, con un 66.7% de respuestas objetivas. El análisis de la relación entre las diferentes características clínicas, patológicas y moleculares, y la respuesta a Trastuzumab no muestra diferencias estadísticamente significativas, excepto en el caso del ECOG.

CONCLUSIONES

1. Se ha realizado una caracterización molecular del adenocarcinoma gástrico *HER2* positivo, demostrando la frecuente coexistencia de múltiples alteraciones genómicas concurrentes con la sobreexpresión y/o amplificación del oncogén *HER2*.
2. La alteración genómica más frecuentemente detectada es la mutación en *TP53*, encontrándose activación de la vía PI3K/Akt/mTOR en un 52% de los casos y coamplificación de genes que codifican otros receptores con actividad tirosina quinasa (*EGFR*, *FGFR*, *MET*) en un 38%.
3. La activación de la vía PI3K/Akt/mTOR se demuestra como un biomarcador pronóstico y predictivo negativo en términos de supervivencia global y libre de progresión en adenocarcinoma gástrico con sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* tratados con Trastuzumab.
4. La amplificación de genes codificantes de receptores de membrana con actividad tirosina quinasa (*EGFR*, *FGFR*, *MET*) no posee valor pronóstico ni predictivo de beneficio en términos de supervivencia global o libre de progresión en adenocarcinoma gástrico con sobreexpresión y/o amplificación del oncogén *HER2* tratados con Trastuzumab.
5. La interacción entre la vía de PI3K/Akt/mTOR y la activación por amplificación de genes codificantes de receptores tirosina quinasa parece demostrarse como un posible mecanismo de resistencia a Trastuzumab, mereciendo ser explorada en estudios futuros.
6. El 69% de los pacientes diagnosticados de adenocarcinoma gástrico con sobreexpresión y/o amplificación del oncogén *HER2* pueden ser subclasificados de acuerdo a otras alteraciones moleculares concomitantes, siendo subsidiarios de diferentes terapias personalizadas en combinación o tras la administración de Trastuzumab.

Por todo lo anterior consideramos demostrado que el conocimiento de las alteraciones moleculares concurrentes con la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2*, en pacientes con adenocarcinoma gástrico avanzado tratados con Trastuzumab, permite identificar factores predictivos y pronósticos así como facilitar el hallazgo de terapias personalizadas para estos pacientes.

SUMMARY

INTRODUCTION

Gastric cancer is the fifth most common type of cancer and the third most frequent cause of cancer-related death in men and women worldwide, with almost a million of new cases diagnosed every year and a 5-year overall survival rate <30%. The poor prognosis of gastric cancer is due to the high percentage of patients diagnosed in advanced stage of the disease, and the relative increased incidence of gastroesophageal junction adenocarcinoma, whose surgical management is more difficult. In Western countries, the disease appears in a metastatic stage in 50% of patients, and only a half of the remaining 50% of patients achieve a potentially curative surgical resection. In advanced stages, 5-years overall survival rate remain <5%, with a median survival lower than one year, despite treatment improvements with multidrug therapy schedules. The only exception to this lack of improvement in terms of overall survival consists of tumors with overexpression and/or amplification of *HER2* treated with Trastuzumab. In these cases, the addition of Trastuzumab to chemotherapy, a monoclonal antibody specifically raised against the cell membrane receptor encoded by this oncogene, has managed to increase survival, raising median of up to 13 to 16 months. However, the survival of these patients remains poor and there are many unanswered questions, such as the mechanisms of resistance to HER2-targeted therapy, or which should be the treatment after progression to first-line therapy based on Trastuzumab in HER2-positive gastric cancer patients. Depending on histology and location, HER2-positive gastric cancer represents between 7 and 34% of gastric cancer patients.

Nowadays, the combination of next-generation sequencing technology, immunochemistry and *in situ* hybridization studies, allows a comprehensive study of different molecular alterations as potential therapeutic targets or predictors of sensitivity or resistance to available treatments. Last years, many studies have been published aimed at identifying genetic alterations that allow you to select specific treatment in patients with gastric adenocarcinoma. However, there are few data on the simultaneity of these changes and the possible interrelationships between different oncogenic pathways, which may affect the response to targeted therapy against HER2, in HER2-positive tumors.

HYPOTHESIS

Knowledge of molecular alterations concurrent with overexpression and/or amplification of *HER2* in patients with advanced gastric adenocarcinoma treated with Trastuzumab, can help to establish new predictive and/or prognostic factors and to facilitate the finding of personalized therapies for these patients. Specifically in the case of HER2-positive tumors, the study of simultaneous intracellular signaling pathways, such as mediated by other tyrosine kinase receptors and the PI3K/Akt/mTOR cascade, may be essential for the selection of suitable patients for targeted therapies against HER2.

OBJECTIVES

1. To molecularly characterize gastric adenocarcinoma with overexpression and/or amplification of *HER2*.
2. To determine the relationship between molecular alterations and clinical and pathological features in patients with HER2-positive gastric cancer.
3. To determine the prognostic role in terms of overall survival and progression-free survival of molecular alterations found in this population.
4. To determine the predictive value of PI3K/Akt/mTOR pathway activation in patients with HER2-positive gastric adenocarcinoma treated with Trastuzumab.
5. To determine the predictive value of tyrosine kinase receptors' genes amplification in patients with HER2-positive gastric adenocarcinoma treated with Trastuzumab.
6. To identify subgroups of patients with HER2-overexpressed and/or HER2-amplified gastric cancer for a personalized treatment with targeted therapy based on their genomic profile, in combination or sequentially to Trastuzumab.

MATERIALS AND METHODS

Among 90 patients with HER2-positive gastric adenocarcinoma by local criteria, diagnosed and treated between 2007 and 2012 from 10 Spanish hospitals, 42 patient samples with the following inclusion criteria were selected: HER2-positive gastric adenocarcinoma confirmed by central criteria (IHQ 3+ or IHQ 2+ and *in situ* hybridization amplification), metastatic stage and first-line Trastuzumab-based chemotherapy. Massive genomic sequencing of these samples was performed by Ion

Torrent Personal Genome Machine platform, based on a panel of 50 genes. As additional studies, PTEN and MET immunohistochemistry expression were assessed. Data from different clinical and pathological variables, including overall survival, progression-free survival and response to treatment, were also collected. Statistical analysis was performed using Stata / IC 13.1 platform.

RESULTS

88.1% of patients have at least one genomic alteration by massive sequencing analysis. The average number of genomic alterations per patient, regardless HER2, is 3.62. 85.7% of patients have a mutation in at least one of the 50 genes analyzed, with an average of 1.24 per sample.

The gene most frequently mutated is *TP53* (73.8%), followed by *PIK3CA* (11.9%). 85.7% of tumor samples have at least a number copy variation on the analyzed genes, with an average of 2.38. The most frequent amplified gene is *FGFR* (31%), followed by *PIK3CA* (23.8%) and *EGFR* (21.4%). 52.38% of our patients have activation of PI3K/Akt/mTOR pathway, defined as loss of expression of PTEN and/or *PIK3CA* amplification and/or *PIK3CA* mutation. 38.1% of patients have amplification of genes encoding tyrosine kinase receptors (*EGFR*, *FGFR* and/or *MET*). There is no relationship between clinical and pathological features and molecular characteristics.

The estimated median overall survival for patients with HER2-positive advanced gastric cancer treated with Trastuzumab is 15.69 months (95% CI 13.0-21.5 months). The univariate Cox regression analysis shows statistically significant difference in overall survival according to ECOG, location of the primary tumor, presence of liver metastases and activation status of PI3K/Akt/mTOR pathway. There are not significantly relationship between overall survival and other clinical, pathological or molecular characteristics as the amplification of genes encoding receptors with tyrosine kinase activity. The analysis of overall survival by activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway, stratified by the status of amplification of genes encoding tyrosine kinase receptors, shows statistically significant results only in the subset without amplification of genes encoding tyrosine kinase receptors. The multivariate overall survival model indicates that subjects with activation of PI3K/Akt/mTOR pathway have a risk of death 3.28 times greater than those without it.

The median progression-free survival estimated for the first line of treatment is 10.35 months (95% CI 7.75-12.75 months). The univariate Cox regression analysis evidence

differences in progression-free survival according to ECOG, Laurén's histological subtype, presence of liver metastases and activation status of the PI3K/Akt/mTOR pathway. There are no relationship between progression-free survival and the other clinical, pathological and molecular variables. The multivariate model determines an increase of 2.04 times on risk of death for patients with activated PI3K/Akt/mTOR pathway, respect to those without activation, in a statistically significant manner. The analysis of progression-free survival by activation status of PI3K/Akt/mTOR pathway, stratified by amplification of tyrosine kinase receptors' genes, shows differences only in the subset without amplification at the limit of statistical significance.

90.5% of patients showed some degree of clinical benefit with Trastuzumab-based therapy, with 66.7% of objective responses. We do not observed any significant association of different clinical, pathological and molecular characteristics, with response to Trastuzumab, except of ECOG.

CONCLUSIONS

1. It has managed to perform a molecular characterization of HER2-positive gastric adenocarcinoma, demonstrating the frequent coexistence of multiple concurrent genomic alterations with overexpression and/or amplification of *HER2* oncogene.
2. The most frequently detected genomic alteration is *TP53* mutation, finding activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in 52% of cases and co-amplification of genes encoding other receptors with tyrosine kinase activity (*EGFR*, *FGFR*, *MET*) in 38%.
3. Activation of PI3K/Akt/mTOR pathway is demonstrated as a prognostic and predictive biomarker of benefit in terms of overall survival and progression-free survival with Trastuzumab based-therapy in gastric adenocarcinoma with overexpression and/or amplification of *HER2*.
4. Amplification of genes encoding tyrosine kinase receptors (*EGFR*, *FGFR*, *MET*) has no prognostic and/or predictive value of benefit in terms of overall survival and progression-free survival with Trastuzumab-based therapy in gastric adenocarcinoma with overexpression and/or amplification of *HER2*.
5. The interaction between PI3K/Akt/mTOR activation and amplification of genes encoding tyrosine kinase receptors seems demonstrated as a possible mechanism of resistance to Trastuzumab, so it should be explored in future studies.

6. 69% of patients diagnosed with HER2-positive gastric adenocarcinoma may be sub-classified according to other concomitant molecular alterations, being subsidiaries of different personalized therapies in combination or following administration of Trastuzumab therapy.

For all these reasons we believe that we have shown how knowledge of molecular alterations concurrent with overexpression and/or amplification of *HER2* in patients with advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma treated with Trastuzumab-based therapy, allow identifying predictive and prognostic factors as well facilitating the finding of personalized therapies for these patients.

I. INTRODUCCIÓN

1. EPIDEMIOLOGÍA

1.1. INCIDENCIA

Casi un millón de nuevos casos de cáncer gástrico (CG) fueron diagnosticados en 2012 (952.000 casos, 6.8% del total), según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, haciendo a éste el 5º tipo de cáncer más frecuente, después de los cánceres de pulmón, mama, colon y próstata. Esto representa un cambio importante desde 1975, cuando el CG era la neoplasia más frecuente a nivel mundial. Existen importantes diferencias geográficas en la incidencia de CG. Más del 70% de los casos ocurren en países en vías de desarrollo, y la mitad de los casos en el Este de Asia, principalmente en China, Japón, regiones andinas de Sudamérica y Este de Europa. Las tasas de incidencia estandarizadas por edad en hombres duplican a las tasas en mujeres, oscilando de 3.3 por 100.000 habitantes en el Oeste de África a 35.4 por 100.000 habitantes en Asia para los hombres, y de 2.6 por 100.000 habitantes a 13.8 por 100.000 habitantes en mujeres, respectivamente (1).

En las últimas décadas se ha producido un descenso significativo en la incidencia de cáncer gástrico a nivel mundial (2, 3), en parte debido al reconocimiento de factores de riesgo como la infección por *Helicobacter pylori*, factores dietéticos y ambientales. Sin embargo, parece existir una tendencia creciente en la incidencia de CG entre la población joven en ciertos países (4-6). El estudio de movimientos migratorios desde Japón a Estados Unidos han confirmado que la exposición ambiental temprana prevalece sobre los factores genéticos en las tasas de incidencia y mortalidad por CG (7).

En la Unión Europea (UE) la tasa de incidencia estandarizada por edad por cada 100.000 habitantes en el año 2008 fue de 16.7 para los hombres y de 7.8 para las mujeres, representando la 5ª causa de cáncer entre los hombres y la 6ª en mujeres. España presenta una tasa estimada para 2008 de 18.1 en hombres y 8.0 en mujeres, ligeramente superior a la media de la UE (8).

Del total de los CG diagnosticados el 90% corresponden a adenocarcinomas gástricos. Se ha reconocido que los factores de riesgo, la distribución geográfica y la edad de aparición del adenocarcinoma gástrico difieren según el tipo histológico de acuerdo con la clasificación de Lauren (intestinal *versus* difuso) y según la localización anatómica del

tumor (unión gastroesofágica, estómago proximal o cardias frente a estómago distal). El adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal es el tipo histológico más frecuente en las áreas de mayor incidencia y parece ser el responsable de la variación a nivel internacional de la cifras de CG (9). Desde la década de 1950 el descenso en la incidencia de adenocarcinoma gástrico ha sido preferentemente de casos del tipo intestinal, haciendo que el tipo difuso sea relativamente más frecuente que con anterioridad, y representando el tipo histológico más frecuente en las áreas de menor incidencia. El descenso en los casos del tipo intestinal se ha documentado en EEUU y Japón mientras los casos de tipo difuso han aumentado (en EEUU) o se han mantenido estables (Japón) (9, 10). En otros países como Finlandia el cambio en la incidencia de los diferentes tipos ha hecho que el CG difuso sea el más habitualmente diagnosticado en pacientes menores de 60 años (11). Por otro lado, aunque la incidencia de adenocarcinoma gástrico no localizado en el cardias ha descendido de manera global en el mundo en las últimas décadas, la incidencia de los tumores de cardias se ha mantenido estable e incluso ha aumentado ligeramente en algunos países europeos, Japón y EEUU (12-15).

1.2. MORTALIDAD

El CG es la 3^o causa de muerte por cáncer en ambos sexos a nivel mundial (723.000 muertes, 8.8% del total). Las mayores tasas de mortalidad se encuentran en el Este de Asia (24 por 100.000 en hombres y 9.8 por 100.000 en mujeres) y las menores en América del Norte (2.8 y 1.5, respectivamente). También encontramos altas tasas de mortalidad en Europa del Este, Europa Central, América del Sur y América Central (1).

En España, el CG representa el 5^o cáncer con mayor mortalidad en hombres (por detrás de pulmón, colorrectal, próstata y vejiga) así como en mujeres (después del de mama, colorrectal, pulmón, y páncreas) (16). Según los últimos datos publicados por el Centro Nacional de Epidemiología, el CG fue la causa principal de muerte en 5616 personas en el año 2013 (3436 hombres y 2180 mujeres), lo que representa una tasa estandarizada por edad y 100.000 habitantes-año de 6.9 en hombres y 3.2 en mujeres. Su supervivencia sigue siendo mala, inferior al 28% a los 5 años en nuestro país (17).

2. ETIOLOGÍA

En la etiología del CG juegan un papel importante tanto factores ambientales como genéticos.

2.1. CÁNCER GÁSTRICO ESPORÁDICO

La mayoría de los cánceres gástricos ocurren de manera esporádica. Como hemos comentado anteriormente, existen grandes diferencias geográficas en la incidencia de CG en el mundo y dentro de la misma área geográfica se evidencian diferencias a lo largo del tiempo y entre poblaciones urbanas y rurales (18). Además, se ha comprobado un descenso en el riesgo de CG en los emigrantes que se trasladan desde áreas de alta incidencia a países de baja incidencia (7). Estos hechos sugieren que los factores ambientales tienen un papel fundamental en la etiología del cáncer gástrico esporádico.

Para las formas esporádicas de CG, Correa *et al.* han postulado un modelo de progresión desde tejido normal hacia gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal y displasia, en relación a la exposición a diversos factores de riesgo (*Tabla 1*), entre los que se encuentran principalmente la dieta, el consumo de tabaco y alcohol y, la infección por *H. pylori* (19).

2.1.1. DIETA

El consumo elevado y mantenido de irritantes de la mucosa gástrica, como la sal y los nitratos, provoca inflamación crónica de la misma y gastritis superficial, pudiendo conllevar al desarrollo de una gastritis atrófica (20, 21). En esta situación de atrofia se produce un incremento en el pH gástrico, lo cual favorece el crecimiento de bacterias anaerobias que reducen los nitratos a nitritos y, ocasionalmente, pueden formar derivados N-Nitroso mutagénicos. Un estudio de cohortes de gran tamaño muestral evidenció que el riesgo de desarrollar un CG es 2.2 veces mayor en los individuos con gastritis atrófica. Además, el riesgo se eleva 1.8 veces si se mantiene un consumo elevado de comidas picantes, y disminuye 0.6 veces si se reduce la ingesta de alimentos salados (21, 22).

Tabla 1. Factores de riesgo adquiridos asociados a CG. Adaptado de Avital I *et al.* (23).

Factores de riesgo adquiridos asociados a cáncer gástrico
Nutricionales <ul style="list-style-type: none">• Dieta rica en sal• Dieta rica en nitratos• Baja ingesta de vitamina A y C• Alimentos en salazón o curados• Escasa refrigeración de los alimentos
Ocupacionales <ul style="list-style-type: none">• Trabajadores del caucho• Trabajadores del carbón
Consumo de tabaco
Obesidad
Infección por <i>H. pylori</i>
Virus de Epstein-Barr
Exposición a radiación ionizante
Cirugía previa por úlcera gástrica benigna
Tratamiento previo de linfoma T asociado mucosas (MALT)

Por el contrario, una ingesta elevada de frutas y vegetales en la dieta diaria se ha asociado con una reducción en el riesgo de desarrollar adenocarcinoma gástrico. Los antioxidantes como los β -carotenos, el α -tocoferol (vitamina E) y el ácido ascórbico (vitamina C) podrían actuar evitando la formación de mutágenos y carcinógenos en el estómago (21, 24), aunque no se conoce con exactitud su papel en la etiología del CG.

2.1.2. TABACO Y ALCOHOL

El consumo de cigarrillos está considerado un agente causal de CG tanto en hombres como en mujeres por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) (25). El riesgo aumenta proporcionalmente con el número de cigarrillos fumados y con la duración del consumo, reduciéndose de manera progresiva tras el abandono del mismo (26). La interferencia en este caso de otros factores como el consumo de alcohol, la dieta o la infección por *H. pylori*, puede ser excluida según los datos de la IARC. Aproximadamente un 18% de los casos de adenocarcinoma gástrico pueden ser atribuidos al consumo de tabaco (27).

La misma IARC descartaba en 1988 el consumo de alcohol como un factor etiológico definitivo para el desarrollo de adenocarcinoma gástrico. Datos recientes procedentes de un metaanálisis sugieren la ausencia de asociación entre el consumo moderado de alcohol y el CG. Tan solo establecen una leve asociación positiva con el consumo alto de alcohol

(>50 g/día), especialmente en adenocarcinoma gástrico no localizado en el cardias (28). Sin embargo, a día de hoy, no se reconoce claramente el consumo de alcohol como factor de riesgo aislado de CG, aunque sí parece tener un papel potenciador del efecto carcinogénico del tabaco sobre la mucosa gástrica, con un aumento del riesgo relativo de CG de hasta 8.05 en fumadores con alta ingesta alcohólica (IC 95%, 3.89-16.6) (29).

2.1.3. OBESIDAD

En un metaanálisis de estudios de cohortes, que incluye 9492 casos de CG, la presencia de un índice de masa corporal (IMC) elevado (definido como $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) se asocia con un aumento del riesgo de CG de 1.2 veces, y la fuerza de dicha asociación se incrementa a medida que aumenta el IMC (30, 31). Específicamente la obesidad se asocia con un incremento del riesgo de cáncer de cardias, pero no del CG no localizado en el cardias. Esta asociación se confirma en un segundo metaanálisis publicado posteriormente, en el que se incluyen 22 estudios en total (estudios de cohortes y estudios de casos y controles), encontrándose en esta ocasión una mayor fuerza en la asociación con un incremento de al menos el 70% para CG en la población con sobrepeso/obesidad, explicable por incluir casos de adenocarcinoma de esófago y de cardias (31).

2.1.4. INFECCIÓN POR HELICOBACTER PYLORI

H. pylori fue aislado en 1982 por Marshall (32) y reconocido por la IARC como un carcinógeno en humanos en 1994, reconociéndose la infección por el mismo como un factor necesario pero no suficiente para el desarrollo del adenocarcinoma gástrico. Es una infección común que afecta al 74% de los individuos de edad media en los países desarrollados y al 58% en los países en vías de desarrollo. La evidencia que soporta la relación causal entre la infección por *H. pylori* y el CG la encontramos en diversos estudios ecológicos, estudios de casos y controles y estudios de cohortes prospectivos (33-35). Forman *et al.* realizaron el análisis conjunto de 3 estudios prospectivos, en el que objetiva que el riesgo de CG tras la infección por *H. pylori* aumenta significativamente con la duración del seguimiento, con un incremento de riesgo de casi 9 veces tras 15 años o más (36). En el metaanálisis publicado por el *Helicobacter and Cancer Collaborative Group*, en el que se incluyeron 12 estudios prospectivos que sumaban 1228 cánceres y 3406 controles, la infección por *H Pylori* aumenta el riesgo de adenocarcinoma gástrico

en 2.36 veces (IC95% 1.98-2.81). Este aumento de riesgo se produce sólo en tumores no cardiales y es mayor cuanto mayor es el tiempo de infección, incrementándose en 5.9 veces en los casos en los cuales la infección fue documentada más de 10 años antes del diagnóstico de CG (37).

Epidemiológicamente los países con mayor incidencia de CG son también los de mayor incidencia de infección por *H. pylori*, habiéndose documentado como en los países desarrollados el descenso en la incidencia de infección por *H. pylori* va seguido por una caída en la incidencia de CG (38, 39). Estudios recientes de la IARC indican que el 90% de los CG no cardiales son causados por la infección por *H. pylori* (40). Múltiples ensayos han investigado el papel de la erradicación del *H. pylori* en la incidencia de CG. En un metaanálisis publicado recientemente, incluyendo 6 ensayos clínicos randomizados, se estima un riesgo relativo de 0.66 (IC95% 0.46-0.95) cuando se compara la incidencia de CG entre de 3294 individuos sanos asintomáticos con infección documentada por *H. pylori* que recibieron terapia con inhibidores de la bomba de protones y antibióticos frente a 3203 individuos que recibieron placebo o no tomaron ningún tratamiento, lo que implica una reducción relativa del riesgo de CG del 34% (41).

El adenocarcinoma esporádico de tipo intestinal se desarrolla a través de una secuencia conocida de lesiones precursoras que son inducidas por la infección por *H. pylori*. Esta infección provoca la aparición de gastritis atrófica y posteriormente metaplasia intestinal, lo que conlleva un aumento en el riesgo relativo de desarrollar adenocarcinoma gástrico, que es 1.7 veces mayor en los casos de atrofia moderada, 4.9 veces superior en los de atrofia severa y 6.4 veces en los de metaplasia intestinal; siempre referidos a la población no infectada (42).

Recientemente se ha secuenciado el genoma completo del *H. pylori*, demostrándose la existencia de secuencias específicas comunes a distintas cepas del germen, aunque no todas las cepas tienen el mismo potencial carcinogénico. Por ejemplo, en humanos la infección por cepas Cag-A (+) está relacionada con una mayor prevalencia de gastritis atrófica y unos mayores niveles de Inmunoglobulina (Ig) G anti-*H. pylori* que la infección por cepas Cag-A (-) (43). Asimismo el *H. pylori* produce una citotoxina vacuolizante denominada Vac-A (44). Teóricamente todas las cepas de *H. pylori* producen Vac-A, sin embargo, hay diferentes variantes con diversa capacidad vacuolizante debido a la existencia de polimorfismos (45). Dentro de los genotipos identificados, las cepas de *H.*

pylori Vac-A s1 y m1, son las que mayormente se han observado en CG (46-48). De esta forma, en algunos países se ha comprobado que las áreas con mayor riesgo de CG son también las de mayor frecuencia de genotipos Cag-A (+) y Vac- A s1 y m1 en las cepas de *H.pylori* aisladas (47, 49).

El efecto carcinogénico viene determinado por el estrés oxidativo que provoca la infección por *H.pylori* en la mucosa gástrica y, dado que este microorganismo se localiza en el moco que recubre el epitelio gástrico normal y no en el de las zonas con metaplasia intestinal donde se origina habitualmente la neoplasia, es necesaria asimismo la presencia de carcinógenos solubles en la luz gástrica para el desarrollo de la neoplasia. En las células inflamatorias y de la lámina propia en los casos de gastritis es posible detectar la Sintetasa de Oxido Nítrico inducible (iNOS). El óxido nítrico es necesario para la renovación de las células más profundas del epitelio foveolar y de los folículos linfoides. En la mucosa precancerosa iNOS migra hacia zonas más superficiales del epitelio foveolar donde se puede producir daño en el ADN celular. El aumento del pH intragástrico en los casos de gastritis atrófica producido por *H. pylori* puede modificar aún más los carcinógenos externos o internos a este nivel. La transformación de Nitritos (NO_2) en Óxido Nítrico (NO) produce Trióxido de Dinitrógeno (N_2O_3) que forma Nitrosotioles y Nitrosaminas, compuestos ambos que están reconocidos como carcinógenos gástricos en modelos experimentales. Esta transformación es inhibida por la presencia de antioxidantes como el ácido ascórbico, lo que explicaría su papel preventivo del CG. De cualquier manera *H. pylori* interfiere con esta acción antioxidante del ácido ascórbico al disminuir la concentración intragástrica del mismo (50, 51). De esta forma, la inflamación inducida por *H. pylori* conduce a un estado de estrés oxidativo que aumenta las posibilidades de daño del ADN y de mutaciones somáticas (52).

Por otro lado, independientemente de los efectos de la inflamación, *H. pylori* causa inestabilidad genómica, directamente mediante daño genético e indirectamente mediante una serie de alteraciones epigenéticas. En relación a lo primero, *H. pylori* produce la rotura de la doble cadena del ADN, lo cual se ha visto que puede ser independiente de la respuesta inflamatoria generada y de la expresión o no de factores de virulencia como Vac-A y Cag-A (53). Además, conduce a una alta expresión de citidina deaminasa, enzima que en condiciones fisiológicas sólo se encuentra activada en cierta etapa del desarrollo del linfocito, y que se ha implicado en la carcinogénesis de tumores digestivos asociados a procesos inflamatorios mediante la activación del factor de transcripción

nuclear (NF)-kB. (54, 55). Sumado a ello, *H. pylori* induce una serie de alteraciones epigenéticas mediante 3 mecanismos principales: la modificación de histonas, la hipermetilación de múltiples islotes de CpG, especialmente en sitios de codificación de genes supresores de tumores como E-cadherina, APC y p16, y la modificación en la expresión de microARN (52, 56, 57). Muchos de estos eventos con potencial carcinogénico, son reversibles tras la erradicación de *H. pylori*, sin embargo, otros de ellos podrían no serlo (58, 59).

2.2. SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA

La mayoría de CG son esporádicos y sólo el 1-3% del global son verdaderos CG hereditarios o familiares. Sin embargo, se estima que existe agregación familiar en el 10% de los pacientes diagnosticados de CG. En algunas familias esta agregación podría ser explicada por la existencia de factores de riesgo exógenos compartidos y, en otras por la existencia de una predisposición genética a gastritis crónica atrófica según un patrón de transmisión autosómico recesivo (60). También se han identificado algunos polimorfismos genéticos asociados a CG, como los de interleuquina 1 beta (IL-1 β) e interferón gamma (IFN- γ), implicados en el efecto proinflamatorio y virulencia de la infección por *H. pylori*, así como en el gen de la metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (61-63). La asociación del grupo sanguíneo A con el CG también sugiere la existencia de factores genéticos ligados no identificados (64, 65).

2.3. CÁNCER GÁSTRICO HEREDITARIO

Como hemos comentado anteriormente, sólo el 1-3% del global son verdaderos CG hereditarios o familiares.

De éstos aproximadamente el 30% corresponde al denominado cáncer gástrico difuso hereditario (CGDH), síndrome de carácter autosómico dominante, en el que típicamente el CG debuta a la edad media de 40 años. Además del riesgo de CG estas familias tienen un incremento de riesgo de cáncer lobulillar de mama y posiblemente de cáncer colorrectal y prostático. En 1999, el *International Gastric Cancer Linkage Consortium*

(IGCLC) definió los criterios clínicos para la identificación de las familias con CGDH (66-68):

- 2 o más casos de cáncer gástrico en una familia con al menos 1 caso de CG difuso confirmado diagnosticado antes de los 50 años.
- 3 o más casos de CG en familiares de primer y segundo grado, independientemente de la edad de diagnóstico.
- 1 caso de CG difuso antes de los 40 años sin historia familiar.
- Historia de CG difuso y cáncer de mama lobulillar, 1 de ellos diagnosticado por debajo de los 50 años.

En el 40% de los pacientes con los criterios clínicos, se identifica una mutación en línea germinal de uno de los alelos del gen que codifica la proteína de adhesión celular E-cadherina (*CDH1*) en su locus 16q22.1 (69, 70). La inactivación del segundo alelo puede ocurrir entonces por mutación o hipermetilación (71). Se han identificado al menos 104 mutaciones en *CDH1* (72) El riesgo de desarrollar un CG a lo largo de su vida en las personas portadoras de una mutación en el gen *CDH1* es del 67% en hombres y del 83% en mujeres. Dado este riesgo elevado, se aconseja el estudio genético de los familiares y la valoración de una posible gastrectomía profiláctica (73). En el 60% de los casos que cumplen criterios clínicos de CGDH no se identifica ninguna mutación en regiones codificantes de *CDH1*, sin embargo, se describe la expresión monoalélica del gen o la existencia de deleciones en regiones no codificantes del mismo como posibles mecanismos subyacentes de la baja o nula expresión de E-caherina en la mayoría de los casos (74). Además, mutaciones en el gen de α -catenina (*CTNNA1*) han sido recientemente identificadas como una causa genética diferente de *CDH1* para CGHD (75).

Asimismo se han caracterizado cuadros de adenocarcinoma gástrico hereditario de tipo intestinal. El mejor conocido es el síndrome de predisposición genética que aparece en los pacientes con Cáncer de Colon Hereditario No polipósico (Síndrome de Lynch o HNPCC) (76). En estos casos la alteración genética consiste en mutaciones en los denominados genes de reparación de errores del ADN (“*Mismatch Repair Genes*”) (77), evidenciándose frecuentemente inestabilidad de microsatélites en la pieza tumoral (*MLH1* y *MSH2*) (78). Otros síndromes de CG hereditario de tipo intestinal incluyen los

descritos en portadores de mutaciones del gen *APC* en casos de Poliposis Adenomatosa Familiar o del gen *LKB1/STK11* en el Síndrome de Peutz-Jeghers (79, 80). En 2012 se identificó el síndrome de adenocarcinoma gástrico y poliposis proximal del estómago (GAPPS), caracterizado por transmisión autosómica dominante de poliposis de glándulas fúndicas (incluyendo lesiones displásicas y CG tipo intestinal o ambos), restringidos a la parte proximal del estómago, sin evidencia de poliposis duodenal o colónica, ni de otros síndromes hereditarios gastrointestinales. Presenta una penetrancia incompleta y la causa genética subyacente aún se encuentra sin identificar (81). También se ha descrito el síndrome de cáncer gástrico familiar de tipo intestinal (FIGC) con carácter autosómico dominante, sin poliposis subyacente y cuya alteración genética aún queda por dilucidar (66, 82). El CG también se ha descrito formando parte de otros síndromes de cáncer hereditario como el síndrome de Li-Fraumeni, el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditarios o el síndrome de Cowden, entre otros.

3. HISTOLOGÍA

Los adenocarcinomas suponen más del 95% de las neoplasias malignas del estómago, por ello nos referimos a ellos cuando, de manera genérica, hablamos de cáncer gástrico. Las neoplasias malignas del estómago pueden clasificarse de acuerdo a su aspecto macroscópico o a sus características histopatológicas microscópicas, existiendo diversas clasificaciones que vamos a desarrollar brevemente.

3.1. CLASIFICACIONES MACROSCÓPICAS

Las 2 clasificaciones macroscópicas más ampliamente utilizadas son la Clasificación de Borrmann (83) en los casos de neoplasias avanzadas y, la clasificación del Cáncer Gástrico Precoz desarrollada por la Sociedad Japonesa de Gastroenterología Endoscópica (EGC-JGES) (84, 85) para los adenocarcinomas confinados a la mucosa o submucosa. Ambas clasificaciones tienen, además de su función clasificatoria, un valor pronóstico.

3.1.1. CLASIFICACIÓN DE BORRMANN

De acuerdo a esta clasificación los tumores gástricos se dividen en cuatro tipos fundamentales de acuerdo a su apariencia macroscópica (*Figura 1a*):

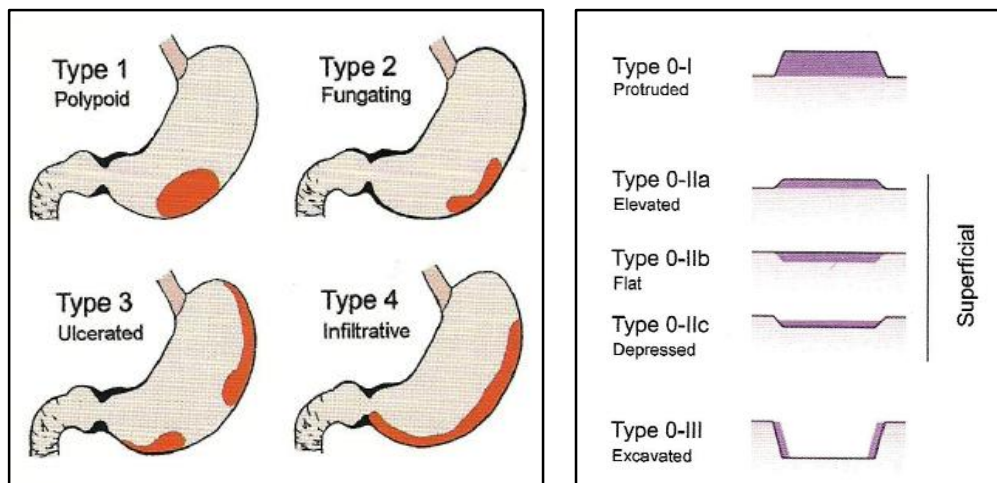
- **Tipo I. Polipoide:** Tumores polipoides bien circunscritos.
- **Tipo II. Fungoide.** Tumores polipoides con una marcada infiltración central.
- **Tipo III. Ulcerados.** Tumores ulcerados con márgenes infiltrativos.
- **Tipo IV. Infiltrativos.** Tumores que se extienden superficialmente en la mucosa y submucosa produciendo una lesión plana con o sin ulceración que, en los casos más extensos se denomina linitis plástica o estómago en “bota de cuero”.

3.1.2. CLASIFICACIÓN JAPONESA (EGC-JGES)

El término Cáncer Gástrico Precoz (CGP) se originó en Japón y se refiere a los adenocarcinomas cuyo crecimiento está confinado a la mucosa y submucosa gástrica, independientemente de la presencia o no de metástasis en los ganglios linfáticos locoregionales. Los casos de CGP se clasifican según la apariencia macroscópica del tumor en la visión endoscópica en 3 tipos principales (*Figura 1b*):

- **Tipo I. Polipoide.** El tumor protruye más de 0.5 cm sobre la superficie de la mucosa gástrica.
- **Tipo II. Superficial.**
 - **Ia. Elevado.** Elevación plana de la mucosa, inferior a 0.5 cm de altura.
 - **Ib. Plano.** Mínima o no elevación en la altura de la mucosa.
 - **Ic. Deprimido.** Erosión superficial y/o ligeramente deprimido.
- **Tipo III. Excavado.** Depresión prominente, caracterizada por una excavación de tipo ulceroso.

Figura 1. a) Clasificación de Borrmann para CG avanzado y b) Clasificación Japonesa para CGP.
Tomado de Bosman F et al. (86).



3.2. CLASIFICACIONES MICROSCÓPICAS

Microscópicamente los adenocarcinomas gástricos pueden presentar diversos patrones histológicos. Aunque existen múltiples clasificaciones propuestas, las dos aceptadas y utilizadas de manera universal son la clasificación de Laurén y la de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

3.2.1. CLASIFICACIÓN DE LAURÉN

La Clasificación de Laurén fue propuesta por este autor francés en 1965 (87), habiendo demostrado desde entonces su utilidad diagnóstica, en especial en lo referente a poder diferenciar dos tipos tumorales con distintas características clínico-patológicas, etiologías, incidencias y lesiones precursoras.

En esta clasificación los adenocarcinomas gástricos se dividen en 2 tipos principales:

- **Carcinomas Intestinales.** Estos tumores se caracterizan por formar estructuras glandulares de diferente grado de diferenciación, ocasionalmente pobremente diferenciadas en el borde de avance del tumor. Aparecen de manera habitual en el seno de mucosas con metaplasia intestinal. Suelen diseminarse principalmente por vía hematógena, siendo las metástasis hepáticas las más frecuentes.
- **Carcinomas Difusos.** Están constituidos por células neoplásicas pobremente cohesionadas que infiltran la pared gástrica de manera difusa con escasa o nula formación de glándulas. La apariencia de las células suele ser redonda y pequeña, dispuestas de manera aislada o en pequeños acúmulos que simulan glándulas o retículos. Estos tumores difusos pueden presentar pequeñas cantidades de mucina intersticial y se asemejan a los clasificados como Tumores de Células en Anillo de Sello de la clasificación de la OMS. La tasa mitótica de los tumores difusos es inferior a la que presentan los tumores de tipo intestinal, así como es menos evidente la inflamación asociada. Por el contrario, el grado de desmoplasia es mayor en este tipo tumoral. Al contrario que los carcinomas de tipo intestinal, suelen extenderse por la superficie peritoneal en forma de carcinomatosis.

Aquellos casos que contienen una proporción similar de ambos tipos histológicos son denominados adenocarcinomas mixtos. Por el contrario, los casos demasiado indiferenciados para ser incluidos en una u otra categoría son clasificados como Indeterminados. Estas 2 últimas categorías suponen aproximadamente un 16% de los casos.

3.2.2. CLASIFICACIÓN DE LA OMS

En la *Tabla 2* se muestra la última clasificación de la OMS para los tumores del estómago publicada en el año 2010 (86).

De acuerdo con esta clasificación los tumores epiteliales malignos se dividen en:

- Adenocarcinoma.
 - Papilar.
 - Tubular.
 - Mucinoso.
 - Pobremente cohesivo (incluye carcinoma con células en anillo de sello y otras variantes).
 - Mixto.
- Carcinoma adenoescamoso.
- Carcinoma con estroma linfoide (carcinoma medular).
- Adenocarcinoma hepatoide.
- Carcinoma con células escamosas.
- Carcinoma indiferenciado.

A pesar de la gran heterogeneidad de histologías de los carcinomas gástricos, se describen 5 tipos principales, que corresponden a los 5 subtipos de adenocarcinoma, y otras entidades raras.

1. **Adenocarcinoma papilar.** Son tumores exofíticos bien diferenciados con procesos papilares/digitales alargados y recubiertos de células cilíndricas o cuboideas unidas a una matriz de tejido conectivo fibrovascular. Las células tienden a mantener su polaridad. Algunos de estos tumores pueden mostrar diferenciación tubular o, más raramente, una arquitectura micropapilar.

Característicamente el borde tumoral suele estar bien delimitado de las estructuras adyacentes y el propio tumor puede estar infiltrado de manera aguda o crónica por células inflamatorias.

2. **Adenocarcinoma tubular.** Contiene túbulos dilatados de manera prominente que varían en su diámetro, pudiendo presentar estructuras acinares. Las células tumorales pueden ser columnares, cuboideas o aplanadas por mucina intraluminal. Pueden detectarse también células claras. Entre las variantes de este tipo histológico se encuentra el carcinoma sólido, variante pobremente diferenciada. Los tumores con prominente estroma linfoide son a veces llamados carcinomas con estroma linfoide, carcinoma medular o carcinoma tipo linfoepitelioma.
3. **Adenocarcinoma mucinoso.** Compuesto por células epiteliales malignas y lagos de mucina extracelular. Por definición, el tumor debe estar compuesto en más del 50% por mucina extracelular. Pueden contener células en anillo de sello de forma aislada.
4. **Carcinoma pobremente cohesivo.** Compuesto por células neoplásicas aisladas o formando pequeños agregados. Éste engloba:
 - a. **Carcinoma con células en anillo de sello.** Definido como un tumor formado predominante o exclusivamente por células en anillo de sello, caracterizadas por un núcleo excéntrico desplazado por un citoplasma globoide ópticamente claro compuesto de mucina. Estas células pueden constituir glándulas con forma de cordón o seguir un patrón microtrabecular en la mucosa, o acompañarse de importante desmoplasia en las paredes más profundas del estómago. En algunos casos las células en anillo de sello pueden estar presentes sólo en la mucosa, en combinación con otros tipos de células pobremente cohesivas en niveles más profundos de la pared gástrica.
 - b. **Otras variantes de carcinoma pobremente cohesivo.** Incluye tumores compuestos por células neoplásicas que asemejan histiocitos o linfocitos, células de citoplasma intensamente eosinofílico y células con núcleos irregulares y bizarros. Algunos tumores pueden presentar una mezcla de estos distintos tipos celular, e incluso algunas células en anillo de sello.

5. **Carcinoma mixto.** Estos tumores están constituidos por un componente glandular (tubular/papilar) y un componente pobremente cohesivo con células en anillo de sello. La relevancia de la proporción de cada componente en el pronóstico del paciente no está establecida, aunque datos preliminares sugieren que la presencia de cualquier componente de carcinoma pobremente cohesivo se asocia a un peor pronóstico. Los carcinomas mixtos son clonales y la divergencia fenotípica se ha atribuido a la mutación somática en el gen de E-cadherina (*CDH1*), restringido al componente de células en anillo de sello/pobremente cohesivo.

Tabla 2. Clasificación de la OMS de los tumores del estómago. Adaptada de: Bosman F et al. (86)

1. Tumores epiteliales	
Lesiones premalignas	
Adenoma Neoplasia intraepitelial (displasia) de bajo grado Neoplasia intraepitelial (displasia) de alto grado	
Carcinomas	
Adenocarcinoma Papilar Tubular Mucinoso Pobremente cohesivo (<i>incluyendo carcinoma con células en anillo de sello y otras variantes</i>) Mixto Carcinoma adenoescamoso Carcinoma con estroma linfoide (medular) Adenocarcinoma hepatoide Carcinoma de células escamosas Carcinoma indiferenciado	
Neoplasias neuroendocrinas	
Tumores neuroendocrinos grado 1 (carcinoides) Tumores neuroendocrinos grado 2 Carcinomas neuroendocrinos de células grandes Carcinomas neuroendocrinos de células pequeñas Carcinomas mixtos adeno-neuroendocrinos Tumores neuroendocrinos de células enterocromafines, productores de serotonina o de gastrina (gastrinoma)	
	2. Tumores mesenquimales
	Tumor de glomus Tumor de células granulares Leiomioma Fibromixoma plexiforme Schwannoma Tumor miofibroblástico inflamatorio Tumores del estroma gastrointestinal Sarcoma de Kaposi Leiomiosarcoma Sarcoma sinovial
	3. Linfomas
	4. Tumores secundarios

3.2.3. OTRAS CLASIFICACIONES

Aunque las clasificaciones de la OMS y de Laurén son las más empleadas, se han propuesto otras clasificaciones. La clasificación de Ming se basa en el patrón de crecimiento e invasión, y divide a los tumores en 2 tipos: infiltrantes y expansivos (88). Nakamura clasifica a todos los tumores en diferenciados e indiferenciados (89). La clasificación de Goseki reconoce 4 tipos según la diferenciación tubular y la producción de mucina (90). El sistema de Carneiro divide a los tumores en 4 categorías (glandular, células aisladas, sólido y mixto) en base a su morfología e inmunofenotipo (91).

Por otro lado se encuentra la clasificación según el grado de diferenciación, que se aplica a los adenocarcinomas papilares y tubulares:

- **Adenocarcinomas bien diferenciados.** Compuestos por glándulas bien formadas, que en ocasiones se asemeja a la metaplasia intestinal.
- **Adenocarcinomas moderadamente diferenciados.** Se encuentra entre las neoplasias bien diferenciadas y las pobremente diferenciadas.
- **Adenocarcinomas pobremente diferenciados.** Compuestos por glándulas muy irregulares que se reconocen con dificultad.

También se pueden clasificar como de **bajo grado** (bien y moderadamente diferenciados) y de **alto grado** (pobremente diferenciados).

4. CLASIFICACIÓN EN ESTADIOS DEL CÁNCER GÁSTRICO

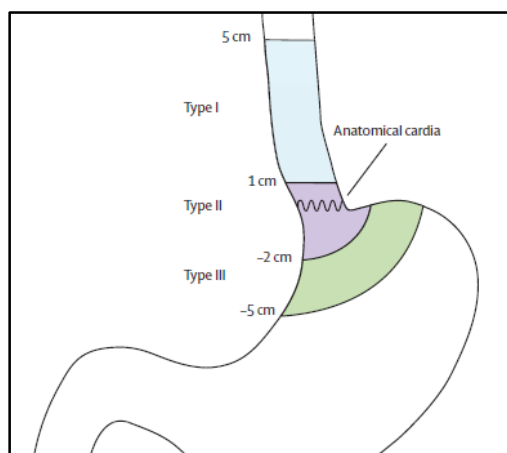
Además de la clasificación histológica que hemos comentado en el anterior capítulo, los sistemas de estadificación para los adenocarcinomas gástricos implementados en la práctica clínica para la toma de decisiones terapéuticas son principalmente los siguientes: estadificación topográfica, sistema TNM y Clasificación Japonesa, que pasamos a desarrollar a continuación.

4.1. CLASIFICACIÓN TOPOGRÁFICA

Divide los carcinomas gástricos según su localización en proximales o distales (92). Esta división se basa no sólo en diferentes factores etiológicos y epidemiológicos, sino también en el diferente tratamiento quirúrgico y complementario indicado.

- **Proximales o de la Unión Esofagogástrica (UGE).** Incluyen los adenocarcinomas que engloban la UGE, independientemente de la localización de la masa tumoral, y los adenocarcinomas localizados hasta 5 cm por debajo de la UGE, anteriormente considerados adenocarcinomas de cardias. A su vez los adenocarcinomas de la UGE se dividen según la clasificación de Siewert-Lend (93) en 3 tipos topográficos con implicaciones terapéuticas y pronósticas (94, 95). Esta clasificación abarca los tumores cuyo epicentro se encuentra dentro de los 5 cm proximales y 5 cm distales a la línea Z anatómica (*Figura 2*):
 - **Siewert tipo I:** adenocarcinoma del esófago distal que asienta sobre un área de metaplasia intestinal (por ejemplo, esófago de Barrett) y que infiltra la UGE desde arriba.
 - **Siewert tipo II:** asienta sobre el cardias o verdadera UGE.
 - **Siewert tipo III:** nace en la región subcardial e infiltra la UGE desde abajo.
- **Distales a la UGE.** Incluye todos los carcinomas que asientan en cuerpo, antro o píloro.

Figura 2. Clasificación de Siewert-Lend (1998). Tomado de Mariette C et al. (95).



4.2. CLASIFICACIÓN TNM

Esta clasificación categoriza los adenocarcinomas gástricos en cuatro estadios (I, II, III, IV) de acuerdo a la extensión del tumor primario (T), la existencia de metástasis ganglionares y su número (N) y la presencia o no de metástasis a distancia (M). Esta clasificación está realizada y revisada periódicamente por la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* y la *International Union Against Cancer (UICC)*, siendo la última publicada y actualmente en uso la 7ª edición (2010) (96). La aceptación universal de esta clasificación viene justificada por su capacidad de dividir de manera fiable los carcinomas gástricos en grupos según su pronóstico, así como por la facilidad de su empleo y reproducibilidad de los resultados. Las *Tablas 3 y 4* muestran la clasificación.

El empleo de sufijos permite determinar si el estadio TNM se basa en los resultados obtenidos en la pieza quirúrgica (pTNM), si se trata de un estadificación clínica (cTNM), ecográfica (uTNM) o incluso si es la realizada tras recibir el paciente tratamiento quimio y/o radioterápico (ypTNM).

Hemos de tener en cuenta, especialmente en la interpretación de los resultados de los ensayos clínicos, que la clasificación TNM de 2010 (7ª edición) sufrió algunos cambios respecto a la 6ª edición de 2002, principalmente en lo que se refiere a la estadificación ganglionar (*Tabla 5*).

Una modificación importante de la 7ª edición de la clasificación TNM es que los tumores de la UGE o proximales, se estadifican como adenocarcinomas esofágicos en vez de como carcinomas gástricos. Aquellos tumores cuyo epicentro se encuentre a más de 5 cm distales a la UGE o aquellos que se encuentren a menos de 5 cm de la UGE pero que no presenten extensión a la UGE o el esófago, se estadifican como carcinomas gástricos.

Tabla 3. Definición T, N y M de la AJCC/UICC 7ª edición (2010)

T. Tumor primario	
Tx	El tumor primario no se puede evaluar
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ: tumor intraepitelial sin invasión de la lámina propia
T1	El tumor invade lámina propia, muscular de la mucosa o submucosa
T1a	El tumor invade lámina propia o muscular de la mucosa
T1b	El tumor invade la submucosa
T2	El tumor invade la muscular propia
T3	El tumor invade la subserosa
T4	El tumor invade la serosa (peritoneo visceral) o estructuras adyacentes
T4a	Invade serosa
T4b	Invade estructuras adyacentes
N. Ganglios linfáticos	
Nx	Los ganglios linfáticos regionales no se pueden valorar
N0	No hay evidencia de metástasis ganglionares regionales
N1	Metástasis en 1 a 2 ganglios linfáticos regionales
N2	Metástasis en 3 a 6 ganglios linfáticos regionales
N3	Metástasis en más de 6 ganglios linfáticos regionales
N3a	Metástasis en 7 a 15 ganglios linfáticos regionales
N3b	Metástasis en más de 15 ganglios linfáticos regionales
M. Metástasis a distancia	
Mx	Las metástasis a distancia no se pueden valorar
M0	No hay evidencia de metástasis a distancia
M1	Presencia de metástasis a distancia

Tabla 4. Clasificación TNM del cáncer gástrico AJCC/UICC 7ª edición (2010)

Estadios TNM			
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
Estadio IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
Estadio IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
Estadio IIIA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
Estadio IIIB	T4b	N0	M0
	T4b	N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
Estadio IIIC	T4b	N2	M0
	T4b	N3	M0
	T4a	N3	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tabla 5. Comparación entre 6ª y 7ª edición de la clasificación TNM del cáncer gástrico.

7ª edición (2010)		6ª edición (2002)
T1a	Lámina propia	T1
T1b	Submucosa	T1
T2	Muscular propia	T2a
T3	Subserosa	T2b
T4a	Invasión de la serosa	T3
T4b	Invasión de estructuras adyacentes	T4
N1	1-2 ganglios regionales	N1
N2	3-6 ganglios regionales	N1
N3a	7-15 ganglios regionales	N2
N3b	≥16 ganglios regionales	N3

4.3. CLASIFICACIÓN JAPONESA (JCGC)

La *Japanese Classification of Gastric Cancer* (JCGC) fue desarrollada inicialmente por cirujanos japoneses para estandarizar el abordaje quirúrgico y la linfadenectomía empleada, sufriendo posteriormente diversas revisiones que incluyen aspectos endoscópicos, quirúrgicos y patológicos (85). La antigua clasificación japonesa, vigente hasta antes de 2010, consideraba la afectación ganglionar según una meticulosa evaluación topográfica con muestreo con biopsia de 16 estaciones ganglionares divididas en 3 grupos de acuerdo a la localización del tumor primario, y diferenciaba como categorías distintas los casos de metástasis hepáticas, peritoneales o de otra localización a distancia, basándose en el pronóstico peor de los pacientes con afectación hepática o peritoneal frente a otras localizaciones como pulmón o hueso. En 2010 la *Japanese Reserch Society for Gastric Cancer* (JRS GC) ha revisado la clasificación y guía de tratamiento del CG (97). Entre los principales cambios se encuentra la adopción de la clasificación propuesta por la 7ª edición del TNM y la simplificación de las definiciones de los diferentes tipos de linfadenectomía.

Utilizar el mismo criterio para definir los estadios va a permitir poder comparar experiencias y tratamientos entre series de pacientes japonesas y occidentales. Uno de los aspectos que probablemente más ha podido influir en la decisión de adoptar el sistema numérico ha sido la subdivisión de la antigua categoría N1 en N1 y N2, ya que en Japón, donde la proporción de tumores en estadios iniciales puede llegar a ser de más del 50%, la antigua clasificación pN no permitía discriminar de forma precisa el pronóstico de este tipo de tumores (98). Continúa existiendo desacuerdo a la hora de clasificar los tumores gástricos proximales que se extienden hacia el esófago. La Clasificación Japonesa continúa estadiando este tipo de tumores como gástricos sin seguir las recomendaciones de la UICC/AJCC, que considera que deben ser estadiados como tumores esofágicos tipo adenocarcinoma.

5. PERFILES DE EXPRESIÓN GENÓMICA Y NUEVAS CLASIFICACIONES MOLECULARES DEL CÁNCER GÁSTRICO

Como hemos comentado previamente, desde un punto de vista histológico la mayoría de los carcinomas gástricos son adenocarcinomas, que pueden subdividirse en difusos o intestinales según la clasificación de Laurén, basada exclusivamente en el estudio mediante microscopía óptica convencional. Por su localización el CG se divide en proximal o distal. Sin embargo, existe una gran variabilidad en lo referente a características epidemiológicas, etiopatogenia, comportamiento clínico y respuesta al tratamiento entre los diferentes subtipos histológicos y topográficos de CG, lo que pone de manifiesto la gran complejidad biológica de esta patología. Los avances en tecnologías de alto rendimiento como análisis de microarrays y métodos de secuenciación genómica de última generación (“*Next-Generation Sequencing*”, NGS), han permitido una mejor caracterización del CG desde el punto de vista patogénico y molecular (99, 100). Ello pone de relieve el alto nivel de heterogeneidad inter- e intra-tumoral del CG, en el que cada paciente presenta un perfil genético y molecular particular.

Para mejorar la evolución de los pacientes con CG resulta esencial la búsqueda de marcadores predictivos de respuesta que guíen el tratamiento sistémico. Los esfuerzos para identificar biomarcadores moleculares en CG han tenido resultados irregulares. Diversas terapias dirigidas frente a dianas moleculares que han demostrado eficacia en otros tipos tumorales, han sido evaluadas o están actualmente bajo investigación para el tratamiento del CG, incluyendo inhibidores de EGFR, MET, VEGF, FGFR y PI3K (101-103). Sin embargo, hasta la fecha, el único biomarcador predictivo de respuesta para una terapia dirigida es la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2*, que predice el beneficio del tratamiento con Trastuzumab en enfermedad avanzada (104, 105). Aunque la reciente aprobación del anticuerpo anti-VEGFR2 Ramucirumab aumenta el arsenal terapéutico en CG, no existen marcadores predictivos validados que identifiquen qué pacientes pueden beneficiarse de las terapias dirigidas frente a VEGFR (106, 107).

Algunos autores han publicado como los subtipos histológicos clásicos de CG se corresponden con perfiles de expresión génica diferentes, lo que está permitiendo no solo una mejor caracterización de las neoplasias gástricas y la descripción de nuevos subtipos

tumorales, sino también un mejor conocimiento de las alteraciones moleculares principales de cada uno de ellos. Diversos estudios retrospectivos han identificado mediante métodos de secuenciación masiva diferentes alteraciones genómicas recurrentes en CG como las mutaciones en los genes *ARID1A*, *CDH1*, *RHOA* y *FGFR2* (108-113).

Wang *et al.* describieron una alta incidencia de la mutación somática de *ARID1A* en el subtipo con inestabilidad de microsatélites (MSI) y Virus de Epstein-Barr (VEB)-positivo (108). El 75% de los CG con mutaciones de *ARID1A* presentaban una pérdida total o parcial de su expresión proteica determinada por inmunohistoquímica (IHQ) comparada con los tumores no mutados. Además, los tumores con mutaciones en *ARID1A* presentaban con menor frecuencia mutaciones en *TP53* (21% vs. 52%, $p=0.0002$). En el modelo de análisis multivariante incorporando el estadio tumoral, la clasificación de Laurén, el estado de MSI y la mutación de *ARID1A*, sólo el estadio avanzado (III/IV) y la ausencia de mutaciones en *ARID1A* fueron variables independientes predictores de recurrencia precoz. Esto puso de manifiesto la importancia de los genes de remodelación de la cromatina y su papel independiente de *TP53* en la carcinogénesis gástrica (108). El mismo grupo de trabajo publicó los datos del análisis mediante NGS de 100 pares de muestras de CG y tejido no tumoral, analizando número de copias de ADN, expresión génica y perfil de metilación (110). Identificaron los genes clave (“*driver genes*”) en cada subtipo tumoral, describiendo como principales genes supresores de tumores: *TP53* en tumores sin inestabilidad de microsatélites (MSS), *ARID1A* en los subgrupos MSI y VEB-positivos, y *CDH1* en los CG difusos. Determinaron una prevalencia de la mutación en *MUC6* del 9.6% de los tumores MSS y 18.2% en los tumores MSI. *MUC6* es el gen codificante de la mucina gástrica, y la disminución en su expresión se ha asociado a estadios tumorales más avanzados y de peor pronóstico (114). Otros genes en los que la prevalencia de mutaciones descrita fue diferente en tumores MSS y MSI fueron los relacionados con la vía del factor de crecimiento transformante *beta* (TGF- β), observándose mutaciones en cuatro genes (*TGFBR2*, *ACVR2A*, *SMAD4* y *ELF3*) en el 13.3% de los tumores MSS y en el 100% de los MSI. Asimismo, destaca la presencia de mutaciones recurrentes en *RHOA* en el 14.3% de los CG difusos, frente al 7.8% de los tumores mixtos o indiferenciados, no identificándose en los tumores de histología intestinal. Las mutaciones en *RHOA* presentaron una predilección por la localización en antro y cuerpo gástrico frente a cardias, se asociaron a pobre diferenciación y presentaron una menor prevalencia de mutaciones en *TP53*. Tampoco se describió asociación entre

las mutaciones en *RHOA* y en *CDHI* o *ARIDIA*. Es llamativo que los CG con mutaciones en *RHOA* presentaron expresión de marcadores de diferenciación intestinal como *CDX2*, lo que sugiere su origen sobre metaplasia intestinal **(110, 115)**.

El grupo del Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) trató de definir el perfil genómico clasificando el CG en 3 subtipos: proximal no-difuso, difuso y distal no-difuso **(116)**. Uno de los genes con expresión diferencial en cada subtipo fue *PLA2G2A*. *PLA2G2A* es una fosfolipasa identificada como factor pronóstico en CG, de manera que los tumores que expresan altos niveles de este gen presentan mayor supervivencia y menor frecuencia de metástasis **(117)**. Asimismo, *PLA2G2A* ha sido descrito como diana de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en carcinogénesis gástrica, asociada con la regulación negativa de genes asociados a invasión y metástasis **(118)**. En el estudio del MSKCC, *PLA2G2A* presentó una sobreexpresión 7 veces mayor en el subtipo proximal no-difuso frente al CG difuso y 12 veces mayor en el subtipo distal no-difuso frente al difuso **(116)**. Otro gen de interés con diferencias significativas entre el subtipo proximal no-difuso y el CG difuso fue *PSCA* (*Prostate Stem Cell Antigen*), con expresión reducida en el primero. Ciertos polimorfismos de *PSCA* habían ya sido descritos como un factor de riesgo para el desarrollo de CG difuso comparado con el subtipo intestinal en población japonesa **(119)**.

Recientemente se ha publicado un estudio prospectivo que analiza mediante NGS 116 muestras de CG localmente avanzado o metastásico, identificando alteraciones genómicas que son potencialmente tratables mediante terapias dirigidas **(120)**. El 78% de los casos albergaban al menos una alteración genómica clínicamente relevante potencialmente tratable con terapias aprobadas en Estados Unidos por la *Food and Drug Administration* (FDA) o dentro de ensayo clínico. Las alteraciones más comunes fueron *TP53* (50%), *ARIDIA* (24%) y *CDHI* (15%). Otras alteraciones clínicamente relevantes fueron las encontradas en los genes *KRAS*, *CDKN2A*, *CCND1*, *ERBB2*, *PIK3CA*, *MLL2*, *MET*, *PTEN*, *ATM*, *DNMT3A*, *NF1*, *NRAS* y *MDM2*. Confirmando los datos de estudios previos, los tumores con pérdida de función de *ARIDIA* presentaron una menor prevalencia de mutaciones de *TP53*, y sin embargo, un aumento de las variantes en *PIK3CA*, *CREBBP* y *MLL2*. A destacar de este estudio es la presencia de alteraciones en receptores tirosina quinasa (RTK) en el 20.6% de los casos. Dentro de éstas se incluyen las amplificaciones de *ERBB2*, *EGFR*, *MET* y *FGFR2* como alteraciones predominantes, aunque también se describen mutaciones y deleciones. El 8.6% de las alteraciones

corresponden al gen *ERBB2*. A diferencia de lo descrito hasta ahora las alteraciones en *ERBB2* fueron sustituciones de bases en la mitad de los casos, hallazgo mutuamente excluyente con la presencia de amplificaciones de *ERBB2*. Las sustituciones de bases en *ERBB2* no pueden ser identificadas por IHQ o hibridación *in situ*, por lo que su detección identificaría a un subgrupo de pacientes que podría potencialmente beneficiarse del tratamiento dirigido anti-HER2, tal como se ha descrito en cáncer de mama (121). Los datos presentados sugieren que los CG con sustituciones en *ERBB2* podrían presentar características clínico-patológicas diferentes respecto a los tumores con amplificación de *ERBB2*, pero esto necesita ser confirmado en series más amplias (120).

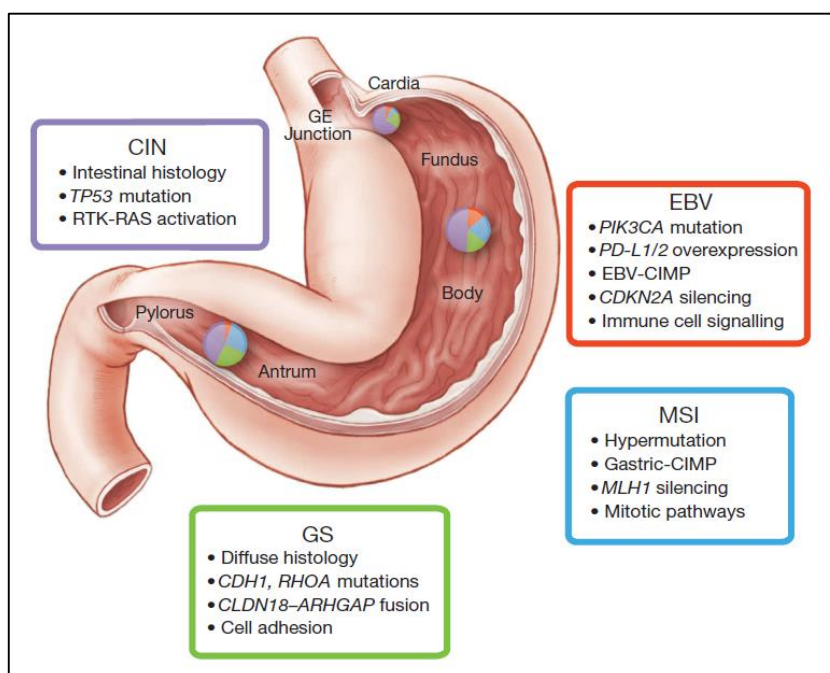
En la actualidad la única clasificación molecular con cierto grado de aplicabilidad directa en la práctica clínica es la publicada por el grupo *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), que pasamos a desarrollar a continuación.

5.1. CLASIFICACIÓN DE THE CANCER GENOME ATLAS (TCGA)

A finales de 2014 se publicó una anotación molecular extensa del cáncer gástrico por el TCGA (*Figura 3*) (122). En esta publicación se analizan muestras de tejido fresco de 295 pacientes con adenocarcinoma gástrico no previamente tratados con quimioterapia ni radioterapia, tomando como referencia para la detección de mutaciones somáticas ADN de línea germinal proveniente de muestras de sangre periférica o mucosa gástrica sana. Caracterizan las muestras usando seis plataformas moleculares: análisis del número de copias somáticas, secuenciación masiva de exomas, perfil de metilación del ADN, secuenciación de ARN mensajero (ARNm), secuenciación de microARN (miARN) y arrays de proteínas en fase reversa (RPPA), habiendo analizado el 77% de los tumores mediante las 6 plataformas. Basándose en los resultados del análisis de estas seis plataformas, crearon un algoritmo para clasificar las 295 muestras de CG en 4 subtipos moleculares, usando una aproximación que pudiera ser aplicada fácilmente en la práctica clínica. En primer lugar, se identificaron los tumores con positividad para VEB (subtipo VEB), los cuales representan un 9% de los CG. Posteriormente se clasificaron según la presencia de alta inestabilidad de microsatélites (subtipo MSI), agrupando al 22% de los CG. Los restantes se diferenciaron por el grado de aneuploidía en genómicamente estables (subtipo GS, 20%) y en aquellos con inestabilidad cromosómica (subtipo CIN, 50%).

Estos subtipos moleculares se han relacionado con algunas características clínicas e histológicas. En el subtipo genómicamente estable existe un predominio de la histología difusa y el diagnóstico se realiza a edades más tempranas. Los tumores con inestabilidad de microsatélites se diagnostican a edades más avanzadas y predominan en mujeres. Los casos VEB positivos predominan en hombres y suelen localizarse en cuerpo o fundus gástrico, mientras que los tumores con inestabilidad cromosómica se localizan preferentemente en unión gastroesofágica/cardias. Los resultados preliminares sobre la supervivencia, no revelaron diferencias significativas entre los cuatro subtipos.

Figura 3. Principales características de los 4 subtipos moleculares de CG. Tomado de: The Cancer Genome Atlas Research Network (122).



5.1.1. HIPERMETILACIÓN DE ADN ASOCIADA A VEB

La prevalencia de infección por VEB en células tumorales de CG es del 8.7% (IC95% 7.5-10) (123). En el estudio del TCGA el estado de VEB fue determinado por secuenciación de ARNm, miARN, exoma y genoma completo, obteniéndose resultados altamente concordantes (122). El análisis de las muestras VEB positivas mostró una intensa asociación con el fenotipo metilador de islotes de CpG (CIMP), a diferencia del subtipo MSI (124). Se han identificado diferencias en el espectro de mutaciones y en el

perfil de expresión génica entre los subtipos VEB y MSI asociados a CIMP. El subtipo VEB tuvo una mayor prevalencia de hipermetilación de ADN. Todos los tumores VEB-positivos mostraron hipermetilación del promotor *CDKN2A* (*p16INK4A*) y ausencia de hipermetilación de *MLH1*, característico de los tumores MSI asociados a CIMP (125).

Por otro lado, se observa una fuerte asociación entre mutaciones en *PIK3CA* y el subtipo VEB positivo, con una prevalencia del 80% de mutaciones no silentes de *PIK3CA* (122, 126). Por el contrario, se identifican mutaciones de *PIK3CA* en el 3-42% de los otros subtipos de CG. En los tumores VEB negativos las mutaciones de *PIK3CA* se suelen localizar en el dominio quinasa (exón 20), mientras que en los tumores VEB positivos las mutaciones se distribuyen de manera dispersa.

5.1.2. ALTERACIONES GENÓMICAS SOMÁTICAS

En el proyecto del TGCA se analizaron 63 tumores hipermutados, identificando 10 genes que presentaban mutaciones tipo sustitución de bases, incluyendo *TP53*, *KRAS*, *ARID1A*, *PIK3CA*, *ERBB3*, *PTEN* y *HLA-B*. Añadiendo al análisis las inserciones y deleciones, la lista de genes con mutaciones significativas se amplió hasta 37, incluyendo *RNF43*, *B2M* y *NF1*. El análisis de tumores MSI detectó alteraciones frecuentes en los genes del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I, como *B2M* y *HLA-B*, lo que se ha asociado a la evasión del sistema inmune reduciendo la presentación de antígenos (127).

El análisis de 215 tumores no-hipermutados identificó 25 genes con mutaciones significativas, entre los que se encuentran *TP53*, *ARID1A*, *KRAS*, *PIK3CA* y *RNF43*, pero también genes relacionados con la vía de β -catenina (*APC* y *CTNNB1*), la vía de TGF- β (*SMAD4* y *SMAD2*) y *RASA1*, un regulador negativo de *RAS*. *ERBB2* estaba mutado de manera significativa; 10 de las 15 mutaciones identificadas se encontraban en puntos conocidos, cuatro casos tenían la mutación S310F, que es activadora y sensible a los fármacos anti-ERBB2 (128).

Los tumores VEB positivos, además de mutaciones en *PIK3CA*, presentaron mutaciones en *ARID1A* (55%) y *BCOR* (23%), siendo raras las mutaciones en *TP53*. En el subtipo CIN de CG con inestabilidad cromosómica se observaron mutaciones de *TP53* en el 71% de los casos. Las mutaciones somáticas de *CDH1* se describieron en el 37% de los tumores estables genómicamente (subtipo GS), los cuales comparten las alteraciones en

ARIDIA con el subtipo VEB. Las mutaciones en *RHOA* aparecen de manera casi exclusiva en el subtipo GS, con una prevalencia del 15%. *RHOA* actúa sobre la contractilidad y motilidad celular dependiente de actina y miosina, y promueve la tumorigénesis a través de la activación de *STAT3*.

Analizando las transversiones o sustituciones de bases de una purina por una pirimidina o viceversa en las muestras de CG, se observa una alta tasa de transversiones de citosina a timidina en dinucleótidos CpG y de adenina a citosina en dinucleótidos AA. Las transversiones de adenina a citosina son especialmente frecuentes en los subtipos VEB, CIN y GS, no estando presentes en el subtipo MSI, tal como se había descrito previamente (129).

El análisis de reordenamientos cromosómicos, reveló translocaciones y fusiones entre *CLDN18* and *ARHGAP26*, implicados en la adhesión y motilidad celular. Las fusiones *CLDN18–ARHGAP* fueron mutuamente excluyentes con las mutaciones en *RHOA* y, son especialmente frecuentes en el subtipo GS. En el subtipo GS, el 30% de los casos presentaron alteraciones en *RHOA* o en *CLDN18–ARHGAP*. Las alteraciones genómicas de la ruta de *RHOA* parecen tener un papel en la capacidad invasiva de los GC fenotipo difuso.

Entre los resultados del análisis del número de copias somáticas destaca la identificación de amplificaciones focales en oncogenes como *ERBB2*, *CCNE1*, *KRAS*, *MYC*, *EGFR*, *CDK6*, *GATA4*, *GATA6* y *ZNF217*, así como la amplificación de *CD44*, marcador de la célula madre gástrica, y amplificaciones del locus 9p, donde se localizan los genes que codifican JAK2, PD-L1 y PD-L2, potenciales dianas terapéuticas. Las amplificaciones del locus 9p se encuentran especialmente en el subtipo VEB, lo que es consistente con los estudios que muestran una alta expresión de PD-L1 en tumores linfoides VEB positivos (130). Los casos amplificados mostraron altos niveles de ARNm y de expresión proteica de JAK2, PD-L1 y PD-L2 en el subtipo VEB positivo, lo que pone de manifiesto la necesidad de testar los antagonistas de JAK2 y PD-L1/2 en este subgrupo de pacientes con CG. Además, se detectaron deleciones focales en genes supresores de tumores como *PTEN*, *SMAD4*, *CDKN2A* y *ARIDIA*.

5.1.3. EXPRESIÓN GÉNICA Y ANÁLISIS PROTEÓMICO

El estudio del TCGA determina diferentes *clusters* o grupos de expresión génica para ARNm, miARN y RPPA, sin embargo, no existe una correspondencia absoluta entre los grupos de expresión génica y los subtipos moleculares.

En el análisis de ARNm destaca el hallazgo de la omisión del exón 2 de *MET* en el 30% de los CG analizados, asociado con un incremento en la expresión de MET, así como la presencia de nuevas variantes de *MET* en las que están implicados los exones 18 y/o 19. Curiosamente los exones omitidos son áreas codificantes de dominios tirosinquinasa.

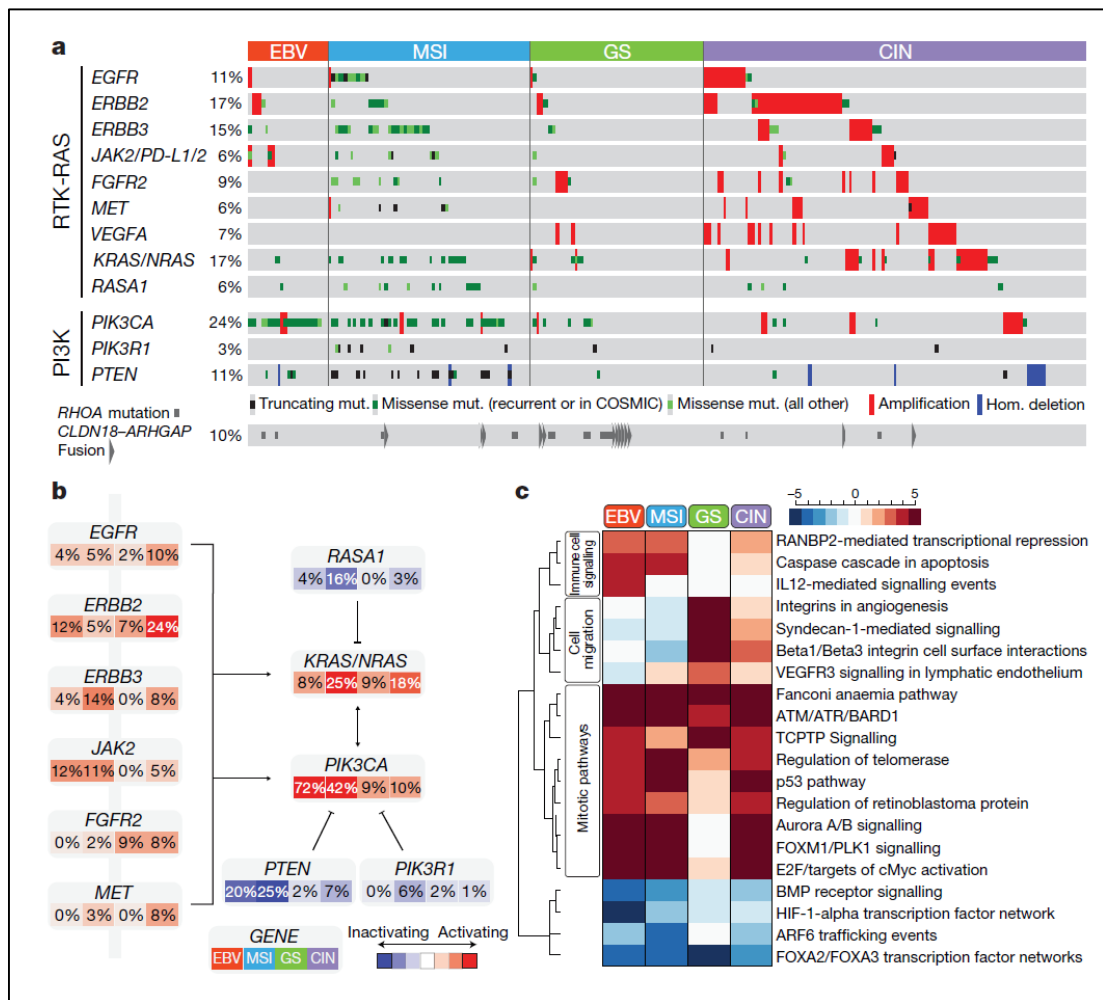
En la revisión de los datos de RPPA observaron 45 proteínas cuya expresión o fosforilación se asoció con los cuatro subtipos moleculares. La fosforilación de EGFR (pY1068) estaba significativamente elevada en el subtipo CIN, lo que es concordante con la amplificación de *EGFR* en este subtipo. También encontraron una alta expresión de p53, lo que es congruente con la alta prevalencia de la mutación de *TP53* y aneuploidía en el subtipo CIN.

5.1.4. ANÁLISIS INTEGRADO DE LAS VÍAS MOLECULARES

El análisis conjunto de las alteraciones en el número de copias y las mutaciones, centrado en los receptores tirosina quinasa y en las vías de RAS y PI3K condujo a las siguientes conclusiones (*Figura 4*):

- Los tumores VEB positivos presentaban mutaciones en *PIK3CA* y amplificaciones de *JAK2* y *ERBB2*.
- Los tumores MSI presentaban mutaciones en *PIK3CA*, *ERBB3*, *ERBB2* y *EGFR*, muchas de ellas en puntos críticos identificados en otros tumores. Destaca la ausencia de mutaciones de *BRAF* V600E, frecuentemente observada en cáncer colorrectal con MSI.
- El subtipo GS exhibe alteraciones en *RHOA* y *CDLN18*.
- En el subtipo CIN es frecuente la amplificación de receptores tirosina quinasa, diana de agentes terapéuticos actualmente en uso o en desarrollo, como ramucirumab o inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (**106, 107, 131**).

Figura 4. Descripción molecular del CG según la clasificación de TCGA. Tomado de: The Cancer Genome Atlas Research Network (122).



a) Mutaciones, cambios en el número de copias y translocaciones de genes seleccionados organizados por subtipos moleculares. La frecuencia de las alteraciones está expresada en porcentaje sobre el total de casos. b) Alteraciones en vías RTK/RAS y RTK/PI3K en los diferentes subtipos moleculares. Rojo: activación. Azul: inactivación. c) Vías significativamente activadas (rojo) o inhibidas (azul) en los 4 subtipos comparado con la mucosa gástrica no-maligna. RTK: receptores con actividad tirosina quinasa.

La comparación del perfil de expresión de cada subtipo con los restantes grupos y con tejido gástrico normal reveló algunos patrones a destacar, incluyendo la elevada expresión de componentes de la mitosis como AURKA/B, E2F (diana de activación de MYC), de la vía FOXM1/PLK1 y componentes de la respuesta al daño del ADN en todos los subtipos moleculares, siendo menor en tumores GS. Por el contrario, el subtipo GS presentaba elevada expresión de componentes de la vía de adhesión celular, incluyendo integrinas B1/B3, vías mediadas por syndecan-1 y vías relacionadas con la angiogénesis. Estos resultados sugieren nuevas dianas terapéuticas candidatas para el desarrollo de fármacos,

como las quinasas Aurora (AURKA/B) y Polo-like (PLK). En los tumores VEB positivos se evidenció una alta expresión de la vía de la IL-12, lo que sugiere una fuerte implicación de la respuesta inmune en este subtipo molecular de CG, que unido a la evidencia de la alta sobreexpresión de PD-L1/2, apoya fuertemente el desarrollo de fármacos inhibidores del sistema inmune en el CG VEB positivo.

6. FACTORES PRONÓSTICOS EN CÁNCER GÁSTRICO

Se consideran factores o marcadores pronósticos en oncología todas aquellas variables biológicas, histopatológicas o moleculares que influyen en la evolución de la enfermedad neoplásica, determinando la historia natural de la misma en ausencia de cualquier tratamiento. Este concepto se aplica de manera habitual a aquellas características que nos ayudan a seleccionar qué pacientes tratar y en qué momento en la evolución de su enfermedad. El pronóstico global de los pacientes afectados de cáncer gástrico es hoy en día pobre, con una supervivencia global a los 5 años inferior al 30%. Por ello es fundamental el conocimiento de aquellos factores que nos permitan detectar qué pacientes presentan un peor pronóstico de acuerdo a sus determinadas características biológicas.

6.1. FACTORES CLÍNICOS Y PATOLÓGICOS

Como resumen e introducción podemos destacar un estudio japonés que ha revelado mediante análisis multivariante el carácter pronóstico de 10 variables clínico-patológicas: profundidad de invasión tumoral (T), infiltración linfática ganglionar (N), tipo de disección linfática empleada, tamaño tumoral, presencia de metástasis hepáticas, carcinomatosis peritoneal, invasión linfática, invasión perineural, tumor que ocupa toda la cavidad gástrica y tumor situado en el estómago medio (132).

El grupo del MSKCC ha desarrollado un nomograma para predecir la supervivencia específica por enfermedad a los 5 años, empleando los datos de 1039 pacientes con cáncer gástrico tratados con resección R0 sin tratamiento neoadyuvante procedentes de una única institución (nomograms@mskcc.org) (133). Los hechos clínico-patológicos incluidos en el nomograma son edad, sexo, localización del tumor primario, clasificación de Laurén, número de ganglios linfáticos positivos y negativos resecados y profundidad de la invasión. Este nomograma fue posteriormente validado por diferentes autores en varios países. Peeters *et al.* encontraron que el nomograma pronosticaba mejor que el sistema de clasificación de la AJCC (134). Esta herramienta puede ser útil para determinar la indicación del tratamiento adyuvante y el protocolo de seguimiento de manera más individualizada.

6.1.1. FACTORES RELACIONADOS CON EL PACIENTE

A pesar de la existencia de estudios iniciales que les asignaban cierto valor, ni el sexo, ni la edad, ni la duración de los síntomas antes del diagnóstico tumoral poseen un valor como marcadores pronósticos independientes. Por el contrario, el estado nutricional deteriorado y el estado inmunitario deficiente sí parecen poseer un carácter de mal pronóstico (135-137).

6.1.2. TIPO HISTOLÓGICO

El valor pronóstico de los diferentes tipos histológicos es un tema controvertido. Si el pronóstico del CG difuso es o no es peor que el pronóstico del tipo intestinal es un tema debatido (138, 139). Recientemente se ha sugerido que el carcinoma gástrico incluye lesiones con diferente pronóstico, por ejemplo el subtipo desmoplástico de bajo grado (con escasa o nula angio-linfo-neuroinvasión) y el subtipo de alto grado (con células anaplásicas) (140, 141). El pronóstico de los pacientes con carcinoma pobremente cohesivo es particularmente malo en niños y adultos jóvenes, cuyo diagnóstico a menudo se retrasa (142). Algunos investigadores refieren que la clasificación de Goseki aporta información pronóstica adicional a la clasificación TNM, de forma que los tumores ricos en mucina (Goseki tipos II y IV) presentan peor pronóstico que los tumores pobres en mucina (Goseki tipos I y III), con una supervivencia a 5 años para los tumores T3 del 18% vs. 53% ($p < 0.0003$) (139).

6.1.3. ASPECTO MACROSCÓPICO

La clasificación en 4 subtipos tumorales de acuerdo a lo descrito por Borrmann ha demostrado en algunos estudios tener valor pronóstico, correspondiendo el mejor resultado a los tumores de tipo I y II (polipoides y polipoides con infiltración central) frente a los tipo III y IV (ulcerados e infiltrantes). Este valor pronóstico del aspecto tumoral macroscópico no ha podido ser confirmado en otros estudios (143, 144).

6.1.4. GRADO DE DIFERENCIACIÓN HISTOLÓGICA

La clasificación de los adenocarcinomas gástricos de acuerdo a su grado de diferenciación glandular en bien (I), moderada (II), pobremente diferenciados (III) e indiferenciados (IV), ha demostrado ser un adecuado factor pronóstico, presentando los pacientes peor supervivencia conforme más indiferenciado es el tumor (Grado I 48% vivos a los 5 años del diagnóstico, grado IV 10%) (145).

6.1.5. LOCALIZACIÓN TUMORAL

La localización del tumor primario ha demostrado ser un factor pronóstico independiente en los estudios de cáncer gástrico, siendo los tumores proximales los de peor pronóstico. Ello puede deberse a factores relacionados con dicha localización como son la incidencia mayor de diseminación ganglionar al diagnóstico o la tasa menor de resecabilidad de los tumores de cardias y unión gastro-esofágica frente a los del estómago distal (cuerpo y antro) (143).

6.1.6. INVASIÓN LINFÁTICA, VASCULAR Y PERINEURAL

Los resultados de 2 grandes estudios en pacientes intervenidos quirúrgicamente de CG han confirmado el carácter pronóstico independiente de estas tres características patológicas. En un primer estudio con 734 casos aquellos pacientes cuyo estudio patológico reveló invasión linfática, vascular y perineural (ILVN) tuvieron una supervivencia global y libre de progresión estadísticamente inferior al grupo de enfermos sin estas características de invasividad (45,5 meses de supervivencia global frente a mediana no alcanzada en el grupo sin infiltración, $p < 0.0001$) (146). Este mismo carácter de mal pronóstico se ha confirmado cuando se restringe el análisis a los casos considerados cáncer gástrico precoz y estadios I, lo que permitiría seleccionar una población de mayor riesgo de recaída y peor pronóstico, susceptible por tanto de un tratamiento adyuvante. Un segundo trabajo realizado en pacientes operados y con ausencia de afectación ganglionar locorregional en el examen anatomopatológico ha demostrado la relación directa entre la presencia de ILVN y la existencia de micrometástasis en los ganglios linfáticos locorregionales (147).

6.1.7. LINFOCITOS INFILTRANTES DEL TUMOR

En un estudio publicado en 2008 se determinó en 22 muestras de cáncer gástrico la densidad de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en el tumor empleando como marcadores inmunohistoquímicos CD3, CD8, CD20 y CD45R0. Los grupos que presentaban una densidad alta de CD3, CD20 CD45R0 presentaban una supervivencia mayor que los grupos correspondientes con densidad baja, confirmando a la densidad de TIL el carácter de marcador pronóstico de supervivencia en cáncer gástrico (148).

6.1.8. ESTADIO PATOLÓGICO

El grado de infiltración del tumor en la pared gástrica y la existencia de metástasis ganglionares locorregionales son los factores pronósticos más reconocidos y forman la base de todos los sistemas de estadificación recientes en esta enfermedad. La relación directa entre la infiltración del tumor en la pared gástrica (T en la clasificación TNM) y la supervivencia del paciente está demostrada en diversos estudios europeos, americanos y japoneses que confirman el pronóstico peor de la enfermedad conforme mayor es la penetración tumoral (23). Asimismo la afectación ganglionar metastásica ha sido clásicamente otro de los factores pronósticos independientes más importantes. Hasta 1997 el estadio N de la Clasificación TNM era determinado en base a la localización anatómica de los ganglios linfáticos infiltrados por el tumor. A pesar de la relevancia pronóstica de este dato, la dificultad de su validación y su falta de reproducibilidad entre estudios motivó su sustitución en esa fecha por una clasificación basada en el número de ganglios afectados por el tumor (96). Esta nueva categorización sigue siendo un marcador pronóstico válido e independiente, existiendo una relación directa entre el número de ganglios infiltrados y el pronóstico del paciente (133). De esta manera los enfermos sin evidencia de invasión ganglionar (N0) presentan índices de supervivencia del 80% a los 5 años del diagnóstico. Esta cifra que desciende al 35% en los casos N1 (1 a 6 ganglios afectos), al 15%-20% en los casos N2 (de 7 a 15 ganglios afectos) e incluso es inferior al 5% en los casos con infiltración tumoral más extensa N3. Estas diferencias son en todos los casos estadísticamente significativas.

Junto con el número total de ganglios afectos se ha descrito el valor pronóstico del ratio de ganglios linfáticos metastásicos (número de ganglios infiltrados dividido por el

número total de ganglios aislados). Este factor pronóstico parece ser tan importante como el número total de ganglios y más exacto a la hora de valorar la infiltración tumoral ganglionar en cada paciente (149, 150). La probabilidad de encontrar ganglios linfáticos afectados aumenta con el número de ganglios linfáticos resecados e identificados en la pieza quirúrgica, lo cual está directamente relacionado con la extensión de la linfadenectomía realizada (72) y ello se relaciona directamente con la supervivencia (151). Se ha sugerido que el número total de ganglios identificados debe ser mayor de 15. Los pacientes con un ratio menor de 0.2 tienen un mejor pronóstico (rangos descritos en la literatura de 0.10 a 0.30) (152-154).

La existencia de metástasis hepáticas y/o de carcinomatosis peritoneal en el momento del diagnóstico constituye un factor de mal pronóstico incluso cuando se ajusta de acuerdo a otras variables como la realización o no de cirugía o el tipo histológico. El índice pronóstico del Hospital Royal Marsden para cáncer gástrico metastásico identificó las metástasis hepáticas y las metástasis peritoneales como 2 factores clínicos independientes asociados a un peor pronóstico (155, 156).

6.1.9. NIVELES PREOPERATORIOS DEL ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNARIO
--

Los pacientes con niveles elevados del Antígeno Carcinoembrionario (CEA) en plasma obtenido antes de una intervención quirúrgica con intención curativa tienen un peor pronóstico que aquellos con niveles más bajos. Este factor permanece significativo cuando se analiza ajustado a otros marcadores pronósticos conocidos (157, 158).

6.1.10. FACTORES RELACIONADOS CON EL TRATAMIENTO

La persistencia tumoral tras una exéresis quirúrgica, bien en forma microscópica (resección R1) o macroscópica (resección R2); es un indicador de mal pronóstico independiente del resto de características clínico-patológicas. Los pacientes con cirugías incompletas presentan una supervivencia escasamente superior a la de los pacientes metastásicos desde el diagnóstico inicial (159). Algunos estudios han destacado la experiencia del cirujano y del centro en el que se lleva a cabo la gastrectomía como factores pronósticos determinantes en cáncer gástrico. En estos trabajos se ha

comprobado como la mortalidad operatoria desciende un 41% y el riesgo de muerte un 7% por cada incremento de 10 casos por año en la experiencia del cirujano (160). Este carácter pronóstico de la experiencia del cirujano resulta significativo incluso cuando se analiza dentro de centros con amplia experiencia y un número elevado de casos por año (161).

6.2. FACTORES MOLECULARES

En las últimas décadas diversos estudios han destacado el papel que las alteraciones genéticas tienen en el desarrollo y progresión del cáncer gástrico (162). Actualmente se conoce como las alteraciones moleculares en CG son diferentes dependiendo del subtipo histológico, así como de las diferentes etiopatogenias implicadas en esta neoplasia (122). El conocimiento de la patología molecular del CG nos permite entender mejor la patogenia de la enfermedad, obtener marcadores pronósticos moleculares, algunos de los cuales tienen asimismo valor predictivo cuando se administra un tratamiento sistémico, y llevar a cabo estrategias terapéuticas adecuadas al pronóstico y a la respuesta esperada (163-165).

Diversos estudios han tratado de identificar un perfil molecular con valor pronóstico aplicable a la práctica clínica de los pacientes con CG. Cho *et al.* identificaron un conjunto de 6 genes (*CTNNB1*, *EXOSC3*, *TOP2A*, *LBA1*, *LZTR1* y *CCL5*), cuyo patrón de expresión se correlacionó con el pronóstico de los pacientes con CG, fácilmente aplicable en la clínica mediante qRT-PCR. Su carácter retrospectivo y la falta de datos sobre su valor predictivo de respuesta a los tratamientos que puedan modificar el pronóstico de los pacientes, obliga a explorarlo con carácter prospectivo dentro de ensayos clínicos (165).

6.2.1. ALTERACIONES DE P53

El gen supresor tumoral *TP53* codifica una proteína nuclear que juega un papel fundamental en la progresión tumoral regulando la reparación del ADN, la división celular y la apoptosis. Una baja tasa de apoptosis y una alta proliferación celular son factores importantes en el desarrollo del CG y la sobreexpresión de p53 podría ser esencial

para controlar la carcinogénesis. Sin embargo, el papel de p53 como factor pronóstico en CG no está definitivamente establecido y los trabajos publicados presentan resultados contradictorios, habiéndose empleado técnicas, anticuerpos y métodos de interpretación distintos en cada serie (**163, 166, 167**). La inducción de expresión de la proteína p21 por el gen *TP53* provoca un bloqueo del ciclo celular en la fase S mediante la fosforilación de quinasas dependientes de ciclinas. Esta relación fue estudiada como posible factor pronóstico en un estudio que concluyó como los pacientes con tumores sin sobreexpresión de p53 pero sí de p21 presentaban una mediana de supervivencia superior a los casos que sobreexpresan ambos genes simultáneamente (**168**).

6.2.2. E-CADHERINA Y B-CATENINA

El gen *CDHI* codifica la proteína E-cadherina, molécula esencial para mantener la adhesión intercelular en las células epiteliales. La disfunción de E-cadherina es uno de los factores más importantes en el proceso de iniciación y progresión del CG (90% de los casos). Sin embargo, sólo la presencia de alteraciones estructurales en E-Cadherina (10% de los casos) representa un factor de mal pronóstico (**169, 170**). Su pérdida de expresión se ha demostrado en muchos tipos de neoplasias malignas incluyendo el CG, proponiéndose la metilación del promotor del gen *CDHI* o un polimorfismo del mismo como causas de esta pérdida (**171**). Se ha postulado la existencia de una relación inversa entre la expresión de E-cadherina y el pronóstico, siendo éste más favorable en los casos de expresión normal de esta proteína, junto con ausencia de expresión de MUC-1 (antígeno de mucina) (**172, 173**). También se ha propuesto la metilación de *CDHI*, entre otras alteraciones epigenéticas, como factor de mal pronóstico en pacientes con CG (**174**). Asimismo se ha publicado un trabajo que muestra como en cáncer gástrico existe una expresión anormal de E-cadherina y de β -catenina en un 46% y 44% de casos respectivamente, apareciendo más frecuentemente entre los casos de tipo histológico difuso de la clasificación de Laurén (**175**). De manera similar se ha demostrado una correlación significativa entre la expresión anormal de β -catenina y la existencia de metástasis ganglionares. Ésta expresión alterada de E-cadherina y de β -catenina se encuentra en un 16% y 36% de los casos de displasia gástrica, sugiriendo que pueden ser eventos precoces en el proceso de tumorigénesis gástrica. La correlación entre la acumulación de β -catenina y una pobre supervivencia la dan un carácter pronóstico que está pendiente de validación en serie más amplias de casos (**163**).

6.2.3. INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

La deficiencia en los mecanismos de de reparación del ADN da lugar a un fenotipo conocido como inestabilidad de microsatélites, en el que las células acumulan errores genéticos en vez de corregirlos. Este fenómeno aparece en el 18-31% de casos de cáncer gástrico esporádico (169, 176). Aunque en esta neoplasia no se han demostrado mutaciones somáticas en los denominados *Mismatch Repair Genes* (MMR) como *hMLH1* o *hMSH2*, los tumores gástricos con MSI presentan una pérdida de expresión de la proteína *hMLH1* probablemente relacionada con una hipermetilación de la región del gen promotor de *hMLH1* (177).

El CG con alta frecuencia de inestabilidad de microsatélites presentan características clínico-patológicas diferenciadas como son una mayor frecuencia de localización antral, subtipo histológico intestinal, seropositividad para *H. pylori* y menor incidencia de metástasis ganglionares (178, 179).

Numerosos estudios han investigado la asociación entre inestabilidad de microsatélites y pronóstico en CG con resultados discordantes. Algunos de estos estudios muestran que la presencia de inestabilidad de microsatélites se asocia a un comportamiento menos agresivo y un pronóstico más favorable. (164, 174, 180). Sin embargo, a día de hoy el estatus MSI aún no puede ser empleado como un marcador pronóstico independiente en CG.

6.2.4. FAMILIA DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO

EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR, HER1)

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, HER1) se expresa aproximadamente en un tercio de los casos de adenocarcinoma gástrico (181, 182). La expresión de EGFR por IHQ o la positividad por hibridación *in situ* fluorescente y la presencia de un alto número de copias se han asociado con la presencia de metástasis ganglionares, alto grado y peor supervivencia (181-184). En el estudio de Lieto *et al.*, en el análisis univariante la supervivencia enfermedad-específica a los 5 años fue del 73%

vs. 40% en los pacientes EGFR negativos frente a los positivos (HR de muerte 0.35, IC95% 0.13-0.75). En este estudio, la intensidad de expresión de EGFR no se asoció con los resultados a largo plazo. En el análisis multivariante, sólo la positividad por IHQ se identificó como factor de mal pronóstico (**181**). Sin embargo, otros estudios indican que la expresión de EGFR podría ser incluso un factor de buen pronóstico (**185**) o incluso no asociarse al pronóstico (**186**).

HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR 2 (HER2)

El oncogén *HER2/neu* es uno de los cuatro componentes de la familia de receptores transmembrana tipo 1 con actividad tirosina quinasa (Familia Erbb). En ella se incluyen junto a *HER2/neu (ERBB2)*: *EGFR* o *HER1 (ERBB1)*, *HER3 (ERBB3)* y *HER4 (ERBB4)*. La amplificación de *ERBB2* y la sobreexpresión de HER2 han sido ampliamente estudiada en cáncer de mama, siendo un biomarcador pronóstico establecido en esta patología. El protocolo aceptado para determinar alteraciones de HER2 consiste en el uso de técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos específicos y técnicas de hibridación *in situ* (hibridación *in situ* fluorescente –FISH-, hibridación *in situ* cromogénica –CISH-, o hibridación *in situ* argéntica –SISH-). Los tumores 3+ por IHQ se consideran HER2 positivos; aquellos con 2+ por IHQ requieren confirmación por FISH, CISH o SISH; y aquellos con IHQ <+2 se consideran HER2 negativos. Usando sistemas de determinación similares la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* se ha observado también en cáncer de pulmón, estómago y ovario (**169, 187**). En cáncer gástrico la sobreexpresión de HER2 o la amplificación de *ERBB2* se ha reportado en el 7-34% de los casos (**187-189**), especialmente en aquellos de localización en la unión gastroesofágica y en el subtipo intestinal de la clasificación de Laurén (**104, 189**). En el estudio ToGA el porcentaje de casos de adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal con sobreexpresión o amplificación positiva alcanzó el 32.2% del total, mientras que los casos con resultados positivos y de tipo histológico difuso fueron el 6.1%, diferencia estadísticamente significativa (p =0.001). Y respecto a la localización, en este ensayo clínico la incidencia de casos positivos y localizados en la unión gastroesofágica fue del 33.2%, frente al 20.9% de casos con sobreexpresión/amplificación entre los tumores de otras localizaciones, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (p<0.001) (**104**).

El valor pronóstico de HER2 en cáncer gástrico es todavía controvertido. Hay publicaciones que indican que la amplificación de *ERBB2* se asocia con un peor pronóstico y mayor agresividad de la enfermedad (**72, 187, 190, 191**), mientras otros estudios no encuentran diferencias estadísticamente significativas (**192, 193**). En el estudio finlandés publicado en 2005 se analizó la relación entre la amplificación de *ERBB2* medida por CISH y la evolución de 231 pacientes intervenidos por cáncer gástrico o cáncer de la unión gastroesofágica. La presencia de amplificación de *ERBB2* se asoció con una supervivencia global menor (12.7 meses no amplificados vs. 6.6 meses amplificados) pero no alcanzó la significación estadística ($p=0.37$) (**189**). Por el contrario, un estudio coreano publicado en 2006 y que analizó la sobreexpresión de HER2 por IHQ y la amplificación del oncogén por CISH y FISH en un grupo de 186 pacientes sometidos a cirugía con intención curativa, sí encontró una relación estadísticamente significativa entre la presencia de *ERBB2* amplificado y una supervivencia global menor (supervivencia global a los 5 años, 21% vs. 63% en los no amplificados $p<0.05$) (**191**). El trabajo de Grabsch que analiza la expresión de HER2 en 924 casos procedentes de dos series independientes (una alemana y otra inglesa) y que se realizó de manera estandarizada empleando el anticuerpo anti-HER2 CB11 y usando Dako Envisión Kit® como método de detección, muestra, además de una gran heterogeneidad intratumoral, una mayor incidencia de sobreexpresión de HER2 en los casos de tipo intestinal en la clasificación de Laurén, sin que esta sobreexpresión esté relacionada de manera significativa con ningún otro parámetro clínico-patológico ni con la supervivencia global de los pacientes (**193**). Asimismo, un estudio reciente publicado en 2013 indica que el estado de HER2 no es tampoco un biomarcador pronóstico independiente en adenocarcinoma esofagogástrico en estadio precoz (**194**).

Las diferencias en los resultados probablemente están relacionados con el uso de diferentes metodologías o sistemas de clasificación para definir el estado HER2 positivo. Los CG son más heterogéneos en el estado de HER2 en comparación con el cáncer de mama, teniendo un carácter más focal con captación membranosa incompleta (**195**). Basándose en el estudio de Hoffmann (**188**), que describe un sistema de clasificación del estado de HER2 específico para CG, se diseñó el estudio ToGA, el cual seleccionaba a los pacientes con IHQ 3+ o con positividad por FISH con ratio HER2/centrómero $17 \geq 2$. Las guías actuales recomiendan el estudio de HER2 inicialmente con IHQ, considerando positivo IHQ 3+ y negativo IHQ 1+. Las muestras con resultado 2+ deben estudiarse

mediante FISH, considerándose positivas aquellas con ratio HER2/centrómero $17 \geq 2$ (195). Un estudio reciente de Janjigiane *et al.* trató de vislumbrar si HER2 es un factor pronóstico en CG metastásico en países occidentales, empleando la metodología indicada anteriormente, y llegó a la conclusión de que el estado de HER2 por sí solo no es un factor pronóstico independiente (196).

6.2.5. ANGIOGÉNESIS Y RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR

La angiogénesis es el proceso por el que se generan nuevos vasos sanguíneos de forma incontrolada a partir de vasos preexistentes, promoviendo el crecimiento tumoral y las metástasis. Los miembros de la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) [VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y factor de crecimiento placentario (PGF)] están continuamente implicados en la angiogénesis tumoral (197, 198). VEGF se expresa en el 42-49% de los tumores gástricos (72, 181, 199). Altos niveles en suero de VEGF se han asociado a mayor carga tumoral y peor supervivencia (200, 201). Asimismo, niveles bajos de neurofilina-1, una glicoproteína transmembrana implicada en la angiogénesis que actúa como correceptor de VEGF, se han asociado a peor pronóstico (202).

6.2.6. RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO

La familia del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4) pertenece a la superfamilia de receptores tirosina quinasa. El estudio del número de copias mediante microarrays de alta resolución de polimorfismos de nucleótido simple (SNP arrays), encontró que el 9.3% de los CG presentaba una ganancia en el número de copias de *FGFR2*, siendo esto más común que en *EGFR* (7.7%), *HER2* (7.2%) o *MET* (4.3%). No se encontró una clara correlación entre la ganancia en el número de copias de *FGFR2* y la amplificación de *FGFR2* por FISH (109). Un estudio realizado en población caucásica y coreana, mostró mayor incidencia de amplificación de *FGFR2* en caucásicos (7.4%) que en coreanos (4.2%), asociándose en ambas poblaciones a la presencia de afectación ganglionar y a la histología difusa en el caso de la cohorte coreana (203). Algunos estudios señalan la amplificación de *FGFR2* como biomarcador pronóstico de peor supervivencia (204).

6.2.7. MET Y FACTOR DE CRECIMIENTO HEPATOCITARIO

MET es un receptor tirosina quinasa activado por el factor de crecimiento hepatocitario (HGF), que condiciona la activación de las vías PI3K/Akt y RAS, así como interactúa con las vías del EGFR y VEGFR. Las amplificaciones de *MET* se han visto implicadas en la resistencia a los inhibidores tirosina quinasa en cáncer de pulmón y diversas aberraciones en *MET* se han relacionado con la patogénesis del carcinoma renal y de otros tumores sólidos como el CG (205). La proteína MET se sobreexpresa en aproximadamente el 50% de los CG y el gen *MET* está amplificado en más del 20% de los casos (206, 207). La sobreexpresión de MET se ha asociado con la presencia de metástasis hepáticas (208). Son múltiples los estudios que muestran el papel pronóstico negativo de MET, habiéndose publicado recientemente un metaanálisis incluyendo 2258 pacientes, que confirma el impacto desfavorable de la sobreexpresión de MET sobre la supervivencia de los pacientes, con una HR de 2.57 (IC95%: 1.97-3.35) (209).

6.2.8. VÍA PI3K/AKT/MTOR Y PTEN

La vía fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K)-proteína quinasa B (PKB/Akt)- mammalian target of rapamycin (mTOR) es una vía con acciones antiapoptoicas y prosupervivencia, que regula funciones celulares como la proliferación, la supervivencia y la migración celular, siendo la vía final de convergencia de la activación de diversos receptores proteína quinasa. Se han observado mutaciones oncogénicas en *PIK3CA* (gen codificante de la subunidad catalítica α p110 de PI3K), que provoca la activación constitutiva de la vía PI3K/mTOR, con una frecuencia que oscila entre 5.1% y 25% según los estudios (169). Uno de esos estudios, reporta un 67% de amplificaciones de *PIK3CA* y lo asocia a un peor pronóstico, indicando que la mutación de *PIK3CA* es un mecanismo fundamental en la activación de la vía PI3K/mTOR en CG (210). Sin embargo, un reciente análisis de biomarcadores dentro de un ensayo clínico con carácter prospectivo muestra una tasa de mutaciones baja del 2.5-5% (211). Diversos estudios muestran que los pacientes con CG que presentan expresión anormal de PI3K/Akt/mTOR presentan con mayor frecuencia estadios avanzados de CG con menores tasas de supervivencia (212-214).

PTEN es un gen supresor tumoral, regulador negativo de la vía PI3K/Akt/mTOR. La infección por VEB induce la pérdida de expresión de PTEN por hipermetilación del

promotor, conduciendo a la activación de PI3K/Akt en el CG asociado a VEB (215). La pérdida de expresión de PTEN se correlaciona con la profundidad de la invasión, el grado de diferenciación, la presencia de metástasis ganglionares y el estadio clínico-patológico en el CG (216).

6.2.9. PD-1/PD-L1 Y PD-L2

PD-1/PD-L1/PD-L2 es una de las dianas emergentes en el campo de la inmunoterapia. Actúa como regulador de la respuesta inmune mediante la inhibición de células T tumor-específicas en el microambiente tumoral (217). Se ha observado que la expresión de PD-1 o PD-L1 es mayor en estadios avanzados y se asocia a peor pronóstico en CG (218). Recientemente se ha publicado la asociación entre una variante en el gen *PDCD1* que codifica PD-1 y el pronóstico en CG localmente avanzado (164). Se ha asociado la positividad de PD-1 como factor pronóstico desfavorable independiente de supervivencia libre de enfermedad (SLE) en pacientes con CG estadios II/III sometidos a cirugía con intención curativa (SLE a los 3 años: 36.1% vs. 64.7%, $p < 0.05$) y de riesgo de recaída tras la cirugía (RR 2.430, IC95%: 1.217–4.852), no alcanzándose la significación estadística en supervivencia global (SG) (219). Además tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en SLE ni SG según la expresión de PD-L1, por lo que todavía no está establecido si la positividad de PD-L1 es útil como marcador pronóstico en CG.

6.2.10. OTROS

CLAUDINA

La familia de las claudinas está constituida por al menos 24 tipos de proteínas transmembrana estrechamente relacionadas, que actúan como proteínas de unión celular, y que se emplean en el diagnóstico diferencial de diferentes tipos de neoplasias. Asimismo se ha visto que la expresión de ciertas claudinas puede emplearse como marcador pronóstico de diversos tipos de cáncer (220). Los datos de un metaanálisis que incluye 1265 pacientes con CG, muestra que la sobreexpresión de Claudina-4 se asocia a peor supervivencia (HR 2.01, IC95%: 1.62-2.50), estadio avanzado (OR 1.96, IC 95%:

1.08-3.56) y metástasis ganglionares (OR 1.72, IC95 %: 1.05-2.81) en pacientes con CG (221). La baja expresión de Claudina-18 se ha observado principalmente en el subtipo intestinal de CG y se ha asociado a un peor pronóstico (222). Claudina-18 ha sido definida como origen gástrico y Claudina-3 y Claudina-4 como intestinales en el caso del CG, y dicha clasificación parece ser un buen biomarcador para determinar el pronóstico (223).

ALK

Según los escasos datos disponibles, la frecuencia de expresión de ALK en CG es del 8.4% (224). Se ha asociado la sobreexpresión de ALK en CG al componente de células en anillo de sello y edad joven, tal como muestran los estudios en cáncer de pulmón (225). En el estudio de Chon *et al.* los pacientes ALK+ tienen un incremento del riesgo de recurrencia y muerte en el análisis multivariante (224).

FACTORES ASOCIADOS A LA APOPTOSIS

Bcl-2 es un protooncogén determinante de la susceptibilidad de la célula tumoral a la apoptosis y se ha asociado al pronóstico de los pacientes con cáncer gástrico avanzado (226, 227). Otros factores relacionados con la apoptosis como FasL y survivina también se han asociado a peor pronóstico en los pacientes con CG (228, 229).

CITOQUINAS

Los tumores gástricos producen diversos tipos de citoquinas, incluyendo IL-1, IL-6, IL-10, IL-11, TNF y CXC. Recientemente, se ha propuesto la activación de la vía GP130/JAK/STAT3 como factor pronóstico de pobre supervivencia en los pacientes con CG, asociado a vías de supervivencia y proliferación celular, angiogénesis y supresión del sistema inmune, siendo los niveles de IL-11 e IL-6 potenciales biomarcadores (230-232).

OTROS REGULADORES DEL CICLO CELULAR

Es conocido que cambios en los niveles de expresión de las ciclinas favorecen la proliferación celular tumoral. De los dos tipos de ciclinas evaluados (D1 y E), sólo la Ciclina E se considera un factor significativo como regulador del ciclo celular y un marcador pronóstico en cáncer gástrico (233). Por otro lado, la sobreexpresión de p53 se ha identificado como factor pronóstico desfavorable en pacientes con CG avanzado (234),

no siendo así en el caso de estadios precoces (235), tal como se comentó en apartados anteriores.

KRAS

Las mutaciones activadoras en *KRAS* están presentes en el 4% de los carcinomas gástricos, principalmente en el CG con MSI. (236). Una publicación reciente asocia la presencia de mutaciones en *KRAS* con peor pronóstico en pacientes con CG proximal, pero son necesarios más estudios para clarificar este punto (237).

MicroARN

Los microARN (miARN) pueden ser empleados como factores pronósticos, dado que se expresan de forma estable y robusta en los tejidos y en la circulación. En particular, los miARN se han asociado a supervivencia y estadio tumoral en CG, así como a recurrencia tumoral y metástasis ganglionares. El estudio de Ueda *et al.* (238) halló 22 miARNs sobreexpresados y 12 subexpresados, comparando 353 muestras tumorales con mucosa gástrica no tumoral. Identificaron que un nivel bajo de let-7g y miR-1433 y un nivel alto de miR-214 se asociaban a pronóstico desfavorable, independientemente de otros factores pronósticos clínico-patológicos. Otro estudio confirmó que altos niveles de miR-20a, miR-25, miR-93, miR-103, miR-106a, miR-106b, miR-130, miR-155, miR-221 y miR-222 en muestras de CG avanzado parecen ser factores de riesgo altamente asociados a penetración de la serosa, metástasis a distancia, afectación ganglionar y malos resultados a en supervivencia a largo plazo en pacientes sometidos a cirugía con intención radical y quimioterapia adyuvante (239). Otros estudios han identificado miARN circulantes como factores predictores de la supervivencia, sin embargo, son necesarios estudios prospectivos de mayor tamaño con cohortes independientes para poder validar y aplicar el análisis de miARN a la práctica clínica (174).

7. FACTORES PREDICTIVOS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER GÁSTRICO

Los factores o marcadores predictivos son aquellas variables genéticas, biológicas o moleculares que ayudan a predeterminar la posibilidad de obtener una respuesta a un tratamiento determinado. En muchos casos un mismo factor/marcador predictivo tiene también valor pronóstico en la enfermedad al correlacionar su presencia o ausencia con la respuesta terapéutica. En el cáncer gástrico se han identificado algunos de estos factores en relación con el tratamiento quimioterápico y, más recientemente, con el empleo de agentes dirigidos frente a dianas moleculares específicas.

7.1. TIMIDILATO SINTETASA

Timidilato sintetasa (TS) es uno de los enzimas clave en el control de la replicación del ADN y asimismo un objetivo de varios agentes antineoplásicos uno de los cuales es el 5-Fluorouracilo (5-Fu). Los datos preclínicos demostraron que la sobreexpresión de TS por las células tumorales determina la resistencia de las mismas al 5-Fu y a la Fluorodeoxyuridina (240, 241). A nivel clínico un estudio sobre 65 casos de cáncer gástrico tratado mediante quimioterapia neoadyuvante que incluía Cisplatino y 5-Fu en infusión continua demostró una correlación entre los niveles de ARNm de TS y la respuesta al tratamiento; encontrándose como 15 de los 28 pacientes (54%) con escasa expresión tumoral de TS respondieron al tratamiento mientras sólo 5 de 29 casos (17%) con niveles elevados de expresión de TS tuvieron una respuesta objetiva (242). Este trabajo fue corroborado posteriormente por otros estudios que determinaron la expresión tumoral de TS por inmunohistoquímica y en pacientes que sólo recibieron 5-Fu o Capecitabina en monoterapia, lo que elimina el posible sesgo por la interacción del Cisplatino en la serie inicialmente estudiada (243-245). La expresión de TS también se ha correlacionado con el pronóstico en pacientes sometidos a gastrectomías con intención curativa, adoptando entonces un carácter pronóstico y un posible papel a la hora de seleccionar los casos con indicación de tratamiento adyuvante (246, 247).

Se ha publicado también el carácter predictivo de la respuesta al tratamiento quimioterápido basado en 5-Fu de los niveles de Timidina Fosforilasa (TP) y Dihidropirimidin Deshidrogenasa (DPD) (247).

7.2. DIHIDROPIRIMIDIN DESHIDROGENASA

La dihidropirimidin deshidrogenasa (DPD) es la principal enzima en el catabolismo del 5FU, convirtiéndolo en un metabolito inactivo, el dihidrofluorouracilo (DHFU). Su valor como predictor de toxicidad a las fluoropirimidinas se encuentra establecido, por lo que su determinación se considera recomendada. Existe una variabilidad interindividual importante (8-21 veces) en el nivel de actividad de la DPD, correlacionándose niveles más bajos con una mayor toxicidad con las fluoropirimidinas (248). Entre un 4-7% de la población padece un síndrome de deficiencia de DPD que sólo se manifiesta cuando estos pacientes son tratados con fluoropirimidinas, momento en el que desarrollan una importante toxicidad (gastrointestinal, hematológica y neurológica) que puede ser incluso letal (249). Si bien el valor predictor de toxicidad se encuentra establecido, la utilidad de DPD como biomarcador de respuesta a las fluoropirimidinas no está clara (250). Es conocido que los pacientes con CG difuso presentan una peor respuesta a la quimioterapia comparada con otros subtipos histológicos. El ensayo FLAGS, que evalúa S-1 y Cisplatino vs. 5-Fu y Cisplatino en CG avanzado, evidenció diferencias en la respuesta según el tipo histológico en el análisis por subgrupos. Los resultados mostraron una mayor SG en pacientes con CG de histología difusa cuando se trataron con S-1 y Cisplatino en comparación con 5-Fu y Cisplatino (251). La expresión de DPD en tejidos de adenocarcinoma gástrico de histología difusa es mayor que en los casos de histología no difusa. En el análisis por subgrupos S-1 fue más efectivo que 5-Fu en pacientes con alta expresión de DPD. (252, 253). Estos resultados sugieren que una mayor expresión intratumoral de DPD podría condicionar mejor respuesta a las fluoropirimidinas que incorporan un inhibidor de DPD, como son el UFT o el S1, que a aquellas que no lo incorporan, como el 5-Fu, la Capecitabina o el Ptegafur. Sin embargo, actualmente con los datos que disponemos no es recomendable la determinación de DPD como marcador predictivo de respuesta fuera de ensayos clínicos, aunque sí lo sea como predictor de toxicidad.

7.3. E-CADHERINA

A nivel preclínico E-cadherina es un marcador predictivo de respuesta a diversos tratamientos. Su alteración reduce la sensibilidad de la célula tumoral a las terapias convencionales y nuevas terapias dirigidas por adquisición de una resistencia a la apoptosis (254, 255). Destacan los estudios preclínicos que sugieren un papel fundamental de la expresión de E-cadherina en la sensibilidad de las células tumorales a los agentes inhibidores de EGFR (255-259). Su papel como biomarcador predictivo a nivel clínico requiere su validación prospectiva dentro de ensayos clínicos.

7.4. INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

Aunque diversos estudios han analizado la relación entre MSI y los beneficios del tratamiento quimioterápico adyuvante basado en 5-Fu en el cáncer de colon (260), los datos en cáncer gástrico son limitados con resultados contradictorios (261, 262).

7.5. FAMILIA DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO

7.5.1. EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR, HER1)

Además de su carácter pronóstico en cáncer gástrico, se ha estudiado la sobreexpresión de EGFR como posible factor predictivo de respuesta al tratamiento con fármacos dirigidos específicamente frente a esa vía. A pesar de los resultados negativos de los primeros ensayos clínicos que emplearon pequeñas moléculas dirigidas frente al dominio intracelular del EGFR (Erlotinib y Gefitinib), numerosos estudios siguen explorando el bloqueo de esta vía de señalización mediante el empleo, por ejemplo, de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a la porción extracelular del receptor. Rojo F *et al.* estudiaron por inmunohistoquímica la expresión de EGFR, pEGFR (la forma activada por fosforilación del receptor), pMAPK, pAKT y Ki67; en muestras obtenidas antes y después del tratamiento con gefitinib (263). Encontraron expresión de EGFR en el 62,5%

con una reducción significativa de los niveles de pEGFR tras el tratamiento con Gefitinib. A pesar de ello sólo se observó un descenso en la proliferación celular en los casos con niveles bajos de pAkt, lo que induce a pensar en el papel fundamental de la vía de PI3K/Akt y su correlación con EGFR como regulador de la respuesta o resistencia a los inhibidores de EGFR.

Datos de diferentes estudios sugieren que la expresión de EGFR, el número de copias de *EGFR*, la expresión de ligandos de EGFR como epirregulina y amfiregulina, o un descenso en los componentes de esta vía de señalización, podrían ser biomarcadores candidatos para la eficacia de los anticuerpos dirigidos frente a EGFR (264, 265). El valor pronóstico y predictivo de EGFR ha sido ya demostrado en el estudio FLEX en cáncer de pulmón no microcítico (266). Este estudio muestra que niveles de alta expresión de EGFR es un biomarcador que puede predecir el beneficio en supervivencia al añadir cetuximab a la quimioterapia.

En cáncer gástrico el tratamiento con pequeñas moléculas inhibitoras de tirosina quinasa contra EGFR, como Lapatinib y Erlotinib, se ha explorado en diversos ensayos clínicos. Sin embargo, el tamaño muestral ha sido pequeño y los pacientes no han sido seleccionados según la sobreexpresión o amplificación de *EGFR* (267). Igualmente en los estudios EXPAND y REAL 3 los anticuerpos contra EGFR Panitumumab y Cetuximab no han mostrado beneficio en supervivencia global en cohortes no seleccionadas (268, 269).

7.5.2. HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR 2 (HER2)

A pesar de su dudoso valor pronóstico, se ha demostrado el papel predictivo de HER2 en cáncer gástrico y de la UGE. Diversos agentes dirigidos frente a HER2 están siendo investigados en cáncer gástrico.

De todos los agentes dirigidos frente a HER2 Trastuzumab (Herceptin®) es el fármaco mejor conocido y con un desarrollo clínico más amplio hasta la fecha. Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado de la clase IgG1 dirigido frente a la porción extracelular del HER2, cuyos mecanismos de acción podemos resumir en:

1. Inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Las células con sobreexpresión de HER2 a las que se ha unido Trastuzumab van a experimentar

citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos por activación de células *natural killer*. Esto explica que las células con mayor sobreexpresión de HER2 presenten mayor sensibilidad a Trastuzumab.

2. Promover de la degradación de HER2. La unión de Trastuzumab a HER2 promueve la internalización y degradación del receptor a través de la activación de la ubiquitina-ligasa c -Cbl **(270)**.
3. Interferir con las vías de señalización intracelular de MAPK y PI3K/Akt/mTOR implicadas en el crecimiento celular, proliferación y supervivencia celular de forma directa o indirecta. Algunos de los mecanismos descritos describen a continuación. La interferencia de la dimerización de HER2 mediante la unión de Trastuzumab al dominio extracelular inhibe la activación de HER2 y la fosforilación de Akt **(271)**. Otros grupos describen que Trastuzumab bloquea la activación de la tirosina quinasa Src, lo cual induce el aumento de expresión de PTEN y la disminución de la actividad de la vía PI3K/Akt **(272)**.
4. Impedir la formación de la forma truncada p85HER2 al interferir la acción de las metaloproteínas de la matriz extracelular sobre la porción extracelular del receptor **(273)**.
5. Inhibir la activación de las rutas dependientes de HER2 impidiendo la transcripción de genes implicados en mecanismos de angiogénesis tumoral, como por ejemplo la transcripción y posterior aumento de niveles de VEGF **(274)**.

El principal estudio que ha establecido la utilidad de añadir Trastuzumab a la primera línea de quimioterapia basada en la combinación de fluoropirimidina y platino en pacientes con cáncer gástrico o de la unión gastroesofágica avanzado HER2 positivo, es el estudio fase III ToGA **(104)**. Se analizó el estado de HER2 en 3.807 pacientes, el 22,1% fueron HER2 positivos y 584 pacientes aleatorizados a recibir quimioterapia sola o con Trastuzumab. En el brazo con Trastuzumab se observó un aumento estadísticamente significativo en el objetivo principal del estudio, que era la supervivencia global (mediana 13.8 meses vs. 11.1 meses, HR 0,74, p=0.0048), y también en las respuestas (47.3% vs. 34.5%, p=0.0017). Hemos de destacar que en el estudio ToGA se consideraban como HER2 positivos (criterio de inclusión) los casos con IHQ 3+ y/o FISH+. Sin embargo, cuando en un análisis de subgrupos preplanificado se determinó el beneficio en supervivencia con la adicción de Trastuzumab según el tipo de positividad de HER2, se

observó que no había beneficio cuando el FISH era positivo pero tenían IHQ negativa o IHQ 1+ (22,8% de los pacientes incluidos; HR: 1.07; IC95%: 0.7-1.62). El beneficio fue más evidente en los pacientes con alta sobreexpresión de HER2 definidos como IHQ 3+ (muy alta expresión) o IHQ 2+ y FISH positivo (alta expresión), con medianas de supervivencia global de 17.9 y 16 meses respectivamente (104). Ante estos resultados la Agencia Española del Medicamento (AEM) y la *European Medicines Agency* (EMA) aprobaron el uso de Trastuzumab en combinación con quimioterapia como tratamiento estándar en primera línea en CG avanzado HER2 positivo, considerando como HER2 positivo IHQ 3+ o IHQ 2+ con FISH positivo. El artículo publicado en 2013 por Gómez-Martín C *et al.* sugiere que en pacientes con adenocarcinoma gástrico avanzado HER2 positivo por los criterios habituales, tratados con Trastuzumab en primera línea, el nivel de amplificación de *HER2* (SISH o FISH) predice la respuesta y la supervivencia de forma más precisa y propone que, si se validan estos hallazgos en otros estudios, la amplificación de *HER2* sea el criterio de selección para tratamiento con Trastuzumab (105). Este estudio identificó el valor 4.7 en el ratio *HER2/CEP17* como punto de corte óptimo para la identificación de los pacientes sensibles o refractarios a Trastuzumab.

También se ha investigado el papel en cáncer gástrico de otros inhibidores de HER2. Lapatinib es un inhibidor oral tirosina quinasa de EGFR1 y HER2. En el estudio TRIO-013/LOGIC que exploró la combinación de Lapatinib con Capecitabina y Oxaliplatino en primera línea, el objetivo primario de supervivencia global fue negativo, y no se evidenció ningún biomarcador que delimitara un subgrupo en el que el beneficio fuera significativo (275). Sin embargo, en el estudio TYTAN de Lapatinib en segunda línea, en el que se vio sólo una tendencia hacia mejor supervivencia no estadísticamente significativa, en el análisis de subgrupos preplanificado, sí que se aumentó significativamente la supervivencia en los pacientes con HER2 IHQ 3+, no estableciéndose el papel de la amplificación o sobreexpresión de EGFR (276). A colación de estos resultados, en la actualidad no existe un biomarcador predictivo de beneficio a Lapatinib en el tratamiento del CG. Trastuzumab-emtansina (T-DM1) es un fármaco que conjuga Trastuzumab y DM1, un potente agente antimicrotúbulo. Cuando DM-1 se une a HER2, una proporción de receptores son internalizados en el proceso de endocitosis del receptor, con la consecuente liberación intracelular de DM1 y muerte celular. Actualmente T-DM1 está aprobado para el tratamiento del cáncer de mama metastásico HER2 positivo que ha progresado a otras terapias anti-HER2 (277). En cáncer gástrico HER2 positivo, T-DM1

mostró alta efectividad en modelos preclínicos (278). El estudio fase II/III con T-DM1 en segunda línea de CG avanzado, cuyos resultados preliminares han sido publicados en el Simposium de Tumores Gastrointestinales de la Sociedad Americana de Oncología en 2016 (ASCO GI 2016), muestra ausencia de beneficio de T-DM1 frente a taxanos (Paclitaxel o Docetaxel) (279). No han sido publicados los resultados sobre el análisis de biomarcadores. A día de hoy tampoco existen datos sobre el estudio de biomarcadores para el tratamiento con Pertuzumab. Pertuzumab es un anticuerpo monoclonal que se une a HER2 en lugar diferente a Trastuzumab, impidiendo la dimerización del receptor, y que ha sido aprobado en el tratamiento del cáncer de mama metastásico y neoadyuvante (72, 280-282). En cáncer gástrico, diversos estudios están explorando su papel tanto en el contexto metastásico como perioperatorio (NCT01774786, NCT01461057, NCT02205047, NCT02581462, NCT02581462).

En un intento por definir aún mejor los pacientes subsidiarios de beneficiarse del tratamiento anti-HER2, sería interesante valorar la posible utilidad de otros potenciales biomarcadores diferentes a la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2*, pero de momento no se cuenta con datos establecidos en la práctica clínica en este sentido (283, 284). Los mecanismos de resistencia a las terapias anti-HER2, especialmente a Trastuzumab, han sido ampliamente estudiados en cáncer de mama (284, 285) y comienzan a dilucidarse en cáncer gástrico. Podemos clasificar los mecanismos de resistencia en 3 grupos:

1. Efectos estéricos. Las mutaciones en *HER2* pueden inducir la proteólisis del dominio extracelular generando una isoforma truncada de HER2 denominada p95HER2, con actividad quinasa constitutiva (286). También se ha correlacionado la expresión elevada de Mucina 4, una glicoproteína de membrana que recubre el dominio extracelular de HER2, con la resistencia a Trastuzumab (287).
2. Aumento de expresión de otros receptores tirosina quinasa. Dado que Trastuzumab no previene la hetero-dimerización de HER2/HER3 dependiente de ligando, la sobreexpresión de HER3 puede compensar la inhibición de HER2 por Trastuzumab y conducir a la activación de las cascadas de señalización intracelular (288). La sobreexpresión de EGFR también ha sido postulada como mecanismo de resistencia a Trastuzumab, aunque los datos clínicos no clarifican este aspecto (288-290). Diversos estudios *in vitro* muestran que la interacción

entre HER2 e Insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-R1) se encuentra implicada en la resistencia celular a Trastuzumab. La inhibición de la actividad tirosina quinasa de IGF-R1 disminuye la fosforilación de HER2 y restaura la sensibilidad a Trastuzumab en estudios preclínicos (291, 292). De igual forma, la sobreexpresión de c-MET se ha relacionado con la adquisición de resistencia a Trastuzumab (293, 294).

3. Alteración en rutas de señalización intracelular. En cáncer de mama la vía PI3K/Akt/mTOR parece tener un papel importante en la resistencia al tratamiento con Trastuzumab, aunque en el momento actual la mayoría de datos proceden de estudios preclínicos y estudios clínicos retrospectivos (285, 295). Nagata *et al.* publicaron que la pérdida de PTEN se presentaba en el 36% de los pacientes con cáncer de mama estadio IV HER2 positivo, y que los tumores con pérdida de expresión de PTEN mostraban peores tasas de respuesta a Trastuzumab (284, 296). Más tarde, otro grupo encontró que los pacientes con cáncer de mama tratados con Trastuzumab que mostraban mutaciones activadoras de *PIK3CA* presentaban menor supervivencia libre de progresión que aquellos sin mutaciones (297). Tanto la pérdida de expresión de PTEN como las mutaciones activadoras de *PIK3CA* resultan en una activación continua de la vía de señalización intracelular, independientemente del bloqueo de HER2. El estudio de biomarcadores del ensayo clínico CLEOPATRA demostró que la mutación de *PIK3CA* se relacionaba con peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo, y que la adición de Pertuzumab beneficiaba a todos los pacientes, independientemente del estado de *PIK3CA* (298). Queda por establecer cuál es el momento adecuado de la evolución de la enfermedad en la que actuar sobre esta vía y cuál es la diana molecular óptima, dado que existen diversos fármacos en desarrollo, desde inhibidores de mTOR hasta inhibidores de Akt o inhibidores específicos de diversas isoformas de PI3K (299). En cáncer esófago-gástrico los datos son más escasos, aunque existen algunos datos en el ámbito preclínico y estudios retrospectivos de pequeño tamaño que implican a la vía PI3K/Akt/mTOR en la resistencia a la terapia anti-HER2 también en esta patología y diversas estrategias terapéuticas con inhibidores de la vía están bajo investigación (300-304). Zhan *et al.* describen la alteración de la proteína SRC como factor central de la resistencia a Trastuzumab, dada su interrelación con receptores tirosina quinasa y la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, entre otras, proponiendo actuar

terapéuticamente inhibiendo SRC para actuar sobre varios mecanismos concomitantes de resistencia a la terapia anti-HER2 (272).

7.6. KRAS

En el caso del CG, a diferencia del carcinoma colorrectal, la presencia de mutaciones en KRAS se restringe principalmente a tumores con MSI (122, 305, 306). Teniendo en cuenta la asociación de resistencia a inhibidores de EGFR en cáncer colorrectal y en otros tipos tumorales, los resultados negativos del estudio EXPAND con Cetuximab asociado a quimioterapia en primera línea de CG avanzado pudieran estar asociados a la presencia de un 4-10% de mutaciones en KRAS (269), así como a la heterogeneidad intratumoral respecto a la presencia de clones con mutaciones de KRAS simultáneamente a clones no mutados (307). Son necesarios más estudios para determinar el papel predictivo de no respuesta a anti-EGFR de las mutaciones de KRAS en CG.

7.7. ANGIOGÉNESIS Y RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR

En cuanto al valor predictivo de los potenciales marcadores de la angiogénesis los resultados son discordantes. El ensayo clínico AVAGAST estudió el efecto en la supervivencia global de la adición de Bevacizumab a Capecitabina y Cisplatino, mostrando un beneficio en tasa de respuestas y supervivencia libre de progresión, sin beneficio significativo en supervivencia global. Dentro de este estudio se realizó un análisis por subgrupos para investigación de biomarcadores, incluyendo VEGF, VEGFR1, VEGFR2 y neurofilina-1. Este estudio no demostró el valor pronóstico ni predictivo de respuesta a Bevacizumab de los niveles de expresión de ninguno de los marcadores estudiados, aunque en población caucásica niveles altos niveles altos de VEGFA y bajos de neurofilina-1 se identificaron como factores potencialmente predictores de forma estadísticamente no significativa (202). Los recientes resultados positivos de los estudios REGARD y RAINBOW respecto a Ramucirumab, anticuerpo monoclonal frente a VEGFR2, en monoterapia y combinado con Paclitaxel en segunda

línea de CG avanzado, tampoco establecen un marcador predictivo de beneficio al tratamiento antiangiogénico (106, 107). Estudios preclínicos sugieren que una hiperactivación de las vías de PDGF y FGFR podría tratarse de un mecanismo de escape para la progresión durante el bloqueo VEGF-VEGFR (308, 309). Sin embargo, los estudios con los inhibidores multiquinasa Sorafenib y Sunitinib en cáncer gástrico avanzado han sido negativos en población no seleccionada, sin existir datos acerca de potenciales biomarcadores de beneficio a estos fármacos en el ámbito clínico (310, 311). De esta forma, desafortunadamente en la actualidad no disponemos de un marcador molecular que permita seleccionar a la subpoblación de pacientes con cáncer gástrico que se beneficia del tratamiento antiangiogénico.

7.8. RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO

Diversos agentes dirigidos frente a FGFR han demostrado eficacia en modelos preclínicos en líneas celulares y modelos animales (109, 312). Actualmente diversos inhibidores selectivos y no selectivos de FGFR2 (Dovitinib, Brivatinib, AZD4547) están siendo evaluados dentro de ensayos clínicos, por lo que su papel dentro del tratamiento del CG y su valor predictivo está por determinar (164).

7.9. MET Y FACTOR DE CRECIMIENTO HEPATOCITARIO

La sobreexpresión de MET se ha establecido como marcador predictivo de respuesta. Rilotumumab es un anticuerpo monoclonal dirigido frente al factor de crecimiento hepatocitario (HGF) que previene su unión al receptor tirosina quinasa MET. El ensayo clínico fase II que estudió la adición de Rilotumumab a la quimioterapia en primera línea de CG avanzado demostró un beneficio en supervivencia libre de progresión, como objetivo primario del estudio (313). El análisis de biomarcadores derivado de este estudio determinó que la sobreexpresión de MET es un marcador tanto pronóstico como predictivo. Los pacientes con alta expresión de MET que recibieron Rilotumumab y quimioterapia presentaron mayor supervivencia global en comparación con quimioterapia

sola (11.1 vs. 5.7 meses) (**314, 315**). Sin embargo, el ensayo clínico fase III RILOMET-1 tuvo que finalizar precozmente por aumento del número de muertes en el brazo de Rilotumumab en comparación con el de quimioterapia sola y sus resultados definitivos se encuentran pendientes de publicar (NCT01697072).

Los estudios con Foretinib (inhibidor oral de MET) y Onartuzumab (anticuerpo monoclonal que impide la unión de HGF a MET) han resultado negativos para sus objetivos primarios en población no seleccionada, incluso en pacientes con *MET* amplificado o elevación de pMET en tumor (**316, 317**).

En base a estos resultados, biomarcadores alternativos a la determinación inmunohistoquímica de MET deben ser explorados. Algunos autores señalan la amplificación de *MET* como un marcador molecular más apropiado para la selección de pacientes que podrían beneficiarse del tratamiento con inhibidores de MET. Datos preliminares indican que pacientes con amplificación de *MET* (<5% de los cánceres gástricos) pueden alcanzar respuestas completas con inhibidores de MET como Crizotinib o AMG337 (**207, 318**).

7.10. VÍA DE PI3K/Akt/mTOR y PTEN

Diferentes fármacos dirigidos contra PI3K/AKT/mTOR están siendo evaluados dentro de ensayos clínicos en CG, incluyendo inhibidores de PI3K, inhibidores de Akt e inhibidores de mTOR (**164, 319**). Los inhibidores de PI3K y de Akt han mostrado efectos prometedores en ensayos clínicos fase I-II, mientras que el ensayo clínico fase III GRANITE-1 con Everolimus fue negativo para supervivencia global en pacientes con CG avanzado en segunda o tercera línea de tratamiento (**320**). Se plantea si los resultados negativos de este estudio son debidos a una función limitada de la vía PI3K/AKT/mTOR en la progresión del CG, la ausencia de biomarcadores en la selección de los pacientes, la heterogeneidad de los pacientes incluidos o la escasa eficacia de la monoterapia con inhibidores de mTOR. Con la finalidad de buscar biomarcadores predictivos de respuesta a Everolimus están pendientes los resultados del análisis mediante métodos de secuenciación masiva de las muestras archivadas (**320**). Además, un ensayo clínico fase III está evaluando la eficacia de añadir Everolimus a Paclitaxel en pacientes previamente tratados con fluoropirimidinas (NTC01248403).

Tras los resultados del estudio del TCGA, parece tener mayor interés el estudio de los inhibidores de PI3K/Akt/mTOR en los pacientes con los subtipos VEB y MSI (122). Además, la activación constitutiva de PI3K causada por mutaciones activadoras de *PIK3CA*, expresión reducida de PTEN o desregulación de la señal puede inducir resistencia a la inhibición de HER2 (321), por lo que el uso combinado de fármacos frente a ambas vías podría ser una estrategia a seguir (322).

7.11. PD-1/PD-L1 Y PD-L2

La importancia del microambiente y del sistema inmune en cáncer gástrico es cada vez más patente, especialmente en el subtipo VEB según los resultados del TCGA, en el que se evidencia alta expresión de PD-L1 (122). Por este motivo, numerosos estudios con inmunoterapia (Pembrolizumab, Nivolumab, Tremelimumab, entre otros) se encuentran en marcha en cáncer gástrico, bien en monoterapia o bien en combinación con quimioterapia u otros agentes dirigidos como Ramucirumab.

La expresión de la molécula PD-L1 (B7-H1) ha sido ampliamente estudiada y relacionada con los resultados clínicos empleando diferentes puntos de corte mediante análisis inmunohistoquímico. Publicaciones recientes sugieren que la alta expresión de PD-L1 en las células inmunes asociadas al tumor se relaciona con mejor respuesta a fármacos anti-PD1/PD-L1 (323-325). En melanoma, los pacientes tratados con Nivolumab con expresión de PD-L1 $\geq 5\%$ presentaron una tasa de respuestas objetivas del 44%, frente al 13% de los pacientes PD-L1 negativos (324). En los estudios con Pembrolizumab en carcinoma no microcítico de pulmón, la tasa de respuestas se relacionó con la expresión de PD-L1, con tasas de respuestas del 45.2% en pacientes con PD-L1 fuertemente positivo (definido como expresión $\geq 50\%$) (326). En cáncer gástrico, los resultados preliminares del estudio fase 1b KEYNOTE-012 indican una posible relación entre la expresión de PD-L1 y los resultados clínicos (327). Sin embargo, diferentes estudios han resultado negativos para dicha correlación, corroborando también la respuesta a agentes anti-PD-L1 en pacientes con expresión negativa, lo que pone en entredicho su utilidad como biomarcador (328, 329). La disparidad de resultados podría deberse, al menos en parte, al uso de tests no estandarizados, así como a las posibles diferencias derivadas de la

heterogeneidad de las muestras empleadas en los diferentes estudios (biopsias en fresco frente a muestras conservadas en parafina) (324, 330).

Dados los resultados, en cáncer gástrico en el momento actual no podemos considerar que exista un biomarcador de respuesta establecido a los tratamientos con inhibidores de los puntos de regulación inmunológica.

8. TRATAMIENTO DEL CÁNCER GÁSTRICO

La resección quirúrgica del tumor primario y de los ganglios linfáticos locoregionales es a día de hoy el único tratamiento potencialmente curativo en el cáncer gástrico. En el éxito del tratamiento quirúrgico influyen no sólo la extensión de la enfermedad, sino también el tipo de cirugía practicada y la correcta selección de los pacientes. Los tratamientos adyuvantes y neoadyuvantes perioperatorios, incluyendo quimioterapia y/o radioterapia, han sido incorporados dentro del abordaje del cáncer gástrico para la enfermedad localmente avanzada e incluso en el contexto del cáncer gástrico precoz, sin embargo, aún no existe consenso acerca de cuál debe ser el esquema de tratamiento ni la secuencia. El tratamiento neoadyuvante ha demostrado conseguir la reducción del tumor primario permitiendo resecciones potencialmente curativas en casos inicialmente de reseabilidad dudosa, sin comprometer por ello la supervivencia a largo plazo del paciente. Cuando la enfermedad es metastásica el tratamiento sistémico con quimioterapia y/o agentes dirigidos ha conseguido mejorar la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes, aunque debemos seguir considerándolo un tratamiento paliativo. En estos casos, la radioterapia y la cirugía se emplean con una intención paliativa para evitar complicaciones asociadas al tumor, como pueden ser el sangrado o la obstrucción intestinal.

8.1. TRATAMIENTO DEL CÁNCER GÁSTRICO LOCALIZADO

8.1.1. TRATAMIENTO ENDOSCÓPICO DEL CÁNCER GÁSTRICO PRECOZ

Según la Clasificación Japonesa, el cáncer gástrico precoz es aquel cuya invasión tumoral está limitado a la mucosa o submucosa (T1), independientemente de la afectación ganglionar (85). En la séptima edición UICC-TNM los tumores T1 se dividen en T1a y T1b, según se encuentren limitados a la mucosa (invadiendo lámina propia o muscular de la mucosa) o invadan la submucosa (96). En el caso de que se emplee el concepto de cáncer gástrico precoz como el correspondiente al estadio I según la clasificación UICC-TNM, éste englobará a los tumores T1N0M0 (estadio IA), T1N1M0 y T2N0M0 (estadio IB), mientras que los tumores T1N2M0 y T1N3M0 se clasificarán como estadios más avanzados.

El riesgo de afectación ganglionar en tumores T1 es baja, especialmente en aquellos casos bien o moderadamente diferenciados, inferiores a 2 cm de diámetro y sin invasión de la submucosa ni de los linfáticos y vasos en la biopsia diagnóstica. Hölscher *et al.* compararon la frecuencia de metástasis ganglionares en pacientes con tumores pT1 en países asiáticos y europeos, siendo en Europa del 6.5% en carcinomas mucosos y del 23.9% en carcinomas submucosos, frente al 2.7% y 22.9% respectivamente en los pacientes asiáticos (331). Una de las causas de las diferencias en la afectación ganglionar en tumores pT1a puede ser la profundidad en la afectación de la mucosa (superficial o profunda), con mayor frecuencia de afectación superficial en los países asiáticos. La localización del tumor primario podría ser otro determinante, dado que en Asia son más frecuentes los tumores en el tercio medio e inferior del estómago, mientras que en países occidentales son más frecuentes los tumores de tercio superior (332, 333). Por otro lado, diferencias biológicas o cambios genómicos o epigenómicos podrían estar implicados, no encontrándose realmente bien estudiados, por lo que son motivo de futuros estudios.

Las opciones terapéuticas en el CG precoz varían desde la resección mucosa endoscópica (EMR), la disección endoscópica submucosa (ESD), la gastrectomía distal abierta o laparoscópica, hasta la gastrectomía con disección ganglionar radical. La resección completa puede ser casi siempre alcanzada mediante gastrectomía convencional y disección ganglionar, y clásicamente ha sido el gold estándar, consiguiendo excelentes resultados en el pronóstico de los pacientes en países asiáticos, pero también en países occidentales (334, 335). En los últimos 15 años la EMR ha sido considerada el tratamiento de elección en países con alta incidencia de CG como Japón. A pesar de la falta de estudios randomizados que comparen la resección endoscópica frente a cirugía abierta, una revisión exhaustiva de este procedimiento ha demostrado su eficacia y seguridad, lográndose supervivencias libres de enfermedad superiores al 95 % a los 10 años, con tasas de recidivas locales inferiores al 6% y un perfil de complicaciones aceptables e inferiores a las que presenta la cirugía tradicional (0.6% perforaciones, 14% sangrado post-resección) (336, 337). La baja frecuencia de cáncer gástrico precoz en nuestro medio y la alta frecuencia de metástasis ganglionares, la dificultad para descartar radiológicamente la afectación ganglionar, junto con la falta de ensayos clínicos randomizados, hacen que el estándar de tratamiento en países occidentales continúe siendo la gastrectomía, aunque la resección endoscópica se está introduciendo y muchos endoscopistas están extendiendo estas técnicas.

La *Japan Gastric Cancer Association* (JGCA) tras analizar múltiples especímenes quirúrgicos ha establecido una serie de indicaciones del tratamiento endoscópico, determinando que las lesiones deben ser 1) carcinoma intramucoso bien diferenciado menor de 2 cm de morfología elevada o, 2) carcinoma intramucoso menor de 1 cm de morfología deprimida sin ulceración, y además el tumor debe de poder ser completamente resecado en bloque (85). Debido a la naturaleza de la técnica, en lesiones de mayor tamaño, existe mayor tasa de excisión parcial y de recurrencias locales (338). Manner *et al.* concluyen que aunque la resección endoscópica en cáncer gástrico precoz es efectiva en países occidentales, ésta presenta un riesgo relevante de complicaciones (339).

8.1.2. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DEL TUMOR PRIMARIO

El tratamiento quirúrgico básico se centra en la realización de una gastrectomía total o subtotal, dependiendo fundamentalmente la elección de una u otra según la localización dentro del estómago del tumor primario y del tipo histológico (340). La gastrectomía total es el procedimiento recomendado en los casos de lesiones localizadas en el estómago proximal, en el tercio medio del mismo o en aquellos casos de tipo difuso en la clasificación de Laurén. En aquellos casos en que el tumor está localizado a nivel del estómago distal, la realización de una gastrectomía total no ha demostrado aportar ningún beneficio frente a la realización de gastrectomías subtotales. En este sentido varios estudios randomizados europeos con gran número de pacientes han concluido que la práctica de una gastrectomía subtotal logra una supervivencia global igual a la gastrectomía total, siendo notablemente menor la tasa de mortalidad operatoria (1% frente a 2%) y la tasa de complicaciones postquirúrgicas (9% frente a 13%), por lo que la gastrectomía subtotal se considera hoy en día la técnica quirúrgica de elección en aquellos casos de tumores localizados en el estómago distal (341, 342).

En todos los casos se recomienda la realización del análisis patológico microscópico de los márgenes de resección. En aquellos tumores con lesiones de patrón infiltrativo se debe lograr un margen quirúrgico proximal libre de tumor de 5 cm, pudiéndose reducirse este margen a 2 cm en los casos expansivos. A nivel distal el píloro parece actuar como una barrera natural y la infiltración del margen quirúrgico distal es excepcional, considerándose suficiente un margen de 2-3 cm (343).

En los últimos 15 años diferentes ensayos clínicos randomizados y metanálisis han sido publicados avalando la eficacia y seguridad de la gastrectomía asistida por laparoscopia (344-346). Recientemente se ha publicado un metaanálisis que incluye 1532 pacientes procedentes de 1 único ensayo clínico randomizado y 12 estudios observacionales, comparando la gastrectomía total laparoscópica frente a la gastrectomía abierta (347). Este metaanálisis concluye que el abordaje laparoscópico ofrece resultados equiparables respecto a número de ganglios linfáticos resecaados, tasas de recurrencia y supervivencia, con menor morbilidad postoperatoria y recuperación más rápida, aunque son necesarios más estudios randomizados y mayor seguimiento a largo plazo para asegurar resultados oncológicamente adecuados del abordaje completo laparoscópico en cáncer gástrico.

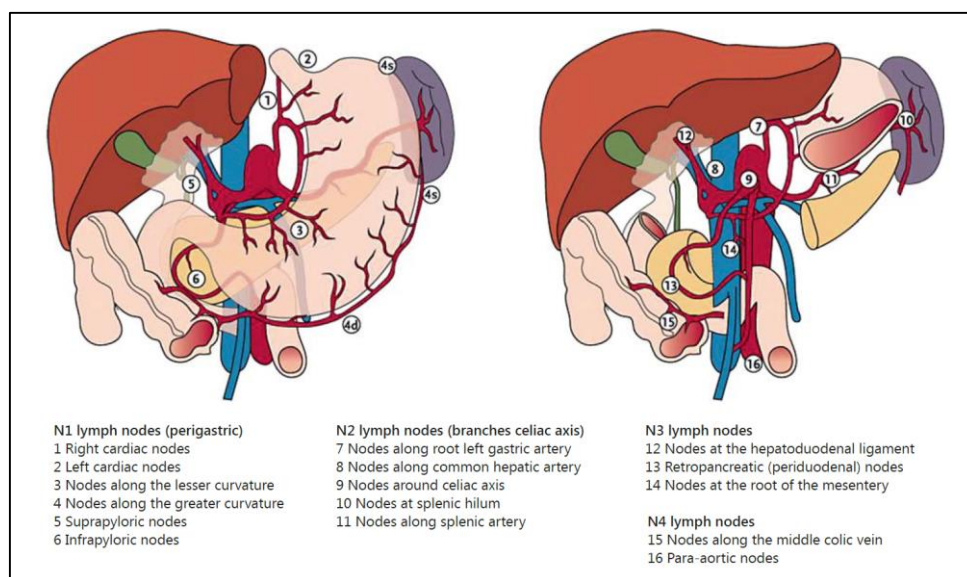
8.1.3. LINFADENECTOMÍA LOCORREGIONAL

La extensión de la linfadenectomía locoregional necesaria en la extirpación de un adenocarcinoma gástrico ha sido y es hoy en día motivo de debate. Desde la categorización por el JCGC de los ganglios linfáticos regionales en 16 estaciones diferenciadas (85), se han definido 4 tipos de linfadenectomías de acuerdo a los territorios extirpados (*Figura 5*):

- Linfadenectomía D1: resección de los ganglios localizados en las curvaduras mayor y menor gástricas (estaciones 1 a 6).
- Linfadenectomía D2: Resección D1 más exéresis de los ganglios a lo largo de la arteria gástrica izquierda, la arteria hepática común, el tronco celíaco, el hilio esplénico y la arteria esplénica (estaciones 7 a 11).
- Linfadenectomía D3: Resección D2 más exéresis de los ganglios situados en el ligamento hepatoduodenal (estación 12), la cara posterior de la cabeza de páncreas (estación 13) y la raíz del mesenterio (estación 14).
- Linfadenectomía D4: Resección D3 más linfadenectomía que incluye los ganglios paracólicos y paraaórticos.

La linfadenectomía D1 por tanto limita la exéresis a los ganglios del nivel N1 en la clasificación del JCGC, la linfadenectomía D2 incluye los niveles N1 y N2, y la linfadenectomía D3 abarca los niveles N1, N2 y N3.

Figura 5. Estaciones ganglionares definidas por el JCGC. Tomado de: De Steur et al. (348).



La extensión de la linfadenectomía a realizar ha sido y sigue siendo un tema controvertido, especialmente en los países occidentales. En Japón, y basándose en amplios estudios retrospectivos, el tratamiento quirúrgico considerado estándar es la gastrectomía acompañada de linfadenectomía D2 (349). Por el contrario, en los países occidentales sigue considerándose un tema controvertido su posible beneficio con respecto a la supervivencia del paciente. Esta controversia viene motivada por los resultados negativos obtenidos en cuatro ensayos randomizados que comparaban específicamente el impacto en la supervivencia de los pacientes que eran sometidos a una linfadenectomía D2 frente a aquellos que se limitaba la linfadenectomía al primer nivel ganglionar.

Los dos primeros estudios fueron realizados por Dent *et al.* (350) en Sudáfrica y por Robertson *et al.* (351) en Hong Kong. Dado su escaso tamaño muestral, se consideraron insuficientes y motivaron dos estudios amplios a nivel europeo. El primero fue realizado por el *British Medical Research Council* (MRC) (352) e incluyó 400 pacientes con cáncer gástrico resecable. Randomizados entre linfadenectomía D1 o D2, el grupo que fue sometido a la resección más amplia mostró una mayor mortalidad operatoria (13% vs. 6.5%, $p=0.04$) y mayores complicaciones postoperatorias (46% vs. 28% $p<.001$), sin obtener ningún beneficio en la supervivencia global (33% vs 35%, HR 1.10, IC95% 0.87–1.39). El segundo estudio fue llevado a cabo por el Grupo Holandés de Cáncer Gástrico (353) que incluyó 996 pacientes reclutados en 80 hospitales distintos. En este estudio,

tanto la morbilidad como la mortalidad postoperatoria fueron superiores en el grupo de linfadenectomía D2 (43% vs. 25% $p < 0.001$ y 10% vs. 4% $p = 0.004$ respectivamente). A pesar de un seguimiento extenso (11 años), los resultados a largo plazo de este estudio no han demostrado una mejoría en la supervivencia de los pacientes sometidos a linfadenectomía más extensa, aunque sí se ha observado un beneficio modesto en el subgrupo de pacientes con estadio II y IIIA según la clasificación TNM (354).

El origen de la controversia radica en que, a pesar de su mayor morbimortalidad en los estudios europeos, la linfadenectomía D2 permite lograr resecciones completas (R0) en aquellos casos con metástasis ganglionares en el segundo nivel (N2) y en los cuales una resección D1 sería insuficiente. La práctica de una linfadenectomía D2 es especialmente deseable si se tiene en cuenta que el 50% de los pacientes sometidos a este vaciamiento ganglionar amplio presentaban metástasis ganglionares en el nivel N2 que no se hubieran resacado con una linfadenectomía menos extensa (D1) (355). Por tanto, un porcentaje elevado de pacientes con afectación N2 pueden ser tratados quirúrgicamente con intención curativa sólo si se realiza un linfadenectomía extensa.

El análisis comparativo de la morbimortalidad entre ambos tipos de linfadenectomía en los diferentes estudios, ha permitido concluir que los excelentes resultados obtenidos en los centros japoneses (menos del 1% de mortalidad) sólo son igualados en los países occidentales por cirujanos con amplia experiencia en este tipo de intervenciones. La falta de experiencia quirúrgica en el ensayo británico y la realización rutinaria de esplenopancreatectomías distales en el ensayo holandés se han considerado factores fundamentales que contribuyeron al incremento de la morbimortalidad de las linfadenectomías D2 y a los resultados negativos obtenidos en ambos estudios (356).

Recientemente la Cochrane ha publicado un metaanálisis incluyendo 8 ensayos clínicos randomizados, con un total de 2515 pacientes, 5 de ellos comparando la linfadenectomía D1 frente a la linfadenectomía D2, y 3 estudios comparando la linfadenectomía D2 frente a D3 (357). Ninguno de los 3 estudios randomizados que comparaban la linfadenectomía D3 frente a D2 en pacientes japoneses mostraron beneficios en supervivencia global. En el análisis de la supervivencia global comparando la linfadenectomía D1 frente a una linfadenectomía extensa sólo uno de ellos mostró beneficios (349), siendo negativo el análisis global de los datos, así como el análisis por subgrupos según el origen europeo (HR 0.98, IC95% 0.86-1.12) o asiático (HR 0.77, IC95% 0.28-2.17) de los estudios. Sin

embargo, sí que se encontró una mejora en la tasas de supervivencia específica por enfermedad (HR 0.81, IC95% 0.71-0.92). La linfadenectomía D2 también se asoció a un aumento de la mortalidad postoperatoria, que en última instancia reduce el beneficio terapéutico. Como medida de los beneficios y riesgos asociados a la linfadenectomía D2 comparada con la D1 se describe la diferencia entre las muertes evitadas (71/1000) frente a las muertes causadas (38/1000) por la disección ganglionar extensa, lo cual se traduce en un beneficio neto de 33 muertes evitadas por cada 1000 linfadenectomías D2 realizadas **(357)**. En base a los resultados la mayoría de los expertos considera como práctica estándar actual la realización de linfadenectomía D2, aunque se debe practicar únicamente en centros y por cirujanos con amplia experiencia.

El impacto de la esplenectomía en la morbimortalidad perioperatoria y la supervivencia de los pacientes es otro tema de controversia. Tanto el estudio del MRC como el del grupo holandés que compararon linfadenectomía D1 vs. D2 mostraron un efecto negativo de la esplenectomía en la supervivencia de los pacientes.

Además de la realización de la esplenectomía, la pancreatectomía córporocaudal o distal permite asegurar una correcta exposición y limpieza de los linfáticos situados a los largo de la arteria esplénica. La práctica de la misma se demostró como un factor de riesgo de mayores complicaciones quirúrgicas en el estudio holandés antes mencionado y de mayor morbimortalidad y peor supervivencia en el estudio británico. Un análisis del subgrupo de pacientes de este último estudio que fueron sometidos a linfadenectomía D2 sin esplenopancreatectomía mostró una supervivencia global superior al grupo que se sometió a linfadenectomía D1. Recientemente se ha publicado un ensayo clínico randomizado específicamente diseñado a este respecto, comparando la linfadenectomía D2 modificada (sin pancreatoesplenectomía) frente a la linfadenectomía D2 clásica, evidenciando resultados similares en supervivencia libre de recidiva, con reducción de la morbimortalidad postoperatoria **(358)**.

En el momento actual se recomienda la realización de una linfadenectomía D2 modificada sin esplenectomía ni pancreatectomía distal, salvo en los casos de infiltración directa del bazo, engrosamiento macroscópico de los ganglios linfáticos del hilo esplénico o una infiltración directa del páncreas a través de la serosa gástrica.

8.1.4. TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO Y/O RADIOTERÁPICO EN ENFERMEDAD LOCALIZADA O LOCALMENTE AVANZADA POTENCIALMENTE RESEABLE

Junto a la cirugía, como único tratamiento potencialmente curativo en el CG localizado, se han incorporado diferentes secuencias de tratamiento quimioterápico y/o radioterápico perioperatorios en la enfermedad localmente avanzada y en estadios precoces de CG. Sin embargo, existe poco consenso acerca de cuál es la mejor estrategia y la terapia asociada a la cirugía va a variar según el área geográfica. Comparado con la cirugía sola, han demostrado beneficio en supervivencia en Asia los estudios con quimioterapia adyuvante, en Norteamérica el tratamiento con quimio-radioterapia adyuvante y en la mayoría de estudios europeos el tratamiento quimioterápico perioperatorio.

TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO PERIOPERATORIO

En los países occidentales la mayoría de los pacientes son diagnosticados con tumores localmente avanzados. En estos casos la práctica de una cirugía completa con márgenes quirúrgicos libres (R0) es posible sólo en la mitad de los casos, con más de un 60% de recaídas tumorales en los 3 años siguientes a la cirugía (359). En estos pacientes la administración de un tratamiento preoperatorio o neoadyuvante puede permitir la erradicación de metástasis ocultas (responsables del alto porcentaje de recidivas precoces a distancia) y la realización de cirugías completas con intención curativa en casos inicialmente no resecables o dudosos. Para ello es fundamental una estadificación correcta preoperatoria que permita definir con exactitud la profundidad de la infiltración tumoral de la pared gástrica y la afectación o no de los ganglios linfáticos locoregionales mediante ecoendoscopia, TC toracoabdominopélvica y/o PET-TC.

Diferentes estudios han sido publicados con anterioridad, pero el que ha marcado el nivel de evidencia 1 de esta aproximación ha sido el ensayo clínico MAGIC publicado en 2006 (360), en el cual pacientes con adenocarcinoma gástrico o del tercio inferior esofágico operables eran aleatoriamente divididos entre ser intervenidos quirúrgicamente de entrada o recibir 3 ciclos de quimioterapia preoperatoria con Epirrubicina, Cisplatino y 5-Fu seguido de cirugía y 3 ciclos más del mismo esquema quimioterápico administrados postoperatoriamente. A pesar de que sólo un 42 % de los pacientes lograron recibir todo el tratamiento propuesto inicialmente y sólo el 86% de los pacientes que completaron la

quimioterapia preoperatoria fueron capaces de completar asimismo el tratamiento postquirúrgico; el grupo asignado a recibir quimioterapia neoadyuvante logró un incremento clínico y estadísticamente significativo tanto en términos de supervivencia global (porcentaje de vivos a los 5 años 36% vs. 23%, HR 0.75, IC95% 0.6-0.9, p=0.009) como de supervivencia libre de enfermedad (HR 0.66, IC95% 0.53-0.81, p=0.001). Asimismo la tasa de resecciones consideradas curativas (R0) fueron superiores en el grupo que recibió tratamiento preoperatorio (79.3% vs. 70%, p=0.03), sin evidenciarse ningún incremento en la morbilidad perioperatoria. Posteriormente el grupo francés presentó sus resultados con un estudio randomizado en el que los pacientes recibían 2-3 ciclos de cisplatino y 5-Fu de manera preoperatoria y 3-4 ciclos postoperatorios frente a tratamiento quirúrgico solamente (361). Al igual que en el estudio MAGIC, la administración de quimioterapia perioperatoria logró un aumento significativo en la supervivencia global de los pacientes.

TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO ADYUVANTE

La necesidad de un tratamiento sistémico postoperatorio viene fundamentada en la estrecha relación entre la supervivencia de los pacientes y su estadio al diagnóstico. Mientras los pacientes con CG precoz presentan tasas de curación del 80% sólo con tratamiento quirúrgico, los pacientes con tumores T3N0 (estadio II) tienen una supervivencia inferior al 50% a los 5 años del diagnóstico y los casos de curación en pacientes con invasión ganglionar inicial son casi anecdóticos. Este pronóstico infausto hace obligada la búsqueda de algún tratamiento postoperatorio que mejore los resultados de la cirugía.

En Europa destaca la publicación de 2 estudios de 228 y 400 pacientes que no consiguieron beneficios estadísticamente significativos en supervivencia de global empleando regímenes de quimioterapia postoperatoria (362, 363), y en los que destaca el pobre cumplimiento terapéutico de los esquemas postoperatorios. Posteriormente otros estudios europeos como el del grupo francés tampoco han conseguido demostrar beneficio de la quimioterapia adyuvante (364).

Al contrario de lo ocurrido con los estudios europeos, un estudio japonés ha logrado un impacto positivo en la supervivencia con el uso de un derivado fluoropirimidínico de 4ª generación, S-1 (365). Tras demostrar su actividad antitumoral en los casos de cáncer

gástrico avanzado, se llevó a cabo un ensayo clínico incluyendo 1059 pacientes sometidos a cirugía con intención curativa y linfadenectomía D2. Los participantes fueron randomizados a cirugía sola versus cirugía seguida de S-1 en monoterapia durante 1 año. Los datos finales mostraron un incremento estadísticamente significativo en la supervivencia global a los 3 años a favor del grupo que recibía S-1 (80.1% vs. 70.1%, HR0.69, IC95% 0.52-0.87, p=0.003). Además el cumplimiento terapéutico fue notablemente superior (65.8%) a lo publicado en anteriores estudios, por lo que los autores recomiendan el empleo de S-1 como terapia adyuvante tras resección curativa de una neoplasia gástrica mediante linfadenectomía D2. Este esquema terapéutico es de hecho el estándar actual de tratamiento en el país nipón. Otro estudio asiático, el estudio CLASSIC (366), randomizó a 1035 pacientes sometidos a gastrectomía D2 a recibir quimioterapia con Capecitabina y Oxaliplatino durante 6 meses o a observación, demostrando un beneficio en supervivencia libre de progresión a los 5 años con una HR de 0.58 (IC 95% 0.47-0.72; p<0.0001). Los datos maduros de supervivencia global publicados en 2014 corroboran el beneficio en supervivencia global, con una disminución del riesgo de muerte del 34% (HR 0.66, IC95% 0.51-0.85, p <0.0015), con tasas estimadas de supervivencia a 5 años del 78% frente al 69% a favor de la rama de quimioterapia (367).

Ante la falta de resultados concluyentes del uso de quimioterapia adyuvante en CG, se han publicado múltiples metaanálisis en los últimos 20 años que incluyen la mayoría de los estudios realizados. El último metaanálisis publicado por la Cochrane en 2013 (368), analiza 34 ensayos clínicos con 7825 pacientes y muestra un beneficio estadísticamente significativo con una reducción del riesgo de muerte del 15% (HR 0.85 IC95% 0.80-0.90) y del 21% en el riesgo de recidiva (HR 0.79 IC95% 0.72-0.87), coincidiendo con otras revisiones realizadas en los últimos años (369, 370), aunque reconoce que existe un alto riesgo de sesgo en los resultados dadas las limitaciones metodológicas y de presentación de resultados en los estudios incluidos. En el análisis por subgrupos este beneficio parece ser mayor, pero no exclusivo, en los pacientes con afectación ganglionar tumoral en la pieza quirúrgica.

TRATAMIENTO QUIMIO-RADIOTERÁPICO ADYUVANTE

En el año 2001 MacDonald *et al.* publicaron los resultados del estudio INT116 del *Southwest Oncology Group* (SWOG) (371). En este ensayo clínico 556 pacientes sometidos a una resección potencialmente curativa de su neoplasia gástrica eran randomizados a seguimiento exhaustivo frente a tratamiento quimio-radioterápico adyuvante basado en 5-Fu y hasta alcanzar una dosis radioterápica total de 45Gy. Tras un seguimiento medio de 5 años, el grupo que recibió tratamiento quimio-radioterápico adyuvante logró un aumento de la supervivencia global a los 5 años del 11.6% (40% vs. 28.4% $p=0.001$), así como un incremento en la supervivencia libre de recaída en el mismo periodo (25% vs. 31% $p=0.001$). La actualización de los datos de este estudio en 2012 están en concordancia con los reseñados anteriormente (372). Estos resultados llevan a los autores a concluir que el tratamiento quimioradioterápico concomitante postoperatorio debe considerarse, y así lo es en los EEUU, el tratamiento estándar en los pacientes intervenidos con intención curativa por un cáncer gástrico. Aunque la discusión de este trabajo es extensa no es objetivo de esta tesis, debemos destacar que diversos problemas metodológicos han llevado a cuestionar en Europa y Asia la validez de estas conclusiones. Entre ellos los más discutidos son el escaso número de pacientes que fueron sometidos a gastrectomía con una linfadenectomía adecuada (el 54% de los pacientes fueron sometidos a gastrectomía sin linfadenectomía, es decir D0); junto con el hecho de que el beneficio parece lograrse por una disminución de las recidivas locoregionales por cuanto las recaídas a distancia son idénticas entre los 2 grupos del estudio. Ello pone en duda el papel de la radioterapia adyuvante en pacientes sometidos a resecciones D2.

En 2012 se publicaron los resultados del estudio ARTIST (373), que randomizó a 458 pacientes sometidos a gastrectomía R0 con al menos linfadenectomía D2 a recibir 6 ciclos de quimioterapia adyuvante con Capecitabina y Cisplatino o a quimio-radioterapia con Capecitabina asociada a 2 ciclos previos y 2 ciclos posteriores de quimioterapia con Capecitabina y Cisplatino. En este estudio no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas ramas (SLP 3 años 74.2% vs. 78.2%, $p=0.0086$). En el análisis por subgrupos se detectó una ventaja en SLP a los 3 años en los pacientes con afectación ganglionar a favor de la quimio-radioterapia (72.3% vs. 77.5%, $p=0.0365$), estando pendiente el desarrollo de un ensayo clínico en este subgrupo de pacientes. Los datos maduros de supervivencia global están pendientes de publicación. Es de destacar que la adición de radioterapia no mostró diferencias estadísticamente

significativas en la tasa de recurrencias locorregionales ni de metástasis a distancia entre los 2 grupos de pacientes.

En el momento actual, no existe ningún estudio publicado que enfrente directamente el tratamiento perioperatorio con quimioterapia, tal como se emplea en el esquema del estudio MAGIC, frente a la cirugía seguida de quimio-radioterapia adyuvante en pacientes con resección R0.

8.2. TRATAMIENTO DEL CÁNCER GÁSTRICO AVANZADO O METASTÁSICO

La evolución de la mayoría de los pacientes con cáncer gástrico reseccionado es desarrollar una recidiva locorregional o metástasis a distancia (374). Por otro lado, en los países occidentales alrededor del 50% de los pacientes presentan enfermedad localmente avanzada irresecable o metastásica al debut. El tratamiento quimioterápico de los carcinomas gástricos metastásicos debe considerarse aún hoy en día como un tratamiento paliativo. A pesar de los diferentes esquemas terapéuticos empleados en los ensayos llevados a cabo en los últimos 30 años la supervivencia global de los pacientes sigue siendo pobre, por lo cual la búsqueda de un tratamiento eficaz sigue siendo una línea prioritaria de investigación en esta neoplasia.

8.2.1. TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO

TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO *versus* TRATAMIENTO DE SOPORTE

Diferentes ensayos clínicos controlados y metaanálisis han aportado evidencia del efecto beneficioso paliativo de la quimioterapia sistémica frente a un tratamiento de soporte exclusivo en pacientes con cáncer gástrico avanzado (375-378). En dicho metaanálisis la administración de quimioterapia aportaba una disminución en el riesgo de muerte del 63% frente al tratamiento de soporte (HR 0.37, IC95% 0.24-0.55), lo que se traducía en una mejora de la mediana de supervivencia global de 4.3 a 11 meses (378). Además, el metaanálisis confirmó que la quimioterapia mejora la supervivencia sin deterioro de la situación funcional y la calidad de vida comparada con solo tratamiento de soporte.

TRATAMIENTO DE QUIMIOTERAPIA EN MONOTERAPIA

Hasta principios de la década de 1990, los agentes quimioterápicos activos en cáncer gástrico o esofágico avanzado eran Bleomicina, Mitomicina-C, 5-Fu, Etopósido, Cisplatino y Doxorubicina. Todos ellos estaban asociados a unas tasas de respuestas modestas, en general inferiores al 20%, y de corta duración (inferiores a 6 meses), siendo muy infrecuentes las respuestas completas (**379-383**). Posteriormente otros nuevos agentes han sido empleados en el tratamiento del cáncer gástrico avanzado en monoterapia, como taxanos (Paclitaxel y Docetaxel), Irinotecán, Vinorelbina y fluoropirimidinas orales (Capecitabina y S-1), con tasas de respuesta algo superiores a los agentes antiguos, en torno al 15-50%, y consiguiendo una mejora marginal en la supervivencia global, nunca superior a los 9 meses (**384-389**).

TRATAMIENTO DE QUIMIOTERAPIA EN COMBINACIÓN

Numerosos ensayos clínicos trataron de mejorar la eficacia de la monoterapia mediante el empleo de esquemas que combinaban 2 (dobletes) o 3 (tripletes) agentes quimioterápicos simultáneamente. De estos estudios preliminares, se pudieron obtener varias conclusiones clínicamente significativas: el empleo de nitrosureas no mejoraba los resultados de la aplicación de 5-Fu en monoterapia; la tasa de respuestas de los esquemas de combinación era superior a la obtenida con los fármacos en monoterapia y el esquema FAM (5-Fu, Adriamicina y Mitomicina C) mostró mejores resultados que otras combinaciones, siendo considerado en aquel momento el esquema estándar de tratamiento (**72, 390, 391**). En la década de 1980 se desarrollaron los regímenes quimioterápicos de 2ª generación. Entre estos nuevos esquemas la combinación FAMTX (5-Fu, Adriamicina y Metrotexate a altas dosis) demostró su superioridad frente al estándar FAM (**392**), que logró una mejora significativa en la tasa de respuestas (41% vs. 9%) así como en la supervivencia global (mediana de 42 semanas vs. 29 semanas del esquema FAM), sin aumentar la toxicidad ni la mortalidad del tratamiento. Otros esquemas de 2ª generación que demostraron su eficacia fueron el esquema ELF (5-Fu, Leucovorin y Etopósido), PELF (Cisplatino, 5-Fu, Leucovorin y Etopósido), PF (Cisplatino, 5-Fu) y ECF (Epirubicina, Cisplatino, 5-Fu) (**393, 394**), siendo la mielosupresión severa uno de los principales efectos tóxicos comunes a todos estos esquemas.

De manera progresiva se han ido desarrollando esquemas de quimioterapia basados en combinaciones de diversos citostáticos con cisplatino, inicialmente con resultados subóptimos como los del estudio de la *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) (**395, 396**). En 1997 se publicaron los resultados del esquema desarrollado en el Royal Marsden Hospital con la triple combinación de Epirrubicina, Cisplatino y 5-Fu (ECF). Este triplete se comparó frente a FAMTX en un ensayo randomizado que incluyó 260 pacientes (**397**). La combinación ECF logró una mayor tasa de respuestas objetivas (45% frente a 21% $p=0.0002$), una mejor supervivencia global (8.9 meses vs. 5.7 meses $p=0.0009$) así como una mayor supervivencia libre de progresión tumoral (7.4 meses vs. 3.4 meses $p=0.00006$). Un análisis posterior de los resultados obtenidos en este estudio confirmó el beneficio demostrado en términos de supervivencia y es por ello que ha sido considerado el esquema de tratamiento estándar en cáncer gástrico avanzado en muchos países europeos hasta la década actual. Este esquema ECF fue la rama de tratamiento estándar utilizada para el ensayo REAL-2 (**398**). Este es un estudio fase III randomizado con un diseño factorial 2x2 en el cual se distribuyeron los pacientes entre 4 grupos de tratamiento: ECF, EOF (Epirrubicina, Oxaliplatino, 5-Fu), EOX (Epirrubicina, Oxaliplatino, Capecitabina) o ECX (Epirrubicina, Cisplatino, Capecitabina). El estudio fue diseñado para demostrar la no inferioridad de capecitabina frente a 5-Fu y de Oxaliplatino frente a Cisplatino cuando se utilizan para el tratamiento del cáncer gástrico avanzado en un esquema con 3 fármacos. Tras la inclusión de más de 1000 pacientes los resultados mostraron la no inferioridad de capecitabina frente a 5-Fu y de Oxaliplatino frente a Cisplatino. No se demostraron diferencias significativas en la tasa de respuestas entre los 4 esquemas empleados (47.9% EOX, 46.4% EOF, 42.4% ECX y 40.7% ECF); aunque sí una diferencia estadísticamente significativa a favor de EOX comparado con ECF en términos de supervivencia global (mediana 11.2 meses EOX vs. 9.9 meses ECF $p=0.02$). Este ensayo junto al publicado por Kang *et al.* (**399**) demostró la equivalencia de 5-Fu y Capecitabina cuando se administran en combinación con derivados del platino.

La introducción de los nuevos taxanos en la década de los años 90 llevó a su estudio como fármacos activos en cáncer gástrico, especialmente tras demostrar el Paclitaxel unas tasas de respuesta entre el 22% y el 51% en diversos ensayos fase II (**400, 401**). Del mismo modo los dobles o tripletes de fármacos conteniendo docetaxel lograron tasas de respuesta del 33-55% con medianas de supervivencia de 9-10 meses (**402**). Entre los

taxanos sólo Docetaxel ha sido evaluado en el contexto de un ensayo clínico randomizado fase III. Este fue el ensayo V-325 (403), en el cual 445 pacientes fueron randomizados a recibir Docetaxel, Cisplatino y 5-Fu (DCF) vs. Cisplatino y 5-Fu (CF). La adición de Docetaxel al esquema standard CF logró una mejoría estadísticamente significativa en la supervivencia global de los pacientes (9.2 meses vs. 8.6 meses $p=0.02$), así como en el intervalo libre de progresión (5.6 meses vs. 37 meses $p < 0.001$) y en la tasa de respuestas objetivas (37% vs. 25% con CF $p=0.01$). Asimismo, el esquema DCF mostró una mejoría en la calidad de vida de los pacientes a pesar de resultar un esquema notablemente más tóxico (toxicidades grado III-IV 69% de los pacientes, neutropenia febril 29%) (403). Este triplete (DCF) ha sido también comparado con el esquema de 3 fármacos ECF y con el doblete DC (Docetaxel, Cisplatino) en un ensayo multicéntrico randomizado (404). Entre los 120 pacientes randomizados se logró una tasa de respuestas del 25% para ECF, 18.5% para DC y 36.6% para el triplete DCF. La mediana de supervivencia fue favorable a los esquemas conteniendo Docetaxel (8.3 meses ECF, 11.0 DC y 10.4 meses DCF) de manera estadísticamente significativa pero, al contrario de lo demostrado en el ensayo V-325, la calidad de vida fue superior en el esquema sin taxanos (ECF). Esto revela la importancia fundamental de la selección de los pacientes y del manejo de la toxicidad de los esquemas empleados a la hora de lograr diferencias en términos de beneficio clínico.

S-1 es una fluoropirimidina oral que incluye tres agentes diferentes: Tegafur, Gimeracil y Oteracil. Ha mostrado resultados prometedores en cáncer gástrico avanzado, aunque la mayoría de los estudios proceden de población asiática (405, 406). El ensayo clínico fase III SPIRITS mostró un beneficio de 2 meses en mediana de supervivencia libre de progresión y en supervivencia global de la combinación de Cisplatino y S-1 frente a S-1 en monoterapia, en población asiática, a costa de tasas de toxicidad grado 3 y 4 significativamente superiores (406). El metabolismo de Tegafur en población occidental es diferente al de la población asiática, con dosis máximas toleradas diferentes, por lo que se han diseñado estudios específicos en población occidental. Los datos procedentes de ensayos fase II en población occidental muestran que S-1 también es eficaz en esta población (407, 408). En el estudio fase III FLAGS se randomizó a 1053 pacientes de diferentes países con adenocarcinoma esofagogástrico avanzado a recibir Cisplatino con 5-Fu o con S-1, no demostrándose la superioridad de cisplatino y S-1, aunque con un perfil de toxicidad más favorable y menor número de muertes relacionadas con el tratamiento (251). Como crítica a este estudio se encuentra la dosis inferior de cisplatino

en el brazo de S-1, por lo que nuevos estudios con S-1 deben confirmar la actividad de este fármaco en población occidental.

En el último metaanálisis publicado por Wagner *et al.* en Cochrane en 2010 (378) sobre tratamiento del cáncer gástrico avanzado, en el que se incluyeron 5726 pacientes, llega a las siguientes conclusiones:

- Los esquemas de combinación de fármacos son superiores en términos de supervivencia a los tratamiento en monoterapia (HR 0.82 IC95% 0.74-0.90) a cambio de un incremento en la toxicidad.
- Los esquemas de 3 fármacos incluyendo antraciclina, 5-Fu y Cisplatino consiguen un incremento estadísticamente significativo en la supervivencia de los pacientes (HR 0.77 IC95% 0.62 – 0.95) frente a los esquemas de Cisplatino y 5-Fu sin antraciclina. Este beneficio es similar si se comparan esquemas con 5-Fu, antraciclina y Cisplatino frente a los esquemas sin Cisplatino (HR 0.82 IC95% 0.73 – 0.92).
- El incremento de mortalidad en los esquemas de 3 fármacos que incluyen 5-Fu parece relacionado con la administración de este fármaco en bolo intravenoso, siendo menos tóxica su administración en infusión continua como se contempla en el esquema ECF.
- Los esquemas basados en Irinotecan no han demostrado un beneficio significativo frente a los esquemas sin este fármaco (HR 0.86, IC95% 0.73-1.02), no habiendo sido además nunca comparados frente a tripletes como ECF. Tampoco se evidencian diferencias estadísticamente significativas en los esquemas con o sin docetaxel (HR0.93, IC95% 0.75-1.15).

En el momento actual se deben considerar los esquemas de 3 fármacos (tripletes) como tratamiento estándar de 1ª línea en los pacientes con cáncer gástrico avanzado. La base de estos esquemas debe ser la combinación de Cisplatino y 5-Fu, pudiendo sustituirse el cisplatino por Oxaliplatino y el 5-Fu en infusión continua por Capecitabina. La elección de taxanos o antraciclina como tercer componente del esquema debe basarse en una cuidadosa selección del paciente y un adecuado tratamiento de soporte ante la mayor toxicidad severa de los esquemas que incluyen docetaxel.

Cuando los pacientes recidivan o la enfermedad progresa tras un tratamiento quimioterápico de 1ª línea el pronóstico de los pacientes es ominoso. La mayoría de los fármacos testados en 2ª línea han logrado resultados discretos con tasas de respuesta en torno al 10% y medianas de tiempo hasta progresión entre 2 y 5 meses y supervivencia global entre los 5 y 8 meses. Los esquemas con resultados más prometedores son los basados en taxanos, irinotecan y/o ramucirumab, no pudiéndose considerar en el momento actual ningún esquema como estándar de tratamiento (409-412).

8.2.2. TRATAMIENTO DIRIGIDO POR ALTERACIONES MOLECULARES

INHIBICIÓN DE EGFR

La sobreexpresión de EGFR ocurre en el 30-50% de los cánceres gástricos (182). El abordaje más común para inhibir EGFR es el uso de anticuerpos monoclonales (Cetuximab, Panitumumab) o inhibidores tirosina quinasa (Gefitinib, Erlotinib). Los resultados actuales sugieren que probablemente la vía del EGFR no sea una diana terapéutica para la mayoría de los pacientes con adenocarcinoma gástrico, siendo necesario identificar biomarcadores que nos permitan determinar qué subgrupo de pacientes podría beneficiarse de la terapia anti-EGFR.

Cetuximab

Cetuximab es una IgG1 quimérica que se une al dominio extracelular del EGFR humano, actuando como inhibidor competitivo de EGF y otros ligandos al receptor, así como de la autofosfolización de los residuos tirosina quinasa. Esta interacción anticuerpo-receptor previene la dimerización y bloquea la activación del receptor tirosina quinasa inducido por el ligando. Cetuximab también induce la internalización del receptor y su degradación (182, 413). Este fármaco está aprobado para el tratamiento del cáncer de colon RAS nativo y de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (414, 415).

Basándose en prometedores resultados de estudios fase II (416, 417), se diseñó el ensayo clínico fase III EXPAND, que randomizó a 908 pacientes con adenocarcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica localmente avanzados o metastásicos a recibir Cisplatino (80 mg/m² días 1) y Capecitabina (1000 mg/m² días 1 a 14) en ciclos trisemanales, con o sin

Cetuximab (400 mg/m² como dosis de carga, seguido de 250 mg/m² semanal). El objetivo primario del estudio fue supervivencia libre de progresión, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas (HR 1.09, IC95% 0.92-1.29, p=0.32) **(269)**. El estudio fase III RTOG 0436 diseñado para pacientes con carcinoma esofágico localmente avanzado que comparaba el tratamiento con quimio-radioterapia concomitante con Paclitaxel y Cisplatino semanales con o sin Cetuximab tampoco demostró beneficios en supervivencia global. A diferencia del carcinoma colorrectal, en el caso del cáncer gástrico las mutaciones de *KRAS* no han sido identificadas como biomarcador predictivo negativo de respuesta a cetuximab **(418)**. Otros parámetros como la expresión de EGFR, el número de copias o la fosforilación han sido evaluados como potenciales biomarcadores, pero el carácter retrospectivo y el escaso número de pacientes de los estudios han impedido alcanzar conclusiones definitivas **(417)**.

Panitumumab

Panitumumab es un anticuerpo monoclonal completamente humano IgG2 dirigido contra EGFR. En cáncer gástrico, el estudio REAL-3 incluyó 522 pacientes con cáncer gástrico avanzado no previamente tratados procedentes de 63 centros de Reino Unido **(268)**. Los pacientes fueron randomizados 1:1 a recibir ciclos trisemanales de Panitumumab 9 mg/kg asociado a quimioterapia con modificación de dosis (Epirrubicina 50 mg/m², Oxaliplatino 100 mg/m² y Capecitabina 1000 mg/m²/día durante días 1-21) o EOX a la dosis estándar establecida en el estudio REAL-2 (Epirrubicina 50 mg/m², Oxaliplatino 130 mg/m² y Capecitabina 1250 mg/m²/día durante días 1-21) **(398)**. Este estudio fue prematuramente cerrado tras realizar un análisis interno preestablecido con 333 eventos y evidenciar una falta de beneficio en supervivencia global y supervivencia libre de progresión.

Erlotinib y Gefitinib

Ambos fármacos son inhibidores tirosina quinasa de EGFR de administración oral. Erlotinib fue testado en un estudio fase II en primera línea de tratamiento de cáncer gástrico o de la unión gastroesofágica avanzados, evidenciándose una tasa de respuestas del 9%, todas ellas en el subgrupo de adenocarcinomas de la unión gastroesofágica **(419)**. El estudio fase III COG, desarrollado en pacientes con carcinoma escamoso o adenocarcinoma esofágico, incluyendo tumores de la unión gastroesofágica Siewert I y II, previamente tratados, se realizó en población no seleccionada por el estatus de EGFR

(420). El estudio fue negativo para su objetivo primario de mejoría de la supervivencia global a 1 año. El análisis de biomarcadores encontró una relación entre el número de copias de EGFR y los resultados clínicos, proponiendo la utilidad potencial de este biomarcador en la selección de los pacientes para la terapia anti-EGFR.

INHIBICIÓN DE HER2

La vía de HER2 fue la primera diana molecular en ser inhibida de forma exitosa en adenocarcinoma gástrico. La sobreexpresión de HER2 es más frecuente en tumores de histología intestinal (34%) que en aquellos de histología difusa (6%), así como es más frecuente en tumores localizados en la unión gastroesofágica (32%) comparado con los tumores gástricos (187).

Trastuzumab

El ensayo clínico fase III ToGA fue el estudio pivotal, evaluando la eficacia de Trastuzumab en combinación con quimioterapia en pacientes con cáncer gástrico avanzado, la mayoría metastásicos (104). Este estudio fue llevado a cabo de manera multicéntrica en 24 países de Asia, Sudáfrica, Australia, Europa, Centroamérica y América del Sur. En este ensayo se incluyeron pacientes con sobreexpresión 3+ de HER2 medida por IHQ o con amplificación de *HER2* determinada por FISH, ratio ≥ 2 . Tras realizar el cribado mediante IHQ y FISH a 3807 posibles candidatos, de los cuales 810 presentaron finalmente sobreexpresión del receptor o amplificación del gen *HER2*, se incluyeron en el estudio 594 pacientes, que fueron randomizados a Trastuzumab (dosis de carga de 8 mg/kg, seguido de 6 mg/kg en dosis sucesivas) con quimioterapia (5-Fu o Capecitabina, a criterio del investigador, y cisplatino) o quimioterapia sola. El tratamiento del estudio fue administrado cada 3 semanas durante 6 ciclos, y Trastuzumab se continuó hasta progresión, toxicidad inaceptable o retirada del consentimiento, no permitiéndose el cruzamiento a la rama de Trastuzumab tras la progresión. El resultado principal del estudio fue alcanzado, logrando la adición de Trastuzumab al tratamiento quimioterápico estándar un incremento en la supervivencia global de 2,7 meses (de 11.1 en la rama control a 13.8 en la rama experimental con Trastuzumab), lo que se corresponde con una HR de 0.74 (IC95% 0.60-0.91, $p=0.0046$). De igual manera, se cumplieron los objetivos secundarios del estudio aumentando el tiempo libre de progresión tumoral de 5.5 meses

a 6.7 meses (HR 0.71 IC95% 0.59-0.85, $p=0.002$), e incrementando la tasa de respuestas tumorales objetivas del 35.5% en la rama de quimioterapia estándar al 47.3% en la rama que incluía Trastuzumab ($p=0.0017$). No hubo diferencias significativas en las tasas de efectos adversos, y la cardiotoxicidad fue rara en ambas ramas, aunque con mayor tasa de descensos asintomáticos de la FEVI, (5% vs. 1%) en la rama de Trastuzumab. Se reportaron tres fallos cardíacos grado 3-4, dos en la rama de Trastuzumab y uno en la rama con quimioterapia sola. Un análisis posterior de la calidad de vida de los pacientes incluidos en el ensayo tampoco encontró diferencias entre las dos ramas del estudio.

Este trabajo encontró una diferencia estadísticamente significativa en la tasa de positividad para HER2 por IHQ y/o FISH a favor de los adenocarcinomas de tipo intestinal vs. difuso (32.3% vs. 6.1% respectivamente), así como una incidencia mayor de casos positivos en los tumores localizados en la unión gastroesofágica frente al resto de localizaciones tumorales (33.2 % vs. 20.9%). La concordancia entre los resultados del análisis IHQ y el análisis por FISH del estado de HER2 fue del 87.3%.

Tal como hemos comentado con anterioridad, en el análisis por subgrupos, Trastuzumab fue más efectivo en prolongar la supervivencia global en los pacientes con tumores IHQ 3+ (HR=0.66 IC95% 0.5-0.87), menos efectivo en pacientes con IHC 2+ (HR=0.78, IC95% 0.55-1.10) e inefectivo en aquellos con *HER2* amplificado por FISH pero sin expresión inmunohistoquímica (IHQ 0 ó 1+). En el subanálisis de aquellos casos con resultado IHQ 3+ o IHQ 2+ y amplificación determinada por FISH Trastuzumab aumentó la mediana de supervivencia global en 4.2 meses (11.8 meses en brazo control vs. 16.0 meses en el brazo experimental).

El estudio ToGA condujo a la aprobación de Trastuzumab por la FDA para los pacientes con adenocarcinoma gástrico con sobreexpresión de HER2 o amplificación por FISH, con los mismos criterios de inclusión del estudio. Sin embargo, la EMEA aprobó el uso de Trastuzumab sólo en pacientes con IHQ 3+, o IHQ 2+ y amplificación por FISH, basándose en los resultados del análisis por subgrupos. De manera similar, las guías del *National Institute for Health and Care Excellence* (NICE) en Reino Unido recomiendan el uso de esta droga sólo en tumores con IHQ 3+.

En base estos resultados, Trastuzumab en combinación con quimioterapia es el estándar de tratamiento en primera línea para pacientes con adenocarcinoma esofagogástrico

avanzado HER2 positivo. Por este motivo, en todos los pacientes con adenocarcinoma esofagogástrico avanzado debe ser evaluado el estado de HER2.

Pertuzumab

Son conocidos los posibles mecanismos de resistencia a Trastuzumab, por lo que existe un interés en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas frente a HER2. Pertuzumab es un anticuerpo monoclonal con unión al receptor HER2 en el dominio II (Trastuzumab se une al dominio IV) y HER3, que impide la dimerización del receptor, bloqueando la cascada de señalización intracelular. Basado en los datos preclínicos en cáncer esofagogástrico, y en la eficacia de Trastuzumab y Pertuzumab en cáncer de mama (280), el estudio JACOB (fase III) randomiza a los pacientes con adenocarcinoma gástrico avanzado a una primera línea de tratamiento con Cisplatino, fluropirimida (5-Fu o Capecitabina) y Trastuzumab, asociado o no a Pertuzumab (NCT01774786).

TDM-1

TDM-1 es un anticuerpo conjugado que emplea la sobreexpresión de HER2 para liberar un potente agente antimicrotúbulo en el interior celular, produciendo citotoxicidad directa. Diferentes ensayos clínicos fase II/III están evaluando TDM-1 en cáncer gástrico avanzado en segunda línea de tratamiento, como el estudio GATSBY que compara TDM-1 frente a la terapia estándar con taxanos en pacientes previamente tratados (NCT01641939).

A partir de los resultados en enfermedad metastásica, diferentes estudios con anticuerpos anti-HER2 están siendo llevados a cabo en otros contextos de la enfermedad como el tratamiento perioperatorio.

Lapatinib

Lapatinib es un fármaco oral inhibidor tirosina quinasa de EGFR1 y HER2, que ha sido aprobado en el tratamiento del cáncer de mama metastásico HER2 positivo en pacientes previamente tratados con Trastuzumab, y asociado a terapia hormonal en pacientes con cáncer de mama triple positivo (421). Lapatinib se ha evaluado en combinación con quimioterapia en pacientes con cáncer gástrico y de la unión gastroesofágica. En el estudio TYTAN en segunda línea en población asiática se comparó Paclitaxel semanal con o sin Lapatinib en pacientes con cáncer esofagogástrico metastásico HER2 positivo.

En este estudio no hubo diferencias estadísticamente significativas a favor de la adición de Lapatinib en supervivencia libre de progresión ni en supervivencia global en la población por intención de tratar, que sí se evidenció en el subgrupo de pacientes con IHQ 3+ (SLP 5.6 vs. 4.2 meses, SG 14.0 vs. 7.6 meses). En el ensayo clínico TRIO-013/LOGIC, pacientes con adenocarcinoma esofagogástrico avanzado HER2 positivo fueron randomizados a quimioterapia (Capecitabina y Oxaliplatino) y Lapatinib o placebo en primera línea de tratamiento (276). Este estudio no alcanzó su objetivo primario de supervivencia global (12.2 meses vs. 10.5 meses, HR 0.91, IC95% 0.73-1.12). La intensidad de la señal de la tinción IHQ no se correlacionó con los resultados. En el análisis por subgrupos, se evidenció un beneficio en supervivencia para los pacientes asiáticos (16.5 meses vs. 10.9 meses) y para aquellos menores de 60 años (12.9 meses vs. 9 meses). La asociación de Lapatinib incrementó la toxicidad. En el momento actual, Lapatinib está siendo evaluado en combinación con otros agentes para definir mejor su papel en el tratamiento del CG avanzado.

INHIBICIÓN DE VEGF/VEGFR

VEGF se sobreexpresa en el 60% de los CG, siendo un indicador de mal pronóstico (422). Entre los fármacos desarrollados específicamente frente al VEGF destacan los anticuerpos monoclonales anti-VEGF y las pequeñas moléculas inhibidoras de la actividad tirosina quinasa del receptor del VEGF.

Bevacizumab

Bevacizumab es un anticuerpo IgG1 humanizado contra VEGF, que ha mostrado eficacia en cáncer de colon, pulmón, ovario, mama y renal (423). En cáncer gástrico varios estudios fase II evaluaron la combinación de este anticuerpo con Irinotecan y Cisplatino o un triplete de Docetaxel, Cisplatino y 5-Fu, mostrando tasas de respuestas objetivas del 65% en ambos estudios, reflejando un beneficio potencial de la adición de este nuevo agente biológico a los esquemas clásicos de quimioterapia antineoplásica (424, 425). El principal inconveniente de estos estudios fue la alta tasa de complicaciones vasculares que presentaron los pacientes (25% trombosis venosas profundas o tromboembolismos pulmonares, 4% hemorragias). Los resultados condujeron al diseño del estudio fase III AVAGAST (202). Este estudio incluyó 774 pacientes de 17 países asiáticos y occidentales, y evaluó el beneficio de añadir Bevacizumab a la quimioterapia con

Cisplatino y Capecitabina. El objetivo primario fue la supervivencia global. La mediana de supervivencia global para la rama con Bevacizumab fue de 12.1 meses frente a 10.1 meses para la rama de placebo, no resultando estadísticamente significativo (HR 0.87, IC95% 0.73-1.03, p=0.1002). Aunque el estudio no alcanzó su objetivo primario, la mediana de supervivencia libre de progresión y la tasa de respuestas objetivas fue significativamente mayor en el grupo de Bevacizumab. Un análisis por subgrupos mostró una variación étnica, no evidenciándose beneficio al añadir Bevacizumab a la quimioterapia en la población asiática, hecho que se corroboró en el estudio fase III AVATAR en población china (426).

Ramucirumab

Ramucirumab es un anticuerpo monoclonal IgG1 completamente humano que se une específicamente a VEGFR-2, que ha demostrado eficacia y tolerabilidad en varios estudios. El ensayo clínico fase III REGARD evaluó en segunda línea de cáncer gástrico o del a unión gastroesofágica avanzado el tratamiento con ramucirumab en monoterapia (8 mg/m² cada 2 semanas) frente al mejor tratamiento de soporte en randomización 2:1, tras progresión a una primera línea con esquemas basados en platino o fluoropirimidinas (106). La mediana de supervivencia global en el grupo tratado con Ramucirumab fue de 5.2 meses frente a los 3.8 meses del grupo tratado con tratamiento de soporte exclusivo, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (HR 0.776 IC95% 0.603-0.998, p=0.047). Este beneficio se mantuvo tras realizar el análisis multivariante ajustado por otros factores de mal pronóstico. Las tasas de hipertensión arterial fueron mayores en el grupo de Ramucirumab (16% vs. 8%), mientras que no existieron diferencias respecto al resto de efectos adversos. Basándose en este estudio, la FDA aprobó el uso de Ramucirumab como agente único en abril de 2014 en segunda línea de tratamiento de cáncer gástrico avanzado tras progresión a un esquema con platino o fluoropirimida, siendo el primer agente biológico aprobado en una población no seleccionada. El estudio randomizado fase III doble ciego RAINBOW exploró la combinación de Paclitaxel y Ramucirumab en el mismo escenario que el estudio REGARD, en la población de pacientes con cáncer gástrico o de la unión gastroesofágica avanzado tras progresión a un esquema con platino o fluoropirimidas (107). En este estudio 665 pacientes fueron randomizados 1:1 a recibir Ramucirumab 8 mg/kg o placebo vía intravenosa los días 1 y 15, y Paclitaxel 80 mg/m² días 1, 8 y 15, en ciclos de 28 días. Fue un estudio positivo para su objetivo primario de supervivencia global, con una disminución del riesgo de

muerte del 19.3% para el grupo de la combinación con Ramucirumab (HR 0.807, IC95% 0.678-0.962, p=0.017), siendo las medianas de supervivencia global de 9.6 meses y 7.4 meses, respectivamente. Este estudio condujo a la aprobación por la FDA de Ramucirumab y Paclitaxel en segunda línea de tratamiento en noviembre de 2014.

Ramucirumab está siendo evaluado en primera línea en combinación con Cisplatino y Capecitabina dentro del ensayo clínico fase III RAINFALL, recientemente abierto al reclutamiento (NCT02314177).

Sunitinib, Sorafenib y otros inhibidores tirosina quinasa

Una estrategia diferente es el empleo de pequeñas moléculas dirigidas frente a la porción intracelular y metabólicamente activa del VEGFR. Esta porción intracelular posee una actividad enzimática de carácter tirosina quinasa que se activa tras la unión del ligando (VEGF) al receptor y es la responsable de la transducción de la señal a los siguientes efectores de la vía de activación relacionada con este receptor. Entre las pequeñas moléculas estudiadas se encuentran Sorafenib, Sunitinib, Vandetanib, Apatinib, Regorafenib y Pazopanib. Todos ellos se hallan en las fases preliminares, fases I-II, de su desarrollo en combinación con quimioterapia. Sunitinib ha demostrado cierta eficacia clínica en un ensayo como agente único y en combinación con Docetaxel en segunda línea de cáncer gástrico avanzado (**310, 427**). En un ensayo fase II con escaso número de pacientes (n=44), Sorafenib en combinación con Docetaxel y Cisplatino mostró una mediana de supervivencia libre de progresión de 5.8 meses y una mediana de supervivencia global de 13.6 meses (**311**), fuera de las cifras habituales en cáncer gástrico, y que no se han corroborado en otros estudios (**428**). Regorafenib se ha evaluado en el ensayo fase II INTEGRATE, reportando una mejoría de la supervivencia libre de progresión de 11.1 vs. 3.9 semanas en población previamente tratada, sin impacto en supervivencia global (**429**).

INHIBIDORES DE FGFR

La amplificación de FGFR2 se ha descrito en aproximadamente el 10% de los CG, especialmente en CG pobremente diferenciado y fenotipos malignos, lo cual lo convierten en una potencial diana molecular para el tratamiento de esta enfermedad (**423**). En modelos preclínicos, AZD2171, un fuerte inhibidor oral tirosina quinasa de VEGF,

FGFR1, PDGFRB y VEGFR-2, permitió la inhibición tumoral en modelos animales de cáncer gástrico. La actividad antitumoral más potente la presentó en los modelos animales con sobreexpresión de FGFR2, lo que hace pensar que podría aportar un beneficio clínico en pacientes con CG con expresión de FGFR2 **(430)**. AZD4547 es un inhibidor tirosina quinasa de FGFR1, 2 y 3 con actividad preclínica y un perfil de seguridad aceptable en un estudio fase I **(431)**. En estudio fase II SHINE exploró la actividad de AZD4547 en segunda línea frente a paclitaxel en adenocarcinomas gástricos con FGFR2 amplificado. Los resultados presentados en el Congreso de la Sociedad Americana de Oncología (ASCO) en 2015 muestran que no existen diferencias significativas entre ambas ramas **(432)**.

INHIBIDORES DE HGF/MET

Como hemos comentado con anterioridad c-MET es un receptor tirosina quinasa y HGF es su ligando. Su sobreexpresión y activación se ha asociado a un pronóstico desfavorable en diversos tipos de cáncer, entre los que se encuentra el cáncer gástrico. Aproximadamente el 25% de los CG sobreexpresan MET, sin embargo, su amplificación es menos frecuente (<5%) **(211)**.

Un estudio fase II ha estudiado la eficacia y seguridad de Foretinib (GSK1363089), un pequeña molécula oral inhibidora de c-MET y VEGFR-2, como agente único en pacientes con CG avanzado. Foretinib ha sido bien tolerado, pero ha demostrado escasa eficacia antitumoral en población c-MET no seleccionada **(423)**.

Onartuzumab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra MET, que impide su unión a HGF, que ha sido evaluado en ensayos clínicos fase II y III en combinación con mFOLFOX6 en pacientes con adenocarcinoma gastroesofágicos HER2 negativos y MET positivos. Los resultados preliminares del estudio fase III MetGastric presentados en ASCO 2015 muestran una falta de beneficio de este fármaco **(317)**.

Rilotumumab es otro anticuerpo IgG2 dirigido contra HGF. Un ensayo clínico fase II randomizado evaluó la eficacia y seguridad de Rilotumumab a dos niveles de dosis (15 mg/kg y 7.5 mg/kg) en combinación con ECX en pacientes no previamente tratados **(313)**. Rilotumumab asociado a la quimioterapia mejoró la mediana de supervivencia libre de progresión, que fue de 5.1 meses en el grupo de Rilotumumab 15 mg/kg, 6.8 meses en el

de Rilotumumab 7.5 mg/kg y de 4.2 meses en el grupo de placebo. Los efectos adversos más frecuentes con rilotumumab fueron edema periférico, neutropenia, anemia, trombocitopenia y trombosis venosa profunda. Un análisis exploratorio según los niveles de expresión de MET, muestra que la adición de Rilotumumab a ECX en pacientes con alta expresión de MET mejora la mediana de supervivencia global de 5.7 a 11.1 meses (HR 0.29, p= 0.0012), y podría generar un efecto desfavorable en la supervivencia en aquellos pacientes con tumores con baja expresión de MET **(315)**. Estos resultados llevaron a diseñar el estudio fase III RILOMET-1 en pacientes con alta expresión de MET **(314)**. En ASCO 2015 se informó de que el estudio se ha parado preozmente tras evidenciar una falta de beneficio, con un aumento del número de muertes en el grupo en el que Rilotumumab se administró en combinación con ECX **(433)**.

Los resultados de estos estudios hacen cuestionarnos la utilidad de la sobreexpresión de MET como biomarcador para estas terapias, siendo necesaria la búsqueda de otros biomarcadores que nos permitan una selección óptima de los pacientes.

INHIBIDORES DE PI3K/Akt/mTOR

La vía de mTOR se encuentra frecuentemente desregulada en varios tipos de cáncer, incluyendo los tumores gástricos. mTOR se encuentra sobreexpresado en más del 50% de los cánceres gástricos y se asocia a un pronóstico desfavorable **(214)**.

Everolimus es un inhibidor de mTOR con alta afinidad por el receptor intracelular FKBP12. En un estudio fase II en población japonesa, Everolimus a dosis de 10 mg/día mostró una tasa de control de la enfermedad del 56%, una mediana de supervivencia libre de progresión de 2.7 meses y una mediana de supervivencia global de 10.1 meses en pacientes con carcinoma gástrico avanzado previamente tratados con quimioterapia **(434)**. El estudio fase III GRANITE-1 con Everolimus en monoterapia incluyó a 656 pacientes, de los cuales 439 recibieron Everolimus a dosis de 10 mg/día y el resto recibió placebo. El objetivo primario fue la supervivencia global, siendo el estudio negativo (5.39 meses vs. 4.34 meses, HR 0.90, IC95% 0.75–1.08) **(320)**. Actualmente Everolimus está siendo evaluado en combinación con otros agentes quimioterapéuticos.

GDC-0068 es una pequeña molécula inhibidora de Akt que ha mostrado actividad en modelos preclínicos con un aceptable perfil de seguridad en combinación con FOLFOX

en un fase I actualmente en marcha (NCT01362374) **(435)**. El estudio JAGUAR (NCT01896531) es un estudio randomizado frente a placebo que está explorando la combinación de GDC-0068 con mFOLFOX6 en primera línea de tratamiento en pacientes con CG avanzado. Está preplanificado realizar un análisis por subgrupos según la pérdida de expresión de PTEN, que va a permitir dilucidar si esta cohorte de pacientes se beneficia más de la terapia dirigida contra Akt.

INHIBIDORES DE IGF-1

IGF-1R pertenece a la familia de receptores de insulina, se expresa en la superficie celular y la fosforilación de los sustratos intracelulares permite la activación de la vía MAPK y PI3K/Akt, que promueve el crecimiento tumoral, la progresión e invasión en diferentes tipos de cáncer, incluido el cáncer gástrico **(436)**. En un estudio con 86 pacientes con cáncer gástrico reseccionado, los pacientes con baja expresión de IGF-1R y EGFR tuvieron supervivencias más largas **(437)**. Un estudio fase I con CP-751871, un anticuerpo anti-IGF-1R, en combinación con docetaxel, ha demostrado resultados prometedores **(423)**.

INHIBIDORES DE PARP

La función de la Poli-ADP-Polimerasa (PARP) es reparar las roturas de cadena simple del ADN. Los inhibidores de PARP previenen la reparación de las roturas de cadena simple de las células tumorales y conduce a la muerte celular. Estos agentes han mostrado actividad en cáncer de mama y ovario, particularmente en pacientes con mutaciones genéticas en BRCA1 y BRCA2. Olaparib ha sido estudiado en segunda línea de cáncer gástrico avanzado en un ensayo fase II en combinación con Paclitaxel. Los pacientes que recibieron Olaparib presentaron mejor supervivencia global (HR 0.56; IC80%, 0.41-0.75, $p=0.005$) y una mediana de supervivencia global de 13.1 meses en el grupo de Paclitaxel y Olaparib frente a 8.3 meses frente al grupo con Paclitaxel y placebo **(438)**. El análisis prospectivo de la expresión de la proteína ataxia telangiectasia (ATM) muestra que los pacientes con baja expresión de ATM presentan una mayor sensibilidad a olaparib. En base a estos resultados, un ensayo clínico fase III está siendo llevado a cabo.

INHIBIDORES DE CICLINAS

Las ciclinas dependientes de quinasas (CDKs) son necesarias para la progresión de la célula a través de las distintas fases del ciclo celular. El Flavopiridol es un inhibidor de CDKs que produce una detención del ciclo celular en las interfases G1-S y G2-M. En un ensayo fase I con este fármaco (439) se determinó la máxima dosis tolerable (40 mgrs/m²/24 hs) y se observó una remisión completa en un paciente con cáncer gástrico avanzado. Esta actividad no se confirmó en un estudio fase II con Flavopiridol como agente único, resultando ser un fármaco notablemente más tóxico de lo esperado (trombosis vascular y astenia) (131). Posteriormente se han llevado a cabo estudios fase I en combinación con platino, Irinotecán, fluoropirimidinas o taxanos con desigual resultado (440, 441).

INHIBIDORES DE LAS METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

Las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs) son proteasas zinc dependientes que degradan las proteínas del tejido conectivo y están implicadas en fenómenos de proliferación celular tumoral, diferenciación, angiogénesis y apoptosis (442). MMP-2 está sobreexpresada en cáncer gástrico y se ha relacionado con un mayor riesgo de progresión tumoral y de metástasis ganglionares (443) Marimastat es un fármaco oral con actividad como inhibidor de MMPs. Un único ensayo realizado en cáncer gástrico avanzado no logró demostrar actividad antitumoral significativa cuando se administró como monoterapia. Un estudio randomizado posterior en el cual se administraba como terapia de mantenimiento tras quimioterapia sí demostró cierto beneficio con respecto al intervalo libre de progresión de enfermedad pero sin impacto en la supervivencia global de los pacientes (444). Estos resultados tan pobres han llevado a su abandono como posible agente frente al cáncer gástrico.

INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA

En la patogénesis de diversas neoplasias entre las cuales se encuentra el cáncer gástrico se ha implicado la activación constitutiva del factor de transcripción nuclear NF- κ B. Éste puede ser inhibido a través de una proteína inhibidora específica (I κ B) (445). La

activación de NF- κ B puede prevenirse mediante la inhibición de la degradación de I κ B mediada por el proteosoma. Este mecanismo se ha mostrado eficaz para aumentar la sensibilidad al tratamiento quimioterápico en líneas celulares y modelos animales. Bortezomib es un inhibidor del proteosoma que ha demostrado cierta actividad antitumoral en diversos tumores entre los cuales están el mieloma múltiple y el cáncer gástrico. En un ensayo clínico fase II que incluyó un escaso número de pacientes (n=16) con adenocarcinomas gástricos tras progresión a una primera línea de tratamiento se administró Bortezomib. No se objetivó ninguna respuesta objetiva y sólo un paciente se mantuvo en enfermedad estable. La tolerancia fue mala, dado que 14 de los 16 pacientes sufrieron toxicidad grado ≥ 2 (446). Su desarrollo en cáncer gástrico no ha continuado a la luz de los resultados obtenidos, sin embargo es un fármaco instaurado en la práctica clínica en los pacientes con mieloma múltiple (447).

INHIBIDORES DE LA HISTONA DEACETILASA

Vorinostat es un nuevo agente que previene la proliferación celular la supervivencia y angiogénesis a través de la inhibición de la histona deacetilasa. Estudios fase I/II están comparando el efecto de Vorinostat con el de esquemas de quimioterapia estándar en cáncer gástrico avanzado (448).

8.2.3. INMUNOTERAPIA

De todo lo expuesto anteriormente se evidencia una necesidad imperiosa de estudios que desarrollen nuevos abordajes terapéuticos en cáncer gástrico avanzado. Es conocido que el sistema inmune juega un papel importante en prevenir y controlar el cáncer. Las células tumorales y su microambiente evaden el reconocimiento por parte del sistema inmune a través de múltiples mecanismos adquiridos durante la evolución tumoral (449). Los linfocitos T tienen un papel protagonista en el funcionamiento del sistema inmune. El bloqueo de las vías naturales de regulación negativa sobre la activación de linfocitos T permite incrementar la actividad inmune antitumoral como nueva forma de terapia contra el cáncer (324). El receptor de muerte programada tipo 1 (PD-1) y el antígeno asociado al linfocito T citotóxico tipo 4 (CTLA-4) son moléculas inhibitoras de la activación del sistema inmune a través de la interacción receptor-ligando. El uso de anticuerpos monoclonales para bloquear la interacción de estas moléculas con sus ligandos se ha

demostrado efectivo como terapia antitumoral. Desde la aprobación de Ipilimumab (anti-CTLA-4) para el tratamiento del melanoma se ha producido un interés creciente hacia la inmunoterapia en otras patologías, como el cáncer de pulmón, el cáncer urotelial de vejiga o el cáncer gástrico, entre otras (326, 450-452).

La experiencia sobre el uso de la inmunoterapia en el cáncer gástrico es aún limitada, múltiples ensayos clínicos se encuentran actualmente en desarrollo y su papel está aún por establecer.

El primer estudio publicado con anticuerpos monoclonales contra estos ligandos en cáncer gástrico fue con Tremelimumab. Tremelimumab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el CTLA-4. Este estudio fase II incluyó un total de 18 pacientes con adenocarcinoma gástrico o esofágico metastásico en progresión al menos a una línea de quimioterapia basada en cisplatino. De entre los 18 paciente, 12 se mantuvieron en enfermedad estable y 1 presentó una respuesta parcial tras el octavo ciclo y se mantuvo dentro del estudio durante 32.7 meses (453). Tremelimumab fue en general bien tolerado, la mayoría de las toxicidades fueron de carácter leve, aunque hubo una muerte en relación con perforación intestinal secundaria a una colitis autoinmune.

Posteriormente se llevó a cabo el estudio fase I KEYNOTE 012 (NCT01848834) con Pembrolizumab, un anticuerpo anti-PD-1, y cuyos resultados en la cohorte de cáncer gástrico fueron presentados por Muro *et al.* en ASCO 2015 (454). De los 162 pacientes a los que se les realizó el screening, el 40% (65 pacientes) presentó expresión inmunohistoquímica de PDL-1 $\geq 1\%$ en estroma y/o células tumorales. De éstos un total de 39 pacientes fueron incluidos en el estudio y recibieron Pembrolizumab 10 mg/kg cada 2 semanas hasta un máximo de 24 meses. El 67% de los pacientes había recibido más de 2 líneas de tratamiento previo. La tasa de respuestas objetivas fue del 22% y la tasa de supervivencia global a los 6 meses fue del 69%. En base a estos datos preliminares, parece que existe una correlación entre la expresión de PDL-1 y la supervivencia. El tratamiento fue bien tolerado, el 5% de los pacientes presentaron toxicidad mayo o igual a grado 3. Estos resultados han motivado el diseño de un ensayo fase II (KEYNOTE 059), en el que Pembrolizumab es administrado en monoterapia o en combinación con Cisplatino y 5-Fu en pacientes previamente no tratados (NCT02335411).

Asimismo, en el momento actual diversos ensayos clínicos exploran el papel de la combinación de diferentes agentes inhibidores de puntos de regulación inmunológica en

cáncer gástrico y en otras neoplasias sólidas y hematológicas. Además del empleo de anticuerpos monoclonales, están en investigación otras múltiples estrategias dentro del campo de la inmunoterapia, como las vacunas, las células dendríticas, los virus oncolíticos, entre otros, y a cuyo desarrollo asistiremos en los próximos años **(455, 456)**.

Por lo tanto, el papel de la inmunoterapia en cáncer gástrico está aún por definir, sin embargo, es ambicioso el beneficio que estas terapias podrían aportar en el tratamiento del cáncer gástrico. Por un lado, podrían suplir la necesidad de tratamiento de pacientes con adenocarcinoma gástrico que no se benefician o no son capaces de tolerar la quimioterapia clásica, y por otro, mejorar los resultados de quimioterapia y las terapias dirigidas contra dianas moleculares mediante su empleo en combinación, aspecto que ya se está explorando dentro de diversos ensayos clínicos, y que se ha puesto de manifiesto en otras patologías **(457, 458)**.

9. MÉTODOS DE ESTUDIO MOLECULAR DEL CÁNCER GÁSTRICO

9.1. INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica es una técnica mediante la cual se detecta la presencia de un péptido o proteína en una célula o tejido, utilizando un anticuerpo (monoclonal ó policlonal, IgG ó IgM) específico contra él. La técnica está basada en la reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) y por ello el anticuerpo primario que se utilice debe haber sido generado en una especie diferente a la que se está estudiando. Para visualizar el lugar donde se produce la unión Ag-Ac es necesario emplear un trazador o marcador.

El marcaje inmunohistoquímico se puede realizar con fluorocromos (técnicas de inmunofluorescencia), técnicas inmunoenzimáticas, iones metálicos en forma coloidal (técnica de inmuno-oro) o isótopos radioactivos (radioinmunoanálisis). Debido a sus ventajas, las técnicas inmunoenzimáticas son las más empleadas, en ellas se utilizan como marcadores enzimas capaces de hacer cambiar de color un sustrato incoloro, siendo las enzimas más frecuentemente utilizadas la peroxidasa y la fosfatasa alcalina. Esta técnica permite una localización más precisa de las reacciones, ya que la tinción es permanente, estable, puede contrastarse y puede ser evaluada con microscopio de luz.

La inmensa mayoría de técnicas de inmunohistoquímica pueden aplicarse a tejido fijado en formalina e incluido en parafina con buenos resultados, siempre que la fijación tisular, su procesado e inclusión se realicen adecuadamente, ya que la utilización de métodos o reactivos inapropiados en el tratamiento tisular previo puede producir pérdidas de antigenicidad que limitarán o impedirán la obtención de resultados fiables. El espectro de anticuerpos disponibles comercialmente crece día a día y actualmente es posible encontrar marcadores para una amplia gama de antígenos.

La IHQ como método diagnóstico es una técnica sencilla, rápida y relativamente barata, que se lleva a cabo en la mayoría de los laboratorios de Anatomía Patológica empleando únicamente microscopios de campo claro estándar. Las muestras teñidas pueden almacenarse por periodos largos de tiempo y ser posteriormente reevaluadas, así como permite un control morfológico de las células tumorales a analizar. Como principales

desventajas debemos resaltar que es una técnica susceptible de variabilidad inter-observador debida a la subjetividad inherente a la interpretación de una escala semicuantitativa de tinción. Además, el resultado puede alterarse por variaciones en el protocolo de tinción empleado y, sobre todo, por alteraciones en la fase pre-analítica relacionadas con problemas en la fijación del tejido y con la conservación de las muestras parafinadas por tiempos prolongados.

9.1.1. INMUNOHISTOQUÍMICA DE HER2

Para la determinación inmunohistoquímica de la expresión de HER2 se emplean anticuerpos mono o policlonales que reconocen distintos epítomos de la proteína p185. El patrón de tinción de las células tumorales es evaluado de acuerdo con un sistema de interpretación especialmente desarrollado para esta técnica. Los estudios iniciales de HER2 en cáncer de mama emplearon los anticuerpos monoclonales CB11 y 4D5 con protocolos que eran validados en cada centro. En el momento actual existen 2 métodos de estudio IHQ comercializados y aceptados internacionalmente: HercepTest® (Dako, Carpinteria, California USA) y Pathway® HER2/neu (4B5) (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA). El HercepTest® emplea el anticuerpo policlonal A085 y, de acuerdo con el fabricante, se considera un caso HER2 débilmente positivo (2+) cuando se objetiva una tinción débil a moderada pero completa de la membrana celular en más del 10% de las células, siendo un caso positivo (3+) cuando existe una tinción fuerte y completa de toda la membrana en más del 10% de las células tumorales. En el caso de Pathway® HER-2/neu (4B5), se emplea el anticuerpo monoclonal 4B5 que se une a un epítomo perteneciente al dominio intracitoplasmático del receptor. Al igual que en el caso del HercepTest® la interpretación del resultado se hace de acuerdo a una escala (0, 1+, 2+, 3+) considerándose un caso débilmente positivo (2+) cuando se tiñe de manera débil pero completa la membrana de más del 10% de las células tumorales, y un caso positivo (3+) aquel en el cual se evidencia una tinción intensa y completa de la membrana de más del 10% de las células. Los casos débilmente positivos (2+) se clasifican como *borderline* o equívocos y se considera que deben ser comprobados mediante técnicas de amplificación génica, aunque existe cierta discordancia al respecto y algunos autores defienden la realización de técnicas de hibridación de manera primaria sin cribado inmunohistoquímico previo (459, 460).

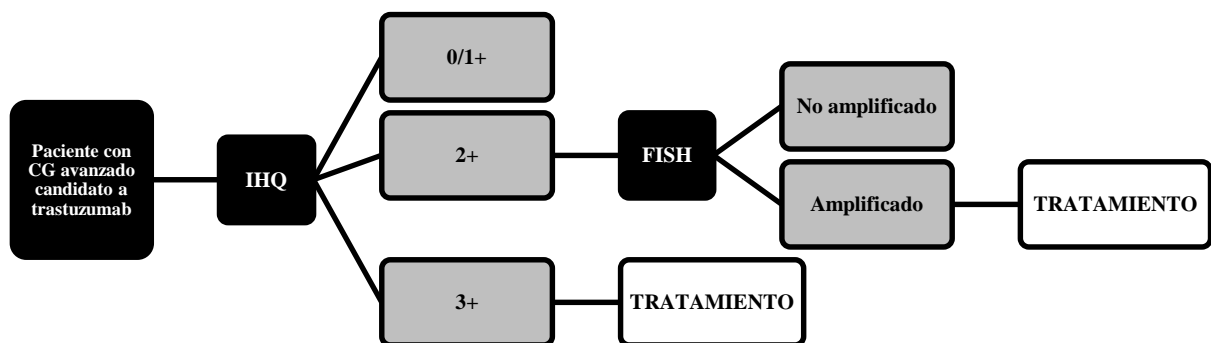
Aunque continúa siendo controvertido, las guías de consenso y recomendaciones para análisis IHQ de HER2 en cáncer de mama tanto a nivel nacional como internacional han determinado los estándares a seguir con respecto al desarrollo, validación e interpretación de los resultados (459, 461). En relación a este último punto, es de destacar que el porcentaje de células tumorales con tinción completa de la membrana necesarias para considerar un caso positivo (3+) se ha elevado al 30% frente al 10% inicialmente empleado y recomendado por el fabricante.

En el caso del cáncer gástrico la determinación del estado de HER2 resulta más compleja al ser un tumor notablemente más heterogéneo que el cáncer de mama. Al igual que ocurrió inicialmente en las neoplasias de mama el rango de casos positivos por IHQ oscilaba según las series entre el 6.8% y el 34% (462, 463). En 2008 se publicó por Hofmann *et al.* (188) un documento de consenso en el que se recogen una serie de modificaciones en el desarrollo e interpretación del Herceptest® para los tumores gástricos. Estas modificaciones tienen en cuenta la heterogeneidad anatomopatológica del cáncer de estómago y las características diferenciales de sus células. De esta manera modifican la necesidad de una tinción completa de la membrana celular para aceptar como positiva una tinción únicamente de la membrana basolateral y reducen el porcentaje de células tumorales que deben teñirse claramente para ser considerado un caso como positivo (3+) al 10% de las células; e incluso a un pequeño agregado de células, independientemente de su porcentaje respecto del total de la muestra, en los casos de muestras patológicas procedentes de biopsias endoscópicas. En el estudio de Hofmann la correlación entre IHQ y FISH fue del 93.5% (188).

En el ensayo clínico ToGA, en el que se incluyeron pacientes con cáncer gástrico con sobreexpresión y/o amplificación de *HER2*, las muestras tumorales eran muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina y la identificación de la proteína HER2 se realizó por IHQ mediante HercepTest™ usando un procedimiento manual, seguido de las instrucciones del fabricante (Dako, Glostrup, Denmark). El análisis del gen de *HER2* se llevó a cabo por FISH con pharmDx™ (Dako). La clasificación inicial del estudio IHQ se realizó según las recomendaciones dadas por HercepTest™ en cáncer de mama, con el punto de corte en 10%, no siguiendo las modificaciones establecidas por las guías americanas publicadas en 2007 (459). El estudio IHQ evidenció diferencias importantes en el patrón de expresión proteica entre cáncer de mama y cáncer gástrico. En tumores gástricos con frecuencia se observa una tinción incompleta (membrana basolateral), que

conlleva que muchos casos se clasifiquen como HER2 negativos, explicado por las características de las células secretoras gástricas y a la formación de luces glandulares más frecuente en el cáncer gástrico que en los tumores mamarios. Por otro lado, se observó con mayor frecuencia la heterogeneidad en la expresión de HER2 (4.8% de los casos). Ello resultaba en la clasificación negativa de aquellos tumores con expresión intensa pero con un porcentaje de positividad celular menor al 10%. Teniendo en cuenta estas dos consideraciones los tumores en la serie del estudio ToGA se clasificaron como HER2 negativos el 72%, HER2 positivos el 10.7% y HER2 dudosos el 17.3%. Sin embargo, el estudio FISH determinó que existía amplificación en el 17.3% del total de tumores gástricos analizados, considerando que el gen está amplificado si existe un ratio $HER2/\text{centrómero cromosoma } 17 \text{ (CEP17)} \geq 2$ (104). Ello pone de manifiesto que la correlación entre los niveles de expresión de HER2 detectados por IHQ y el estado del gen es menor en el cáncer gástrico respecto al cáncer de mama, de forma que un número significativo de tumores gástricos con niveles de expresión clasificados como 0/1+ presentan amplificación de *HER2*. En el estudio ToGA (104) el 18.6% de los cánceres gástricos 1+ presentaron amplificación de *HER2*. Tras estos resultados el algoritmo de diagnóstico propuesto por este estudio recomienda la inmunohistoquímica como técnica de primera elección. Se considera que los pacientes que se benefician de Trastuzumab son aquellos con IHQ 3+ o IHQ 2+ y amplificación por FISH (Figura 6).

Figura 6. Algoritmo para la selección de pacientes candidatos a Trastuzumab en CG.



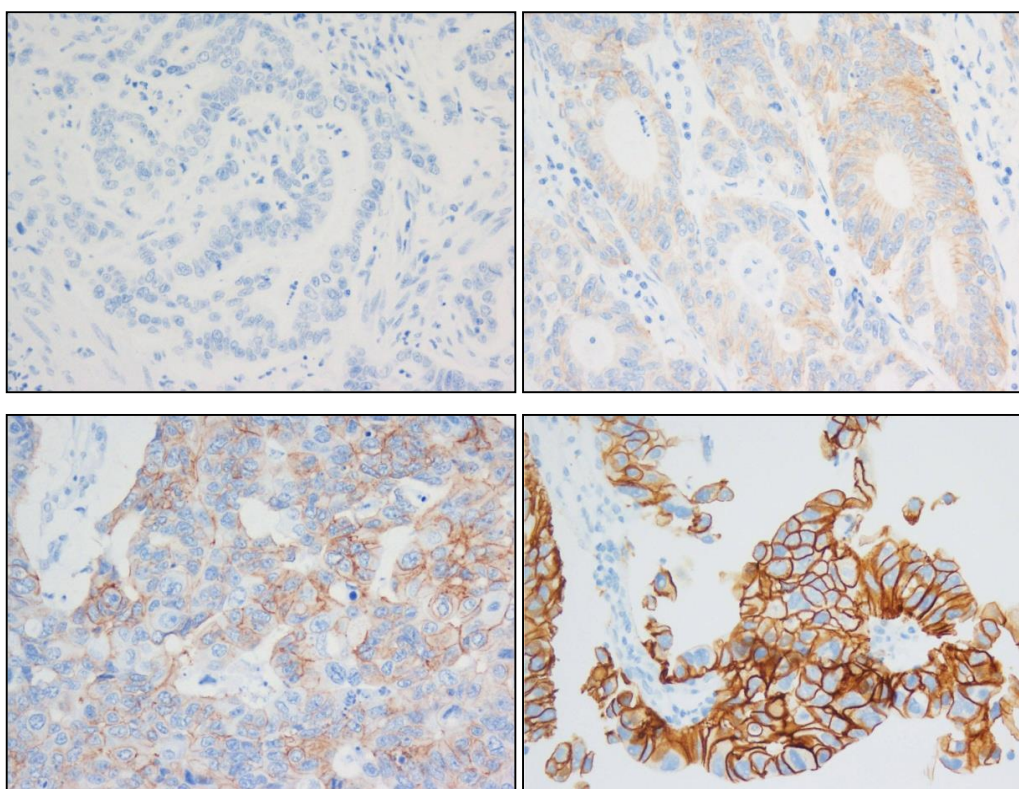
En 2011 la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) publicaron unas guías de consenso para la determinación e interpretación de HER2 en cáncer gástrico, cuyas peculiaridades se muestran en la *Tabla 6* (464). En la *Figura 7* se muestran ejemplos de tinciones IHQ en muestras de CG.

Tabla 6. Interpretación de los resultados de IHQ según las guías SEOM/SEAP.

Interpretación de los resultados de IHQ	
Negativo (0)	Ausencia de tinción o tinción en menos del 10% de las células (piezas quirúrgicas)*
Negativo (1+)	Tinción de la membrana, al menos basolateral, casi imperceptible (visible sólo con objetivo 40x) en >10% de las células (piezas quirúrgicas)*
Indeterminado (2+)	Tinción moderada de la membrana, al menos basolateral (visible con objetivo de 10-20x) en >10% de las células (piezas quirúrgicas)*
Positivo (3+)	Tinción intensa de la membrana, al menos basolateral (visible con objetivos 2.5-5x) en >10% de las células (piezas quirúrgicas)*

**En biopsias endoscópicas nidos celulares de al menos 5 células se consideran positivas, independientemente del porcentaje de tinción.*

Figura 7. Tinciones inmunohistoquímicas de HER2 en cáncer gástrico.



a) IHQ HER2 0+ (40x). b) IHQ HER2 1+ (40x). c) IHQ HER2 2+ (40 x). d) IHC HER2 3+, (40x).

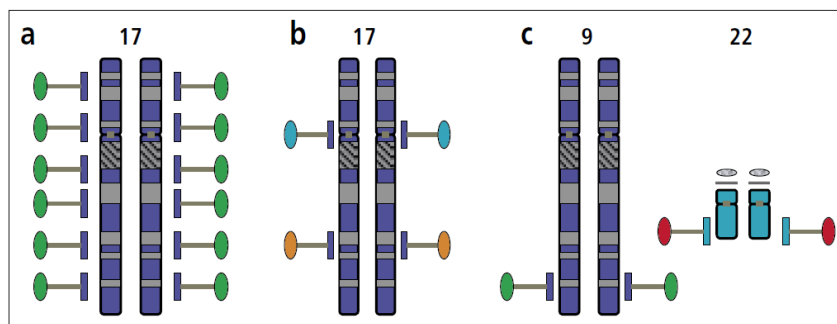
9.2. HIBRIDACIÓN *IN SITU*

9.2.1. FISH

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica que permite la localización de una secuencia de ADN de un gen o cromosoma en una preparación tisular, mediante el anillamiento de una cadena simple de ADN marcada con fluorescencia a la secuencia diana complementaria. Actualmente 3 tipos de sondas son las más utilizadas (465):

- Sondas de pintado cromosómico que identifican un cromosoma completo mediante la unión a secuencias superpuestas en su diana (por ejemplo el cromosoma 17) y pintan el cromosoma con la fluorescencia elegida (*Figura 8a*).
- Sondas centroméricas, que identifican la región del centrómero de un cromosoma específico y ayudan a cuantificar el número de copia de ese cromosoma, incluso en células en interfase (*Figura 8b*).
- Sondas alelo-específicas, que se adhieren a secuencias específicas de un alelo, como por ejemplo el gen supresor de tumores p53 o el oncogen *HER2/neu* (*Figura 8b y 8c*).

Figura 8. Tipos de sondas para FISH. Tomado de: Netto GJ (465)



a) Sondas de pintado cromosómico. b) Sondas centromérica del cromosoma 17 (azul) y sonda alelo-específica de HER2/neu (naranja). c) Sondas alelo-específicas en los cromosomas 9 y 22 para BCR-ABL.

Las ventajas que ofrece el FISH sobre otras técnicas de citogenética convencional es que se puede emplear tanto en tejido fresco como parafinado. Además puede llevarse a cabo con células en división (metafase) o no (interfase). Actualmente las técnicas de FISH se

emplean de forma rutinaria en la determinación del estado del gen *HER2/neu* en cáncer de mama y cáncer gástrico. El FISH de *HER2* es un método sensible y específico que identifica el número de copias del gen *HER2* así como el número de copias del centrómero del cromosoma 17 si utilizamos sondas duales. Existen tres métodos de FISH para *HER2* comercializados y aprobados en EEUU y Europa: PathVysion *HER2* DNA® kit (Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park II, USA) que emplea una sonda de hibridación naranja (Orange) para el gen *HER2* y una sonda verde (FITC) para el centrómero del cromosoma 17 (CEP17); INFORM *HER2/neu* Probe® (Ventana Medical Systems, Tucson AZ. USA) que emplea una única sonda fluorescente para la detección de *HER2* y *HER2* FISH pharmDx® kit (Dako, Carpinteria, California. USA) que emplea al igual que PathVysion dos sondas de hibridación, una roja (Texas Red) para el gen y otra verde (FITC) para el centrómero del cromosoma 17.

Esta técnica puede realizarse en secciones estándar (4-5 µm) de muestras parafinadas o incluso sobre extensiones citológicas o fluidos. La valoración del resultado es cuantitativa y se expresa como el número de copias del gen *HER2* en los casos de FISH sin control centromérico y como el ratio resultante de dividir el número de copias del gen frente al número de copias del centrómero del cromosoma 17 cuando se emplean 2 sondas, una específica para *HER2* y otra para el centrómero. Una célula normal debe tener 2 copias del gen *HER2/neu*, una en cada de las copias del cromosoma 17. Usando una sonda centromérica para el cromosoma 17 (señal verde) y una zona alelo-específica para el oncogén *HER2/neu* (señal roja), se espera encontrar 2 señales verdes y 2 señales rojas en una célula normal (ratio= 1).

En las guías nacionales e internacionales para la determinación de *HER2* en cáncer de mama, cuando se usa hibridación fluorescente sin control centromérico se considera un resultado positivo, es decir, existe amplificación del gen *HER2*, si se detectan más de 6 copias del gen por núcleo; considerándose *borderline* si el número está entre 4 y 6 copias/núcleo y no amplificado si se detectan menos de 4 copias del gen/núcleo. En las técnicas de FISH realizadas con control centromérico, se considera un cáncer de mama amplificado para *HER2* cuando el ratio es ≥ 2.2 . Las neoplasias con ratios entre 1.8 y 2.2 se clasifican como *borderline*, recomendándose la observación de un mayor número de núcleos, la evaluación por un segundo observador y/o la repetición de la prueba sobre otra sección. Este algoritmo diagnóstico no se aplica en la actualidad al resto de neoplasias donde un ratio ≥ 2 se considera amplificación para *HER2* (461).

Al ser el ADN más estable que las proteínas, los factores pre-analíticos (fijación de la muestra, conservación, etc...) tienen menos impacto sobre el resultado del FISH que sobre el de la IHQ. Asimismo la interpretación del resultado es más objetiva y con menor variabilidad interobservador que en las técnicas de IHQ, permitiendo identificar aquellos casos con resultado IHQ dudoso (2+) y que presenten amplificación del gen *HER2*. Las principales desventajas del FISH son la falta de control morfológico directo del área en que se determina la posible amplificación, el coste económico dado que requiere un microscopio de fluorescencia y la pérdida de la señal fluorescente con el tiempo si no se respeta su conservación refrigerada a -20°C.

En el caso del cáncer gástrico la guía de la SEOM y la SEAP (464) recomienda:

1. A ser posible se realizará la valoración de toda la sección histológica y una adecuada selección de los campos para cuantificar la señal. En campos de aumento intermedio (x200) se evaluará la distribución de la señal, que en general será homogénea en toda la superficie tumoral, sin embargo en algunas ocasiones son posibles distribuciones heterogéneas, que pueden dar lugar a amplificaciones en mosaico.
2. Se evaluará sólo el componente tumoral.
3. En el caso de piezas quirúrgicas se deberán evaluar al menos secciones con 20 células consecutivas. En el caso de biopsias endoscópicas, se requieren al menos 5 células evaluables.
4. En el caso de técnicas con sondas duales, la interpretación se realizará de la siguiente manera:
 - No amplificado: ratio *HER2*/CEP17 <2 (*Figura 9*).
 - Amplificado; ratio *HER2*/CEP17 ≥2 (*Figura 10*).
 - Polisomía del cromosoma 17: el número de señales de centrómero 17 por núcleo es >3 (*Figura 11*).
 - Monosomía del cromosoma 17: número de señales de centrómero 17 <1.5. En algunos casos en la monosomía del cromosoma 17 el ratio *HER2*/CEP17 es igual a 2 por la existencia de una copia del centrómero 17 y 2 copias del gen *HER2*. Sin embargo, estos casos no deben interpretarse como amplificados.

- No interpretable:
 - i. No presencia de señal de una u otra de las sondas en al menos 20 células.
 - ii. Si la señal es débil o no existe señal en >25% de las células.
 - iii. Los controles no muestran el resultado esperado.

Figura 9. FISH *HER2/CEP17* no amplificado (100x).

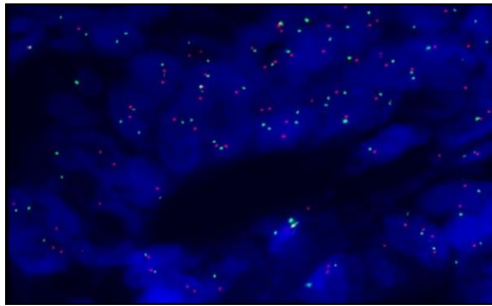


Figura 10. FISH *HER2/CEP17* amplificado (100x).

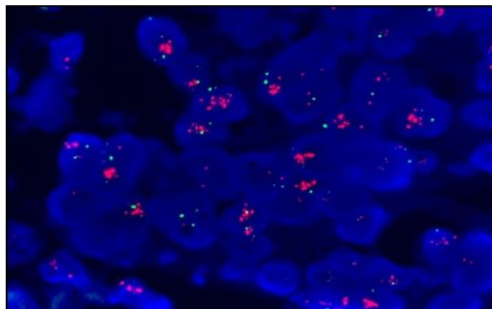
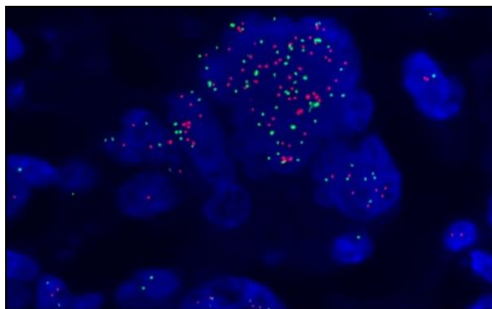


Figura 11. FISH *HER2/CEP17* no amplificado. Polisomía Cromosoma 17 (100x).



9.2.2. CISH

El CISH (Hibridación *in situ* cromogénica) es una modificación del método FISH para la detección de amplificación del gen *HER2*. Esta técnica se basa, al igual que el FISH, en la capacidad de una sonda de ácido nucleico previamente marcada de unirse *in situ* a la secuencia complementaria de ADN dentro de los núcleos celulares de una muestra tisular. Al igual que el FISH, el CISH puede realizarse sobre secciones de 4-5 µm de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina; siguiendo los mismos pasos que el FISH. La principal ventaja del CISH frente al FISH recae en la posibilidad de detectar la amplificación del gen empleando un microscopio de campo claro, no de fluorescencia. Esto es posible mediante conversión enzimática del revelado cromogénico de las sondas fluorescentes, al unir a la sonda a hibridar un enzima peroxidasa que permite su posterior detección por métodos cromogénicos. Asimismo permite realizar de manera simultánea un control morfológico de la lesión y el recuento de las copias del gen. La señal de hibridación permanece estable por periodos prolongados a temperatura ambiente de manera similar a los estudios con inmunohistoquímica, y la lectura de los resultados es más rápida y sencilla.

Existen 2 clases de CISH:

- **CISH estándar o monocromo;** en el cual se emplea una única sonda marcada para la detección del gen *HER2*, como el empleado en el preparado comercial SPoT-Light CISH detection® Kit (Zymed Immunoproducts, Invitrogen Carlsbad, CA, USA).
- **Dual Colour CISH (dc-CISH) o CISH dual;** utiliza dos sondas simultáneamente, una marcada con dioxigenina para la detección de las copias del gen *HER2* y otra marcada con biotina para la del centrómero del cromosoma 17. El empleo de dc-CISH permite el cálculo del ratio de amplificación de manera idéntica a como se realiza con el FISH así como la detección de posibles polisomías del cromosoma 17. El más reciente ejemplo de dc-CISH comercializado es el Dako Duo-CISH® (Dako, Carpinteria, California, USA), que emplea las sondas de FISH Texas Red y FITC para, posteriormente, incubarlas primero con anticuerpos AntiTexas Red/AP y AntiFITC/HRP y finalmente con una solución de substratos cromógenos que dan la señal azul (centrómero) y roja (gen).

Con el empleo en estudios más recientes de dc-CISH, la concordancia con FISH es del 95-100% a la hora de determinar si existe o no amplificación (466-469).

9.2.3. SISH

El método Silver-enhanced *In situ* Hybridization (SISH) o hibridación *in situ* argéntica es una técnica mixta que surge de la aplicación de los métodos metalográficos a las técnicas de hibridación *in situ* empleadas habitualmente para la determinación del estado del oncogén *HER2* (Figura 12). Podemos diferenciar dos tipos de SISH:

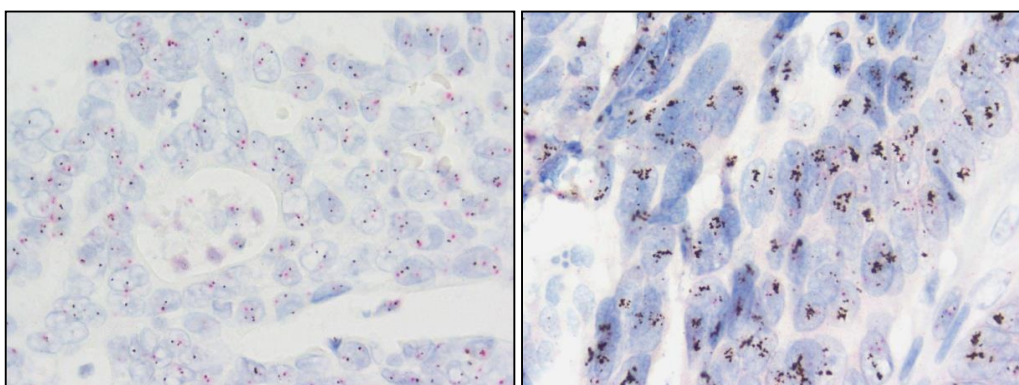
- **SISH monocromo.** Este método SISH fue comercializado con la denominación EnzMet Genepro® (Ventana Medical Systems, Tucson AZ. USA). Al tratarse de un método de hibridación sin control centromérico el resultado se expresa en número de copias del gen *HER2*, considerándose un caso amplificado si tiene más de 6 copias del gen por cada núcleo o grandes acúmulos de depósito de plata puntiformes en más del 30% de las células.
- **Dual Colour SISH o SISH dual (dc-SISH).** Se trata de un método de hibridación argéntica bicolor automatizado comercializado como Dual Colour SISH INFORM *HER2* DNA Probe® and INFORM Chromosome 17 Probe® (Ventana Medical Systems, Tucson AZ. USA). Este método se desarrolla mediante dos hibridaciones secuenciales, primero el gen *HER2* y a continuación el centrómero del cromosoma 17. Las sondas se incuban, en un primer paso, con anti-DNP (dinitrofenol) y posteriormente con un anticuerpo de cabra conjugado con enzimas (HRP para el gen *HER2* y fosfatasa alcalina para el centrómero) a los que se unirán las sales de plata y el cromógeno rojo para su posterior visualización. El resultado es expresado como el ratio entre las copias del gen *HER2*/CEP17, considerándose amplificación positiva ratios ≥ 2.2 en carcinoma de mama y ≥ 2 en otras neoplasias, incluido el carcinoma gástrico.

Este método dc-SISH es llevado a cabo de manera completamente automática mediante un sistema robotizado, lo que consigue completar todo el proceso en 12 horas frente a las más de 24 horas que necesitan las técnicas de hibridación previas (FISH y CISH). Esta automatización del proceso permite el procesamiento de una mayor cantidad de muestras de modo simultáneo, aumenta la eficiencia y consistencia de los resultados y permite la realización de procesos independientes en muestras contiguas. Estas ventajas se unen a la

facilidad de lectura de los resultados al precisar únicamente un microscopio de campo claro, al igual que el CISH, y permanecer, a priori, la tinción estable durante largos periodos de tiempo cuando se conserva en condiciones apropiadas.

Diversos estudios han demostrado la alta concordancia (96-98%) entre los métodos de FISH y dc-SISH en cáncer de mama para la determinación del estado de *HER2* (470, 471). En un estudio español en una amplia serie de adenocarcinomas gástricos se evidenció una concordancia en la determinación de la amplificación de *HER2* del 96.4% entre dc-SISH y FISH, siendo el índice Kappa de 1 (concordancia del 100%) en el caso de considerar un punto de corte de 3 para considerar *HER2* amplificado por dc-SISH (472). La ventaja de esta técnica sobre el FISH es la facilidad de su fase post-analítica, de más fácil aplicación en la práctica clínica diaria y con posibilidad de realización en laboratorios más pequeños.

Figura 12. a) dc-SISH *HER2*/CEP17 no amplificado. b) dc-SISH *HER2*/CEP17 amplificado (40x).



9.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

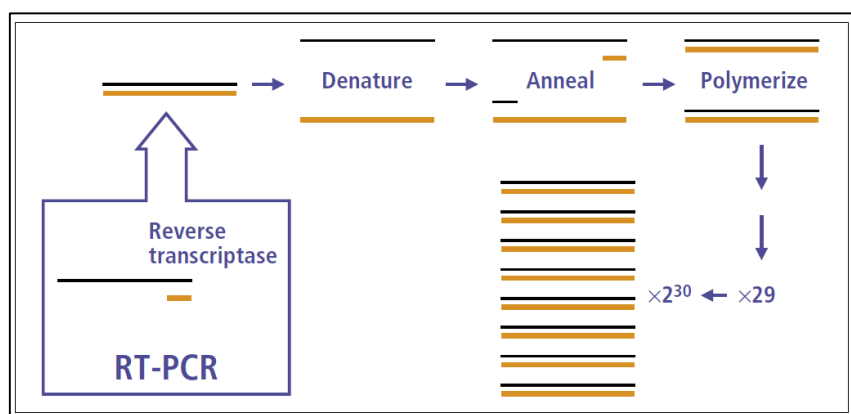
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las técnicas más utilizadas en los laboratorios de biología molecular. En la PCR una única secuencia de un ácido nucleico es elegida para su amplificación, por ejemplo un oncogén, una mutación genética, etc. La especificidad de la técnica es aportada por el uso de dos oligonucleóticos cortos (compuestos por entre 15 y 30 nucleótidos) llamados *primers* o cebadores que delimitan la zona de interés, siendo complementarios a los extremos de la secuencia de ADN que se quiere amplificar. La enzima ADN-polimerasa cataliza la unión de nucleótidos al

extremo 3' del *primer* en cada una de las cadenas de ADN. Cada PCR consta 3 pasos básicos (*Figura 13*):

1. Desnaturalización. Las dos cadenas de la hélice de ADN se desenrollan y se separan por calor a una temperatura entre 90 y 95°C.
2. Alineamiento o hibridación. Los *primers* se unen a las bases complementarias de cada una de las cadenas de ADN. Este paso se realiza a una temperatura menor de 55°C.
3. Polimerización. A 65-75°C la enzima polimerasa lee la cadena molde y va uniendo los nucleótidos correspondientes, dando lugar de nuevo a una doble cadena de ADN. La polimerasa más empleada es la *Taq*-polimerasa, llamada de esta forma por derivar de la bacteria *Thermophilus aquaticus*.

Este proceso se repite 30-40 veces, doblando la cantidad de material genético en cada ciclo. Al final del procedimiento, se habrán generado millones de copias idénticas de la secuencia de ADN de interés. Esas copias son idénticas en peso molecular y carga eléctrica, por lo que migrarán simultáneamente, formando una banda única cuando se realice una electroforesis.

Figura 13. Pasos de una reacción PCR/RT-PCR. Tomado de Netto GJ (465).



La PCR también puede emplearse para amplificar secuencias de ARN, a este procedimiento se le denomina PCR por transcriptasa reversa (RT-PCR). En la RT-PCR en primer lugar la secuencia de ARN de interés es convertida a una doble cadena de ADN (cADN) mediante una enzima transcriptasa reversa procedente de un retrovirus. La

secuencia de cADN puede entonces ser amplificada mediante el mismo ciclo de PCR explicado con anterioridad. Como el ARN no es tan estable como el ADN, en general se requieren biopsias frescas para la realización de RT-PCR, a diferencia de la PCR del ADN, que se puede realizar sobre muestras en parafina archivadas.

La PCR en tiempo real (Q-PCR) añadió importantes ventajas a la PCR clásica. Como su propio nombre indica, permite cuantificar en tiempo real la cantidad sintetizada del producto de la PCR tras cada uno de los ciclos. El método de Q-PCR emplea colorantes o fluorocromos como SYER Green y EtBr que aumentan su fluorescencia cuando se unen a la doble cadena de ADN. La señal fluorescente generada es proporcional al número de copias del producto. Se reduce el tiempo de análisis post-PCR, dado que elimina la necesidad de emplear un gel de electroforesis. Los resultados pueden obtenerse en 2 horas y, dependiendo del instrumento usado, pueden analizarse unas 96 muestras en cada carrera de PCR. Además disminuye el riesgo de contaminación del amplicón, puesto que la amplificación y cuantificación de cada muestra se realiza en un único tubo sellado, y los resultados son más reproducibles.

La técnica MLPA o *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples) es una variante de PCR que permite amplificar múltiples secuencias diana empleando tan solo un par de *primers*. No vamos a explicar el procedimiento de esta técnica por no ser motivo de este proyecto, sin embargo, cabe decir que la MLPA consigue de manera eficaz y fácil determinar el número relativo de copias y de exones dentro de un gen con una alta sensibilidad. Además es un método cuantitativo, que a diferencia de otras técnicas empleadas en la determinación de HER2 como la IHQ o el FISH no está influida por interpretaciones subjetivas. Se postula su potencial valor en los casos con polisomía del cromosoma 17 (473). Su validación para la determinación del estado de amplificación de *HER2* aún no está establecida y requiere más estudios que confirmen la concordancia de sus resultados con las técnicas estándar (474, 475).

9.4.MICROARRAYS

El análisis de microarrays es uno de las nuevas tecnologías implantadas en los últimos años en la investigación de la genética y las vías de señalización oncogénicas. Junto con las plataformas de secuenciación masiva de última generación, han permitido avanzar en el descubrimiento de dianas terapéuticas y de nuevos biomarcadores. Los marcadores basados en el ADN incluyen mutaciones, polimorfismos de nucleótido único (SNP), aberraciones cromosómicas, cambios en el número de copias de ADN o diferencias en la metilación. Entre los biomarcadores basados en el ARN se encuentran la sobreexpresión o subexpresión de transcritos y miARN.

Un microarray es un formato experimental, que permite el análisis de múltiples genes en un único análisis, basado en la síntesis o fijación de sondas, que representan los genes (o proteínas, o metabolitos), sobre un sustrato sólido (cristal, plástico, silice,...), y expuestos a las moléculas diana (la muestra) (*Figura 14*). El nivel de hibridación entre la sonda específica y la molécula diana se indica generalmente mediante fluorescencia. Esta imagen es analizada mediante un software especial, que transforma los resultados en una rejilla en la que cada gen está representado en una casilla correspondiente a la sonda en la muestra problema. Los colores indican el nivel de expresión del gen (*Figura 15*).

Figura 14. Plataforma de microarrays.

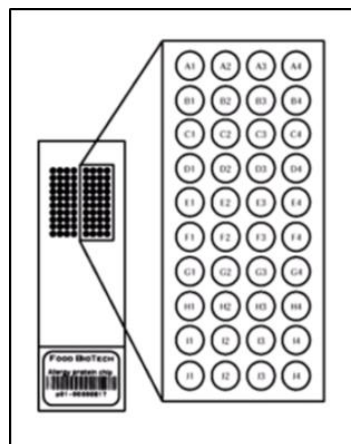
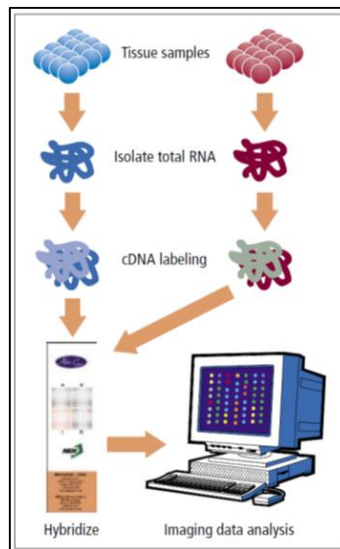


Figura 15. Pasos en el análisis de microarrays de ADN. Tomado de Netto GJ (465).



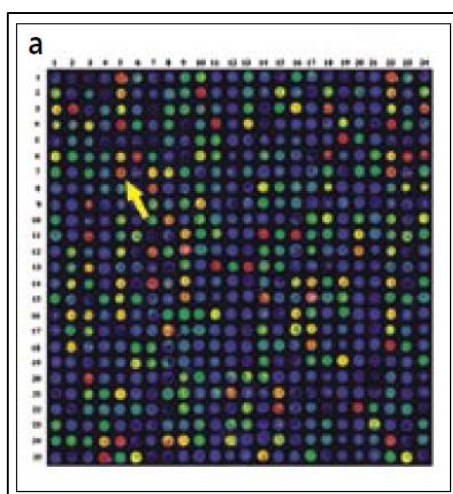
Existen diferentes tipos de microarrays:

- De ADN:
 - De CGH (*Comparative Genomic Hybridization* o hibridación genómica comparada).
 - De SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms* o Polimorfismos de nucleótido único).
- De proteínas.
- De tejidos.
- De expresión:
 - De cADN.
 - De oligonucleótidos.

Los microarrays de c-ADN están compuestos por secuencias de ADN complementario a una librería de ARNm. Las sondas de ADN se inmovilizan en un soporte sólido y sirven de sondas de anclaje a las que se unirá el ARNm procedente de las muestras a estudio durante el proceso de hibridación. Si el ARNm a testar se une primero a un marcador fluorescente, la intensidad de la fluorescencia en cada localización de anclaje (correspondiente a cada sonda empleada) será proporcional a la cantidad de ARNm o grado de expresión del gen de esa localización. Un lector de microarrays mostrará la

intensidad de fluorescencia en una rejilla en la que cada punto representa un gen y el color la intensidad de expresión. En el ejemplo de la *Figura 16* el color azul indica expresión normal del gen y los colores verde, amarillo, naranja y rojo representa grados de expresión del gen progresivamente mayores. Por ejemplo, en la figura, si la casilla correspondiente a la columna 5-fila 7 es el gen *HER2/neu*, la señal roja en esa localización representa una alta sobreexpresión de HER2 en la muestra tumoral.

Figura 16. Plataforma de microarrays de cADN. Tomado de: Netto GJ (465).



Los microarrays de oligonucleótidos emplean pequeñas secuencias de ADN (de 20-70 nucleótidos de longitud) sintetizadas químicamente y colocadas en un soporte sólido o directamente sintetizadas sobre dicho soporte, y que servirán como sondas de hibridación para los ARNm complementarios de la muestra.

Sus aplicaciones son múltiples: estudio de genes que se expresan diferencialmente en distintas condiciones (sanos/enfermos, mutantes/nativos, tratados/no tratados), clasificación molecular de enfermedades complejas, identificación de genes característicos de una patología (*firma o "signature"*), predicción de respuesta a un tratamiento, detección de mutaciones y polimorfismos de un único gen, entre otras.

En los últimos años se han publicado diferentes estudios que emplean la tecnología de microarrays en el análisis genómico del cáncer gástrico (**115, 116, 476-480**), siendo múltiples sus aplicaciones y los avances en el conocimiento de las bases moleculares que con ello se están alcanzando. A continuación comentamos algunos de estos estudios a

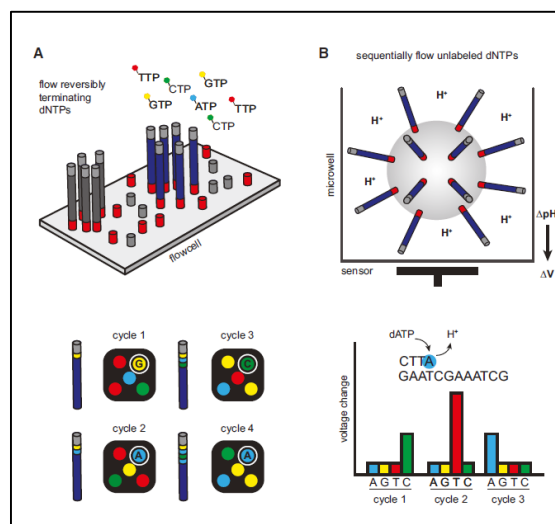
modo de ejemplo, pero son muchos otros los que podemos encontrar en la literatura. Mediante arrays de cADN, Shah *et al.* (116) analizaron 36 pacientes con cáncer gástrico e identificaron diferentes vías de expresión génica que se encuentran diferencialmente reguladas en las distintas histologías de cáncer gástrico y determinan diferentes comportamientos clínicos. Sakamoto *et al.* (119) mediante el estudio de SNPs por análisis de microarrays, identificaron el gen *PSCA* como gen de susceptibilidad genética para cáncer gástrico difuso. Jin *et al.* (479) analizaron mediante arrays de CGH el perfil de expresión génica de diferentes muestras de cáncer gástrico y de controles sanos, encontrando en las muestras tumorales una sobreexpresión de los genes relacionados con la proliferación celular, mientras que los relacionados con el sistema inmune y la homeostasis celular presentan una baja expresión. Otros investigadores se han centrado en el estudio de lncARN (ARN largo no codificante), fragmentos de ARN encargados de regular la expresión de otros genes, como posibles biomarcadores y futuras dianas terapéuticas (481). Mediante microarrays de expresión se ha estudiado el papel de diferentes miARN en la progresión y el pronóstico del cáncer gástrico (238).

Es evidente que la aplicación de la tecnología está acelerando el conocimiento de la compleja estructura e historia natural de los tumores. Sin embargo, la mayoría de los datos proceden de pequeños estudios, siendo necesario llevar a cabo grandes ensayos clínicos para poder definir correctamente el papel del análisis de microarrays en la práctica clínica y su papel pronóstico y predictivo.

9.5. PLATAFORMAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA

Antes de hablar de los métodos de secuenciación masiva, vamos a resumir brevemente la historia de la secuenciación del ADN. En 1977 Frederick Sanger desarrolló la tecnología de secuenciación del ADN conocido como método enzimático de terminación de cadena o método didesoxi de Sanger, y Walter Gilbert desarrolló la tecnología basada en la modificación química del ADN y posterior escisión de bases. Debido a su alta eficiencia y baja radioactividad, el método de Sanger tuvo una mayor aceptación y se adoptó como tecnología de secuenciación de “primera generación”. Años después se desarrollaron los primeros sistemas automatizados empleando la electroforesis capilar automatizada. El desarrollo tecnológico de estos sistemas automatizados más veloces condujo a completar el Proyecto Genoma Humano en 2001 (482). Ello aceleró el desarrollo de las tecnologías de “segunda generación” o métodos de secuenciación masiva en paralelo (“*Next-Generation Sequencing*”, NGS) que permiten la secuenciación de múltiples fragmentos en paralelo en menor tiempo, a un coste más reducido y con menos mano de obra (*Figura 17*) (483).

Figura 17. Plataformas de secuenciación masiva en paralelo. Tomado de: Reuter JA et al. (484).



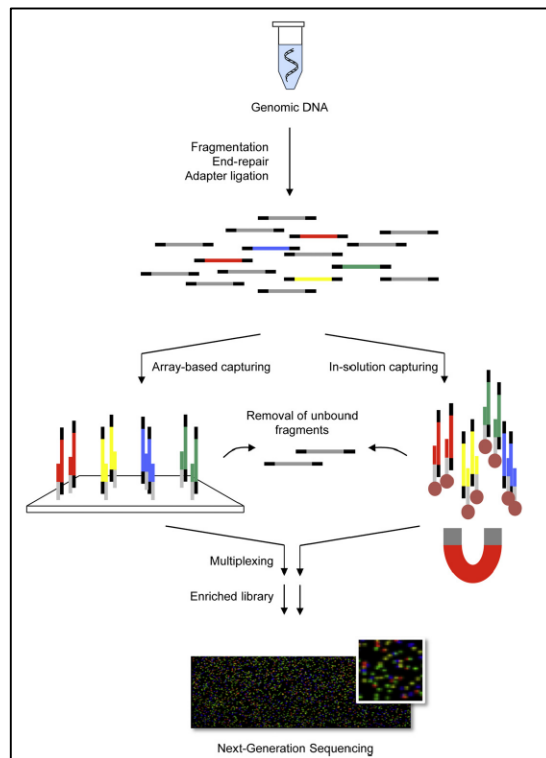
A) Illumina. Método de secuenciación basado la lectura del color de la base incorporada en cada ciclo; clonación en una celda de flujo o superficie de cristal. B) Ion Torrent. Método de secuenciación mediante semiconductores y detección de cambios de pH; PCR en emulsión.

Entre las plataformas de secuenciación masiva más ampliamente empleadas se encuentran 454 Genome Sequencer (Roche Applied Science), Solexa technology (Illumina) y SOLiD (Life Science). Aunque existen algunas diferencias técnicas, el concepto de estas plataformas de NGS es bastante similar y consta de los siguientes pasos:

1. Preparación de la librería (Figura 18).

- a. Aislamiento del ADN de la muestra.
- b. Fragmentación del ADN genómico en pequeños fragmentos de 300-500 pares de bases.
- c. Unión de adaptadores sintéticos de acción enzimática en los extremos del fragmento de ADN, que proporcionan las secuencias de hibridación necesarias para la posterior amplificación y secuenciación de los fragmentos de la librería.
- d. Fijación en un soporte sólido, donde cada molécula adopta una determinada posición.

Figura 18. Preparación de la librería. Tomado de: Haas J et al. (485)



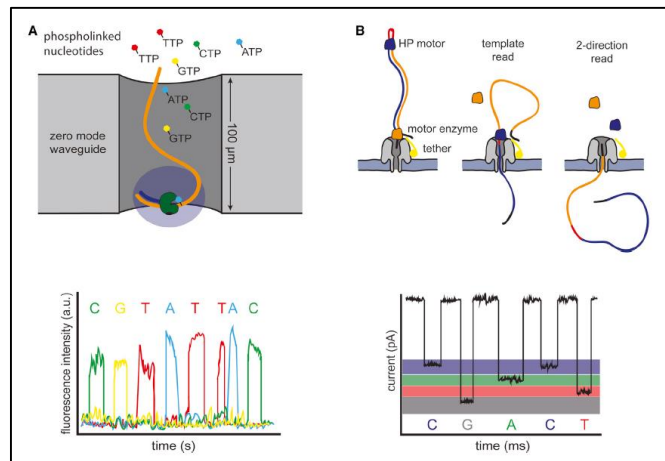
2. **Amplificación masiva de los fragmentos de la librería mediante PCR.**
3. **Secuenciación por síntesis de cada fragmento en paralelo.**
4. **Análisis de los datos bioinformáticos:** análisis de la señal, confrontación con valores de referencia e interpretación de los resultados.

En nuestro estudio empleamos la plataforma de secuenciación Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) (Life Technologies, Carlsbad, CA, SA), que se basa en la tecnología de semiconductores para medir cambios en el pH y cuya metodología específica explicaremos en el apartado de Material y Métodos de esta tesis.

Desde 2005, con el objeto de secuenciar grandes genomas en menor tiempo y con reducción de costes, se han desarrollado los sistemas de “tercera generación” o de Secuenciación de Molécula Única, entre las que se encuentran SMRT de Pacific BioScience (Menlo Park, CA, USA) y Oxford Nanopore Technologies (*Figura 19*). Las ventajas respecto a las plataformas de “segunda generación” son: la secuenciación se realiza a partir de una única molécula, no requiriendo amplificación previa, por lo que se acorta el tiempo necesario para la preparación del ADN, requieren menor cantidad de muestra inicial, y la señal es capturada a tiempo real. Como desventajas se encuentran el mayor ratio de errores, el elevado coste de las plataformas y el mayor coste por base, siendo aún tecnologías inmaduras.

Las técnicas de secuenciación masiva en el campo de la Oncología nos permiten analizar exhaustivamente la genómica, transcriptómica y epigenómica del cáncer mediante diferentes técnicas: secuenciación dirigida, secuenciación del exoma, secuenciación de ARN, análisis de cromatina por inmunoprecipitación, análisis de metilación, y métodos de secuenciación de todo el genoma, aplicables al campo del consejo genético, el screening, el diagnóstico, el tratamiento, el pronóstico, la detección de enfermedad mínima residual o la recurrencia, entre otros (486-488). A día de hoy se ha secuenciado y analizado el genoma de muchos tipos de cáncer, incluyendo grandes proyectos internacionales como el TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) (122) y el ICGC (*The International Cancer Genome Consortium*) (489).

Figura 19. Plataformas de secuenciación de molécula única. Tomado de: Reuter JA et al. (484).



A) SMRT Pacific BioSciences. La secuenciación tiene lugar en un compartimento en cuyo fondo está situada la polimerasa. La polimerización ocurre de forma continua y la lectura de la secuencia de ADN ocurre en tiempo real mediante la grabación de las señales fluorescentes. B) Oxford Nanopore Technologies. Basado en la lectura de los cambios de corriente eléctrica que ocasiona el paso de los nucleótidos a través de un poro o canal.

Centrándonos en el estudio molecular del cáncer gástrico, en los últimos años han crecido de manera exponencial los estudios empleando NGS. Wang *et al.* publicaron en 2011 el primer estudio de secuenciación de exomas de 22 pares de muestras de cáncer gástrico y tejido gástrico sano, e identificaron 20 genes candidatos a *drivers*, entre los que se encontraban *TP53*, *PTEN*, *CTNNB1*, *TTK*, *ACVR2A*, entre otros. El mayor descubrimiento de este estudio fue la alta incidencia de la mutación en el gen *ARID1A* en cáncer gástrico. Posteriormente empleando el método de Sanger secuenciaron un número adicional de muestras de cáncer gástrico, encontrando que la tasa de mutaciones en *ARID1A* era diferente según el subtipo molecular y clínicamente las alteraciones en *ARID1A* se asociaban a un mejor pronóstico, independientemente del estadio (108). De manera especialmente interesante, Zang *et al.* identificaron *ARID1A* como un gen *driver* en un estudio de secuenciación exómica que llevaron a cabo en 15 muestras pareadas de cáncer gástrico y tejido sano (490). En este estudio también identificaron *FAT4*, un gen de la familia de E-cadherina, como gen supresor tumoral. En otro estudio del mismo grupo, se analizó la región codificante de 537 proteínas quinasa, y se identificaron más de 300 variantes de nucleótido único (491). Holbrook *et al.* mediante el análisis dirigido de 384 genes implicados en la patogenia del cáncer, identificaron mutaciones en las vías RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT, WNT y de Hedgehog, sugiriendo nuevas oportunidades terapéuticas (492). Recientemente, en 2014 Wang *et al.* publicaron los resultados de un estudio de mayor tamaño llevado a cabo en 100 pares de muestras de CG

y tejido no tumoral, analizando número de copias de ADN, expresión génica y perfil de metilación, e identificaron los genes clave en cada subtipo tumoral **(110)**. También se han realizado estudios en el ámbito de la transcriptómica mediante NGS, que permite detectar no sólo los niveles de expresión génica, sino también empalmes (en inglés *splicings*) alternativos, genes de fusión, expresión alélica, entre otros **(493)**. Como claro ejemplo de los avances aportados por las plataformas NGS en el CG se encuentra el proyecto del TGCA, publicado en 2014, en el que usando seis plataformas moleculares (análisis del número de copias somáticas, secuenciación masiva de exomas, perfil de metilación del ADN, secuenciación de ARN mensajero, secuenciación de microARN y arrays de proteínas en fase reversa), se analizaron 295 muestras de adenocarcinoma gástrico y crearon un algoritmo para clasificar el CG en 4 subtipos moleculares **(122)**, tal y como hemos comentado en el apartado de clasificación molecular.

Aunque las tecnologías de NGS representan una revolución en la secuenciación del genoma tumoral, también suponen un gran reto para su aplicación con éxito en la práctica clínica habitual, dada la gran cantidad de datos generada, su complejidad y la dificultad para seleccionar adecuadas dianas terapéuticas. Su complementación con técnicas clásicas como la inmunohistoquímica puede ayudar a seleccionar las dianas terapéuticas óptimas para el diseño de ensayos clínicos con nuevas moléculas y a alcanzar su aplicabilidad en la práctica clínica.

II. HIPÓTESIS

El conocimiento de las alteraciones moleculares concurrentes con la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* en pacientes con adenocarcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica en estadio avanzado tratados con Trastuzumab, puede ayudar a establecer nuevos factores predictivos y/o pronósticos, así como facilitar el hallazgo de terapias personalizadas para estos pacientes. En concreto en el caso de los tumores HER2 positivos, el estudio de la activación simultánea de otras vías mediadas por receptores con actividad tirosina quinasa y de la ruta PI3K/Akt/mTOR puede ser esencial para la selección de los pacientes idóneos para terapias dirigidas frente a HER2.

III. OBJETIVOS

1. Caracterizar molecularmente los adenocarcinomas gástricos con sobreexpresión y/o amplificación de *HER2*.
2. Determinar las posibles relaciones entre las alteraciones moleculares halladas y las diferentes características clínicas y patológicas de los pacientes con cáncer gástrico HER2 positivo.
3. Determinar el papel pronóstico en términos de supervivencia global y supervivencia libre de progresión de las alteraciones moleculares encontradas en esta población.
4. Determinar el valor predictivo de la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR en los adenocarcinomas gástricos HER2 positivos tratados con Trastuzumab.
5. Determinar el valor predictivo de la amplificación de los genes codificantes de receptores de membrana con actividad tirosina quinasa en los adenocarcinomas gástricos HER2 positivos tratados con Trastuzumab.
6. Identificar subgrupos de pacientes con adenocarcinoma gástrico con sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* subsidiarios de un tratamiento personalizado mediante fármacos dirigidos a dianas moleculares en base a su perfil genómico, en combinación o secuencialmente con Trastuzumab.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE CASOS

1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Los adenocarcinomas gástricos estudiados en este proyecto de tesis proceden de diversos centros hospitalarios de España diagnosticados y tratados en los mismos centros entre los años 2007 y 2012 (*Tabla 7*).

Los criterios de inclusión para la selección inicial de las muestras son:

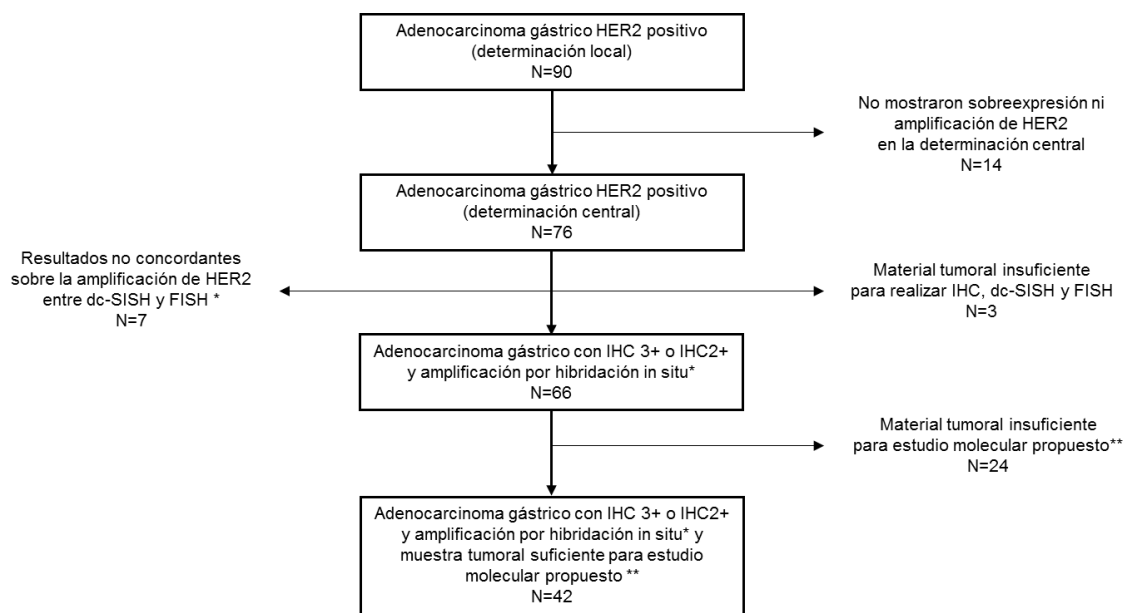
1. Confirmación histológica de adenocarcinoma gástrico de acuerdo a resultados anatomopatológicos locales.
2. Estadio avanzado (metastásico).
3. Tratamiento con quimioterapia de primera línea basada en Trastuzumab.
4. Disponibilidad de los datos clínicos necesarios para su posterior correlación, incluyendo evaluación de la respuesta tumoral según criterios RECIST v1.0 (*Anexo I*) y adecuado seguimiento.
5. Muestra tumoral suficiente para el análisis molecular, incluyendo IHQ, dc-SISH y eventualmente FISH, así como secuenciación masiva con tecnología de última generación (NGS).

Tabla 7. Listado de centros hospitalarios participantes.

Centros hospitalarios
1. Hospital Universitario Madrid-Norte (Madrid)
2. Hospital Univesitario Marqués de Valdecilla (Santander)
3. Hospital Universitario Arnau Vilanova (Lérida)
4. Hospital Del Mar (Barcelona)
5. Hospital Miguel Servet (Zaragoza)
6. Fundación Jiménez Díaz (Madrid)
7. Hospital Central de Asturias (Oviedo)
8. Hospital Clinic Barcelona (Barcelona)
9. Hospital Vall d'Hebron (Barcelona)
10. ICO Bellvitge (Barcelona)

Las muestras histológicas empleadas se obtuvieron a partir de biopsias endoscópicas, de las piezas quirúrgicas procedentes de gastrectomías, y/o de muestras quirúrgicas procedentes de localizaciones metastásicas antes de recibir cualquier tratamiento. Todas las muestras tumorales inicialmente seleccionadas fueron revisadas de manera centralizada para la determinación del estado de HER2 mediante IHQ y dc-SISH, independientemente de los resultados del laboratorio local. Se realizó FISH de *HER2* cuando el resultado por dc-SISH no fue valorable o mostró un ratio *HER2/CEP17* menor de 4, con objeto de asegurar que sólo se incluían pacientes con verdadera amplificación de *HER2* (472). Solamente los pacientes con confirmación central de la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* fueron finalmente incluidos (*Figura 20*).

Figura 20. Diagrama de flujo de los pacientes del estudio.



*Todas las muestras tumorales fueron revisadas de manera central para la determinación del estado de HER2 empleando IHC y dc-SISH. Se realizó FISH de HER2 cuando el resultado por dc-SISH falló o mostró un ratio *HER2/CEP17* menor de 4 para confirmar que sólo se incluían pacientes con verdadera amplificación de HER2.

Se definió la población del estudio HER2 positiva candidata a tratamiento con trastuzumab (según criterios de FDA) si cumplía alguno de los siguientes criterios:

IHC 3+.

IHC 2+ y dc-SISH ratio *HER2/CEP17* ≥ 4 .

IHC 2+, dc-SISH *HER2/CEP17* ratio ≥ 2 confirmado por FISH (ratio *HER2/CEP17* ≥ 2)

**IHC e ISH de MET, IHC de PTEN y secuenciación mediante NGS.

De los 90 pacientes de la serie inicial con adenocarcinomas gástricos HER2 positivos según determinación local, se seleccionaron 76 casos con adenocarcinoma gástrico HER2 positivo según la determinación central. Del global de pacientes con un seguimiento adecuado se seleccionaron 42 pacientes que cumplían todos y cada uno de los siguientes requisitos:

- Presentaban sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* según alguno de los siguientes parámetros:
 - IHQ 3+.
 - IHQ 2+ y dc-SISH ratio *HER2*/CEP17 ≥ 4 .
 - IHQ 2+, dc-SISH *HER2*/CEP17 ratio ≥ 2 confirmado por FISH (ratio *HER2*/CEP17 ≥ 2).
- Habían sido tratados con Trastuzumab y quimioterapia.
- Existía suficiente material tumoral como para realizar los métodos de diagnóstico molecular propuestos (IHQ, dc-SISH, FISH si procede y NGS).

1.2. RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS

Dada la necesidad de recoger datos confidenciales de los pacientes incluidos, este proyecto fue presentado para su aprobación por el Comité Ético y de Investigación Clínica del Hospital Universitario “12 de Octubre” de Madrid, valorándose positivamente y autorizando su realización.

La recogida de datos clínicos fue llevada a cabo de forma centralizada mediante la revisión de las historias clínicas de todos los pacientes incluidos inicialmente en este proyecto de tesis. Los datos clínicos e histológicos recogidos fueron anonimizados en bases de datos.

Los datos clínico-patológicos obtenidos de cada paciente fueron:

- Epidemiológicos: edad, sexo.
- Anatomopatológicos: tipo histológico, grado de diferenciación.
- Clínicos: afectación metastásica y localización de la misma, antecedentes de cirugía del cáncer gástrico y fecha de la misma, tratamiento adyuvante y tipo,

fecha de recidiva y tratamiento de 1ª línea de la misma, respuesta al tratamiento de 1º línea, fecha de recidiva tras tratamiento de 1ª línea y tratamiento de 2ª línea administrado, respuesta al tratamiento de 2ª línea, fecha de exitus o de último seguimiento y situación en el mismo.

1.3. ESTUDIO HISTOLÓGICO

Inicialmente se obtuvieron muestras tumorales procedentes de 90 pacientes con confirmación histológica de adenocarcinoma gástrico con sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* según criterios locales. De cada uno de los pacientes se remitió el bloque tumoral parafinado al laboratorio central. En aquellos casos en que se disponía de más de una muestra por paciente se seleccionó para su análisis molecular aquella en mejor estado de conservación y contenido mayor de tejido tumoral.

De cada una de las muestras se evaluaron todas las preparaciones histológicas disponibles, seleccionando con un rotulador indeleble aquellas áreas que contuviesen una cantidad óptima de tumor y excluyendo las zonas con necrosis o inflamación. Una vez elegidas las preparaciones más representativas de cada caso, se seleccionaron sus respectivos bloques. Todos los casos fueron revisados y clasificados de acuerdo a la última clasificación de la OMS (86) y la clasificación de Laurén (87) por dos patólogos experimentados.

Inicialmente se realizaron 10 cortes de 3 μ de cada uno de los bloques para su posterior uso en las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*. Para ello, se empleó la técnica tradicional de microtomía: enfriando ligeramente los bloques antes de cortarlos, empleando un baño de agua caliente y utilizando portaobjetos silanizados (cargados electrostáticamente). Para mantener la antigenicidad de los cortes tisulares tras la sección, los portaobjetos se introdujeron en parafina líquida y así se almacenaron. Para su uso inmediato posterior, se eliminó la parafina dejando los portaobjetos en la estufa toda la noche a 56° C.

1.4. SELECCIÓN DE CASOS HER2 POSITIVOS

1.4.1. INMUNOHISTOQUÍMICA DE HER2

El estudio para la determinación de la proteína HER2 mediante inmunohistoquímica se realizó con el anticuerpo Pathway anti-HER-2/*neu* (4B5) en la plataforma automatizada BenchMark ULTRA® (Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). Como control positivo se seleccionó un carcinoma de mama con expresión proteica 3+ para HER2 y como control negativo un carcinoma de mama con expresión proteica 0 para HER2. El desparafinado y recuperación antigénica con CC1 durante 30 minutos se realizaron de manera automatizada en el BenchMark ULTRA. A continuación, el anticuerpo anti-HER-2/*neu* (4B5) fue incubado durante 16 minutos a 37° C. La detección antigénica se realizó con *ultraview* Universal DAB Detection Kit. Las muestras fueron contrateñidas con Hematoxilina II durante 8 minutos y “Bluing Reagent” durante 4 minutos. Se seleccionaron las áreas con expresión mayor de la proteína para su valoración. La interpretación de la inmunohistoquímica de HER2 se realizó según el método propuesto por Ruschhoff *et al.* (494), específico para los adenocarcinomas gástricos.

1.4.2. DC-SISH DE HER2

La técnica de *dual-colour* hibridación *in situ* argéntica (dc-SISH) fue realizada de forma automatizada en Ventana Benchmark XT® (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Las sondas para el gen *HER2* (INFORM HER2 DNA Probe®) y para el centrómero del cromosoma 17 (INFORM Chromosome 17 Probe®) fueron visualizadas en la misma preparación siguiendo el protocolo del fabricante e introduciendo variaciones mínimas a las condiciones de la técnica con el fin de conseguir resultados óptimos (470, 472). La totalidad del procedimiento (desparafinado, pretratamiento, hibridación, astringencia, revelado de la señal y contratinción) se realizó de forma totalmente automatizada (495). El pretratamiento se realizó con “Reaction Buffer” y digestión enzimática con ISH Protease 3 durante 12 minutos. La sonda para el gen *HER2* fue desnaturalizada a 95° C durante 15 minutos e hibridada a 56° C durante 6 horas. En un segundo paso, la sonda para el centrómero del cromosoma 17 fue desnaturalizada a 95° C durante 12 minutos,

realizándose la hibridación a 44° C durante 3 horas. Los lavados de astringencia para la sonda del gen se realizaron a 72° C durante 8 minutos (3 pasos) y, posteriormente, los cristales fueron incubados con el anticuerpo anti-DNP (dinitrophenol) durante 20 minutos. A continuación, las muestras fueron incubadas con anticuerpo de cabra conjugado con HRP durante 16 minutos. La señal de plata para *HER2* fue revelada mediante reacciones secuenciales con plata (Silver C) durante 4 minutos. Para la sonda del centrómero del cromosoma 17, se realizaron tres lavados de astringencia a 59° C durante 8 minutos. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con anticuerpo anti-DNP durante 20 minutos y anticuerpo de cabra conjugado con fosfatasa alcalina durante 12 minutos. La señal del centrómero se reveló con Red ISH Naphthol durante 4 minutos. Las muestras fueron contrateñidas con Hematoxilina II durante 8 y con “Bluing Reagent” durante 4 minutos. Los cristales fueron montados con el medio permanente Cytoseal. La evaluación de SISH se realizó usando un microscopio de campo claro (Olympus BX41) con el objetivo de 40x. Un caso se consideró amplificado para *HER2* cuando el ratio fue ≥ 2 , no amplificado cuando el ratio fue < 2 . La polisomía del cromosoma 17 se definió como ≥ 3 copias del centrómero del cromosoma 17 por núcleo (188).

1.4.3. FISH DE HER2

Para el FISH, se evaluaron un total de 20 núcleos en dos áreas tumorales diferentes usando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX61) equipado con los filtros DAPI, Spectrum Orange, Spectrum Green y un filtro doble Orange/Green, usando una lente de inmersión (100x).

El análisis del número de copias del gen *HER2* por FISH se realizó con la sonda comercial PathVysion *HER2* DNA probe kit® (Vysis Inc, Abbot Laboratories, IL). El protocolo recomendado por el fabricante fue modificado, empleándose el DAKO Histology FISH Accesory kit® con el fin de optimizar la técnica (reducción en los procedimientos de laboratorio. La técnica se realizó sobre secciones completas de adenocarcinomas gástricos. Como controles positivos y negativos, se incluyeron secciones de carcinoma de mama amplificado y no amplificado para *HER2* respectivamente. Las secciones se mantuvieron en la estufa a 56° C durante toda la noche y posteriormente fueron desparafinadas en dos series de xilol y rehidratadas en una serie de alcoholes de graduación decreciente. Los cristales fueron pretratados con “Pretreatment Solution”

(solución de pretratamiento) en baño a 97° C durante 10 minutos. La digestión enzimática se realizó con pepsina “Ready-to-Use” durante 3 minutos a temperatura ambiente para las biopsias endoscópicas y durante 6 minutos a 37° C para las piezas quirúrgicas. Las secciones se deshidrataron con alcoholes de graduación ascendente. A continuación, se aplicaron 10 µl de mezcla de sonda *HER2/CEP17* en cada sección de tejido. Las condiciones de hibridación fueron: desnaturalización de la sonda y el tejido a 80° C durante 5 minutos e hibridación durante toda la noche en un hibridador a 37° C. El segundo día de la técnica, las secciones fueron lavadas con “Stringent Wash Buffer” (buffer de astringencia) a 65° C durante 10 minutos en un baño. Por último, las muestras fueron deshidratadas usando una serie de alcoholes. Se contratiñeron los núcleos con DAPI (4', 6-Diamino-2-phenylindole, dihydrochloride), 10 µl por porta.

Tal como hemos comentado anteriormente, se realizó FISH de *HER2* cuando el resultado por dc-SISH no fue valorable o mostró un ratio *HER2/CEP17* menor de 4 para confirmar que sólo se incluían pacientes con verdadera amplificación de *HER2* (**472**). Clasificamos a los pacientes como *HER2* amplificados cuando el ratio *HER2/CEP17* por FISH era mayor de 2, valor por encima del cual está indicado el tratamiento con Trastuzumab (**195**).

2. ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN MASIVA

Basándonos en la disponibilidad de material para el estudio molecular, se seleccionaron 52 muestras, 42 muestras tumorales y 10 muestras de tejido normal, para el análisis mediante método de secuenciación masiva.

2.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Antes de la extracción del ADN, secciones representativas de tejido fueron teñidas con hematoxilina-eosina y revisadas por un patólogo para determinar el porcentaje de células tumorales, marcando el área tumoral con un rotulador permanente. Las muestras con una pequeña proporción de tumor, infiltración linfocitaria importante, o en aquellos casos en los cuales era necesario para obtener tejido normal, se realizó macrodissección para enriquecer el porcentaje final de células tumorales. El procedimiento de macrodissección consiste en calentar el bloque de parafina a 65°C durante una hora para liberar el tejido y facilitar la separación del tejido tumoral del área no tumoral con un bisturí, seguido de la reconstrucción en 2 bloques de parafina por separado, uno con la zona tumoral y otro con el tejido no neoplásico. La macrodissección se realizó garantizando la existencia de al menos el 30% de tejido tumoral en todos los casos, suficiente para el análisis.

Para la extracción de ADN, se realizaron secciones de entre 5 y 10 µm de tejido fijado en formol e incluido en parafina de cada una de las muestras, desparafinando posteriormente dichas secciones mediante dos lavados con xylol y un lavado final en etanol puro. La extracción del ADN se realizó usando Cobas DNA Sample Preparation Kit (Roche Molecular Systems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una pequeña alícuota de ADN (1 µl) se separó para cuantificación usando Qubit™ dsDNA HS Kit en el Fluorómetro Qubit™2.0 (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). La extracción del ADN se llevó a cabo a -20°C.

2.2. SECUENCIACIÓN MEDIANTE ION TORRENT

Se secuenciaron las muestras de ADN usando la plataforma de secuenciación masiva Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) basada en un método de secuenciación no-óptico. En lugar de utilizar las señales luminosas (fotones) que se generan cuando los nucleótidos se incorporan a la cadena de ADN que se está sintetizando, la plataforma PGM se basa en una tecnología de semiconductores basadas en mediciones de cambios de pH.

El proceso de secuenciación se divide en 3 pasos, que pasamos a desarrollar a continuación.

2.2.1. PREPARACIÓN DE LA LIBRERÍA

La preparación de la librería para cada muestra se realizó usando el kit *Ion AmpliSeqTM Library Kit 2.0* (Life Technologies). Brevemente, se emplearon 10 ng de ADN como plantilla para generar la librería de amplicones para la secuenciación. Para la preparación de la librería mediante el método de multiplex PCR se empleó el panel *Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2*. Este panel abarca más de 2800 mutaciones clave en 50 oncogenes y genes supresores de tumores (*Tabla 8*). Los genes no están completamente secuenciados, sólo aquellas regiones donde se han descrito mutaciones con más frecuencia. La lista completa de mutaciones que incluye el panel se puede encontrar en <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/4475346>. Una descripción detallada de las mutaciones se puede obtener de la base de datos *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer* (COSMIC), accediendo a la siguiente página web: <http://www.sanger.ac.uk/research/projects/cancergenome/>. Finalmente la librería resultante se purificó usando el reactivo AMPure XP (Beckman Coulter, SA, Nyon, Switzerland) y se cuantificó mediante el *Bioanalizador Agilent* en un chip de ADN de Alta Sensibilidad (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA).

Tabla 8. Genes incluidos en el panel *Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2*.

<i>ABL1</i>	<i>EGFR</i>	<i>GNAS</i>	<i>KRAS</i>	<i>PTPN11</i>
<i>AKT1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>GNAQ</i>	<i>MET</i>	<i>RB1</i>
<i>ALK</i>	<i>ERBB4</i>	<i>HNF1A</i>	<i>MLH1</i>	<i>RET</i>
<i>APC</i>	<i>EZH2</i>	<i>HRAS</i>	<i>MPL</i>	<i>SMAD4</i>
<i>ATM</i>	<i>FBXW7</i>	<i>IDH1</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>BRAF</i>	<i>FGFR1</i>	<i>IDH2</i>	<i>NPM1</i>	<i>SMO</i>
<i>CDH1</i>	<i>FGFR2</i>	<i>JAK2</i>	<i>NRAS</i>	<i>SRC</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>FGFR3</i>	<i>JAK3</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>STK11</i>
<i>CSF1R</i>	<i>FLT3</i>	<i>KDR</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>TP53</i>
<i>CTNNB1</i>	<i>GNA11</i>	<i>KIT</i>	<i>PTEN</i>	<i>VHL</i>

2.2.2. PCR DE EMULSIÓN/PREPARACIÓN DEL TEMPLATE

La preparación de la plantilla o *template*, que incluye los pasos de PCR de emulsión, rotura de la emulsión y enriquecimiento, se desarrolló siguiendo el protocolo *Ion OneTouch System* con el kit *Ion One Touch 200 Template Kit v2* y usando el instrumento *Ion One Touch 2* (Life Technologies). La librería para cada muestra tumoral se diluyó en el tampón Low-TE (Tris-EDTA) para obtener una solución de 100 pmol/L. A continuación el ADN se añadió a la mezcla de PCR de emulsión. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se mezclaron seis librerías diferentes en la misma mezcla de PCR de emulsión. Cada librería, y cada muestra tumoral, fueron identificadas mediante un único “*barcode adapter*”. Se generó la emulsión y el ADN fue amplificado de forma clonal. Seguidamente, las partículas *Ion Sphere* (ISPs) fueron recuperadas y enriquecidas con plantillas ISPs positivas usando perlas *Dynabeads MyOne Streptavidin C1* (Life Technologies) en el instrumento *Ion OneTouch ES* (Life Technologies). El enriquecimiento de ISP, que implica el aislamiento selectivo de ISPs con ADN amplificado clonalmente, se cuantificó usando el *Ion Sphere Quality Control Kit* (Life Technologies) y el fluorómetro *Qubit™ 2.0* (Life Technologies).

2.2.3. ULTRASECUENCIACIÓN MEDIANTE ION TORRENT PGM

Las perlas ISPs enriquecidas fueron sometidas a secuenciación en el *Ion PGM* usando el kit *Ion PGM 200 Sequencing*. Previamente a la carga sobre los chips 316v2, se añadieron los *primers* y la polimerasa a las perlas ISPs enriquecidas. La plataforma PGM se basa en la tecnología de semiconductores, que utiliza una matriz de alta densidad compuesta por millones de pocillos en los que se llevará a cabo el proceso bioquímico. Cada uno de los pocillos posee un ADN molde diferente. Debajo de los pocillos hay una capa de un material sensible a los iones y debajo de ésta un sensor que capta los iones liberados. Cada vez que un nucleótido es incorporado a la hebra de ADN que se está sintetizando, se libera un ión de hidrógeno (H^+) como bioproducto. La carga de los iones liberados va a cambiar el pH de la solución y este cambio será detectado por el sensor de iones. La información codificada químicamente (A, T, G, C) será transformada en información digital (0, 1) mediante un chip semiconductor. De esta forma, se irán incorporando unos nucleótidos tras otros en la hebra de ADN llevando a cabo la reacción de secuenciación y la lectura de las bases incorporadas.

2.2.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE LA SECUENCIACIÓN

Los datos resultantes de la secuenciación se procesaron mediante el software *Torrent Suite v4.2* (Life Technologies), para generar las lecturas de secuencia, cortar las secuencias adaptadoras, filtrar y eliminar las malas señales de lectura.

Para que una variante de secuencia sea considerada relevante, se consideraron como requisitos mínimos una cobertura de secuenciación de 250x y una frecuencia alélica de al menos el 5%. El punto de corte del 5% fue seleccionado para facilitar la validación de mutaciones putativas mediante métodos alternativos de análisis génico, como el método de Sanger o la PCR en tiempo real, disponibles en nuestro laboratorio.

Además, los datos de la secuenciación fueron analizados con el software *Ion Reporter 4.2* con la finalidad de detectar cambios en el número de copias de los genes incluidos en el panel. Con este propósito, se seleccionaron 10 muestras de tejido sano, y se secuenciaron mediante la plataforma Ion PGM, de acuerdo al protocolo descrito previamente, empleándolos como referencia para la detección de alteraciones en el número de copias génicas en las muestras tumorales analizadas.

3. ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS

Dado el conocimiento de la existencia fenómenos post-transcripcionales importantes en la regulación de la funcionalidad de *PTEN*, hemos determinado de forma complementaria al estudio génico mediante secuenciación masiva, los niveles de expresión proteica de *PTEN* mediante técnicas de inmunohistoquímica como factor regulador esencial de la vía *PI3K/Akt/mTOR*. Asimismo, hemos determinado por inmunohistoquímica la expresión proteica de *MET* con objeto de valorar su activación de forma complementaria al número de copias génicas, en base a los estudios previos.

3.1. INMUNOHISTOQUÍMICA DE *PTEN*

El estudio para la determinación de la expresión proteica de *PTEN* mediante inmunohistoquímica se realizó con el anticuerpo *PTEN (D4.3) XP Rabbit mAb (cell signaling)* en la plataforma automatizada *BenchMark XT IHQ/ISH (Ventana Medical System Inc.)*. El desparafinado y recuperación antigénica se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante y utilizando el protocolo de desenmascaramiento con un acondicionador celular estándar (*CC1 del inglés, cell conditioning 1*) durante 30 minutos de manera automatizada en el *BenchMark ULTRA*. Las condiciones de incubación del anticuerpo fueron de 32 minutos a 37°C. La detección antigénica se realizó con *Ultraview Universal DAB Detection Kit*. Finalmente todas las preparaciones fueron contrateñidas con *Hematoxilin II* durante 8 minutos seguido de *Bluing Reagent*, con una duración de 4 minutos.

3.2. INMUNOHISTOQUÍMICA DE *MET*

El estudio para la determinación de la expresión proteica de *MET* mediante inmunohistoquímica se realizó con el anticuerpo *CONFIRM anti-Total c-MET (SP44) (Ventana Medical System Inc.)* en la plataforma automatizada *BenchMark XT IHQ/ISH (Ventana Medical System Inc.)*. El desparafinado y recuperación antigénica se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante y utilizando el protocolo de desenmascaramiento con un acondicionador celular estándar (*CC1 del inglés, cell conditioning 1*) durante 60

minutos. Se realizaron de manera automatizada en el BenchMark ULTRA. Las condiciones de incubación del anticuerpo fueron de 16 minutos a 37°C. La detección antigénica se realizó con *Ultraview Universal DAB Detection Kit*. Finalmente todas las preparaciones fueron contrateñidas con *Hematoxilin II* durante 8 minutos seguido de *Bluing Reagent*, con una duración de 4 minutos.

4. ALMACENAMIENTO DE LOS DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos recogidos de las variables clínicas y anatomopatológicas se incluyeron en una base de datos Excel (Microsoft Office 2013). El análisis estadístico se realizó utilizando la aplicación informática Stata/IC 13.1 (StataCorp LP, USA). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con una $p \leq 0.05$. El estudio estadístico constó de los siguientes procedimientos.

4.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

En primer lugar, se efectuó un análisis descriptivo de las diferentes variables cualitativas y cuantitativas objeto del estudio.

- Análisis de frecuencia o porcentajes de las variables cualitativas.
- Determinación de media \pm desviación estándar, mediana y rango de las variables cuantitativas.

4.2. ESTADÍSTICA INFERENCIAL

Este análisis tiene como finalidad establecer conclusiones respecto a las muestras y variables estudiadas.

Para todos los análisis realizados se estableció un riesgo bilateral, o nivel de significación $\alpha=0.05$. En el caso de las variables cuantitativas objeto de estudio, la comprobación de la hipótesis de normalidad se realizó mediante el test estadístico de Shapiro-Wilk.

La comparación de grupos independientes, respecto a las variables cuantitativas, se realizó mediante la aplicación del test t de Student (comparación de dos grupos), o Anova (comparación de más de dos grupos) cuando la variable sigue una distribución normal. En aquellos casos en que la variable no sigue una distribución normal, se aplicó el test no paramétrico Wicoxon-Mann-Whitney (para la comparación de dos grupos) o el test no paramétrico Kruskal-Wallis (comparación de más de dos grupos).

En las variables categóricas, la posible asociación entre el resultado del análisis molecular y los distintos parámetros clínico-patológicos se analizó mediante el test Chi-cuadrado o, cuando se requería, mediante el test exacto de Fischer.

Para el cálculo del riesgo relativo y su intervalo de confianza en el caso de variables independientes categóricas binarias, se aplicó el modelo de regresión logística.

La supervivencia global se midió desde el momento del diagnóstico de enfermedad metastásica hasta la muerte del paciente por cualquier causa. Un paciente no fallecido se considera censurado en la última fecha de contacto con el mismo.

El tiempo hasta la progresión como el tiempo transcurrido desde la fecha en que se realiza el diagnóstico de la metástasis hasta la fecha en que el paciente muestra progresión tumoral o muere por la enfermedad. Un paciente se censura si no progresa. En este caso el tiempo hasta la progresión se calcula como el tiempo transcurrido desde la fecha en que se diagnostica la metástasis hasta la fecha del último contacto.

El análisis de la supervivencia global y del tiempo hasta la progresión tumoral se realizó aplicando un modelo de Kaplan-Meier, estimando la mediana y el intervalo de confianza (IC) al 95%. Las diferencias en las curvas de supervivencia fueron analizadas mediante el test de Log-Rank o de Mantel-Haenzel. Se aplicó también un modelo de regresión de Cox, para identificar qué variables podrían tener valor pronóstico en la supervivencia y analizar el mismo, estimando para esto la Hazard Ratio (HR) y sus intervalos de confianza.

Asimismo, hemos realizado un análisis multivariante de la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión, determinando el impacto de dichas alteraciones de forma independiente respecto a otras variables que pudieran estar influyendo como variables de confusión o variables modificadoras del efecto. Para ello hemos construido un modelo de regresión de Cox ajustado a dichas variables según el método explicado en Domenech Massons JM *et al.* (496). Las variables incluidas en el modelo máximo inicial fueron aquellas variables que han resultado estadísticamente significativas en el modelo univariante. A continuación hemos realizado un análisis por pasos: 1-Evaluación del global de los términos de interacción mediante pruebas de significación estadística, en base a la razón de verosimilitud (*chunk test*) y análisis de cada uno de los términos de interacción por separado. 2- Evaluación del modelo que incluye todos los términos de

confusión y los términos de interacción estadísticamente significativos y. 3-Evaluación de los términos de confusión en base a la existencia de un cambio prácticamente importante según el criterio de Maldonado y Greenland (considerando que el ajuste es necesario para corregir el factor de confusión si el cambio entre el efecto ajustado y el efecto no ajustado es superior al 10%).

Para el análisis de la respuesta al tratamiento se agruparon los pacientes en 2 categorías según la respuesta objetiva determinada según criterios RECIST 1.0 (progresión de la enfermedad o enfermedad estable *versus* respuesta completa o respuesta parcial) (Anexo I) con objeto de realizar un análisis estadístico con mayor correlación clínico-biológica.

V. RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS

Del total de 90 pacientes de la serie inicial, se estudiaron finalmente 42 pacientes con adenocarcinoma gástrico avanzado HER2 positivo según determinación central y que cumplieran todos y cada uno de los criterios de inclusión, tal como hemos comentado en el apartado Material y Métodos. De estos 42 pacientes, el 61.9% presenta enfermedad diseminada al debut de la enfermedad. La mediana de edad es de 62.3 años (rango: 21.6-77.3 años) y la mayoría (81%) son hombres. La distribución de la localización del tumor primario, el tipo histológico, el grado de diferenciación y la localización de las metástasis se muestran en la *Tabla 9*.

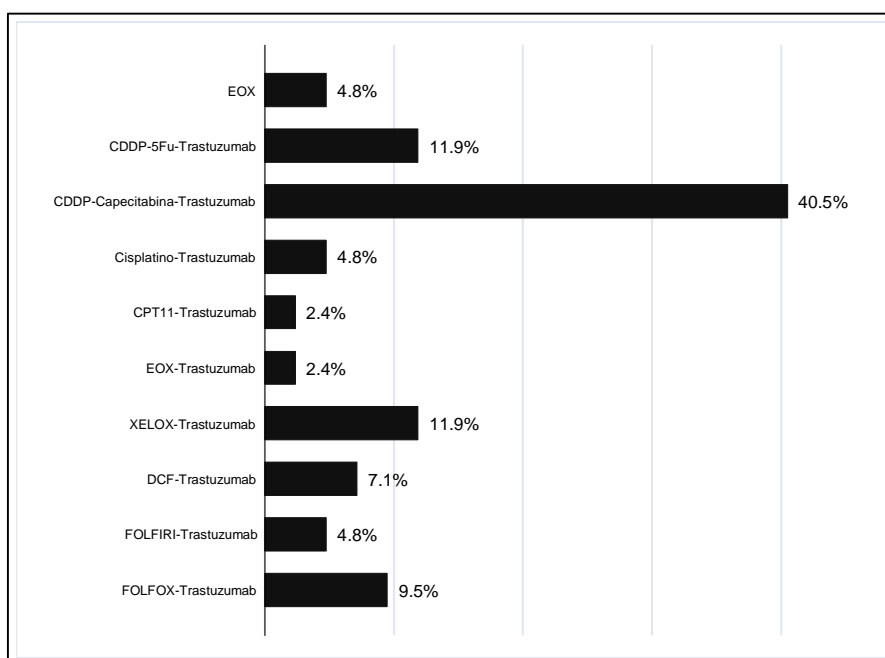
Tabla 9. Características clínico-patológicas de los pacientes del estudio.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	N=42
Edad diagnóstico, mediana (rango)	62.3 (21.6-77.3)
Sexo, n (%)	
Hombre	34 (81)
Mujer	8 (19)
ECOG, n (%)	
0	6 (14.3)
1	31 (73.8)
2	5 (11.9)
Localización del tumor primario, n (%)	
UGE (incluye cardias)	17 (40.5)
Fundus	5 (11.9)
Cuerpo/antro	20 (47.6)
Tipo histológico, n (%)	
Intestinal	27 (64.3)
Difuso	4 (9.5)
Mixto	2 (4.8)
Indeterminado	8 (19.1)
No determinado	1 (2.4)
Grado de diferenciación, n (%)	
Bien diferenciado	7 (16.7)
Moderadamente diferenciado	17 (40.5)
Pobrementemente diferenciado	15 (35.7)
No determinado	3 (7.1)
Localización de las metástasis, n (%)	
Hígado	19 (45.2)
Pulmón	8 (19.1)
Peritoneo	10 (23.8)
Hueso	2 (4.8)
Ganglios torácicos	7 (16.7)
Ganglios abdominales	27 (64.3)
SNC	0 (0)

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status. SNC: Sistema Nervioso Central.

Todos los pacientes analizados recibieron tratamiento de primera línea con quimioterapia, en combinación con Trastuzumab en el 95.2% de los casos (n=40). Los esquemas de quimioterapia que recibieron se muestran en el *Gráfico 1*. Los 2 pacientes que no fueron tratados con Trastuzumab en primera línea son aquellos que recibieron un esquema con antraciclinas, recibiendo el Trastuzumab en segunda línea.

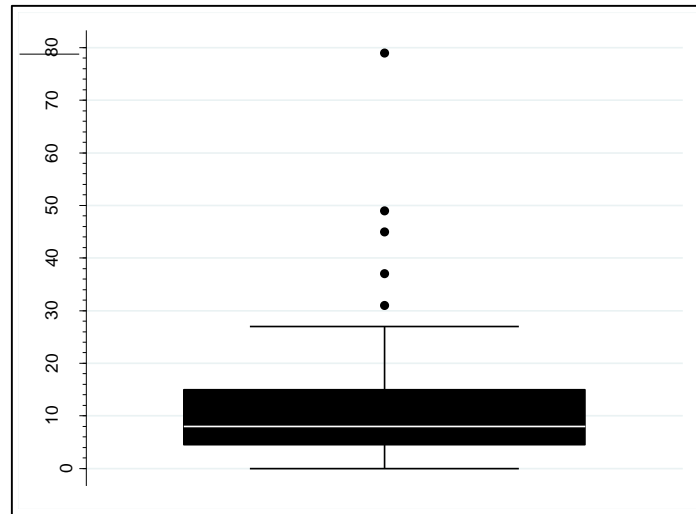
Gráfico 1. Esquemas de tratamiento en primera línea y porcentaje de pacientes.



CDDP: Cisplatino. CPT11: Irinotecán. EOX: Epirrubicina, Oxaliplatino, Capecitabina. DCF: Docetaxel, Cisplatino, 5-Fu, Leucovorin. XELOX: Capecitabina, Oxaliplatino. FOLFIRI: 5-Fu, Leucovorin, Irinotecán. FOLFOX: 5-Fu, Oxaliplatino.

La mediana de duración del tratamiento de primera línea fue de 3.75 meses (rango: 0-19.02 meses), con una mediana de número de ciclos de 6 (rango: 0-79 ciclos). Tras la primera línea de quimioterapia con Trastuzumab, el 42.8% (n=18) de los pacientes recibió tratamiento de mantenimiento con Trastuzumab. La mediana de ciclos totales de Trastuzumab en primera línea fue de 11 (rango: 3-70 ciclos). Como observamos en el gráfico de caja (*Gráfico 2*), hay 5 pacientes *ourliers* cuyo número de ciclos de Trastuzumab supera a la mediana en más de 1.5 rangos intercuartílicos, representando pacientes con largas respuestas a la terapia dirigida frente a HER2.

Gráfico 2. Gráfico de caja del número de ciclos de Trastuzumab en 1ª línea.



La progresión a la primera línea de tratamiento se produjo a distancia en el 61.9% (n=26) de los pacientes, a nivel locorregional en el 2.4% (n=1), y en ambas en el 16.7% (n=7). En 1 de los pacientes la progresión se consideró por criterios clínicos, sin constatación radiológica.

2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

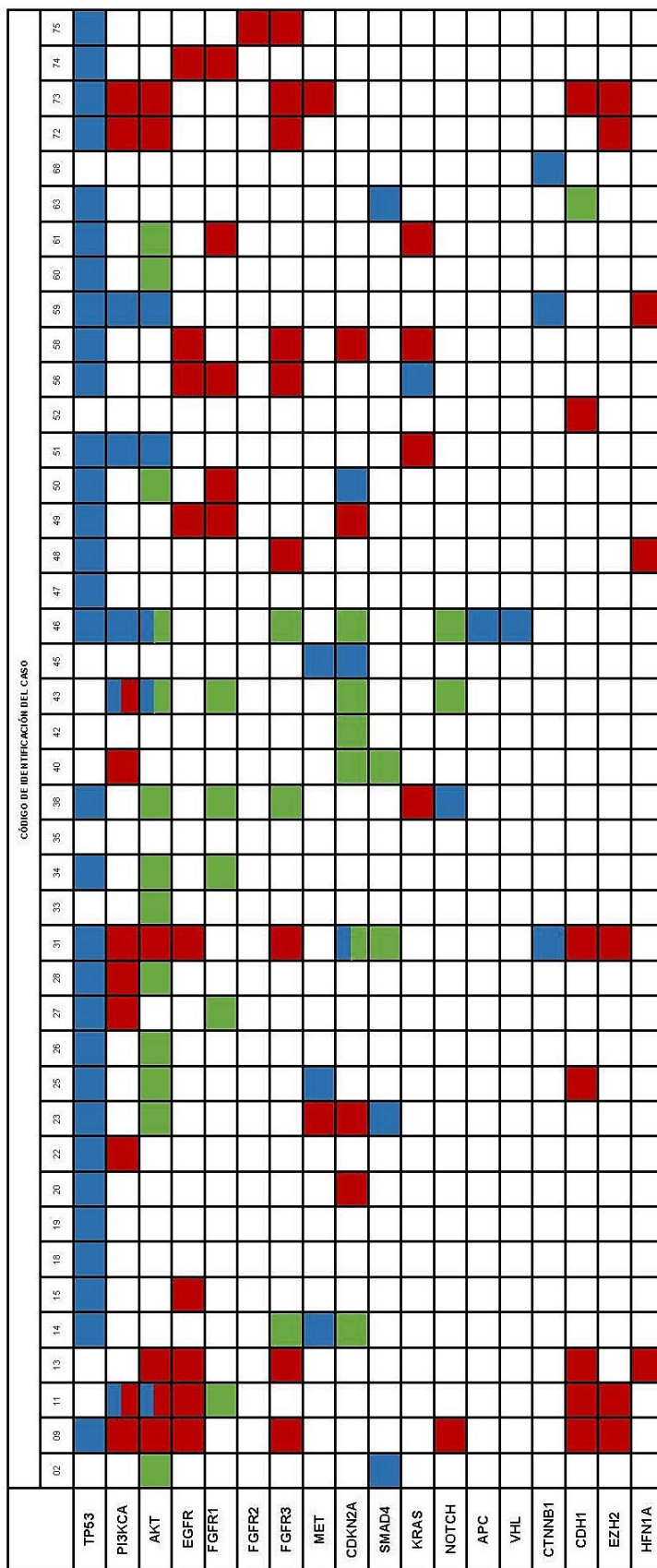
2.1. ESTADO DE HER2

El 90.5% de las muestras presentan sobreexpresión de HER2 con IHQ 3+ (n=38), siendo el 9.5% restante IHQ 2+. El 100% muestran amplificación de *HER2* por SISH (ratio *HER2*/CEP17 ≥ 2). El 88.1% de los pacientes presentan ratio *HER2*/CEP17 determinado por SISH mayor o igual a 4. El 11.9% restante presentan un ratio ≥ 2 y < 4 , considerándose la amplificación de *HER2* mediante FISH cuando el ratio es mayor o igual a 2.

2.2. SECUENCIACIÓN GÉNICA MASIVA

El 88.1% de los pacientes presentan al menos una alteración genómica en el análisis mediante NGS (mutaciones o cambios en el número de copias). El número medio de alteraciones genómicas por paciente, sin considerar *HER2*, es de 3.62 (rango 0-11). La alteración genómica más frecuentemente detectada es la mutación en *TP53* (73.8% de las muestras, n=31), seguida de la amplificación de *FGFR* (31%, n=13), amplificación de *PIK3CA* (23.8%, n=10), amplificación de *EGFR* (21.4%, n=9), amplificación de *CDH1* (16.7%, n=7), delección de *CDKN2A* (14.3%, n=6), amplificación de *Akt* (14.3%, n=6), mutación de *PIK3CA* (11.9%, n=5) y amplificación de *KRAS* (9.5%, n=4). Dentro de las amplificaciones de *FGFR* la de mayor incidencia es la amplificación de *FGFR3* (21.4%, n=9). En el [Gráfico 3](#) se muestra la frecuencia absoluta de las diferentes alteraciones detectadas mediante NGS del total de 42 pacientes analizados.

Gráfico 3. Resultados del análisis de secuenciación masiva.

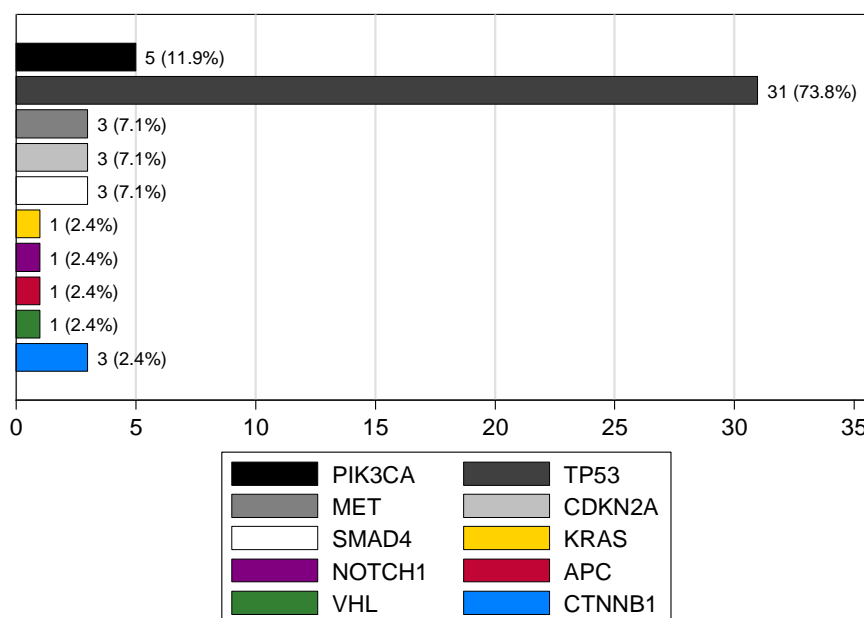


Azul: mutación; Verde: Delección; Rojo: Amplificación.

2.2.1. MUTACIONES

El 85.7% de los pacientes presenta alguna mutación en al menos uno de los 50 genes analizados. El número medio de mutaciones por muestra es de 1.24 (rango 0-4). El gen mutado con más frecuencia es el gen supresor tumoral *TP53* (73.8%). En 8 de los pacientes (19.0%) las mutaciones suponen la generación de un codón STOP. Además de las mutaciones en *TP53* encontramos mutaciones en *PIK3CA* (11.9%), *MET* (7.1%), *CDKN2A* (7.1%), *SMAD4* (7.1%), *CTNNB1* (7.1%), *KRAS* (2.4%), *NOTCH* (2.4%), *APC* (2.4%) y *VHL* (2.4%) (Gráfico 4).

Gráfico 4. Mutaciones: Frecuencias absolutas (porcentaje).



Dentro de las 5 mutaciones detectadas en *PI3KCA*, 3 de ellas son sustituciones *missense* en codones hotspots: 2 casos de la mutación p.H1047R en el exón 20 y 1 caso de p.E545K en el exón 9, mutaciones activadoras descritas previamente. Además se describen 2 mutaciones adicionales en codones no hotspots (p.Q75E y p.E81K).

Encontramos 3 mutaciones en *MET* (2 casos p.E168D, 1 caso p.1010I) consistentes en sustituciones *missense*. El estudio inmunohistoquímico de estas muestras mostró

positividad 2+ en dos de ellas y 3+ en una de ellas, y no mostrando ninguna de ellas amplificación por dc-SISH.

La mutación hallada en *KRAS* se localiza en el codón 12 del exón 2 (p.G12A), mutación descrita con mayor frecuencia en carcinoma colorrectal, que presenta una prevalencia <1% en los pacientes con cáncer gástrico según los datos consultados en COSMIC (497).

2.2.2. AMPLIFICACIONES Y DELECCIONES

El 85.7% de las muestras tumorales analizadas presentaban al menos un cambio en el número de copias (CNV) de los genes analizados. La media de alteraciones en el CNV es de 2.38 (rango 0-8). El gen amplificado con más frecuencia es *FGFR* con una prevalencia del 31%, seguido de *PIK3CA* con el 23.8% y *EGFR* con el 21.4%. En la *Tabla 10* se muestra la prevalencia de CNV de cada uno de los genes analizados.

Tabla 10. Variaciones en el número de copias génicas.

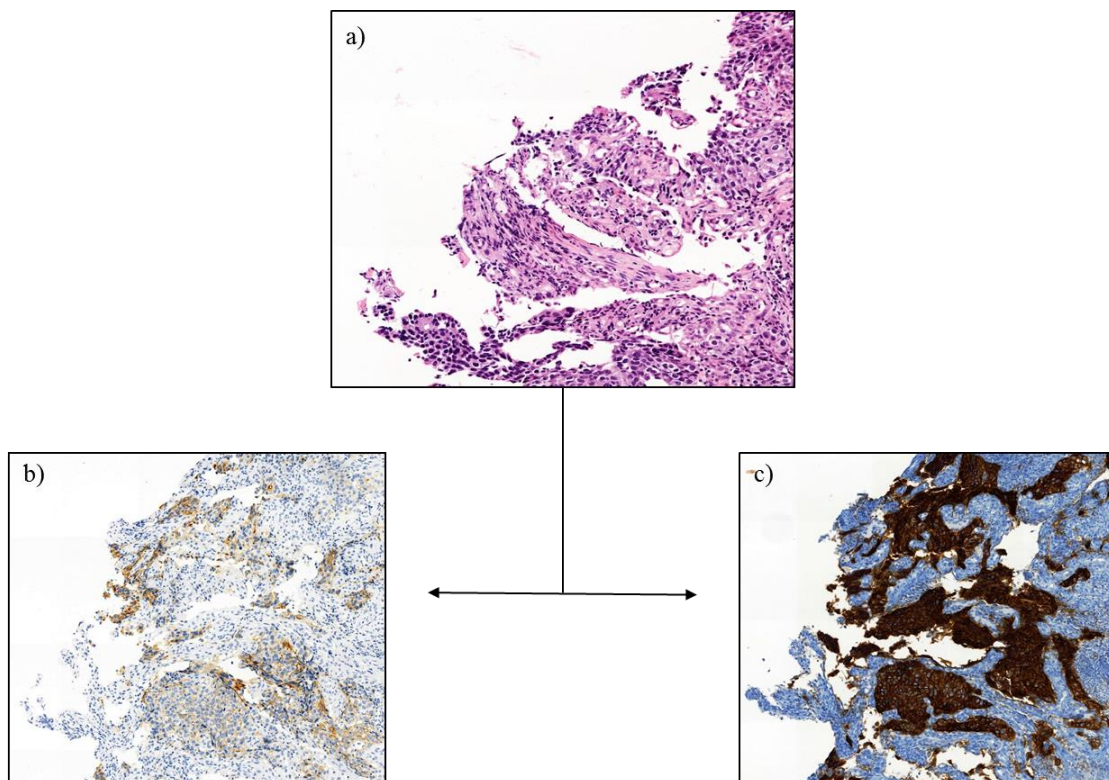
Amplificaciones	n (%)
EGFR	9 (21.4)
MET	2 (4.8)
FGFR	13 (31)
FGFR1	5 (11.9)
FGFR2	1 (2.4)
FGFR3	9 (21.4)
KRAS	4 (9.5)
PIK3CA	10 (23.8)
AKT	6 (14.3)
NOTCH	2 (4.8)
CDKN2A	4 (9.5)
CDH1	7 (16.7)
EZH2	5 (11.9)
HFN1A	3 (7.1)
Delecciones	n (%)
FGFR	7 (16.7)
FGFR1	5 (11.9)
FGFR2	0 (0)
FGFR3	3 (7.1)
AKT	13 (31)
NOTCH	2 (4.8)
CDKN2A	6 (14.3)
CDH1	1 (2.4)
SMAD4	3 (7.1)

2.3. EXPRESIÓN PROTEICA DE PTEN Y MET

La pérdida de expresión de PTEN determinada mediante técnicas de inmunohistoquímica está presente en el 33.3% de las muestras tumorales (n=14). Sin embargo, no hemos detectado deleciones génicas de PTEN.

El 85.71% de los pacientes presenta sobreexpresión de MET en el estudio inmunohistoquímico (*Figura 21*). Por el contrario, en el análisis mediante NGS se detectaron sólo 2 amplificaciones génicas de *MET* (4.8%).

Figura 21. Muestra de adenocarcinoma gástrico con sobreexpresión de HER2 y MET.



a) Tinción hematoxilina-eosina b) IHQ: sobreexpresión de HER2 c) IHQ: sobreexpresión de MET.

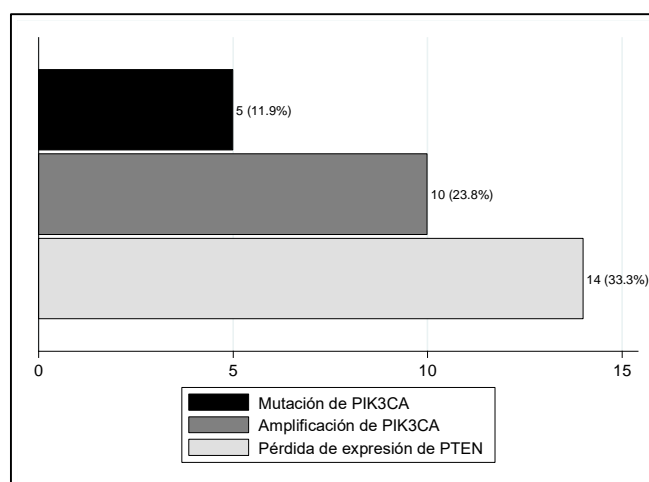
2.4. ACTIVACIÓN DE LA VÍA PI3K/Akt/TOR

En nuestra muestra hemos detectado pacientes que presentan alteraciones concomitantes en distintos puntos de la vía de PI3K/Akt/mTOR. Tras la revisión de la literatura consideramos alteraciones clave en la activación de esta vía la amplificación o mutación de *PIK3CA* y la pérdida de expresión de PTEN.

Agrupados de acuerdo a este criterio, el 52.38% de nuestros pacientes (n=22) presentan activación de la vía PI3K/Akt/mTOR. En 5 de los casos (11.90%) existe amplificación o mutación en *PIK3CA* de forma concurrente a la pérdida de expresión de PTEN (1 caso con delección de PTEN y mutación de *PIK3CA* y 4 casos con delección de PTEN y amplificación de *PIK3CA*). En 8 de ellos (19.05%) la amplificación, mutación o ambas en *PIK3CA* se presentan de forma aislada (2 casos con mutaciones, 4 casos con amplificaciones y 2 casos con ambas alteraciones). La pérdida de expresión de PTEN como mecanismo exclusivo de activación de la vía se muestra en 9 de los pacientes (21.43%).

En el Gráfico 5 se muestran las frecuencias absolutas y porcentajes de las distintas alteraciones del total de 42 pacientes.

Gráfico 5. Prevalencia de las alteraciones implicadas en la activación de PI3K/Akt/mTOR

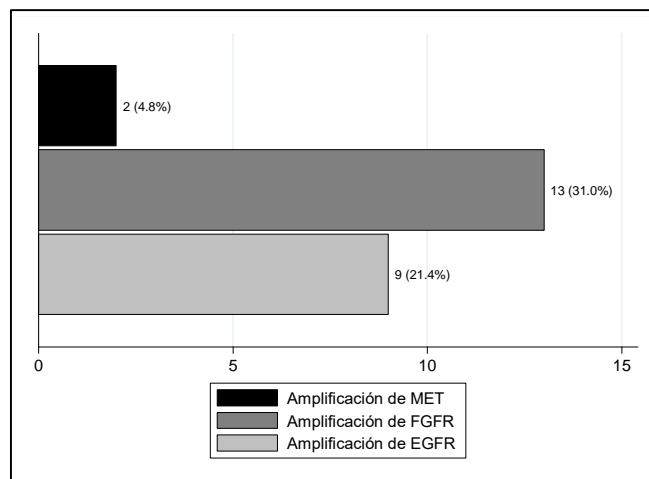


2.5. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES CODIFICANTES DE RECEPTORES TIROSINA QUINASA

La activación de rutas mediadas por otros receptores con actividad tirosina quinasa (RTK) ha sido descrita como posible mecanismo de resistencia a Trastuzumab en pacientes *HER2* positivos. Por ello, determinamos la amplificación de los genes *EGFR*, *FGFR* y *MET*, los cuales codifican receptores de membrana con la actividad tirosina quinasa mencionada. Consideramos como amplificación de genes codificantes de RTK el aumento del número de copias de alguno o varios de los genes que codifican EGFR, FGFR y/o MET. El 38.1% de los pacientes (n=16) presentan amplificación de genes codificantes de RTK según estos criterios.

En el *Gráfico 6* se muestran las prevalencias de las amplificaciones en los genes codificantes de cada uno de los receptores. En algunos de los casos existe amplificación génica de varios de los receptores, no siendo por tanto alteraciones mutuamente excluyentes.

Gráfico 6. Prevalencia de amplificación de los genes codificantes de RTK.



3. RELACIÓN ENTRE LAS ALTERACIONES MOLECULARES Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

3.1. RELACIÓN ENTRE LA ACTIVACIÓN DE PI3K/AKT/MTOR Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

El análisis de la relación entre el estado de activación de la vía PI3K/Akt/mTOR y las características clínicas y patológicas mediante el test de χ^2 de Pearson o el test exacto de Fisher, según corresponda, no detectó diferencias estadísticamente significativas según la activación o no de esta vía respecto a las diferentes características analizadas. Los resultados se muestran en la *Tabla 11*.

3.2. RELACIÓN ENTRE LA AMPLIFICACIÓN DE GENES CODIFICANTES DE RECEPTORES TIROSINA QUINASA Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

El análisis de la relación entre la amplificación de los diferentes genes codificantes de RTK y las características clínicas y patológicas mediante el test de χ^2 de Pearson o el test exacto de Fisher, según corresponda, no detectó diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos. Los resultados se muestran en la *Tabla 12*.

Tabla 11. Relación entre la activación de PI3K/Akt/mTOR y las características clínico-patológicas.

	Activación PI3K/Akt/mTOR		Total n (%)	p-valor
	No n (%)	Sí n (%)		
Edad				p=0.071
<70 años	18 (56.3)	14 (43.8)	32 (100)	
>70 años	2 (20)	8 (80)	10 (100)	
Sexo				p=0.700
Mujer	17 (50)	17 (50)	34 (100)	
Varón	3 (37.5)	5 (62.5)	8 (100)	
ECOG				p=1.000
0-1	18 (48.7)	19 (52.4)	37 (100)	
2	2 (40)	3 (60)	5 (100)	
Clasificación de Laurén				p=0.801
Intestinal	13 (48.2)	14 (51.9)	27 (100)	
Difuso	1 (25)	3 (75)	4 (100)	
Mixto	1 (50)	1 (50)	2 (100)	
Indeterminado	5 (62.5)	3 (37.5)	8 (100)	
No determinado	0 (0)	1 (100)	1 (100)	
Grado de diferenciación				p=0.118
Bien diferenciado	4 (57.1)	3 (42.9)	7 (100)	
Moderadamente diferenciado	11 (64.7)	6 (35.3)	17 (100)	
Pobrementemente diferenciado	5 (33.3)	10 (66.7)	15 (100)	
No determinado	0 (0)	3 (100)	3 (100)	
Localización tumor primario				p=0.738
Otra localización	15 (50)	15 (50)	30 (100)	
UGE/cardias	5 (47.6)	7 (52.4)	12 (100)	
Metástasis hepáticas				p=0.757
No	10 (43.5)	13 (56.5)	23 (100)	
Sí	10 (52.6)	9 (47.4)	19 (100)	
Carcinomatosis peritoneal				p=0.723
No	16 (50)	16 (50)	32 (100)	
Sí	4 (40)	6 (60)	10 (100)	

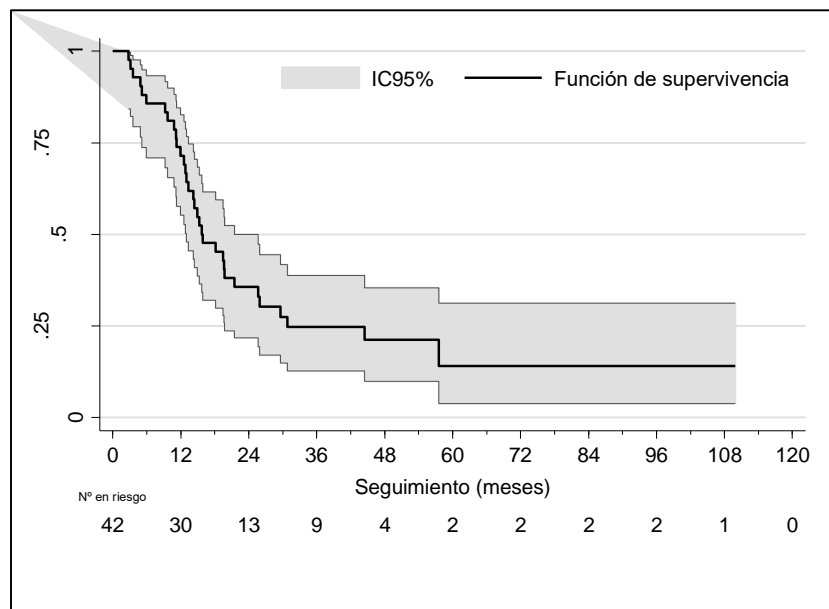
Tabla 12. Relación entre la amplificación de RTK y las características clínico-patológicas.

	Amplificación de RTK		Total n (%)	p-valor
	No n (%)	Sí n (%)		
Edad				p=0.715
<70 años	19 (59.4)	13 (40.6)	32 (100)	
>70 años	7 (70)	3 (30)	10 (100)	
Sexo				p=0.454
Mujer	22 (64.7)	12 (35.3)	34 (100)	
Varón	4 (50)	4 (50)	8 (100)	
ECOG				p=0.352
0-1	24 (64.9)	13 (35.1)	37 (100)	
2	2 (40)	3 (60)	5 (100)	
Clasificación de Laurén				p=0.642
Intestinal	17 (63.0)	10 (37.0)	27 (100)	
Difuso	2 (50)	2 (50)	4 (100)	
Mixto	2 (100)	0 (0)	2 (100)	
Indeterminado	5 (62.5)	3 (37.5)	8 (100)	
No determinado	0 (0)	1 (100)	1 (100)	
Grado de diferenciación				p=0.474
Bien diferenciado	3 (42.9)	4 (57.1)	7 (100)	
Moderadamente diferenciado	11 (64.7)	6 (35.3)	17 (100)	
Pobrementemente diferenciado	9 (60)	6 (40)	15 (100)	
No determinado	3 (100)	0 (0)	3 (100)	
Localización tumor primario				p=0.735
Otra localización	16 (64.0)	9 (36.0)	25 (100)	
UGE/cardias	10 (58.8)	7 (41.2)	17 (100)	
Metástasis hepáticas				p=0.429
No	13 (56.5)	10 (43.5)	23 (100)	
Sí	13 (68.4)	6 (31.6)	19 (100)	
Carcinomatosis peritoneal				p=1.000
No	20 (62.5)	12 (37.5)	22 (100)	
Sí	6 (60)	4 (40)	10 (100)	

4. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL

La mediana de supervivencia global de la muestra con cáncer gástrico avanzado HER2 positivo tratada con Trastuzumab estimada por Kaplan-Meier es de 15.69 meses (IC95% 13.0-21.5 meses) (*Gráfico 7*). El primer cuartil o percentil 25, es decir, el tiempo en el que se han producido el 25% de muertes, corresponde a 11.3 meses (IC95% 5.1-13.4 meses). El cuartil tercero o percentil 75, corresponde a 30.8 meses [IC95% 19.8- No alcanzado (NA)]

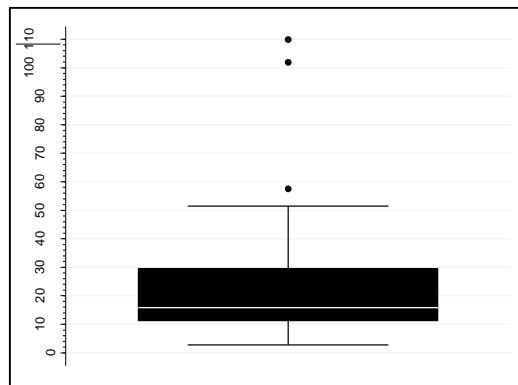
Gráfico 7. Supervivencia global (curva de Kaplan-Meier)



La tasa de supervivencia estimada a 1 año es del 71.4% (IC 95% 55.2%- 82.7%), a 2 años del 35.7% (IC95% 21.7%-49.9%), a 3 años del 24.7% (IC95% 12.7%-38.8%) y a 5 años del 14.1% (IC95% 3.7%-31.7%).

En el *Gráfico 8* observamos que hay tres pacientes *outliers*, con medianas de supervivencia de 57.55, 101.94 y 109.90 meses.

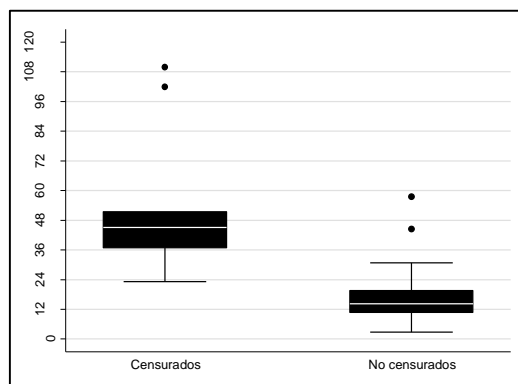
Gráfico 8. Diagrama de caja: supervivencia global.



Hemos valorado la calidad del seguimiento de los pacientes de nuestro estudio, analizando los siguientes parámetros:

1. Duración del seguimiento: la duración del seguimiento medio para los pacientes del estudio es de 24.40 meses, y en los pacientes que no han fallecido (tiempos censurados) de 53.43 meses. Finalmente los dos gráficos de caja representan las distribuciones de los tiempos censurados y completos de seguimiento (*Gráfico 9*).
2. Causas de censura: existe un 21.4% de tiempos incompletos por encontrarse vivos en el momento de fin del seguimiento, siendo el 78.6% tiempos completos (muertes). No han existido pérdidas de seguimiento.

Gráfico 9. Diagrama de caja: duración del seguimiento para el cálculo de la supervivencia global.



4.1. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL SEGÚN CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

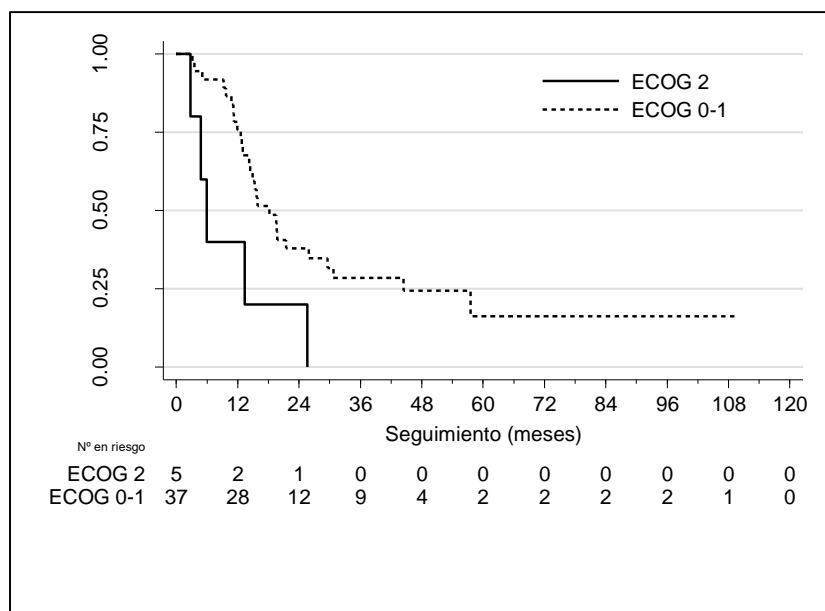
4.1.1. SUPERVIVENCIA SEGÚN EDAD Y SEXO

En el análisis de regresión de Cox univariante no se evidencian diferencias en supervivencia global según la edad <70 años o ≥70 años (HR 1.09, IC95% 0.44-2.68, p=0.850) ni el sexo (HR 1.52 hombre/mujer, IC95% 0.70-3.29, p=0.292).

4.1.2. SUPERVIVENCIA SEGÚN ECOG

El test de log-rank evidencia una diferencia estadísticamente significativa según ECOG (p= 0.0152), con medianas de supervivencia de 5.91 meses con ECOG 2 (IC 95% 2.8-NA) y de 18.2 meses con ECOG 0 ó 1 (IC 95% 14.2-26.0 meses) (*Gráfico 10*).

Gráfico 10. Supervivencia global según ECOG.



El análisis mediante regresión de Cox estima que los pacientes con ECOG 2 tienen un riesgo de muerte 3.14 veces mayor que los pacientes con ECOG 0-1 (HR 3.14, IC95% 1.19-8.32, p=0.021).

4.1.3. SUPERVIVENCIA SEGÚN LA CLASIFICACIÓN DE LAURÉN

El análisis univariante mediante regresión de Cox de la supervivencia global según la clasificación histológica de Laurén pone de manifiesto que no existen diferencias estadísticamente significativas (LR χ^2 3.70, Prob > χ^2 = 0.4485), tal como queda reflejado en la *Tabla 13*.

Tabla 13. Análisis univariante de la supervivencia global según la clasificación de Laurén.

Subtipo Laurén	HR	p-valor	IC95%
Intestinal*			
Difuso	1.68	0.405	0.49-5.74
Mixto	0.45	0.445	0.059-3.45
Indeterminado	0.91	0.833	0.37-2.25
No determinado	7.84	0.062	0.89-68.48

*Categoría de referencia para el cálculo del HR

4.1.4. SUPERVIVENCIA SEGÚN GRADO DE DIFERENCIACIÓN

El análisis univariante mediante regresión de Cox de la supervivencia global según el grado de diferenciación no muestra diferencias significativas (LR χ^2 3.20, Prob > χ^2 = 0.3620), tal como se muestra en la *Tabla 14*.

Tabla 14. Análisis univariante de la supervivencia global según el grado de diferenciación.

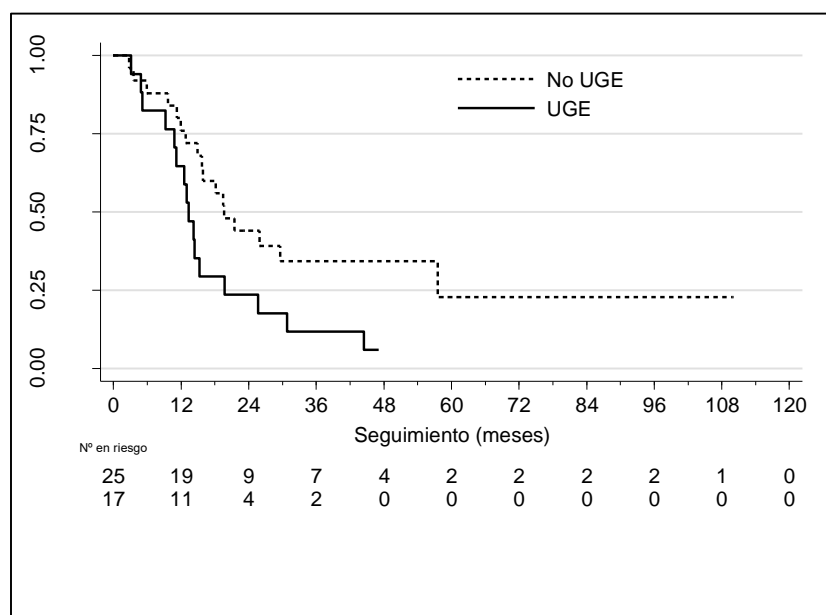
Grado de diferenciación	HR	p-valor	IC95%
Bien diferenciado*			
Moderadamente diferenciado	1.85	0.282	0.60-5.71
Pobrementemente diferenciado	2.58	0.101	0.83-7.99
No determinado	2.33	0.270	0.52-10.49

*Categoría de referencia para el cálculo del HR

4.1.5. SUPERVIVENCIA GLOBAL SEGÚN LA LOCALIZACIÓN DEL TUMOR PRIMARIO

La mediana de supervivencia según la localización del tumor primario es de 13.35 meses para los tumores localizados en la UGE (IC95% 9.27-19.76 meses) frente a 19.63 meses para los tumores en otra localización (IC95% 14.89-57.55 meses), siendo esta diferencia estadísticamente significativa en el test de log rank ($p= 0.0305$) (*Gráfico 11*)

Gráfico 11. Supervivencia global según localización de tumor primario.



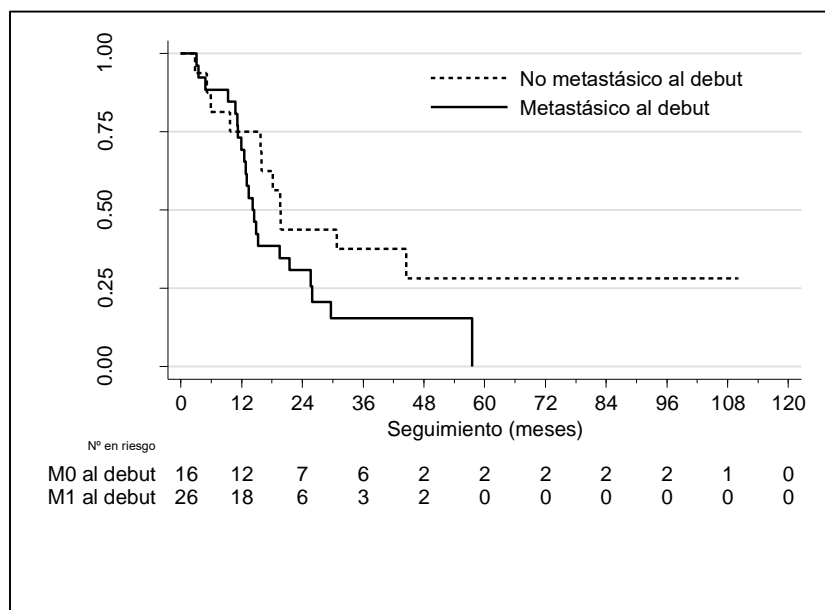
En análisis de regresión de Cox estima que los pacientes con tumores localizados en la UGE o el cardias presentan un riesgo de muerte 2.13 veces mayor que los pacientes con tumores localizados distalmente, siendo este incremento de riesgo estadísticamente significativo (HR 2.13, IC 95% 1.06-4.28, $p=0.034$).

4.1.6. SUPERVIVENCIA GLOBAL SEGÚN EL DEBUT METASTÁSICO

La mediana de supervivencia global estimada para los pacientes que debutan con enfermedad metastásica es de 14.21 meses (IC95% 11.97-21.47 meses) frente a los 19.63 meses (IC95% 9.67- NA) de los pacientes cuya enfermedad debuta como enfermedad no

metastásica y posteriormente recurren (*Gráfico 12*). El test de log-rank indica que no es estadísticamente significativo ($p=0.1276$). El análisis de regresión de Cox estima un riesgo de muerte 1.76 veces mayor para los pacientes con debut metastásico, no estadísticamente significativo (HR 1.76, IC95%0.84-3.68, $p=0.132$).

Gráfico 12. Supervivencia global según debut metastásico de la enfermedad.

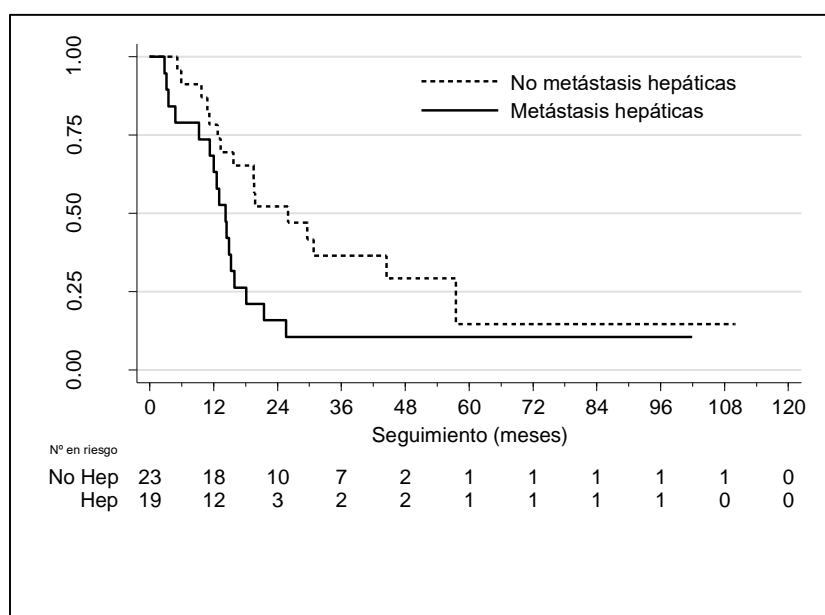


4.1.7. SUPERVIVENCIA GLOBAL SEGÚN LOCALIZACIÓN METASTÁSICA

La mediana de supervivencia según la presencia de metástasis hepáticas es de 25.95 meses para los pacientes sin metástasis hepáticas (IC95% 13.4-57.6 meses) y de 14.2 meses para los pacientes con metástasis hepáticas (IC95% 9.3-15.9 meses), siendo esta diferencia estadísticamente significativa en la prueba de log-rank ($p=0.0266$) (*Gráfico 13*). No se constatan diferencias significativas según la presencia de carcinomatosis peritoneal (escasa muestra, $p= 0.7922$) ni respecto a otras localizaciones metastásicas.

El análisis de regresión de Cox estima que los pacientes con metástasis hepáticas presentan un riesgo de muerte 2.16 veces mayor que los pacientes que no tienen metástasis hepáticas, el cual resulta estadísticamente significativo (HR 2.16, IC95% 1.08 a 4.34, $p=0.030$).

Gráfico 13. Supervivencia global según la presencia de metástasis hepáticas.



El análisis univariante mediante regresión de Cox para el resto de localizaciones metastásicas no resulta estadísticamente significativo, tal como se muestra en la *Tabla 15*.

Tabla 15. Análisis univariante de regresión de Cox según la localización de las metástasis.

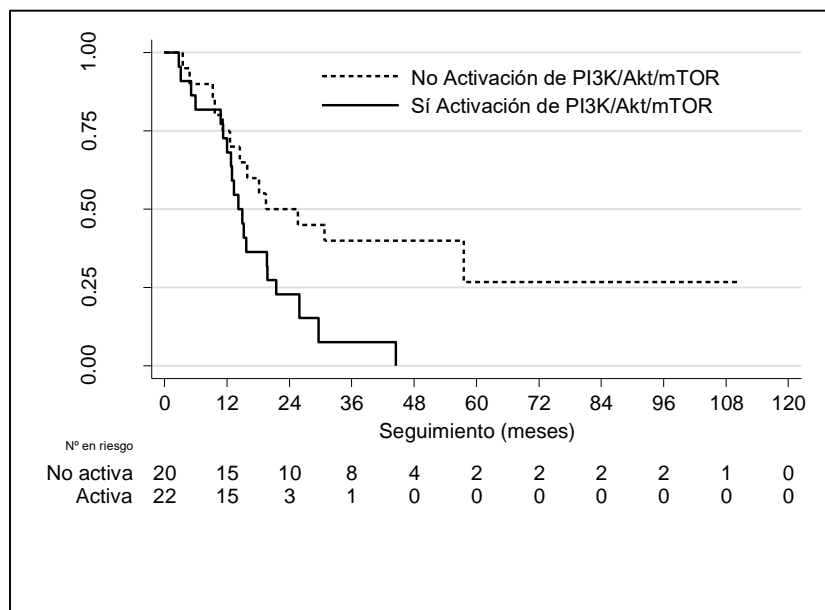
Localización de las metástasis	HR	IC95%	p-valor
Hígado	2.16	1.08-4.34	0.030
Pulmón	0.87	0.36-2.13	0.765
Ganglios torácicos	1.79	0.77-4.17	0.180
Ganglios abdominales	0.88	0.43-1.81	0.736
Hueso	2.96	0.67-13.06	0.153
Peritoneo	1.11	0.50-2.50	0.792

4.2. ANALISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL SEGÚN LAS ALTERACIONES MOLECULARES

4.2.1. SUPERVIVENCIA GLOBAL SEGÚN LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT/MTOR

Las curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia global según la activación de la vía de PI3K/Akt/mTOR se muestran en el *Gráfico 14*. La mediana de supervivencia para los sujetos sin activación de PI3K/Akt/mTOR es de 19.5 meses (IC 95% 11.11 meses- NA) y de 14.21 meses para los sujetos con activación de la vía (IC 95% 10.28- 19.17 meses). El test de log-rank indica que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0213$).

Gráfico 14. Supervivencia global según la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR.

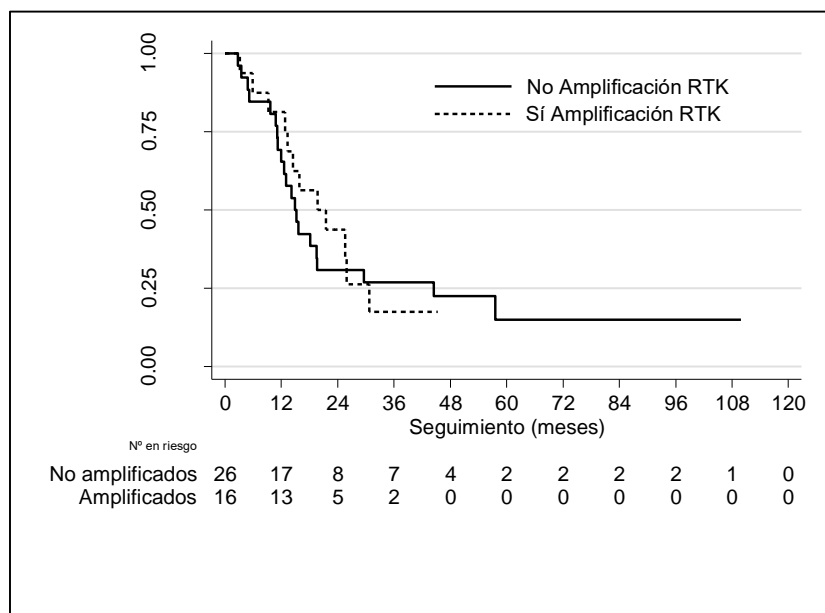


El análisis de regresión de Cox univariante determina que los pacientes con activación de PI3K/Akt/mTOR presentan un riesgo de muerte 2.35 veces mayor que los pacientes sin activación de esta vía, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (HR 2.35, IC95% 1.11 -4.95, $p=0.025$).

4.2.2. SUPERVIVENCIA GLOBAL SEGÚN LA AMPLIFICACIÓN DE GENES CODIFICANTES DE RECEPTORES TIROSINA QUINASA

La mediana de supervivencia estimada por Kaplan-Meier es de 14.9 meses para los pacientes sin amplificación de los genes codificantes de RTK (IC95% 11.3 - 19.6 meses) y de 19.8 meses para los pacientes con amplificación (IC 95% 12.8 - 30.8 meses). Estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($p=0.7215$) (*Gráfico 15*).

Gráfico 15. Supervivencia global según la amplificación de los genes codificantes de RTK.



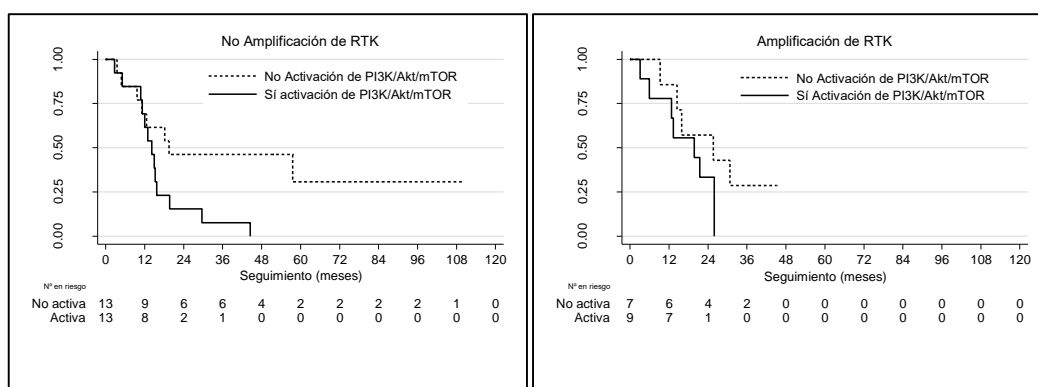
El modelo de regresión de Cox determina que no existen diferencias estadísticamente significativas en el riesgo de muerte según la amplificación de genes codificantes de RTK (HR 0.88, IC95% 0.43-1.81, $p=0.722$).

En el *Gráfico 16* se muestran las gráficas de Kaplan-Meier según la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR estratificando por el estado de amplificación de los genes codificantes de RTK. En el subgrupo de pacientes sin amplificación, aquellos que presentan activación de PI3K/Akt/mTOR presentan una mediana de supervivencia de 14.21 meses (IC95% 10.79- 15.69 meses) frente a 19.5 meses de los pacientes sin activación de PI3K/Akt/mTOR (IC95% 9.7 meses- NA), siendo esta diferencia estadísticamente significativa en el test de log rank ($p= 0.0353$). El análisis de regresión de Cox estima un

riesgo 2.67 veces mayor para los pacientes con activación de PI3K/Akt/mTOR en el subgrupo sin amplificación de genes codificantes de RTK, siendo este resultado estadísticamente significativo (HR 2.67, IC95% 1.04-6.86, p=0.042).

En el subgrupo de pacientes con amplificación de genes codificantes de RTK no existe diferencia estadísticamente significativa según el estado de activación de PI3K/Akt/mTOR (p= 0.2360). El análisis de Cox muestra resultados concordantes: HR 2.12, IC95% 0.60-7.58, p=0.245.

Gráfico 16. Supervivencia global según la activación de PI3K/Akt/mTOR. Análisis por subgrupos según la amplificación de genes codificantes de RTK.



4.2.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL SEGÚN LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT/MTOR

Dado que nuestro estudio se trata de un estudio de investigación no experimental, la ausencia de aleatorización facilita que las variables de confusión produzcan un sesgo en la estimación cruda del efecto de una variable. Además del efecto de las variables de confusión, será preciso controlar la existencia interacción o de variables modificadoras del efecto, que son aquellas que según el valor que toman cambian la intensidad y/o el sentido de la relación entre el factor de estudio y la respuesta. De esta forma, para determinar el impacto crudo de la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR sobre la supervivencia global de forma independiente a otras variables que pudieran estar influyendo como variables de confusión o variables modificadoras del efecto, hemos construido un modelo de regresión de Cox ajustado a dichas variables mediante el método de Domenech Massons *et al.* (496), tal como hemos comentado en el apartado de Material

y Métodos. Las variables incluidas en el modelo máximo inicial fueron aquellas variables que han resultado estadísticamente significativas en el modelo univariante: ECOG, localización del tumor primario, presencia de metástasis hepáticas y activación de la vía PI3KCA/Akt/mTOR (*Tabla 16*).

Tabla 16. Análisis univariante de riesgos proporcionales de Cox para la supervivencia global.

Variable	HR	IC95%	p-valor
Activación de PI3KCA/Akt/mTOR	2.35	1.11-4.95	0.025
Amplificación de RTK	0.88	0.43-1.81	0.722
ECOG	3.14	1.11-8.32	0.021
Grado de diferenciación			
Bien diferenciado*			
Moderadamente diferenciado	1.85	0.60-5.71	0.282
Pobremente diferenciado	2.58	0.83-7.99	0.101
No determinado	2.33	0.52-10.49	0.270
Clasificación histológica de Laurén			
Intestinal*			
Difuso	1.68	0.49-5.74	0.405
Mixto	0.45	0.59-3.45	0.445
Indeterminado	0.91	0.37-2.25	0.833
No determinado	7.84	0.89-68.48	0.062
Localización tumor primario	2.13	1.06-4.28	0.034
Estadio metastásico al debut	1.76	0.84-3.68	0.132
Metástasis hepáticas	2.16	1.08-4.34	0.030
Carcinomatosis peritoneal	1.11	0.50-2.50	0.792

*Categoría de referencia en el cálculo de la HR. Variables incluidas en el modelo de regresión: Activación de PI3KCA/Akt/mTOR (No versus Sí), Amplificación de RTK (No versus Sí), ECOG (0-1 versus 2), Grado de diferenciación (según lo indicado), localización del tumor primario (UGE y cardíacas versus otra localización), estadio metastásico al debut (No versus Sí), Metástasis hepáticas (No versus Sí), Carcinomatosis peritoneal (No versus Sí).

El modelo multivariante finalmente seleccionado para medir el efecto crudo sobre la supervivencia global de la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR incluye como variables de confusión el ECOG y la presencia de metástasis hepáticas (*Tabla 17*). Éste indica que los sujetos, con el mismo valor para las variables ECOG y presencia de metástasis hepáticas, que presentan activación de la vía de PI3K/Akt/mTOR tienen un riesgo de muerte 3.28 veces mayor que aquellos sin activación de la vía (HR 3.28, IC95% 1.45-7.41, p=0.004).

Tabla 17. Modelo multivariante explicativo de la supervivencia global según la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR.

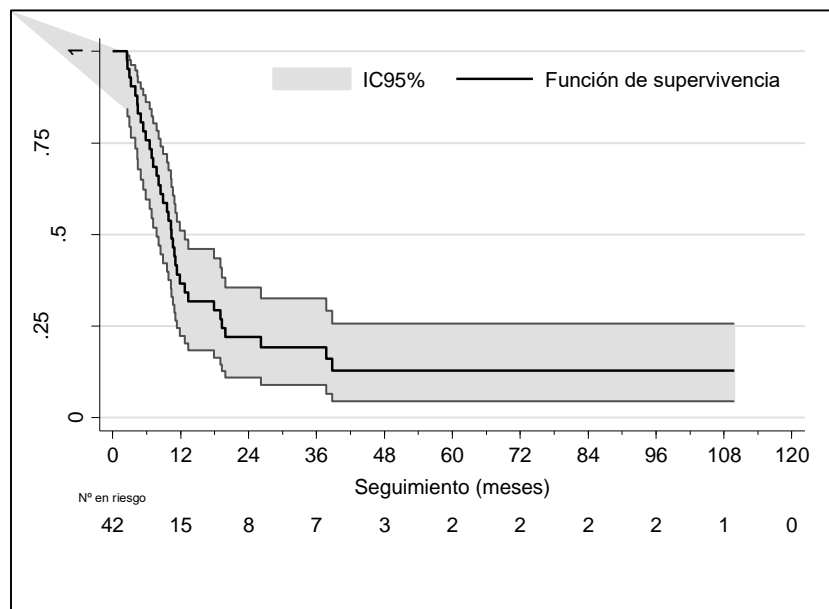
Variable	HR	IC95%	p-valor
Activación de PI3KCA/Akt/mTOR	3.28	1.45-7.41	0.004
ECOG	0.29	0.10-0.80	0.017
Metástasis hepáticas	2.50	1.2-5.17	0.014

5. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN

La mediana de supervivencia libre de progresión estimada para la primera línea de tratamiento es de 10.35 meses (IC95% 7.75 a 12.75 meses) (*Gráfico 17*).

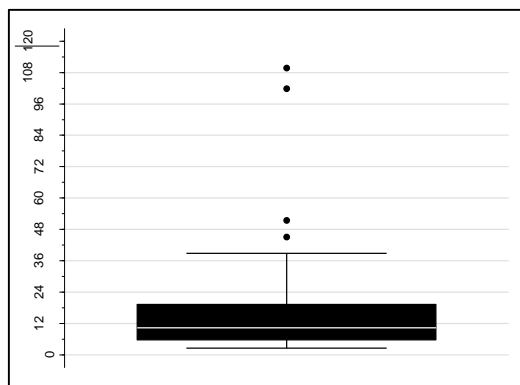
La tasa de supervivencia libre de progresión estimada a 1 año es del 36.65% (IC 95% 22.34%-51.07%), a 2 años del 21.99% (IC95% 10.90%-35.53%), a 3 años del 19.24% (IC95% 8.89%-32.56%) y a 5 años del 12.83% (IC95% 4.48%-25.75%).

Gráfico 17. Supervivencia libre de progresión (curva de Kaplan-Meier)



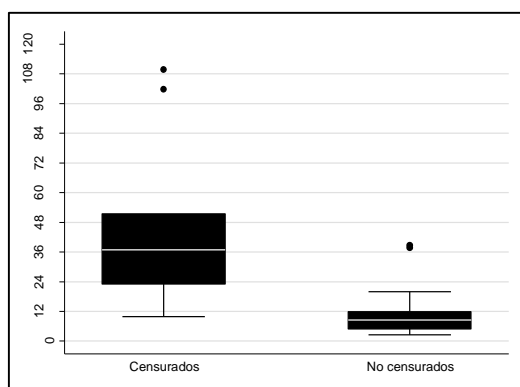
Como podemos observar en el *Gráfico 18* hay cuatro sujetos *outliers* con medianas de supervivencia libre de progresión largas, que superan en más de 1.5 rangos intercuartílicos la mediana de supervivencia del resto de la muestra, con valores de 45.03, 51.42, 101.85 y 109.80 meses.

Gráfico 18. Diagrama de caja: supervivencia libre de progresión a la 1ª línea.



La duración del seguimiento para el cálculo de la SLP para el total de los pacientes del estudio es de 18.23 meses y en los sujetos que no han progresado (tiempos censurados) de 46.16 meses. Los diagramas de caja (*Gráfico 19*) representan las distribuciones de los tiempos censurados y completos de seguimiento.

Gráfico 19. Diagrama de cajas: duración del seguimiento para el cálculo de la supervivencia libre de progresión.



5.1. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SEGÚN CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

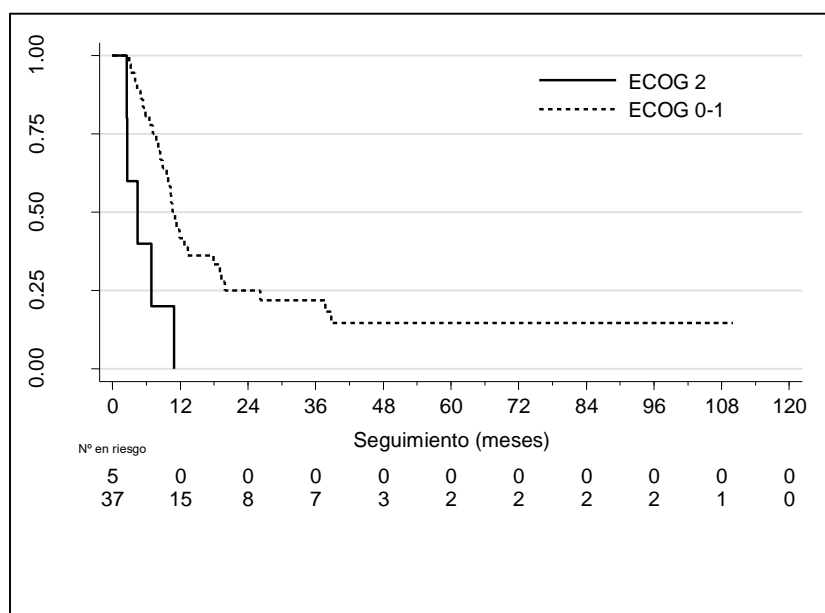
5.1.1. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SEGÚN EDAD Y SEXO

En el análisis univariante de regresión de Cox no se identifican como variables predictoras de la progresión a la primera línea de tratamiento ni la edad (HR 1.31, IC95% 0.61-2.83, $p=0.482$), ni el sexo (HR 1.14, IC95% 0.49-2.67, $p=0.747$).

5.1.2. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SEGÚN ECOG

La mediana de SLP estimada para los pacientes con ECOG 0-1 es de 11.04 meses (IC95% 8.48-17.87 meses) frente a 4.47 meses (IC95% 2.50- NA) de los pacientes con ECOG 2. El test de log-rank evidencia una diferencia estadísticamente significativa en la SLP según el ECOG ($p=0.0016$). Las curvas de Kaplan-Meier se muestran en el *Gráfico 20*.

Gráfico 20. Supervivencia libre de progresión según ECOG.



El modelo univariante de regresión de Cox determina que los pacientes con ECOG 2 presentan un riesgo de progresión a la primera línea de tratamiento 4.38 veces mayor que los pacientes con ECOG 0-1 (HR 4.28, IC95% 1.6-11.94, $p=0.004$).

5.1.3. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SEGÚN CLASIFICACIÓN DE LAURÉN

El análisis univariante mediante regresión de Cox evidencia una diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia libre de progresión según el subtipo de Laurén (LR $\text{Chi}^2= 12.39$, Prob $> \text{Chi}^2=0.0147$). Como muestra la *Tabla 18*, los pacientes con adenocarcinomas de tipo difuso presentan un riesgo de progresión tumoral 3.62 veces mayor que los pacientes con histología intestinal (IC95% 1.14-11.46, $p=0.029$).

Tabla 18. Análisis de la supervivencia libre de progresión según la clasificación de Laurén.

Subtipo Laurén	HR	p-valor	IC95%
Intestinal*			
Difuso	3.62	0.029	1.14-11.46
Mixto	0.44	0.424	0.06-3.29
Indeterminado	1.02	0.971	0.43-2.40
No determinado	$4.94 \times e^{15}$	1.0	0-.NA

**Categoría de referencia para el cálculo del HR*

5.1.4. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SEGÚN GRADO DE DIFERENCIACIÓN

En el análisis univariante de Cox no se evidencian diferencias estadísticamente significativas en la SLP según el grado de diferenciación (LR $\text{Chi}^2= 1.56$, Prob $> \text{Chi}^2= 0.6684$). En la *Tabla 19* se muestran los resultados por categorías.

Tabla 19. Análisis de la supervivencia libre de progresión según el grado de diferenciación.

Subtipo Laurén	HR	p-valor	IC95%
Bien diferenciado*			
Moderadamente diferenciado	1.35	0.568	0.48-3.77
Pobrementemente diferenciado	1.82	0.258	0.64-5.14
No determinado	1.74	0.449	0.41-7.34

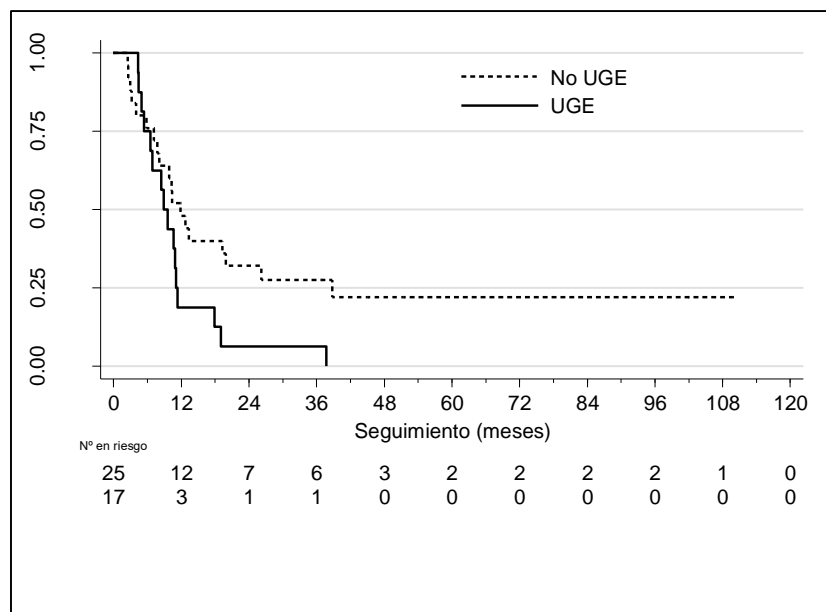
**Categoría de referencia para el cálculo del HR*

5.1.5. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SEGÚN LA LOCALIZACIÓN DEL TUMOR PRIMARIO

La curva de Kaplan-Meier según la localización del tumor primario se muestra en el *Gráfico 21*. La mediana de SLP estimada para los tumores localizados en la UGE es de 8.90 meses (IC95% 5.36 a 11.04 meses) y para los tumores fuera de dicha localización fue de 11.89 meses (IC95% 7.75 a 26.22 meses). El test de log-rank indica que estas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0.0435$).

El análisis de regresión de Cox estima un riesgo de progresión a la primera línea de tratamiento 2.02 veces mayor para los pacientes con tumores localizados en la UGE o el cardias, siendo estadísticamente significativa (HR 2.02, IC95% 1.01 a 4.06, $p=0.047$).

Gráfico 21. Supevivencia libre de progresión según la localización de tumor primario.

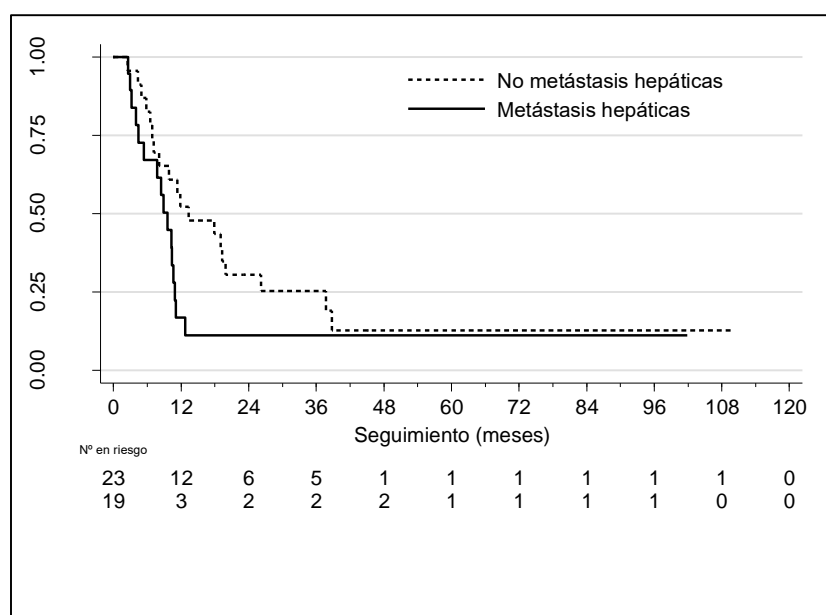


5.1.6. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SEGÚN LA LOCALIZACIÓN METASTÁSICA

La mediana de SLP estimada para los pacientes con metástasis hepáticas es de 9.63 meses (IC95% 4.47-10.61 meses) y para los pacientes sin metástasis hepáticas es de 13.31 (IC95% 7.13-19.91 meses). Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas mediante el análisis de log-rank ($p=0.1051$), y tampoco si aplicamos el test

de Peto-Peto para detectar diferencias tempranas ($p=0.0687$) ni el de Tarone-Ware para detectar diferencias en el medio ($p=0.0662$). En el Gráfico 22 se muestran las curvas de Kaplan-Meier.

Gráfico 22. Supervivencia libre de progresión según metástasis hepáticas.



De igual manera ocurre con la presencia de carcinomatosis peritoneal. En las curvas de Kaplan-Meier que se muestran en el Gráfico 23 parece existir una diferencia en la SLP según la presencia de carcinomatosis peritoneal, sin embargo los tests de log-rank, Tarone-Ware y Peto-Peto no muestran diferencias estadísticamente significativas ($p=0.1080$, $p=0.1267$ y $p=0.1336$, respectivamente). La mediana de SLP estimada para los pacientes con carcinomatosis peritoneal fue de 7.75 meses (IC95% 2.50-12.74) y para los pacientes sin carcinomatosis peritoneal fue de 10.61 meses (IC95% 8.11-17.87 meses).

El modelo de regresión de Cox univariante para cada una de las localizaciones metastásicas estima que no existen diferencias estadísticamente significativas en el riesgo de progresión a la primera línea de tratamiento para las diferentes localizaciones metastásicas, tal como se muestra en la Tabla 20.

Gráfico 23. Supervivencia libre de progresión según carcinomatosis peritoneal.

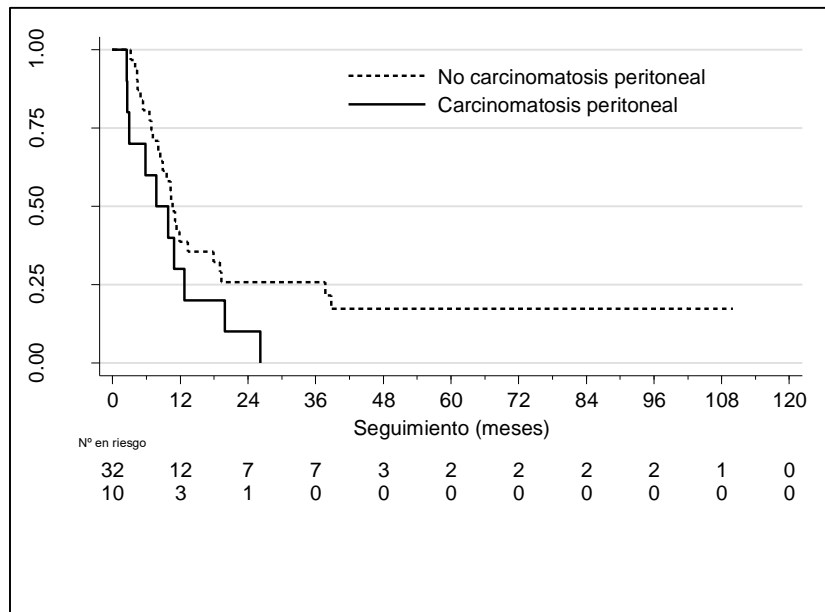


Tabla 20. Análisis univariante de regresión de Cox según la localización de las metástasis.

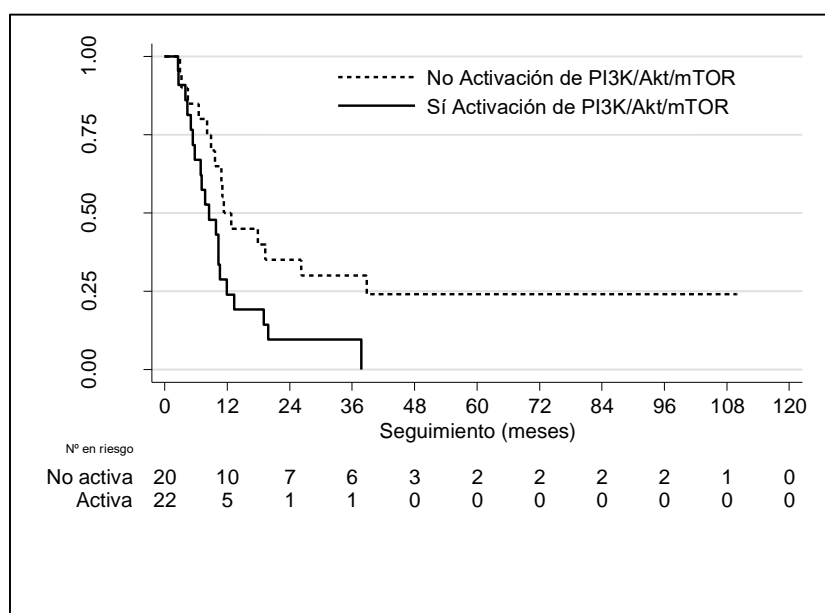
Localización de las metástasis	HR	IC95%	p-valor
Hígado	1.75	0.88-3.47	0.109
Pulmón	1.2	0.54-2.64	0.651
Ganglios torácicos	1.64	0.71-3.79	0.245
Ganglios abdominales	0.67	0.34-1.33	0.249
Hueso	3.53	0.77-16.15	0.104
Peritoneo	1.82	0.87-3.84	0.113

5.2. ANALISIS DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SEGÚN ALTERACIONES MOLECULARES

5.2.1. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SEGÚN LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT/MTOR

Las curvas de Kaplan-Meier de la SLP según la activación de PI3K/Akt/mTOR se muestran en el *Gráfico 24*. La mediana de SLP estimada para los pacientes con activación de PI3K/Akt/mTOR es de 8.48 meses (IC95% 5.36 a 10.61 meses) y para los pacientes sin activación de PI3KCA de 11.33 meses (IC95% 8.11 a 38.79 meses). Los test de log-rank evidencia diferencias estadísticamente significativas ($p=0.0219$).

Gráfico 24. Supervivencia libre de progresión según activación de PI3K/Akt/mTOR

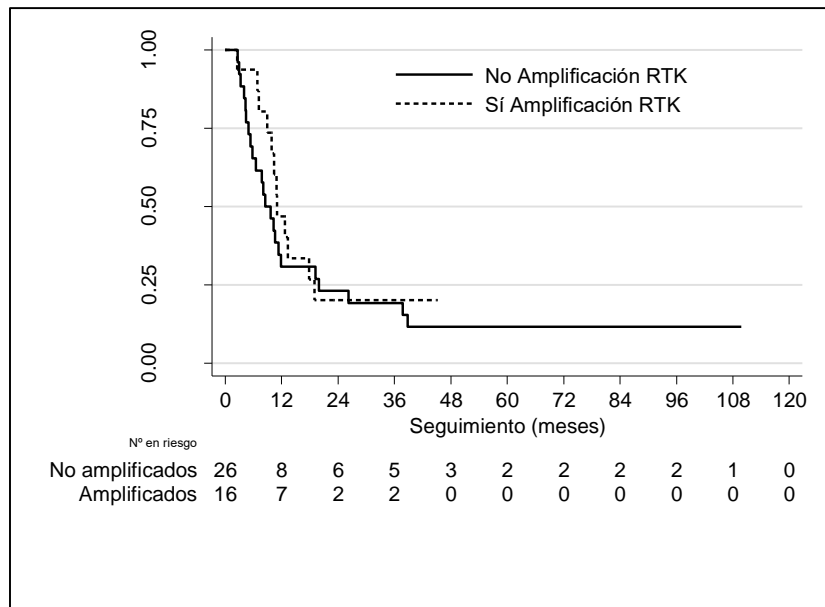


El análisis de regresión de Cox estima un riesgo de progresión a la primera línea de tratamiento 2.22 veces mayor para los pacientes con activación de PI3K/Akt/mTOR frente a aquellos en los que no existe activación, siendo estadísticamente significativa (HR 2.22, IC95% 1.10-4.47, $p=0.025$).

5.2.2. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SEGÚN LA AMPLIFICACIÓN DE GENES CODIFICANTES DE RECEPTORES TIROSINA QUINASA

Las curvas de Kaplan-Meier de la SLP reflejan que no existe diferencia entre los pacientes con amplificación de genes que codifican RTK y los pacientes sin amplificación (*Gráfico 25*). La mediana de SLP para los pacientes con amplificación fue de 11.04 meses (IC95% 8.90-17.87 meses) y de 8.48 meses para los pacientes sin amplificación (IC 95% 5.36-11.89 meses). El test de log-rank muestra ausencia de diferencias estadísticamente significativas ($p=0.4847$).

Gráfico 25. Supervivencia libre de progresión según la amplificación de genes codificantes de RTK.

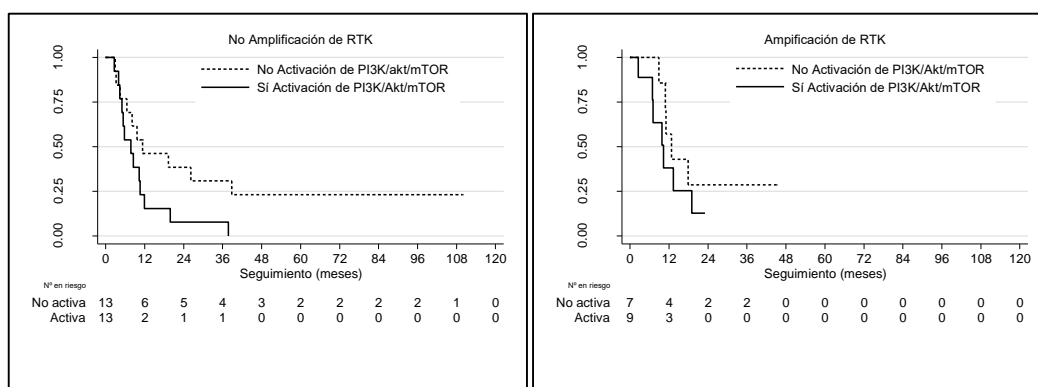


El modelo de regresión de Cox determina una HR de 0.78 no estadísticamente significativa (HR 0.78, IC95% 0.38-1.58, $p=0.486$).

En el *Gráfico 26* se muestran las curvas de Kaplan-Meier de la SLP según la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR estratificando por el estado de amplificación de los genes codificantes de RTK. En el subgrupo de pacientes sin amplificación, la mediana de supervivencia para los pacientes sin activación de PI3K/Akt/mTOR es de 11.33 meses (IC95% 4.46-38.77) y de 7.75 meses en los pacientes con activación de la vía (IC95%

4.34-10.61). El test de log rank muestra resultados en el límite de la significación estadística ($p=0.0601$). La HR estimada por el modelo de Cox es de 2.26 (IC95% 0.95-5.41, $p=0.066$). En el subgrupo de pacientes con amplificación de genes codificantes de RTK, la mediana de supervivencia es de 12.75 meses para los pacientes sin activación de PI3K/Akt/mTOR (IC95% 8.90-NA) y de 10.35 meses para los pacientes con activación (IC95% 2.50-19.0 meses). El test de log-rank muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0.3288$). La HR estimada por el modelo de Cox es de 1.76 (IC95% 0.55-5.61, $p=0.335$).

Gráfico 26. Supervivencia libre de progresión según la activación de PI3K/Akt/mTOR. Análisis por subgrupos según amplificación de genes codificantes de RTK.



5.2.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SEGÚN LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT/MTOR

Para determinar el impacto de la activación de la vía de PI3K/Akt/mTOR de forma independiente, eliminando los sesgos potenciales producidos por el desbalance en la distribución de otros factores pronósticos potenciales, y para estimar su importancia relativa en la supervivencia libre de progresión, hemos realizado un análisis multivariante según el método de Cox. Hemos incluido en el modelo máximo inicial aquellas variables que han resultado estadísticamente significativas en el análisis univariante: ECOG, clasificación histológica de Laurén y localización del tumor primario, junto con la activación de PI3K/Akt/mTOR (*Tabla 21*).

Tabla 21. Análisis univariante de riesgos proporcionales de Cox para la supervivencia libre de progresión.

Variable	HR	IC95%	p-valor
Activación de PI3K/Akt/mTOR	2.22	1.10-4.47	0.025
Amplificación de RTK	0.78	0.38-1.58	0.486
ECOG	4.28	1.6-11.46	0.004
Grado de diferenciación			
Bien diferenciado*			
Moderadamente diferenciado	1.35	0.48-3.77	0.568
Pobremente diferenciado	1.82	0.64-5.14	0.298
No determinado	1.74	0.41-7.34	0.449
Clasificación histológica de Laurén			
Intestinal*			
Difuso	3.62	1.14-11.46	0.029
Mixto	0.44	0.06-3.29	0.424
Indeterminado	1.02	0.43-2.40	0.971
No determinado	4.94 x e ¹⁵	0-	1.0
Localización tumor primario	2.02	1.01-4.06	0.047
Metástasis hepáticas	1.75	0.88-3.47	0.109
Carcinomatosis peritoneal	1.82	0.87-3.84	0.113

*Categoría de referencia en el cálculo de la HR. Activación de PI3KCA (No versus Sí), Amplificación de RTK (No versus Sí), ECOG (0-1 versus 2), Grado de diferenciación (según lo indicado), Clasificación histológica de Laurén (según lo indicado) localización del tumor primario (UGE y cardias versus otra localización), Metástasis hepáticas (No versus Sí), Carcinomatosis peritoneal (No versus Sí).

Tras el análisis por pasos, el modelo finalmente seleccionado que mejor determina el efecto de la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR sobre la supervivencia libre de progresión es aquel que incluye la localización del tumor primario como variable de confusión. Dicho modelo determina que los pacientes con activación de PI3K/Akt/mTOR presentan un riesgo de progresión 2.04 veces mayor que aquellos sin activación, de forma estadísticamente significativa (HR 2.04, IC95% 1.01-4.10, p=0.045) (Tabla 22).

Tabla 22. Modelo multivariante explicativo de la supervivencia global según la activación de PI3K/Akt/mTOR.

Variable	HR	IC95%	p-valor
Activación de PI3KCA/Akt/mTOR	2.04	1.01-4.11	0.045
Localización UGE/cardias	1.81	0.91-3.63	0.091

6. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

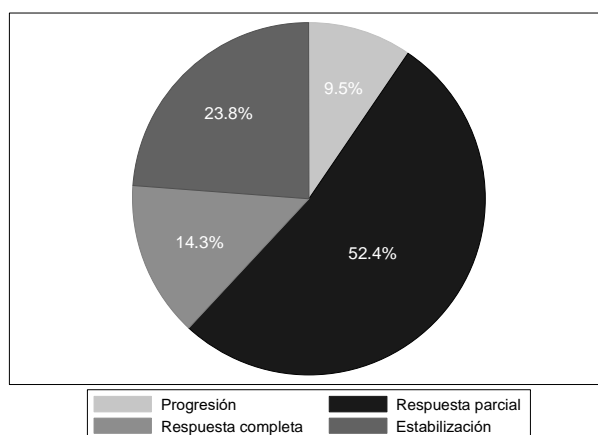
En la *Tabla 23* se muestra la respuesta al tratamiento de primera línea con quimioterapia, con un porcentaje de beneficio del 88.1%, incluyendo respuestas completas (RC), respuestas parciales (RP) y estabilizaciones de la enfermedad (EE), con tan sólo un 21.9% de progresiones de la enfermedad (PE). Estos porcentajes son similares a los resultados de la respuesta al tratamiento con Trastuzumab que se muestran a continuación, dado que el 95% de los pacientes recibieron Trastuzumab en primera línea.

Tabla 23. Respuesta a la quimioterapia de 1ª línea.

RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA DE 1ª LÍNEA N=42	N(%)
Progresión	5 (11.2)
Respuesta parcial	21 (50.0)
Respuesta completa	6 (14.3)
Estabilización	10 (23.8)

El 90.5% de los pacientes (n=38) presentaron algún grado de beneficio clínico con el tratamiento con Trastuzumab: 52.4% (n=22) respuestas parciales, 14.3% (n=6) respuestas completas y 23.8% (n=10) enfermedad estable (*Gráfico 27*). La tasa de respuestas objetivas a Trastuzumab fue del 66.7% (n=28).

Gráfico 27. Diagrama de sectores: Respuesta a Trastuzumab.



6.1. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

El análisis mediante el test de χ^2 de Pearson o el test exacto de Fisher, según corresponda, de la relación entre la respuesta objetiva a Trastuzumab y las características clínicas y patológicas sólo detecta diferencias estadísticamente significativas en el caso del ECOG. En el resto de las variables los resultados no son estadísticamente significativos, tal como se muestra en la *Tabla 24*.

En el caso del ECOG el riesgo relativo calculado mediante regresión logística indica que presentar un ECOG 2 multiplica el riesgo de presentar progresión de la enfermedad o enfermedad estable con Trastuzumab por 2.96 (RR 2.96, IC95% 1.49-5.89, $p=0.002$).

Tabla 24. Análisis de la relación entre la respuesta objetiva al tratamiento con Trastuzumab y las características clínico-patológicas.

	Respuesta a Trastuzumab			
	RP/RC n (%)	EE/PE n (%)	Total n (%)	
Edad				p=0.440
<70 años	22 (68.75)	10 (31.25)	32 (100)	
>70 años	6 (60)	4 (40)	10 (100)	
Sexo				p=0.543
Mujer	23 (67.65)	11 (32.35)	34 (100)	
Varón	5 (62.50)	3 (37.50)	8 (100)	
ECOG				p=0.002
0-1	27 (72.97)	10 (27.03)	37 (100)	
2	1 (20)	4 (80)	5 (100)	
Clasificación de Laurén				p=0.092
Intestinal	19 (70.37)	8 (29.63)	27 (100)	
Difuso	1 (25)	3 (75)	4 (100)	
Mixto	1 (50)	1 (50)	2 (100)	
Indeterminado	7 (87.50)	1 (12.50)	8 (100)	
No determinado	0 (0)	1 (100)	1 (100)	
Grado de diferenciación				p=0.395
Bien diferenciado	6 (85.71)	1 (14.29)	7 (100)	
Moderadamente diferenciado	10 (58.82)	7 (41.18)	17 (100)	
Pobremente diferenciado	9 (60)	6 (40)	15 (100)	
No determinado	3 (100)	0 (0)	3 (100)	
Localización tumor primario				p=0.288
Otra localización	18 (72)	7 (28)	25 (100)	
UGE/cardias	10 (58.82)	7 (41.18)	17 (100)	
Metástasis hepáticas				p=0.826
No	15 (65.22)	8 (34.78)	23 (100)	
Sí	13 (68.42)	6 (31.58)	19 (100)	
Carcinomatosis peritoneal				p=1.000
No	21 (65.63)	11 (34.38)	32	
Sí	7 (70)	3 (30)	10	

6.2. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y ALTERACIONES MOLECULARES

6.2.1. RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y ACTIVACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT/MTOR

Analizamos la respuesta al tratamiento con Trastuzumab y la activación de PI3K/Akt/mTOR, no detectándose diferencias estadísticamente significativas en la prueba de Chi² de Pearson (p=0.662).

Tabla 25. Respuesta a Trastuzumab y activación de PI3KCA/Akt/mTOR.

	Activación de PI3K/Akt/mTOR		
	No	Sí	
RP/RC	14 (70%)	14 (63.6%)	28 (66.7%)
EE/PE	6 (30%)	8 (36.4%)	14 (33.3%)
	20 (100%)	22 (100%)	42 (100%)

6.2.2. RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y AMPLIFICACIÓN DE GENES CODIFICANTES DE RECEPTORES TIROSINA QUINASA

En el análisis de la respuesta a Trastuzumab según la amplificación de los genes codificantes de receptores tirosina quinasa mediante la prueba Chi² de Pearson no se evidencian diferencias estadísticamente significativas, con p-valor de 0.369 (*Tabla 26*).

Tabla 26. Respuesta a Trastuzumab y amplificación de genes codificantes de RTK.

	Amplificación de RTK		
	No	Sí	
RP/RC	16 (61.5%)	12 (75%)	28 (66.7%)
EE/PE	10 (38.5%)	4 (25%)	14 (33.3%)
	24 (100%)	18 (100%)	42 (100%)

VI. DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y ANATOMOPATOLÓGICA DEL CÁNCER GÁSTRICO HER2 POSITIVO

La serie final de adenocarcinomas gástricos que presentamos en este trabajo, es aquella en la que dispusimos de material histológico suficiente para realizar el análisis molecular propuesto, tal cual se muestra en el diagrama de flujo correspondiente (*Figura 20*). Consta de 42 pacientes con adenocarcinoma gástrico en estadio metastásico, con sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* tratados con Trastuzumab, de los cuales se obtuvo la información clínica, patológica y molecular en el 100% de los casos.

En nuestra muestra la mediana de edad es de 62.3 años, existe un predominio de varones y la mayor parte de los pacientes presentan una buena situación funcional (ECOG 0 ó 1), datos concordantes con estudios previos (**87, 498, 499**).

Respecto al tipo histológico, la literatura describe que dentro de los adenocarcinomas gástricos cabe esperar aproximadamente un 54% adenocarcinomas intestinales, un 32% de adenocarcinomas difusos y un 15% mixtos o indeterminados, según la clasificación de Laurén (**87**). En nuestro estudio el 64.3% de las muestras de adenocarcinoma gástrico analizadas son de tipo intestinal, el 9.5% de tipo difuso, el 4.8% mixto y el 19.1% indeterminado (**500**). Esto refleja una mayor proporción de pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal frente a una menor proporción del tipo difuso, como cabe esperar por las características de la muestra, en la que se han seleccionado los casos con sobreexpresión y/o amplificación de *HER2*, asemejándose nuestras frecuencias relativas a las del estudio ToGA (**104, 500**). Es de destacar el alto porcentaje de pacientes en los que no ha sido posible determinar el tipo histológico; el 24.9% de las muestras fueron clasificadas como como subtipo mixto o indeterminado, lo cual podría poner de manifiesto por un lado, la heterogeneidad y compleja clasificación histopatológica del CG y, por otro la necesidad de patólogos experimentados en esta patología en los laboratorios de Anatomía Patológica de los hospitales españoles. En relación al grado de diferenciación, la mayor parte de los tumores son bien o moderadamente diferenciados, como cabe esperar según estudios previos.

En relación a la localización del tumor primario, el 40.5% se localizan a nivel proximal (unión gastroesofágica-cardias) y el 59.5% a nivel distal (fundus, cuerpo o antro gástricos). La existencia de una frecuencia relativa de adenocarcinomas proximales mayor a lo esperado es explicable por la selección de los casos HER2 positivos como muestra del estudio (104).

En el 61.9% de los pacientes la enfermedad debutó en estadio avanzado, mientras que en el 39.9% se desarrollaron metástasis en el transcurso evolutivo de la enfermedad. La localización de las metástasis en los pacientes de nuestra muestra se ajusta a lo descrito en trabajos previos, con preferencia por las metástasis ganglionares, hepáticas y peritoneales (501). Aunque existe una menor frecuencia relativa de la afectación peritoneal y mayor de las metástasis hepáticas respecto a lo que cabría esperar en una muestra de pacientes con CG, esto es explicable por la predominancia de los adenocarcinomas de tipo intestinal en la muestra de CG HER2 positivo.

El 95.2% de los pacientes recibieron tratamiento con quimioterapia asociada a Trastuzumab en primera línea. La quimioterapia elegida con mayor frecuencia fue la combinación de Cisplatino y fluoropirimidinas en el 52.4% de los casos, siguiendo el esquema del estudio pivotal en fase III ToGA. Otros esquemas de tratamiento basados en fluoropirimidinas, antraciclinas, taxanos o CPT-11, han sido empleados en combinación con Trastuzumab, a pesar de la ausencia de estudios fases III que lo avalen. Ello refleja, por un lado, la práctica clínica habitual en la que Trastuzumab se combina con diversos esquemas de quimioterapia distintos al empleado en el estudio ToGA; y por otro la ausencia de una primera línea estándar en CG avanzado. La mediana de ciclos de Trastuzumab en primera línea es de 11 (rango: 3-79 ciclos), superior a lo esperado según el estudio ToGA (104), hecho que probablemente se encuentre en relación con la optimización en la selección de los pacientes, tal como comentaremos más adelante.

La mediana de supervivencia global estimada en la muestra estudiada es de 15.69 meses (IC 95% 13-21.5 meses) y la mediana de supervivencia libre de progresión es de 10.35 meses (IC95% 7.75-12.75 meses). Estos resultados parecen superiores a los presentados en la población inicial del estudio ToGA, en el que la mediana de SG en el brazo experimental de Trastuzumab y quimioterapia fue de 13.8 meses (IC95% 12-16 meses) y la mediana de SLP de 6.7 meses (IC95% 6-8 meses). Sin embargo, en el estudio ToGA tras el análisis exploratorio predefinido de acuerdo al estado de HER2, se evidenció que

los pacientes con alta expresión de HER2 (IHQ 2+ y FISH positivo o IHQ 3+) presentaban una mediana de SG de 16 meses (IC95% 15-19 meses), cifra concordante con los resultados de nuestra muestra (104). En nuestra muestra el 90.5% de los pacientes presenta sobreexpresión de HER2 con IHQ 3+, mientras que el 9.5% restante con IHQ 2+ demostró amplificación por dc-SISH, siguiendo los criterios de Ruschoff *et al.* (195). Del total de los pacientes, el 88.1% presentan un ratio *HER2/CEP17* mayor o igual a 4 por SISH. Distintos estudios han definido un punto de corte superior a 4 para el ratio de la amplificación de *HER2* como factor predictivo de respuesta al tratamiento y de supervivencia global en pacientes tratados con Trastuzumab (105, 502) cuando se determina por hibridación *in situ* no fluorescente, por lo que una óptima selección de los pacientes puede determinar mejores resultados en tasa de respuestas y en supervivencia global con el tratamiento con Trastuzumab en nuestra cohorte de pacientes.

En nuestro estudio el 88.1% de los pacientes presentaron algún grado de beneficio clínico a la primera línea de tratamiento. El 90.5% de los pacientes presentaron sensibilidad a la terapia con Trastuzumab (incluyendo a todos los pacientes tratados con Trastuzumab en primera o en segunda línea), con una tasa de respuestas objetivas del 66.7%. Estos datos son superiores a los que cabría esperar según la rama experimental del estudio ToGA, en el que se objetivó beneficio clínico en el 79% de los pacientes y una tasa de respuestas objetivas del 47%. Tal como hemos comentado con anterioridad, la población inicial del estudio ToGA y de la que se muestran los resultados, incluyó a pacientes con IHQ 3+ o con FISH positivo, por lo que se incluyeron pacientes con IHQ 0 y 1+ con FISH amplificado. Posteriormente se evidenció que esta subpoblación presentaba menor beneficio al tratamiento con trastuzumab que aquellos con alta expresión de HER2.

El análisis estratificado de la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión según el ECOG determina que los pacientes con un ECOG 2, respecto a aquellos con ECOG 0 ó 1, mueren antes (HR 3.14, IC 95% 1.19-8.32) y presentan una recaída de la enfermedad más precoz con el tratamiento de quimioterapia (HR 4.28, I 1.6-11.94), por lo que el ECOG se muestra como un factor pronóstico en nuestra serie, tal como se ha mostrado en la literatura (155, 156). El análisis estratificado según la edad y el sexo no ha demostrado diferencias estadísticamente significativas.

Por otro lado, la localización proximal del tumor primario se identifica como factor pronóstico, existiendo un mayor riesgo de muerte (HR 2.13, IC95% 1.06-4.28) y menor

tiempo a la progresión con el tratamiento de primera línea (HR 2.02, IC 95% 1.01-4.06) respecto a aquellos pacientes con tumores de localización distal, lo cual también se encuentra en concordancia con lo hallado en series previas (**143**).

El grado histológico, cuyo valor pronóstico ha sido identificado en otras publicaciones (**145**), no se ha mostrado en nuestra muestra como factor determinante de la supervivencia global ni de la supervivencia libre de progresión, aunque dado el limitado tamaño muestral no es posible establecer conclusiones definitivas a este respecto.

El valor pronóstico de los diferentes tipos histológicos es un tema controvertido, no aclarado en la literatura (**138, 139**). En nuestra muestra el análisis estratificado de la supervivencia libre de progresión según la clasificación de Laurén, estima un riesgo de progresión 3.62 veces mayor en los pacientes con adenocarcinoma gástrico difuso respecto a los pacientes con histología intestinal (HR 3.62, IC95% 1.14-11.46). Sin embargo, el análisis de la supervivencia global según el subtipo histológico determina que no existen diferencias estadísticamente significativas, lo cual podría traducirse en que los pacientes con CG difusos presentan un menor beneficio con el tratamiento de quimioterapia y Trastuzumab, considerándose la histología como factor predictivo negativo de respuesta al tratamiento, pero no como factor pronóstico en nuestra serie.

El índice pronóstico validado prospectivamente por el Hospital Royal Marsden (Londres, Reino Unido) identificó la presencia de metástasis hepáticas y la carcinomatosis peritoneal como dos factores pronósticos independientes en el análisis multivariante (**155, 156**). En nuestra muestra, la presencia de metástasis hepáticas es identificada como un factor asociado a menor mediana de supervivencia, estimando que el riesgo de muerte para los pacientes con metástasis hepáticas es 2.16 veces mayor que para aquellos que no las presentan (HR 2.16, IC95% 1.08-4.34). Por el contrario, la carcinomatosis peritoneal no se asocia a mayor riesgo de muerte en nuestra muestra, hecho que podría estar en relación con el escaso tamaño muestral y la menor incidencia de carcinomatosis peritoneal entre los pacientes con sobreexpresión y/o amplificación de *HER2*, en su mayoría de histología intestinal. El análisis de supervivencia libre de progresión según la presencia de metástasis hepáticas o carcinomatosis peritoneal no muestra diferencias estadísticamente significativas.

Con estos datos consideramos que nuestra muestra es equiparable a la población general de pacientes con adenocarcinomas gástricos *HER2* positivos, constituyendo una serie de

casos válida para el estudio clínico y molecular de esta neoplasia. Sin embargo, el tamaño muestral es una limitación que deberemos considerar en todas nuestras interpretaciones, y que puede condicionar la falta de potencia estadística para encontrar diferencias estadísticamente significativas en algunos casos, aún siendo éstas clínicamente relevantes.

2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER GÁSTRICO HER2 POSITIVO

En los últimos años diversos estudios relacionados con el perfil molecular del cáncer gástrico han sido publicados, tratando de identificar diferentes alteraciones genómicas potencialmente tratables con terapias dirigidas, y de relacionar factores clínico-patológicos con dichas alteraciones moleculares.

Destaca entre dichos estudios la clasificación establecida por el TCGA, en el que se evalúan de forma integrada las mutaciones, cambios en el número de copias, expresión génica y metilación del ADN de 295 pacientes con adenocarcinoma gástrico (122). Históricamente, el CG ha sido identificado como una entidad única, sin embargo, en los últimos años ha quedado de manifiesto la gran heterogeneidad de la enfermedad a nivel clínico y molecular (503). De esta forma, el estudio del TCGA redefine el CG en cuatro subtipos moleculares distintos. En primer lugar, el subtipo VEB se caracteriza por la presencia de hipermetilación y una alta prevalencia de mutaciones en *PIK3CA*. En segundo lugar, en el subtipo MSI predomina un patrón de hipermetilación diferente al observado en el VEB positivo y alta tasa de mutaciones somáticas, con mutaciones recurrentes en *PIK3CA* y *ERBB3*. En tercer lugar, los tumores con inestabilidad cromosómica muestran aneuploidia y amplificaciones de genes codificantes de RTK, especialmente *HER2*. Por último, el subtipo genómicamente estable, principalmente representado por el adenocarcinoma difuso, presenta alteraciones en la vía de señalización de Rho en el 30% de los casos.

Otro estudio importante publicado en los últimos años, es el análisis génico y de expresión proteica de 300 tumores primarios gástricos realizado por *The Asian Cancer Research Group* (ACRG) (504), en el que se divide a los pacientes en cuatro subtipos con diferente pronóstico: mesenquimal (MSS/EMT), con inestabilidad de microsatélites (MSI), sin mutación de *TP53* (MSS/*TP53*-) y con mutación de *TP53* (MSS/*TP53*+), de peor a mejor pronóstico respectivamente. La comparación del estudio del TCGA con el estudio del ACRG muestra algunas similitudes, como la presencia de un grupo con inestabilidad de microsatélites y la correspondencia entre los subtipos GS y MSS/EMT, VEB y MSS/*TP53*+, y CIN y MSS/*TP53*-. Sin embargo, los subtipos CIN y GS del estudio del TCGA se encuentran representados en todos los subtipos del ACRG y el porcentaje de

adenocarcinoma gástrico difuso en cada uno de los estudios difiere de forma significativa en los subtipos GS y MSS/EMT respectivamente (57% vs. 27%). Además, cuando se aplica la clasificación molecular empleada por el TCGA sobre las muestras del estudio asiático no se evidencia la asociación pronóstica.

Por lo tanto, ambas clasificaciones pueden considerarse complementarias y, a día de hoy, no existe una clasificación molecular con aplicabilidad práctica para el CG. No obstante, los diferentes estudios publicados en los últimos años sobre la caracterización molecular del CG asientan las bases para la estratificación de los pacientes y el desarrollo racional de terapias dirigidas en distintos grupos de pacientes.

Hasta la fecha el único marcador predictivo de respuesta a una terapia dirigida es la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2*. Trastuzumab ha demostrado prolongar la supervivencia global y el tiempo hasta la progresión de los pacientes con cáncer gástrico y de la unión gastroesofágica con sobreexpresión y/o amplificación de *HER2*. Sin embargo, no todos los pacientes *HER2* positivos presentan este beneficio, siendo necesaria la identificación de aquellos que son refractarios de forma primaria a esta terapia, y de aquellos otros que desarrollan un beneficio limitado en el tiempo, desarrollando mecanismos de resistencia adquirida. En cáncer de mama diversos estudios han investigado los mecanismos de resistencia a la terapia con Trastuzumab, sin embargo, en cáncer gástrico los datos son limitados. Este hecho refleja la importancia de dilucidar el papel que desempeñan alteraciones genómicas concomitantes a la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* en el desarrollo de resistencia primaria o secundaria al tratamiento con Trastuzumab en cáncer gástrico, con dos finalidades principales:

- Realizar una óptima selección de los pacientes, que evite toxicidad y costes de un tratamiento ineficaz.
- Desarrollar estrategias de combinación de fármacos que mejoren la eficacia del tratamiento.

Basándonos en la tesis de que la existencia de eventos oncogénicos asociados a la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* podría afectar a la evolución que los pacientes presentan con el tratamiento con Trastuzumab en cáncer gástrico, hemos analizado mediante NGS el perfil molecular de 42 muestras de pacientes con adenocarcinoma gástrico avanzado tratados con Trastuzumab. De las 42 muestras analizadas, 38 de ellas

(88.1%) presentan al menos una alteración genómica concomitante, incluyendo mutaciones, amplificaciones y/o deleciones entre los 50 genes analizados. El número medio de alteraciones genómicas por paciente es de 3.62 (rango 0-11). Por lo tanto, en base a estos resultados podemos afirmar que la coexistencia de alteraciones genómicas asociadas a la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* es un hecho frecuente en el adenocarcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica, tal como han mostrado otros estudios publicados recientemente (120, 302).

2.1. MUTACIONES

2.1.1. TP53

En nuestro estudio, la alteración genómica más frecuentemente detectada es la mutación de *TP53*, la cual está presente en el 73.8% de las muestras. La proteína p53 nativa o “*wild-type*” está implicada en la regulación de diferentes procesos: ciclo celular, reparación del ADN, apoptosis, autofagia, angiogénesis, entre otros. (505). *TP53* es el gen mutado con más frecuencia en las neoplasias humanas, estando alterada la función de la proteína p53 en el 50% de los cánceres y habiéndose descrito más de 30.500 mutaciones distintas (506). Diferentes estudios preclínicos han demostrado que la pérdida de función de p53 tiene un papel fundamental en el desarrollo, invasión, proliferación y capacidad metastásica del cáncer (507). La mayoría de los estudios experimentales se han focalizado en los codones relacionados con el dominio de unión de p53 al ADN, que representan aproximadamente el 80% de las mutaciones descritas. La mayoría de ellas son mutaciones puntuales que cambian un codón codificante por otro que especifica un aminoácido distinto en el ARNm transcrito (505).

En cáncer de mama la presencia de mutaciones en *TP53* parece asociarse a peor pronóstico y a una peor respuesta a tratamiento con quimioterapia, especialmente a antraciclinas, hormoterapia y radioterapia, aunque su impacto parece depender del subtipo molecular y del tipo de mutación encontrada (508, 509). En cáncer gástrico, el papel de *TP53* como factor pronóstico y predictivo no está establecido (163, 166, 167, 510).

En el estudio publicado por Critescu *et al.* (504) realizado por el ACRG se establece el valor pronóstico de la clasificación molecular, otorgando el mejor pronóstico a los pacientes del subtipo MSI y el peor al subtipo MSS/EMT. Dentro de los tumores con pronóstico intermedio, los que presentan mutaciones en *TP53* tienen una supervivencia mayor que aquellos que no presentan alteración de *TP53*. Este estudio pone de manifiesto la importancia que puede alcanzar *TP53* como alteración molecular clasificatoria de los subtipos moleculares del cáncer gástrico. El hecho de que la expresión proteica por inmunohistoquímica se puede emplear como marcador surrogado de la mutación de *TP53*, junto con el mayor conocimiento de sus funciones e importancia en la patogenia de diferentes neoplasias, convierten a *TP53* en una diana atractiva para el desarrollo de estrategias terapéuticas en cáncer (507).

En diferentes estudios en CG se describe una prevalencia aproximada de mutaciones en *TP53* del 36-54% (109, 122, 302, 511). Algunos estudios de pequeño tamaño muestral focalizados en CG HER2 positivo muestran una prevalencia cercana al 50% (302). En el estudio del TCGA, la prevalencia global de mutaciones en *TP53* es del 46%, siendo de hasta el 71% en el subtipo cromosómicamente inestable, el cual se asocia con la localización en UGE y con la histología intestinal (122). Dado que la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* igualmente se asocia a dichas características clínicas e histopatológicas, cabría pensar que *TP53* juega un papel más importante en la patogenia del CG HER2 positivo que en el CG HER2 negativo. En nuestro estudio la prevalencia de mutaciones en *TP53* alcanza casi el 74%, siendo éste un porcentaje significativamente mayor al descrito en otros estudios de CG y similar al descrito en el subgrupo CIN del TCGA (109, 122). Contrariamente al estudio del TCGA, en el estudio del ACRG la amplificación de *HER2* estuvo presente tan solo en el 3% de los tumores MSS/*TP53*+, siendo del 17.4% en los tumores MSS/*TP53*-. La baja prevalencia de mutaciones en *TP53* del estudio asiático puede explicarse por el alto porcentaje de pacientes con adenocarcinoma gástrico difuso (45% vs. 24% en el estudio del TCGA), predominantemente genómicamente estables con baja tasa mutacional. Sin embargo, al igual que en el subtipo CIN del TCGA, el subtipo MSS/*TP53*- del ACRG muestra con mayor frecuencia aumento en el número de copias de diferentes genes para los que existen o están en estudio terapias dirigidas como Trastuzumab o fármacos anti-EGFR. La falta de concordancia entre las diferentes clasificaciones moleculares podría explicar, al menos en parte, estas diferencias.

Por lo tanto, consideramos que son necesarios más estudios que analicen las mutaciones en *TP53* y su valor patogénico en el subtipo de CG HER2 positivo, teniendo en cuenta como posibles factores de confusión la localización tumoral y el subtipo histológico.

2.1.2. PIK3CA

Las mutaciones en *PIK3CA* se encontraron en el 11.9% de nuestros pacientes. Las mutaciones encontradas son en su mayoría mutaciones activadoras localizadas en los exones 9 y 20 del dominio quinasa de la proteína, y que han sido descritas previamente (512). La presencia de mutaciones en *PIK3CA* en pacientes con cáncer gástrico HER2 positivo contradice lo publicado por Kuboki *et al.*, quienes describen que la amplificación de *HER2* es mutuamente excluyente con la presencia de mutaciones en *PIK3CA* (511). En el estudio del TCGA existe una prevalencia global de mutaciones en *PIK3CA* del 24%, siendo máxima en el subtipo VEB positivo (80%) y menor en el resto de grupos moleculares (del 3 al 42%). Esto hace pensar que los fármacos inhibidores de PI3K deberían testarse específicamente en este subtipo tumoral de cáncer gástrico. La prevalencia de mutaciones en *PIK3CA* de nuestro estudio es concordante con los datos en tumores gástricos globalmente. El estudio publicado por Lee JY *et al.* en tumores HER2 positivos en población asiática describe una prevalencia de mutaciones en *PIK3CA* del 2% (302). Es de destacar que según un metaanálisis publicado en 2014, la frecuencia de mutaciones en *PIK3CA* en cáncer gástrico varía según la etnia, siendo más frecuente en pacientes caucásicos que en asiáticos (15% vs. 7%), lo que explica que en nuestra muestra la prevalencia se asemeje más a la descrita en el estudio del TCGA (513).

Por lo tanto, podemos considerar que la frecuencia de mutaciones halladas en nuestro estudio es concordante con lo descrito en la literatura. Abordaremos con más detalle las mutaciones de *PIK3CA* en el análisis conjunto de los datos de la vía PI3K/Akt/mTOR.

2.1.3. OTRAS MUTACIONES

Otras mutaciones que hemos encontrado han sido descritas previamente en la literatura. Aunque se encuentran presentes en menor frecuencia, no por ello son menos importantes:

- En el 7.1% de las muestras hemos encontrado mutaciones en ***MET***. c-MET es un receptor tirosina quinasa activado por HGF que condiciona la activación intracelular de la vía PI3K/Akt/mTOR y la vía de RAS, y se interrelaciona con VEGFR y la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR1, HER2). Aunque la sobreexpresión y/o la amplificación de *MET* son las alteraciones más frecuentemente descritas, diversas mutaciones en *MET* han sido implicadas en la patogénesis de diversos tumores, incluyendo alteraciones en el dominio extracelular y en el dominio citoplasmático yuxtamembranoso de la proteína en regiones no asociadas a actividad tirosina quinasa (514). Por lo tanto, la función de *MET* puede alterarse tanto por amplificaciones como por mutaciones. La amplificación de *MET* se ha identificado como factor pronóstico desfavorable en cáncer gástrico (209), quedando por determinar si las mutaciones en *MET* tienen el mismo valor. Los resultados respecto al valor predictivo de *MET* son discordantes en base a los resultados obtenidos con Rilotumumab y Foretinib (313), dos inhibidores selectivos de MET, aunque otros fármacos continúan su desarrollo clínico.
- ***CDKN2A***. En el 7.1% de las muestras existe una mutación en ***CDKN2A***, gen supresor tumoral responsable de la expresión de la proteína p16, implicada en la regulación del ciclo celular, y que se ha relacionado con la patogénesis del cáncer gástrico asociado a la infección del VEB (261). En el estudio del TCGA los tumores clasificados como VEB positivos mostraron hipermetilación del ADN, incluyendo la del promotor de *CDKN2A*, sin mostrar metilación de *MLH1*, que es característica del subtipo MSI (122). Estos tumores asociados al VEB representan aproximadamente el 9% de los cánceres gástricos, porcentaje similar al obtenido en nuestra muestra.
- ***SMAD4***. En el 7.1% hay mutaciones en ***SMAD4***, gen implicado en la señalización intracelular de la vía de TGF- β , y cuya pérdida de expresión se ha asociado a la

carcinogénesis de diferentes tumores digestivos mediante varios mecanismos, como la degradación del proteosoma, la hipermetilación, la pérdida de heterocigosidad, entre otros (515). En el estudio publicado por Wang *et al.* (110) se describe una prevalencia del 4.3% de mutaciones en *SMAD4*, presentes especialmente en tumores con inestabilidad de microsatélites.

- Alteraciones en genes relacionados con la vía **Wnt/ β -catenina**. En el 7.1% encontramos mutaciones en *CTNNB1*, gen de la β -catenina, y en el 2.4% de las muestras hallamos mutaciones en el gen *APC*. Wnt señala a través de una familia de receptores de superficie celular llamados *frizzled*, y estimula varias vías, de las cuales la central implica a β -catenina y APC. En ausencia de señales Wnt, APC provoca la degradación de β -catenina, evitando su acumulación en el citoplasma. Para ello se forma un complejo macromolecular con β -catenina, axina y GSK3b, el cual conduce a la fosforilación y finalmente ubiquitinación de β -catenina y su consecuente destrucción por el proteasoma. Las señales de Wnt bloquean el complejo de destrucción APC-axina-GSK3b, permitiendo que se transloque la β -catenina del citoplasma al núcleo, donde forma un complejo con un factor de transcripción, regulando positivamente la proliferación celular a través de *c-MYC*, *ciclina D1* y otros genes. Si se altera el gen *APC*, se altera el complejo de destrucción y la β -catenina sobrevive y se transloca al núcleo, donde coopera con dicho factor de transcripción. Los tumores en los que β -catenina está mutada, ésta ejerce su función como factor de transcripción, dado que el gen *APC* no puede unirse a la misma. Por otro lado, la β -catenina se une a la E-cadherina, responsable de la adhesividad intercelular, por lo que su alteración también se ha asociado a mayor invasividad, metástasis y un pronóstico desalentador para los pacientes (516).
- **KRAS**. En los estudios publicados en los últimos años empleando tecnologías de secuenciación masiva el porcentaje de mutaciones en *KRAS* descrito para cáncer gástrico oscila entre el 1.7% al 16% (120, 122, 302, 504, 511). En nuestra muestra el porcentaje de mutaciones en *KRAS* es del 2.4%, similar a lo descrito en el estudio de Lee YJ *et al.* realizado en CG HER2 positivo (302). No identificamos mutaciones en otros componentes de la vía de RAS como *NRAS* o *BRAF*. El paciente que mostró mutación en *KRAS*, no presentaba mutación de *PIK3CA*, y sí

presentaba amplificación de varios receptores tirosina quinasa (EGFR, FGFR1, FGFR3, así como HER2), lo cual es concordante con los datos publicados sobre la ausencia de concurrencia entre la mutación en *KRAS* y *PIK3CA* en cáncer gástrico (517). Dentro de los subtipos de CG del TCGA existe una predominancia de las mutaciones en *KRAS* en los subtipos con inestabilidad de microsatélites y en el cromosómicamente inestable, en el que también predominan las amplificaciones en genes codificantes de RTK (122). El papel patogénico y el carácter pronóstico de las mutaciones en *RAS* en cáncer gástrico es incierto. Algunos estudios sugieren su carácter pronóstico negativo, aunque son necesarios datos de series prospectivas más amplias para concluirlo (518, 519). Asimismo, desconocemos el valor predictivo negativo de la respuesta a terapias anti-EGFR en pacientes con mutaciones en *RAS*, a diferencia de lo que ocurre en cáncer colorrectal, patología en la que esto se encuentra firmemente establecido (520). En el apartado de cambios en el número de copias discutiremos el posible papel predominante de las amplificaciones de *KRAS* sobre las mutaciones en cáncer gástrico.

- **NOTCH.** En una de las muestras (2.4% de los pacientes) evidenciamos la presencia de mutación en *NOTCH1*. Son necesarios estudios *in vitro* e *in vivo* bien diseñados y de mayor tamaño muestral para evaluar correctamente el papel de la vía de NOTCH en la carcinogénesis del cáncer gástrico, dado que los datos disponibles hasta la fecha son controvertidos (521). La vía IL-6/STAT3/Jagged-1/NOTCH ha sido implicada en la resistencia adquirida a Trastuzumab y a inhibidores tirosina quinasa en modelos celulares a través de la regulación del fenómeno de transición epitelio-mesénquima (522, 523), siendo necesarios estudios exploratorios sobre biomarcadores dentro de ensayos clínicos para dilucidar su papel predictivo a dichos fármacos. En nuestro estudio el escaso tamaño muestral y la baja incidencia de dicha mutación impide extraer conclusiones.
- **VHL.** Asimismo hemos hallado una mutación en el gen *VHL* en una de las muestras (2.4% de los pacientes). Son prácticamente nulos los datos acerca del papel de los cambios genéticos y/o epigenéticos de este gen en el desarrollo del cáncer gástrico (524).

2.2. ALTERACIÓN EN EL NÚMERO DE COPIAS

En nuestra muestra encontramos alteraciones en el número de copias en el 85.7% de los casos, siendo la media de 2.4 alteraciones por muestra (rango 0-8) (**511**). El gen amplificado con más frecuencia es *FGFR* (31%), especialmente *FGFR3* (21.4%), seguido de *PIK3CA* (23.8%), *EGFR* (21.4%) y *CDHI* (16.7%). También hemos hallado deleciones con una alta prevalencia, siendo las más frecuentes *AKT* (31%), *FGFR* (16.7%) y *CDKN2A* (14.3%). A continuación discutimos la prevalencia de las alteraciones y posible significación de las mismas.

2.2.1. AMPLIFICACIÓN DE FGFR

Las amplificaciones de *FGFR* están presentes en el 31% de las muestras analizadas. El subtipo más frecuentemente amplificado es *FGFR3*, en el 21.4% de los casos, seguido de *FGFR1* con el 11.9%. La amplificación de *FGFR2* está presente sólo en un paciente. En 2 de los casos existe co-amplificación de dos subtipos de receptores FGFR. Nuestro panel de genes no incluye el análisis de *FGFR4*.

De los 4 subtipos de receptores FGFR, el más estudiado en CG ha sido el FGFR2, que ha sido propuesto como diana terapéutica. Diversos ensayos clínicos con inhibidores selectivos y no selectivos de FGFR2 se encuentran en marcha. La prevalencia de amplificaciones en *FGFR2* descrita en la literatura es de aproximadamente el 2-9% (**109, 504**). Existe controversia sobre su asociación con el subtipo histológico difuso (**109**), habitualmente relacionándose la amplificación de *FGFR2* con un estadio T y N más avanzado y con una peor supervivencia (**204, 525**).

En el estudio del TCGA la frecuencia de alteraciones (incluyendo mutaciones y alteraciones en el número de copias) en *FGFR2* es del 9%, con un predominio de las amplificaciones sobre las mutaciones o deleciones, y siendo especialmente frecuente su alteración en los subtipos GS y CIN (**122**). Sin embargo, en nuestra serie la prevalencia de amplificaciones en *FGFR* es mucho mayor (31%) y predominan las amplificaciones en *FGFR3* sobre *FGFR2*. En el estudio de Kuboki *et al.* predominan, como en nuestro estudio, las amplificaciones en *FGFR3*, aunque con una prevalencia menor (7.3%) (**511**). El estudio realizado en CG HER2 positivo publicado por Lee JY *et al.* no se describen

alteraciones en *FGFR* (302). En este último estudio la detección de las alteraciones en el número de copias se realiza a través de una plataforma de 21 genes en el que se incluye sólo *FGFR2*, y el número de muestras es igualmente escaso (n=50).

Algunos estudios apuntan que las amplificaciones de *FGFR2* y *HER2* son prácticamente mutuamente excluyentes en CG, y que aquellos tumores que co-amplifican ambos suelen hacerlo en células tumorales distintas y con carácter heterogéneo, lo que apunta a un origen clonal distinto (109, 525). Esto apoyaría el uso combinado de fármacos anti-*HER2* y anti-*FGFR2*. Por otro lado, de acuerdo a nuestros datos, es posible que la amplificación de *HER2* se asocie con mayor prevalencia de amplificaciones en *FGFR3* y *FGFR1*, siendo menor el papel que pueda desempeñar *FGFR2*. Este punto sería otro de los aspectos a explorar de cara al diseño de estrategias terapéuticas de combinación de fármacos con inhibidores no selectivos de *FGFR2*.

2.2.2. AMPLIFICACIÓN DE *PIK3CA*

El porcentaje de amplificaciones en *PIK3CA* descrita por el metaanálisis realizado por Chong ML *et al.* (513) es del 23.2% (IC95%: 2.6-77.3%), porcentaje similar al encontrado en nuestro estudio (23.8%). En el estudio del TCGA se describe que la amplificación de *PIK3CA* se halla con más frecuencia en el subtipo MSI (122). Como hemos comentado previamente abordaremos las alteraciones en la vía PI3K/Akt/mTOR de forma conjunta más adelante.

2.2.3. AMPLIFICACIÓN DE *EGFR*

El porcentaje de amplificación en *EGFR* descrito en la literatura para CG es aproximadamente del 2-8% (109, 504). En el estudio de Cristescu *et al.* (504) la amplificación de *EGFR* predomina en el grupo MSS/TP53- con una prevalencia del 7%. En este subgrupo existe un aumento estadísticamente significativo de la presencia de amplificaciones focales en genes como *ERBB2* y *EGFR*, entre otros, y ello se relaciona con un incremento de los niveles de ARNm y de la expresión proteica. La activación de *EGFR* debida a amplificaciones se describe en el 10% de los pacientes con CG cromosómicamente inestable, mientras que la activación de *EGFR* debida a mutaciones predomina en el subtipo con inestabilidad de microsatélites con una prevalencia del 5%

(122). Nuestro estudio, focalizado en CG HER2 positivo, muestra una prevalencia de amplificaciones mayor a la descrita en la literatura para CG (21.4%), lo que puede hacernos pensar por un lado, que existe una asociación entre la amplificación de *HER2* y la amplificación de *EGFR* y, por otro lado, que dado el escaso tamaño muestral existe una sobreestimación de la prevalencia en nuestra muestra.

Según Cristescu *et al.* (504) en el subtipo MSS/TP53- existe una tendencia a que las amplificaciones más frecuentes (*ERBB2*, *EGFR*, *CCNE1*, *CCND1*) sean mutuamente excluyentes entre sí. En el estudio de Deng *et al.* (109) igualmente se apunta a una exclusividad de las amplificaciones en los genes codificantes de receptores tirosina quinasa (*FGFR2*, *ERBB2*, *EGFR* y *MET*), lo cual, tal como hemos discutido previamente con *FGFR*, tampoco observamos con *EGFR* en nuestra cohorte de pacientes. En nuestra muestra, la frecuencia de co-amplificación de *ERBB2* (*HER2*) y *EGFR* es del 21.4%. A favor de los resultados de nuestro estudio, se encuentran los datos publicados por Ali SM *et al.* (120), donde se describen amplificaciones concomitantes de *EGFR* con *FGFR2*, *MET* y *ERBB2*. Los datos publicados por Lee JY *et al.* (302) en una cohorte de 50 pacientes con CG HER2 positivo determinan la expresión de *EGFR* mediante inmunohistoquímica en 37 pacientes, de los cuales 4 de ellos presentan sobreexpresión (12.1%). Otro estudio asiático determina la co-expresión mediante IHQ de *HER2*, *EGFR* y *MET*, encontrando un 9% de pacientes con GC HER2 positivo en el que existe co-expresión de los tres receptores, un 17% que junto a *HER2* co-expresa *EGFR* y un 22% co-expresa *MET* (526). Este último estudio establece que la co-expresión de varios receptores tirosina quinasa implica un peor pronóstico.

Según nuestros hallazgos y de acuerdo con otras publicaciones, las amplificaciones de *HER2* y *EGFR* no son mutuamente excluyentes y además, se presentan con una prevalencia mayor que en la población global de cáncer gástrico. Dados los datos discordantes, serían necesarios estudios multicéntricos, de mayor tamaño muestral, y con estandarización de los sistemas de detección para alcanzar conclusiones definitivas.

La detección de co-amplificaciones podría conducir al empleo de terapias combinadas frente a diferentes dianas moleculares, que aumenten la eficacia y rentabilidad de dichos tratamientos. En cáncer de mama la sobreexpresión de *EGFR* y *MET* se ha identificado como biomarcador de resistencia a Trastuzumab (527, 528). El valor pronóstico y predictivo de *EGFR* ha sido demostrado en el estudio FLEX en cáncer de pulmón no

microcítico (266), en el que un nivel alto de expresión de EGFR es un biomarcador que puede predecir el beneficio en supervivencia de añadir Cetuximab a la quimioterapia. En cáncer colorrectal, la amplificación de *EGFR* no ha sido identificada como un biomarcador adecuado con carácter predictivo de beneficio a terapias anti-EGFR (529). En cáncer gástrico algunos estudios sugieren que la expresión de EGFR, el número de copias de *EGFR* y la expresión de ligandos de EGFR como epirregulina y amfiregulina, así como un descenso en los componentes de la vía de EGFR podrían ser biomarcadores candidatos para la eficacia de los anticuerpos dirigidos frente a EGFR (264, 265).

La mayoría de ensayos clínicos con fármacos dirigidos frente a dianas moleculares han excluido a los pacientes con CG HER2 positivo al existir un tratamiento dirigido frente a este subtipo. Este abordaje ha impedido el desarrollo de posibles alternativas terapéuticas a estos pacientes que desgraciadamente en la mayoría de los casos desarrollan resistencia al tratamiento con Trastuzumab, y podrían beneficiarse de otras terapias dirigidas en la progresión o de forma primaria, aumentando la eficacia terapéutica. Los resultados negativos de los estudios con pequeñas moléculas como Erlotinib y Gefitinib, así como con anticuerpos anti-EGFR como Panitumumab o Cetuximab, se han obtenido sobre población no seleccionada; por lo que consideramos que son necesarios ensayos clínicos realizados en población seleccionada según biomarcadores potencialmente útiles (como la amplificación de *EGFR*), incluyendo dentro de la muestra también a los pacientes con amplificación de *HER2* (267-269).

2.2.4. OTRAS AMPLIFICACIONES Y DELECCIONES

- **AMPLIFICACIÓN DE *CDHI*.** A diferencia de lo que cabría esperar, en nuestro análisis encontramos mayor número de amplificaciones de *CDHI* que de delecciones (16.1% vs. 2.4%). Entre los 7 pacientes con amplificación de *CDHI*, 5 de ellos (71.4%) la histología es intestinal, 1 de ellos es indeterminada y en otro caso no disponemos del dato. Es conocida la asociación entre las alteraciones de E-cadherina debido a mutación, delección o hipermetilación en el gen *CDHI* y el cáncer gástrico, de histología difusa predominantemente, aunque también en el subtipo intestinal, y tanto CG hereditario como esporádico (170, 171, 530). Corso *et al.* (170) encuentran una prevalencia de alteraciones en *CDHI* del 27.5% en adenocarcinoma intestinal y del 38.4% en el difuso. Sin embargo, en nuestra

muestra encontramos una prevalencia de deleciones del 2.4%, sin hallar mutaciones, no habiendo estudiado la hipermetilación como mecanismo silenciador. Por el contrario, hallamos un porcentaje alto de amplificaciones en *CDHI*, en el 16.1% de los pacientes. La vía de señalización inducida por EGF ha sido descrita como un regulador negativo de la expresión de E-cadherina (531). Ello se traduce en que un aumento de la expresión de receptores ERBB produce un descenso de la expresión de E-cadherina favoreciendo la capacidad de invasividad tumoral (531, 532). La amplificación de *CDHI* podría explicarse como un mecanismo genético compensador de la sobreexpresión de ERBB. De esta forma, la sobreexpresión y/o amplificación de *CDHI* podría estar implicada como mecanismo de resistencia al bloqueo de EGFR o HER2 en CG.

- **AMPLIFICACIÓN DE AKT.** La amplificación de *Akt* es otro de los mecanismos de activación de la vía PI3K/Akt/mTOR en cáncer gástrico. Akt es una proteína serina/treonina con actividad quinasa, responsable de gran parte de las acciones intracelulares de la vía. Su forma activada se produce tras la fosforilación de los residuos serina y treonina. La mayoría de los estudios determinan la activación de Akt por la detección inmunohistoquímica de Akt fosforilada (p-Akt). Éstos describen una prevalencia del 40-82% de sobreexpresión de Akt (533). En nuestro análisis mediante NGS la prevalencia de amplificación de *Akt* es del 14.3%. En el estudio de Kuboki *et al.* se describen 4 amplificaciones de *Akt* en el análisis de CNV de las 121 muestras (3.3%) (511). No es posible comparar las frecuencias encontradas, dados los diferentes métodos de determinación empleados.
- **AMPLIFICACIÓN DE EZH2.** Es un gen implicado en la remodelación de la cromatina mediante la metilación del ADN (534). Actúa como regulador de la proliferación celular, la migración, invasión y diferenciación de las células *stem* y de la tumorigénesis. La proteína EZH2 se encuentra sobreexpresada en múltiples tumores, entre ellos el CG, en el que se ha asociado a un peor pronóstico (535). Matsukawa *et al.* detectan sobreexpresión de EZH2 en el 56.6% de las muestras de CG analizadas mediante inmunohistoquímica. En nuestro estudio detectamos la amplificación de *EZH2* mediante NGS en el 11.9% de las muestras. EZH2 podría convertirse en una nueva diana terapéutica en cáncer gástrico, que aún se

encuentra en fases tempranas de desarrollo en diversas neoplasias sólidas y hematológicas.

- **AMPLIFICACIÓN DE *KRAS*.** Tal como hemos comentado en apartados anteriores, la prevalencia de amplificaciones en *KRAS* en nuestra muestra (9.5%) es mayor que la prevalencia de mutaciones en este gen (2.4%). La prevalencia de amplificaciones de *KRAS* es concordante con la descrita en la literatura (2-9%) (109, 504, 511). Es de destacar que al igual que en nuestro análisis, otros estudios muestran la predominancia de la amplificación de *KRAS* sobre la presencia de mutaciones en pacientes con CG (122, 511). Algunos estudios refieren una falta de eficacia de las terapias anti-EGFR en cáncer de colon en pacientes con amplificaciones de *KRAS* (536), por lo que este aspecto también debería explorarse en cáncer gástrico. Con los datos disponibles, es plausible que a diferencia del cáncer colorrectal, la amplificación de *KRAS* represente el mecanismo predominante de sobreactivación de la vía RAS en cáncer gástrico. El estudio de Deng *et al.* (109) determina que el subgrupo de pacientes con CG con amplificación de *KRAS* presenta peor pronóstico que aquellos que no muestran amplificaciones de genes codificantes de receptores tirosina quinasa o *KRAS*, con un riesgo de muerte 2 veces mayor (HR 2.12, p=0.002). Además determinan en líneas celulares que la inhibición de *KRAS* produce una reducción del tamaño tumoral en las líneas celulares con mutación o amplificación de *KRAS* y no en las líneas celulares *wild-type*. Tras los resultados negativos de los estudios con terapias anti-EGFR en CG metastásico en población no seleccionada (268, 269, 420), se hace necesaria la adecuada selección de los pacientes por la presencia de alteraciones moleculares concretas para determinar la eficacia de estos tratamientos dirigidos.
- **AMPLIFICACIÓN DE *HNFI*A.** Hemos encontrado amplificación de *HNFI*A (*Hepatocyte nuclear factor 1 alpha*) con una baja prevalencia (7.1% de las muestras). *HNFI*A es un factor de transcripción que puede estar implicado en la carcinogénesis de diversos tumores, y que en la actualidad está siendo estudiado en cáncer de páncreas y esofagogástrico, entre otros (537-539). Su papel está aún por determinar.

- **AMPLIFICACIÓN DE *NOTCH*.** En nuestra muestra hemos encontrado un 4.8% de pacientes con aumento del número de copias de este gen (2 pacientes) y un 4.8% de muestras con delección. Tal como comentamos en el apartado de perfil mutacional, queda por aclarar el papel de *NOTCH* en la carcinogénesis gástrica, no obstante, los datos iniciales de los que disponemos parecen apuntar a su papel como oncogén y la posible implicación de su amplificación en la resistencia a Trastuzumab (521, 522). De esta forma se señala la inhibición de NOTCH como potencial nueva diana terapéutica en cáncer gástrico
- **AMPLIFICACIÓN DE *MET*.** La prevalencia de amplificaciones de *MET* halladas en nuestro estudio (4.8%) se asemejan a las encontradas en la literatura: 2-7% (120, 504, 511). La amplificación de *MET* se asociado a peor pronóstico en CG (209). Su valor pronóstico en nuestra muestra lo analizaremos en conjunto con otros receptores tirosina quinasa, dado el escaso tamaño de nuestra muestra.
- **DELECCIONES DE *CDKN2A* Y *SMAD4*.** Tal como comentamos en el apartado de perfil mutacional, ambos son genes supresores tumorales, cuya pérdida de expresión se ha relacionado con la patogénesis del cáncer gástrico. Hemos encontrado delección en el número de copias de *CDKN2A* en el 14.3% de las muestras (6 pacientes) y en el 7.1% en el caso de *SMAD4*. En el estudio del TCGA se describe la presencia de delecciones focales en ambos genes, sin que se especifique su frecuencia relativa (122).

A pesar de su prevalencia no comentamos algunas de las delecciones halladas, tales como la delección de *Akt* o la delección de *FGFR*, por considerar que carecen de significado patogénico según los conocimientos científicos de los que disponemos en la actualidad. Su alta prevalencia pudiera tener que ver con mecanismos de homeostasis celular ante la alteración de otras vías moleculares.

2.3. PÉRDIDA DE EXPRESIÓN DE PTEN

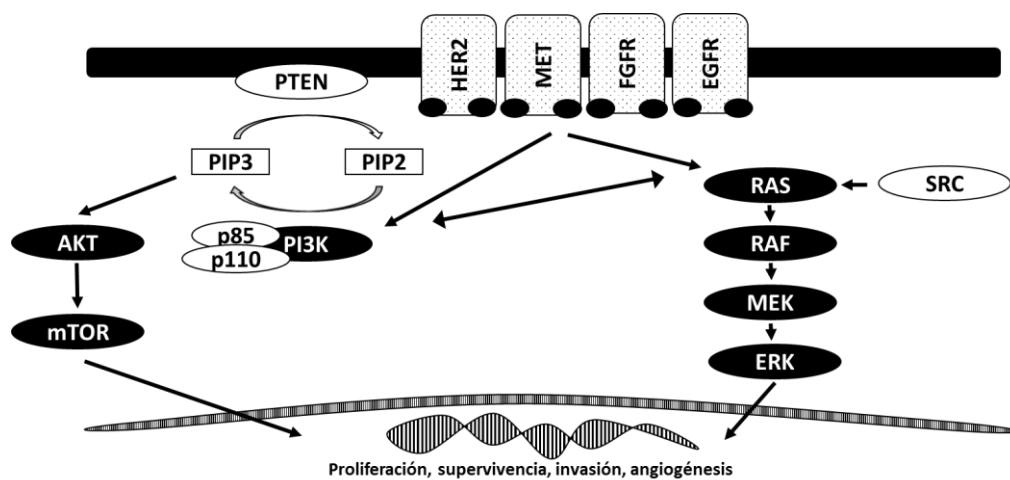
Diversos estudios sugieren una alta prevalencia de alteraciones en PTEN en CG, describiendo pérdidas de expresión de PTEN determinada por IHQ del 18-77%, rango en el que se encuentra la prevalencia del 33.3% encontrada en nuestra muestra **(540)**. Estudios más recientes empleando FISH, secuenciación directa o NGS detectan una tasa de mutaciones y/o alteraciones en número de copias en torno al 2-10% **(122, 504, 541)**. En nuestra muestra no hemos encontrado mutaciones o cambios en el número de copias de PTEN.

En los estudios con inmunohistoquímica, a pesar de la variabilidad de anticuerpos empleados, criterios de clasificación y variabilidad en la prevalencia encontrada, son varios de ellos los que han relacionado la pérdida de expresión de PTEN con un fenotipo desfavorable de CG, asociándose a la profundidad de la invasión, el grado de diferenciación, la presencia de metástasis ganglionares y el estadio clínico-patológico **(216)**, así como a la resistencia a la terapia con Trastuzumab **(303)**. Este carácter pronóstico y predictivo de PTEN no queda tan claramente establecido cuando se ha analizado según las mutaciones o cambio en el número de copias, como lo está con la expresión proteica. Se postula que las modificaciones post-transcripcionales que sufre PTEN pueden tener un fuerte impacto en los niveles de expresión proteica celulares, de mayor importancia que el número de copias génicas, por lo que la inmunohistoquímica sería la mejor forma de determinarlo. En la literatura se han descrito distintos mecanismos de regulación post-transcripcional de PTEN, tales como la regulación negativa que NEDD4-1 (neural precursor cell expressed developmentally down-regulated-4-1) ejerce sobre PTEN a través de poliubiquitinación **(542)** o el efecto supresor de la vía NF- κ B **(543)**.

2.4. VÍA PI3K/Akt/mTOR

La cascada PI3K/Akt/mTOR es una de las vías principales de señalización intracelular asociadas a la activación de HER2 y otros receptores tirosina quinasa (544). PTEN actúa como regulador negativo de la vía inhibiendo la activación de PI3K mediante la defosforilación de PIP3 a PIP2 (545) (Figura 22).

Figura 22. Principales vías de señalización intracelular de receptores tirosina quinasa.



Nuestro trabajo determina que el 52.38% de los pacientes con CG HER2 positivo presentan activación de esta vía, lo que pone de manifiesto la alta prevalencia de la alteración de la vía de PI3K/Akt/mTOR en CG HER2 positivo y su potencial papel predominante en la resistencia a Trastuzumab u otros inhibidores de HER2 en esta patología. La alteración más frecuentemente detectada es la pérdida de expresión de PTEN con una prevalencia del 33.3%. El 23.8% presenta amplificación de *PIK3CA* y el 11.9% mutación de *PIK3CA*. No hemos encontrado mutaciones o deleciones de PTEN.

En nuestra muestra la mayoría de los pacientes (72.7%) presentan una única alteración en la vía PI3K/Akt/mTOR, definida como la mutación y/o amplificación de *PIK3CA* y/o pérdida de expresión de PTEN. Se dan dos alteraciones en la vía en 6 de los 22 casos con activación de la vía, lo que representa el 27.3%: 3 casos pérdida de expresión de PTEN y amplificación de *PIK3CA*, 1 caso pérdida de expresión de PTEN y mutación de *PIK3CA*, 2 casos amplificación y mutación de *PIK3CA*. En concordancia con nuestros resultados,

el metaanálisis de 2014 muestra que la mayoría de las alteraciones de la vía PI3K/Akt/mTOR son mutuamente excluyentes, existiendo alteración en un único punto de la vía en el 52% de los casos del total de pacientes (513). La co-ocurrencia se da más frecuentemente entre la pérdida de expresión de PTEN y la amplificación de *PIK3CA*, en el 20% de los casos. Sin embargo, en nuestro estudio hemos observado que todos los pacientes con mutación y/o amplificación de *Akt*, a excepción de un caso, presentan mutación y/o amplificación de *PIK3CA*, por lo que podemos considerar que son alteraciones que con frecuencia ocurren conjuntamente. La fosforilación de Akt es un paso secundario en la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR, existiendo mecanismos Akt-dependientes y Akt-independientes de activación, regulados primariamente por PI3K y PTEN (546).

La prevalencia de las alteraciones descritas varía ampliamente entre unos estudios y otros, procediendo la mayor parte de los datos de estudios realizados en poblaciones no seleccionadas de cáncer gástrico. Según el metaanálisis publicado en 2014, que incluye estudios de cáncer gástrico tanto en población asiática como caucásica, hasta el 86% de los pacientes presentan alteraciones en la vía PI3K/Akt/mTOR (513). Al igual que en nuestro estudio, la alteración más frecuentemente detectada la pérdida de expresión de PTEN, con una prevalencia entre el 30 y 81% según los estudios (513). La siguiente alteración más frecuente es la detección inmunohistoquímica de pAkt con una frecuencia del 18-86%. La frecuencia de mutación o amplificación de *PIK3CA* es del 12-23%, siendo las amplificaciones doblemente frecuentes (513), en concordancia con los datos en nuestra muestra y tal como ocurren en otras patologías como el cáncer de ovario o endometrio (547, 548). Hemos de tener en cuenta las diferencias en las características de nuestra muestra con la población incluida en este metaanálisis. En primer lugar, nuestra muestra sólo consta de población caucásica, en la que se describe una frecuencia mayor de mutaciones en *PIK3CA* respecto a la población asiática (15% vs. 7%), así como de pérdida de expresión de PTEN (78% vs. 47%), siendo menos frecuente la delección de PTEN (4% vs. 21%) (513). En segundo lugar, no determinamos mediante inmunohistoquímica la sobreexpresión de pAkt ni de PI3K. Esto puede condicionar diferencias en las frecuencias observadas en la activación de la vía, dado que el metaanálisis incluye cualquier tipo de alteración independientemente del método empleado o de la definición de “activación de la vía” establecida, lo que difiere según los estudios. Y en tercer lugar, nos centramos en CG HER2 positivo, lo que puede

condicionar un perfil genómico diferente, tal como ocurren en los diferentes subtipos de cáncer de mama.

Los datos publicados en cáncer de mama HER2 positivo, indican que el 20-25% de los casos presentan pérdida de expresión de PTEN, el 25-30% muestran mutaciones de *PIK3CA*, el 10% amplificaciones de *PI3KCA* y el 1.4-8% mutaciones en *Akt* (549, 550). Son escasos los datos publicados en cáncer gástrico HER2 positivo. El artículo publicado por Kim J *et al.* (551), en el que se agrupan los resultados del TCGA (122) y otros estudios (109, 552), incluye 742 muestras, de las cuales 62 pertenecen a tumores con amplificación de *HER2*. De éstas se seleccionan 42 muestras en las que es posible la secuenciación completa del exoma, hallando una frecuencia de activación de la vía PI3K/Akt/mTOR del 11.9%. Las limitaciones de este estudio son principalmente dos: 1- La definición del estado de *HER2*, puesto que se basa en el análisis del número de copias, en desacuerdo con lo establecido a nivel del diagnóstico clínico y el uso de Trastuzumab, que se basa en la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* (195). 2- La ausencia de determinación de la pérdida de expresión de PTEN mediante inmunohistoquímica, alteración más frecuente en la activación de la vía. Esto hace difícilmente comparables sus resultados con los obtenidos en nuestra muestra, así como los esperables en la población global con cáncer gástrico HER2 positivo. En el estudio de Lee JY *et al.*, que incluye 50 pacientes con cáncer gástrico HER2 positivo, se describe pérdida de expresión de PTEN en el 20% de los casos, amplificación de *PIK3CA* en el 8% y la mutación de *PIK3CA* en el 2%, frecuencias inferiores a las encontradas en nuestro estudio (302). En el estudio de Zhang X *et al.* se analiza la expresión de PTEN mediante inmunohistoquímica y el estado mutacional de *PIK3CA* mediante pirosecuenciación en 48 muestras de CG HER2 positivo, encontrando un 47.9% de pérdida de expresión de PTEN y ninguna mutación en *PIK3CA* (303).

En base a lo anterior podemos concluir que las alteraciones en la vía PI3K/Akt/mTOR son comunes en cáncer gástrico HER2 positivo, presentándose en aproximadamente el 50% de los casos, y representan una potencial diana terapéutica en estos pacientes. La pérdida de expresión de PTEN es el principal mecanismo de activación de la vía en este subtipo de pacientes, no existiendo correlación entre la presencia de mutaciones o cambios en el número de copias génicas de *PTEN* y la expresión proteica, tal como ocurre en cáncer de mama. Esto se explica por la existencia de mecanismos de regulación post-transcripcionales, que condicionan que las técnicas de IHQ sean el método más robusto

en la determinación del estado funcional de PTEN, confirmando la necesidad de combinar tecnologías de última generación como las plataformas de secuenciación masiva con técnicas clásicas como la IHQ para una mejor caracterización de los tumores. En cáncer gástrico parece existir una menor prevalencia de mutaciones en *PIK3CA* y una mayor prevalencia de amplificaciones de *PIK3CA* respecto a los datos disponibles en cáncer de mama. Las discrepancias encontradas entre los diferentes estudios en cáncer gástrico se explican por el escaso tamaño muestral, las diferentes tecnologías empleadas en cada uno de ellos y las distintas poblaciones analizadas. De esta forma, es necesario el desarrollo de estudios de mayor tamaño muestral y la estandarización de procedimientos para determinar la verdadera prevalencia de cada alteración y su verdadero papel patogénico.

2.5. AMPLIFICACIÓN DE GENES CODIFICANTES DE RECEPTORES TIROSINA QUINASA

La amplificación de genes que codifican receptores de membrana celular con actividad tirosina quinasa es una de las alteraciones más frecuentemente detectadas en cáncer gástrico. Sin embargo, no existen series amplias de CG HER2 positivo que determinen la prevalencia de las amplificaciones de RTK en este subgrupo de pacientes. En nuestra serie el 38.1% de los pacientes presentan amplificación de genes codificantes de RTK, con prevalencias de 21.4% para *EGFR*, 31% para *FGFR* y 4.8% para *MET*, existiendo casos en los que existe amplificación de varios de los receptores, no siendo, por tanto, alteraciones mutuamente excluyentes. En base a los resultados previos publicados, nuestros hallazgos ponen de manifiesto una mayor prevalencia de las amplificaciones de los genes que codifican RTK en CG HER2 positivo. En el estudio de Deng *et al.* el 37% de las muestras de CG muestran amplificación de *RAS* o genes codificantes de RTK, siendo la amplificación más frecuente la de *FGFR2* con el 9.3%, seguido de *KRAS* (8.8%) y *EGFR* (7.7%) (109). Este estudio incluye una cohorte de CG con amplificación de *HER2*, que representa el 7.2% del total de pacientes, sin embargo, no se presentan los datos de CG HER2 positivo de forma aislada. En el estudio del TCGA no se muestran de forma conjunta las amplificaciones en genes codificantes en RTK, y las frecuencias de amplificación de *EGFR* y *FGFR2* reportadas, del 11% y 9% respectivamente, son menores a las halladas en nuestro estudio (122).

Dada la alta prevalencia de la co-amplificación de genes codificantes de RTK asociada a la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2*, es necesario investigar su papel predictivo y/o pronóstico, así como su posible implicación en la resistencia a la terapia anti-*HER2*, en una serie amplia de pacientes con CG *HER2* positivo tratada con Trastuzumab. El uso de diferentes agentes frente a RTK en combinación según la presencia de co-amplificación de otros RTK diferentes a *HER2* podría mejorar los resultados en el tratamiento del CG *HER2* positivo.

3. RELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y MOLECULARES

El análisis de la relación entre las alteraciones moleculares y las características clínicas y patológicas en nuestra serie de pacientes ha sido negativo. No hemos hallado ninguna relación estadísticamente significativa entre la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR y las características clínicas (edad, sexo, ECOG, localización del tumor primario, metástasis hepáticas, carcinomatosis peritoneal) ni patológicas (clasificación histológica de Laurén, grado de diferenciación). Tampoco hemos evidenciado ninguna relación significativa con la amplificación de RTK.

En los últimos años se han publicado diversos estudios con intento de realizar una clasificación molecular del cáncer gástrico (109, 122, 504). El estudio de mayor relevancia es el realizado por el TCGA, publicado en 2014 (122). Dentro de los subtipos del TCGA se han identificado algunas alteraciones genómicas más características, aunque no exclusivas, de cada uno de ellos. Además se han relacionado algunas características clínico-patológicas con algunos de los subtipos tumorales:

- Los tumores asociados al virus de Epstein-Barr se presentaron con más frecuencia en el fundus o el cuerpo gástricos y fueron más frecuentes en varones. Presentaban con más frecuencia mutaciones *PI3KCA*, amplificaciones de *JAK2* y *ERBB2*, alteraciones en vías de señalización inmune como la sobreexpresión de PD-L1/2, y silenciamiento de *CDKN2A*.
- Los tumores con inestabilidad de microsatélites (MSI) se presentaron con más frecuencia a edades más avanzadas y en el sexo femenino. Se caracterizaron por una alta tasa de mutaciones en proteínas potenciales dianas terapéuticas, especialmente *PI3KCA*, *ERBB3*, *ERBB2* y *EGFR*, destacando la ausencia de la mutación V600E en *BRAF*, frecuentemente observada en cáncer colorrectal con MSI.
- Los tumores genómicamente estables (GS) se diagnosticaron a edades más tempranas y con más frecuencia presentaron histología de carcinoma gástrico difuso, mostando alteraciones en *RHOA* y *CDLN18*.

- Los tumores con inestabilidad cromosómica (CIN) se localizaron con más frecuencia en la unión gastroesofágica o el cardias, y en ellos se identificó con más frecuencia la amplificación de receptores tirosina quinasa.

En nuestro estudio, el escaso tamaño muestral y la baja frecuencia de cada una de las alteraciones por separado puede condicionar una baja potencia estadística para detectar diferencias estadísticamente significativas. Clásicamente los tumores han sido clasificados según la localización del tumor primario y el subtipo histológico. Sin embargo, actualmente conocemos que los tumores agrupados según el órgano de origen e la histología, son en realidad diversas entidades que difieren enormemente en sus características moleculares, evolución clínica y sensibilidad al tratamiento. De esta forma, dada la gran heterogeneidad tumoral del cáncer gástrico, consideramos que debemos continuar profundizando en el conocimiento de su perfil molecular, y no insistir en relacionar las características clásicas histológicas y topográficas con las alteraciones moleculares.

La aplicación de las tecnologías de secuenciación masiva en cáncer en proyectos como TCGA, ha permitido ampliar el conocimiento acerca de las bases genómicas de los diferentes tipos tumorales. Ésto unido al desarrollo de agentes dirigidos contra dianas moleculares, ha conducido al desarrollo de la medicina de precisión y el tratamiento personalizado del cáncer en base a su perfil genómico. A día de hoy se encuentra establecido que la mayoría de las alteraciones moleculares deletéreas son compartidas por varios subtipos tumorales, lo que ha está conduciendo a un intento de clasificación del cáncer tejido-independiente, basada en las alteraciones genéticas y epigenéticas del tumor (553). Existen varios ejemplos de terapias dirigidas frente a una diana molecular eficaces en diferentes tipos tumorales que albergan la misma alteración molecular. Uno de ellos es el tratamiento con Trastuzumab en cáncer de mama y cáncer gástrico con sobreexpresión y/o amplificación de *HER2*. En general las alteraciones moleculares en cada tipo tumoral ocurren en una pequeña proporción de pacientes, motivo por el que está cambiando el diseño de los ensayos clínicos con fármacos dirigidos contra dianas moleculares (554). Las tecnologías de secuenciación masiva permiten la identificación de múltiples alteraciones moleculares potencialmente tratables en un único prodecimiento con un coste razonable y en un tiempo compatible con la práctica clínica. La tendencia actual en el diseño de ensayos clínicos es evaluar en el mismo protocolo diversos

fármacos, asignando a los pacientes a un agente específico según la alteración molecular hallada en el tumor, o incluir en un mismo estudio diferentes patologías tumorales que comparten una misma alteración genética y exponer a los pacientes al mismo agente terapéutico independientemente de la histología. Son los denominados ensayos clínicos “*umbrella trial*” y “*basket trial*” (555-557). Esto refleja la tendencia cada vez más establecida de clasificar los tumores según su perfil molecular, independientemente de su localización o subtipo histológico.

4. ALTERACIONES MOLECULARES COMO FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS EN CÁNCER GÁSTRICO HER2 POSITIVO

Desde los resultados del estudio ToGA, que mostró un beneficio en supervivencia libre de progresión y supervivencia global, la adición de Trastuzumab a quimioterapia basada en doblete de platino y fluoropirimidina se ha convertido en el estándar de tratamiento en cáncer gástrico o de la unión gastroesofágica avanzado HER2 positivo (104). Sin embargo, estudios posteriores con otros fármacos frente a HER2 como Lapatinib, han sido negativos (276, 558). Globalmente la eficacia de las terapias anti-HER2 en cáncer gástrico ha resultado más limitada e insatisfactoria de lo inicialmente esperado, dado que la mayoría de los pacientes con cáncer gástrico desarrollan resistencia adquirida al tratamiento. Según los resultados del estudio ToGA, el 12% de los pacientes presentan resistencia primaria a Trastuzumab, y la mayoría de ellos desarrollan resistencia adquirida después de un periodo de tiempo relativamente corto, con una supervivencia libre de progresión de 6.7 meses (104). La identificación de los mecanismos moleculares que subyacen la resistencia al tratamiento puede aumentar el beneficio derivado del empleo de terapias anti-HER2 los pacientes con cáncer gástrico HER2 positivo.

Diversos estudios han investigado la resistencia a Trastuzumab en cáncer de mama, implicando alteraciones en los receptores tirosina quinasa, en las vías de señalización intracelulares asociadas éstos y en la activación de vías alternativas para compensar la inhibición de HER2 (284, 285). En cáncer gástrico los datos proceden en su mayoría de estudios preclínicos, estando por establecer cuáles son las alteraciones concurrentes a la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* que pueden condicionar el beneficio a la terapia con Trastuzumab u otros inhibidores de HER2 (300, 559). En los últimos años son varios los estudios publicados acerca de la clasificación molecular del cáncer gástrico, tal como hemos revisado en la introducción de este proyecto de tesis doctoral (109, 120, 122, 511). Sin embargo, no existen series amplias de adenocarcinoma gástrico HER2 positivo tratadas con Trastuzumab en las que se caracterice el perfil molecular de este subgrupo de tumores, que representa entre el 7 y el 34% de los pacientes con cáncer gástrico (187, 188).

Este proyecto de tesis doctoral es el primer trabajo realizado específicamente en pacientes con cáncer gástrico avanzado HER2 positivo tratados con Trastuzumab que identifica alteraciones moleculares concomitantes a la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* como factores pronósticos y predictivos de beneficio a la terapia con Trastuzumab.

4.1. VÍA PI3K/AKT/MTOR COMO FACTOR PRONÓSTICO Y PREDICTIVO EN CÁNCER GÁSTRICO HER2 POSITIVO

En cáncer de mama diversos estudios preclínicos en cáncer de mama han identificado la hiperactivación de la vía PI3K/Akt/mTOR como marcador de resistencia a Trastuzumab en modelos celulares (297). Los estudios clínicos han mostrado resultados discordantes respecto al valor predictivo y pronóstico de la activación de PI3K/Akt/mTOR en cáncer de mama HER2 positivo (299, 560). Mientras que el estudio de Esteva *et al.* muestra que la activación de la vía PI3K, definida como pérdida de expresión de PTEN y/o mutación de *PIK3CA*, se asocia a peor respuesta a Trastuzumab y a menor supervivencia (561), otros estudios han resultado negativos (289). Un metaanálisis publicado en 2013 agrupando los resultados de diversos estudios realizados entre los años 1996 y 2012, con un total de 1889 casos, analiza el papel predictivo de la activación de PI3K en cáncer de mama HER2 positivo tratado con Trastuzumab (295). Los resultados varían según el contexto de la enfermedad al que nos referimos. No encuentra diferencias estadísticamente significativas según el estado de activación de PI3K ni en tasa de respuesta patológica completa, como marcador surrogado de beneficio a Trastuzumab en el contexto neoadyuvante, ni en supervivencia libre de enfermedad en el contexto adyuvante. Ello puede ser debido, al menos en parte, a la existencia de una importante heterogeneidad entre los diferentes estudios respecto a los métodos de evaluación empleados para valorar la relación entre los biomarcadores y los beneficios al tratamiento. De acuerdo con lo anterior, es preciso el empleo de criterios uniformes en los diferentes estudios para extraer conclusiones firmes. En el ámbito de la enfermedad metastásica este metaanálisis establece que la pérdida de expresión de PTEN es un marcador de menor sensibilidad a la terapia con Trastuzumab, y señala que no es posible extraer conclusiones acerca del valor de las mutaciones en *PIK3CA* por considerar que los datos son insuficientes (295). Posteriormente el análisis de biomarcadores de diversos ensayos clínicos con inhibidores de HER2 han identificado la activación de PI3K como marcador

pronóstico desfavorable en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo con resultados consistentes (298, 562), y ello ha justificado el desarrollo de diversos ensayos clínicos con inhibidores de la vía PI3K/Akt/mTOR en cáncer de mama refractario a Trastuzumab (563, 564).

En cáncer gástrico, los datos sobre los mecanismos de resistencia a Trastuzumab se encuentran menos establecidos que en cáncer de mama. Como hemos descrito en este trabajo, la vía PI3K/Akt/mTOR se encuentra activada en más del 50% de casos de cáncer gástrico HER2 positivo, lo cual establece la importancia patogénica de la misma y la convierte en un potencial mecanismo de resistencia. Estudios preclínicos sugieren la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR como factor determinante de la sensibilidad a Trastuzumab en cáncer gástrico, tal como ocurre en cáncer de mama (300, 551, 559, 565, 566). Sin embargo, hasta la fecha, no existen datos procedentes de series amplias de pacientes con cáncer gástrico avanzado HER2 positivo tratadas con Trastuzumab que establezcan el papel predictivo de la activación de la vía de PI3K/Akt/mTOR a nivel clínico.

Según nuestro conocimiento, este proyecto de tesis doctoral es el primer trabajo que identifica la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR como marcador de beneficio del tratamiento con Trastuzumab en una serie de pacientes con adenocarcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica HER2 positivo. La activación de la vía PI3K/Akt/mTOR la hemos definido según los criterios empleados en estudios preclínicos y clínicos previamente publicados, estableciendo que se encuentra hiperactivada cuando existe amplificación y/o mutación de *PIK3CA* y/o pérdida de expresión de PTEN. Nuestro trabajo establece que los pacientes con activación de la vía PI3K/Akt/mTOR presentan menor supervivencia global que aquellos sin activación, multiplicándose el riesgo de muerte en 2.35 veces en el análisis univariante. Estos resultados se confirman en el análisis multivariante, en el que el riesgo de muerte se multiplica por 3.28 veces para los pacientes con activación de PI3K/AKT/mTOR, de forma estadísticamente significativa. De la misma manera, encontramos una relación estadísticamente significativa para la supervivencia libre de progresión, mostrando que los pacientes con activación de la vía PI3K/Akt/mTOR muestran un riesgo de progresión a la terapia con Trastuzumab 2.22 y 2.02 veces mayor, en los análisis univariante y multivariante respectivamente. Estos hallazgos señalan la importancia de la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR como

marcador predictor de la evolución de los pacientes con adenocarcinoma gástrico HER2 positivo tratados con Trastuzumab.

Se considera factor pronóstico en oncología a aquella variable que influye en la evolución de la enfermedad neoplásica, determinando la historia natural de la misma en ausencia de cualquier tratamiento, y factor predictivo a aquella variable que ayuda a predeterminar la posibilidad de obtener una respuesta a un tratamiento determinado. En muchos casos un mismo factor predictivo tiene también valor pronóstico en la enfermedad al correlacionar su presencia o ausencia con la respuesta terapéutica. Los hallazgos de nuestro trabajo demuestran el papel de la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR como factor predictivo negativo de beneficio a la terapia con Trastuzumab en pacientes con adenocarcinoma gástrico avanzado HER2 positivo, determinado por una menor supervivencia libre de progresión. Y además, establecen que la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR actúa como factor pronóstico adverso, evidenciando menor supervivencia global en los pacientes con mutación y/o amplificación de *PIK3CA* y/o pérdida de expresión de PTEN.

En la misma línea que nuestro trabajo se encuentra el estudio publicado por Zang *et al.* (490) en el que se relaciona la pérdida de expresión de PTEN con una menor supervivencia libre de progresión y duración de la respuesta al tratamiento con Trastuzumab o Lapatinib en una serie de 48 pacientes con adenocarcinoma gástrico. Este estudio muestra una tendencia a menor supervivencia global de los pacientes con pérdida de expresión de PTEN, pero no alcanza la significación estadística. En este trabajo no se encuentran mutaciones en el análisis mediante pirosecuenciación de los exones 9 y 20 de *PIK3CA*, y no se analiza la existencia o no de amplificación de *PIK3CA*, por lo que no permite evaluar el papel de la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR de forma global. En el estudio publicado por Lee JY *et al.*, de pequeño tamaño muestral, no se observó correlación entre la respuesta a Trastuzumab y la pérdida de expresión de PTEN o las mutaciones en *PIK3CA*. Estas últimas tan solo se detectaron en un 2% de los pacientes y los autores consideran que no se pueden establecer conclusiones. De igual forma, no se analiza el papel de las amplificaciones de *PIK3CA* (302, 490).

En base a nuestros resultados y los estudios previos sobre los mecanismos de resistencia a Trastuzumab, consideramos que la combinación de fármacos inhibidores de la vía PI3K/Akt/mTOR e inhibidores de HER2 podría mejorar la evolución de los pacientes con cáncer gástrico HER2 positivo, disminuyendo la resistencia primaria y adquirida al

tratamiento. Por ello, consideramos que se encuentra justificado el desarrollo de ensayos clínicos que confirmen esta hipótesis, e incorporen estudio de biomarcadores con carácter prospectivo. Esto permitiría seguir avanzando en la personalización de la terapia oncológica en base al perfil molecular en el cáncer gástrico.

4.2. AMPLIFICACIÓN DE GENES CODIFICANTES DE RECEPTORES TIROSINA QUINASA COMO FACTOR PRONÓSTICO Y PREDICTIVO EN CÁNCER GÁSTRICO HER2 POSITIVO

Es conocido que la activación de HER2 conduce a la activación de dos vías de señalización intracelular: la vía de PI3K/Akt/mTOR y la vía de proteínas quinasas activadas por mitógenos o MAPK conformada por la cascada RAS/RAF/MEK/ERK. De la misma forma que HER2, la activación de otros receptores tirosina quinasa como EGFR, FGFR, MET/HGF e IGF-1R produce la activación de ambas vías de señalización intracelular (544, 569, 570) (*Figura 21*). Uno de los posibles mecanismos de resistencia a inhibidores de HER2 es la sobreexpresión de RTK alternativos que restauren las vías de señalización intracelular (571). Algunos estudios *in vitro* sugieren que el aumento de la señalización a través de MET o IGF-1R se trata de uno de los mecanismos de resistencia a Trastuzumab y Lapatinib en cáncer de mama y en cáncer gástrico (291, 528, 572, 573). La sobreexpresión de otros receptores de la familia del EGFR que interaccionan con HER2, como HER3 y EGFR/HER1, también ha sido identificada como mecanismo de resistencia a Trastuzumab en estudios preclínicos, aunque los resultados en el ámbito clínico han sido dispares (284, 527, 565).

Los datos clínicos acerca de biomarcadores relacionados con RTK diferentes a HER2 en pacientes con CG HER2 positivo son escasos. Según nuestro conocimiento este proyecto de tesis doctoral parece ser el primer estudio que evalúa el valor pronóstico y predictivo de la co-amplificación de otros RTK asociada a la sobreexpresión y/o amplificación de HER2 en CG avanzado HER2 positivo.

Disponemos de algunos datos en cáncer gástrico no seleccionado por criterios moleculares. Los resultados de un metaanálisis publicado en 2014 establece el valor

pronóstico desfavorable de la sobreexpresión y/o amplificación de *MET* (209). De igual forma, existen datos que apoyan el carácter pronóstico de la amplificación de *FGFR2* como predictor de peor supervivencia en pacientes con CG (204). Sin embargo, respecto al papel pronóstico de la amplificación y/o sobreexpresión de *EGFR* en CG los resultados son discordantes (181-186). Desde nuestro punto de vista, esta disparidad de resultados podría ser debida en gran medida a la falta de homogeneidad en la metodología empleada, la ausencia de correlación entre los niveles de expresión proteica y el número de copias génicas de *EGFR*, así como la heterogeneidad intratumoral que caracteriza al cáncer gástrico. El estudio publicado por Deng *et al.* analiza el impacto global de la presencia de amplificaciones en genes codificantes de RTK sobre la supervivencia de los pacientes, estableciendo que los pacientes con amplificación en alguno de los genes que codifican los RTK (*FGFR2*, *HER2*, *EGFR* y/o *MET*), presentan peor supervivencia que aquellos sin amplificación (109). Estos resultados se confirman también en el análisis multivariante de forma independiente a otros factores pronósticos. Otro estudio que analiza la sobreexpresión proteica de los RTK también muestra los resultados desfavorables respecto al valor pronóstico de la expresión de *HER2*, *EGFR* y *MET* de forma conjunta en cáncer gástrico (526).

En lo concerniente a los posibles factores predictivos, a día de hoy el único marcador molecular predictivo de respuesta en pacientes con cáncer gástrico tratados con Trastuzumab es *HER2* (104). Algunos datos procedentes de ensayos clínicos fase I y II mostraron el carácter predictivo de respuesta de la expresión de *MET* en pacientes con cáncer gástrico avanzado tratados con Rilotumumab que sobreexpresan *MET* (313-315). Sin embargo, el estudio fase III RILOMET-1, que incluyó pacientes con CG avanzado con sobreexpresión de *MET*, y cuyos resultados se encuentran pendientes de publicar, finalizó precozmente por aumento del número de muertes en el brazo de Rilotumumab. Otros estudios con inhibidores de *MET* han resultado negativos (316, 317). Por lo tanto, hasta la fecha no se ha podido establecer de manera inequívoca el papel de *MET* como factor predictivo. Una de las limitaciones más importantes en el desarrollo de biomarcadores en cáncer gástrico es la heterogeneidad intratumoral, que dificulta el empleo de la inmunohistoquímica como marcador robusto y reproducible, tal como ha quedado demostrado con *HER2*. Además estudios preclínicos han evidenciado que la sobreexpresión proteica de *MET* se encuentra regulada tanto por factores dependientes de ligando (HGF) como por factores independientes de él. Por lo tanto, el análisis de la expresión génica o amplificación de *MET* podría permitir una selección más precisa de la

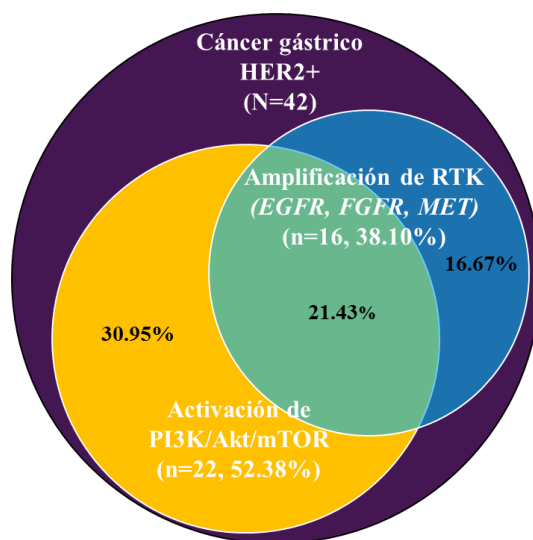
subpoblación de pacientes con cáncer gástrico MET positivo, siendo potencialmente un biomarcador más adecuado para la terapia anti-HGF/MET (567, 568). Los inhibidores tirosina quinasa, que actúan sobre la porción intracelular bloqueando la fosforilación y la cascada de señales intracelulares permiten inhibir ambas formas de regulación de MET, a diferencia de los anticuerpos monoclonales que bloquean sólo la señal dependiente de ligando (567). Son necesarios ensayos clínicos bien diseñados con fármacos anti-HGF/MET que incluyan estudio de biomarcadores para definir el papel predictor de la amplificación de *MET*. Respecto a la terapia anti-EGFR algunos estudios han sugerido el posible papel predictor de la expresión proteica o la amplificación génica de *EGFR*, así como de la expresión de ligandos como epirregulina o amfiregulina (264, 265). Sin embargo, los ensayos clínicos fase III desarrollados en CG avanzado que evalúan Cetuximab y Panitumumab asociado a quimioterapia, no han identificado un biomarcador predictivo de respuesta (211, 268, 269). Sus resultados se encuentran limitados por la ausencia de muestra para el estudio de biomarcadores en un alto porcentaje de pacientes y por la falta de homogeneidad entre los diferentes estudios. No existen resultados acerca de biomarcadores para las terapias anti-FGFR que actualmente se encuentran en desarrollo (164).

Los resultados del análisis de la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión en nuestra serie de pacientes con CG HER2 positivo tratados con Trastuzumab no muestra diferencias estadísticamente significativas según el estado de amplificación de los RTK. Sin embargo, cuando evaluamos el papel pronóstico y predictivo de la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR estratificando en 2 grupos según el estado de amplificación de los RTK observamos que en el grupo sin amplificación de RTK la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR mantiene su carácter pronóstico y predictivo, existiendo diferencias estadísticamente significativas en supervivencia global y supervivencia libre de progresión con Trastuzumab. Al contrario, en el grupo de pacientes con amplificación de RTK no encontramos diferencias estadísticamente significativas en supervivencia global ni en supervivencia libre de progresión según el estado de activación de la vía PI3K/Akt/mTOR. Estos datos hemos de tomarlos como datos exploratorios dado el escaso tamaño muestral, que puede influir en la escasa potencia estadística para detectar diferencias. No obstante, consideramos que la posible interacción entre la vía de PI3K/Akt/mTOR y la amplificación de RTK como posibles mecanismos de resistencia a Trastuzumab debe ser estudiada en una serie de mayor tamaño muestral para poder establecer conclusiones definitivas.

5. IMPLICACIONES PRÁCTICAS

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, según nuestros resultados el 69.05% de los pacientes con CG avanzado HER2 positivo podrían beneficiarse de terapias dirigidas frente a la vía PI3K/Akt/mTOR y/o receptores tirosina quinasa distintos a HER2 en monoterapia o en combinación con fármacos anti-HER2 (*Figura 23*).

Figura 23. Alteraciones moleculares potenciales dianas terapéuticas en CG HER2 positivo.



En la *Tabla 27* exponemos los fármacos en desarrollo clínico y preclínico dirigidos contra dianas moleculares en cáncer gástrico avanzado y la prevalencia detectada de las alteraciones moleculares en cáncer gástrico HER2 positivo en nuestro estudio (**164, 205, 423, 574, 575**).

Tabla 27. Biomarcadores y fármacos dirigidos contra dianas moleculares en CG avanzado.

Diana molecular	Prevalencia	Fármaco
PI3K/Akt/mTOR	52.38%	MK-2206 BYL719 Everolimus en combinación GSK2636771 AZD5363 GDC0068
EGFR	21.4%	Cetuximab Panitumumab Matuzumab Gefinitib Erlotinib
FGFR	31.4%	Dovitinib (TKI258) TAS-120 AZD4547
MET	4.8%	Rilotumumab (AMG102) Onartuzumab AMG337 LY2875358 Foretinib Crizotinib Cabozantinib Golvatinib
ERBB3	ND	Pertuzumab Trastuzumab-emtansina (T-DM1)
VEGF/VEGFR	ND	Bevacizumab Ramucirumab Sunitinib Sorafenib Pazopanib Vandetanib Telatinib
PD-1/PD-L1/PD-L2	ND	Pembrolizumab Nivolumab MPDL3280A MEDI 4736
JAK/STAT	ND	AZD1480 INCB018424 TG101348
PARP	ND	Olaparib Veliparib
Otras vías de señalización	ND	RO4929097 ¹ PF3084014 ¹ Sonidegib ² Buparlisib ² Vismodegib ² Verteprofina ³ AUY922 ⁴

1 Vía NOTCH. Inhibidor de gamma-secretasa. 2 Vía Hedgehog. 3 Vía Hippo. Inhibidor de YAP. 4 Inhibidor de HSP90. ND: no determinado. PARP: poli-ADP-ribosa polimerasa

6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Nuestro trabajo consiste en un estudio observacional o no experimental con una finalidad tanto descriptiva como analítica. Se trata de un estudio de series de casos longitudinales o de seguimiento de una cohorte formada por pacientes diagnosticados de cáncer gástrico avanzado HER2 positivo y que han sido tratados con Trastuzumab. La recogida de información se realiza de forma ambispectiva, dado que los efectos del tratamiento (progresión de la enfermedad y muerte) se recogen tanto de forma retrospectiva como prospectiva desde el momento de selección de la cohorte. Los factores de riesgo, consistentes en la presencia o ausencia de una determinada alteración molecular o variable clínica, se miden con carácter retrospectivo. De forma inherente al tipo de diseño el estudio tiene una serie de fortalezas y limitaciones.

Respecto a la selección de la población de estudio, la definición clara de los criterios de inclusión y exclusión empleados en la selección de la muestra, el carácter multicéntrico del estudio y la selección de pacientes tratados según la práctica clínica estándar, aumentan la validez interna y externa de los resultados. Sin embargo, la selección de una serie de pacientes candidatos a tratamiento oncológico puede suponer un sesgo de selección de una muestra con pronóstico más favorable al de la población general de cáncer gástrico. Además, no existe una cohorte no expuesta al tratamiento con Trastuzumab, lo cual limita las conclusiones sobre el carácter pronóstico de las alteraciones moleculares en ausencia de tratamiento. No obstante, no sería aceptable éticamente en el ámbito clínico el diseño de un ensayo clínico con una rama de placebo en primera línea de cáncer gástrico avanzado HER2 positivo.

Como principal factor limitante hemos de considerar el tamaño muestral pequeño. Un escaso tamaño de la muestra puede condicionar no encontrar diferencias estadísticamente significativas cuando sí existen diferencias clínicamente relevantes. De esta forma, dada la baja prevalencia de la mayoría de las alteraciones moleculares, un tamaño muestral pequeño dificulta su detección, así como encontrar posibles relaciones con los efectos del tratamiento. Sin embargo, hemos de destacar que el largo seguimiento medio de los pacientes y la ausencia de pérdidas de seguimiento como causa de censura de los datos, ha permitido el análisis de los datos incluyendo a todos los pacientes que conformaban la muestra al inicio del estudio.

Otro punto importante a tener en cuenta en la interpretación de los resultados es la heterogeneidad intra e intertumoral. La heterogeneidad tumoral interpersonal, determinada por factores del huésped que condicionan el microambiente tumoral, variaciones germinales o mutaciones somáticas que ocurren de manera exclusiva en cada paciente, explica que pacientes con el mismo subtipo tumoral no presenten la misma evolución clínica. Además, en los últimos años diferentes estudios han evidenciado la gran heterogeneidad intratumoral, evidenciando la existencia de diversas poblaciones celulares con características genéticas, epigenéticas y fenotípicas distintas dentro del mismo tumor (503). Mediante técnicas de secuenciación masiva diversos estudios han demostrado que los tumores están constituidos por alteraciones somáticas que ocurren en estadios precoces de la carcinogénesis, y por otras alteraciones somáticas en algunas de sus células que ocurren en etapas más avanzadas del tumor, dando lugar a clones y subclones dentro del mismo tumor. Incluso lesiones metastásicas en diferentes localizaciones pueden proceder de clones celulares distintos, dando lugar a heterogeneidad intermetastásica. Además una lesión metastásica puede adquirir nuevas mutaciones dando lugar a diferentes clones dentro de la misma lesión, lo que es conocido como heterogeneidad intrametastásica. Esta gran heterogeneidad de los tumores en estadios avanzados va a limitar la eficacia de las terapias contra dianas moleculares y explica la implicación de múltiples mecanismos de resistencia adquirida al tratamiento en el mismo paciente (576, 577). La presión selectiva que ejercen los tratamientos sobre determinados clones celulares, determina que las subpoblaciones celulares con resistencia intrínseca o adquirida predominen en la masa tumoral y sean éstas las que gobiernen la progresión tumoral. En la práctica clínica diaria nos encontramos con la dificultad de caracterizar qué clones y alteraciones genéticas son los predominantes en un determinado paciente. Para ello en primer lugar, va a ser primordial disponer de una muestra tisular amplia conformada por múltiple biopsias, a ser posible de diferentes áreas tumorales. Sin embargo, en cáncer gástrico es frecuente disponer de muestras tumorales escasas, obtenidas vía endoscópica. En segundo lugar, dado que la enfermedad es dinámica va a ser de suma importancia la realización de biopsias longitudinales para poder determinar los cambios moleculares que el tumor sufre en su evolución natural y al someterlo a la presión de determinadas terapias. Sin embargo, hoy en día es habitual emplear biopsias del tumor primario para decidir la terapia oncológica de la enfermedad metastásica, que ha podido debutar de forma sincrónica o metacrónica. La selección de una terapia dirigida frente a una diana molecular en base a biopsias de pequeño tamaño o metacrónicas en el

tiempo puede condicionar la resistencia primaria al tratamiento por identificación inadecuada de la vía molecular presente en el clon tumoral predominante, condicionando la progresión de la enfermedad. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, podemos comprender la complejidad que presenta la validación de un biomarcador molecular como predictivo de respuesta a una determinada terapia. En relación a ello, en cáncer gástrico diferentes estudios han demostrado el beneficio de realizar biopsias múltiples en la selección de terapias dirigidas debido a la heterogeneidad intratumoral detectada en diversos biomarcadores como HER2, FGFR2, cMET o EGFR, entre otros (578-581). Una estrategia para afrontar la heterogeneidad tumoral es emplear terapias dirigidas frente a varias vías de señalización intracelular de forma simultánea (582, 583). La hipótesis de nuestro trabajo apoya que el conocimiento de las alteraciones moleculares concurrentes a la sobreexpresión y/o amplificación de HER2 en pacientes con adenocarcinoma gástrico avanzado tratados con Trastuzumab, puede ayudar en la selección de terapias dirigidas que mejoren la evolución de los pacientes.

Otra limitación que reconocemos en nuestro estudio es la ausencia de estudio inmunohistoquímico o análisis de expresión proteica de ciertos biomarcadores, entre otros posibles estudios moleculares, como consecuencia de la escasez de muestra tumoral disponible en muchos de los pacientes. En la última década los avances en el conocimiento de las bases moleculares del cáncer ha puesto de manifiesto la importancia de la integración de las distintas ciencias “ómicas” en el estudio de la biología tumoral. A pesar de ello, en la mayoría de los casos el diagnóstico histológico se realiza a partir de biopsias endoscópicas, dado que en países occidentales más del 50% de los pacientes debuta en estadio metastásico o irresecable. De esta forma, la disponibilidad de material histológico para la realización de estudios moleculares no siempre es posible. Ello ha podido ser una de las causas de los resultados negativos de los estudios de biomarcadores de ciertos ensayos clínicos con terapias dirigidas, y es una limitación para el avance en el tratamiento personalizado de los pacientes con cáncer gástrico. La coordinación interdisciplinar en el proceso diagnóstico y terapéutico del paciente con cáncer, y la integración de los patólogos moleculares en los equipos de trabajo, puede ayudar a una mayor concienciación sobre la importancia de la biopsia y re-biopsia en el manejo de los pacientes con cáncer en la era de la biología molecular y las terapias dirigidas.

VII. CONCLUSIONES

1. Se ha realizado una caracterización molecular del adenocarcinoma gástrico HER2 positivo, demostrando la frecuente coexistencia de múltiples alteraciones genómicas concurrentes con la sobreexpresión y/o amplificación del oncogén *HER2*.
2. La alteración genómica más frecuentemente detectada es la mutación en *TP53*, encontrándose activación de la vía PI3K/Akt/mTOR en un 52% de los casos y coamplificación de genes que codifican otros receptores con actividad tirosina quinasa (*EGFR*, *FGFR*, *MET*) en un 38%.
3. La activación de la vía PI3K/Akt/mTOR se demuestra como un biomarcador pronóstico y predictivo negativo en términos de supervivencia global y libre de progresión en adenocarcinoma gástrico con sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* tratados con Trastuzumab.
4. La amplificación de genes codificantes de receptores de membrana con actividad tirosina quinasa (*EGFR*, *FGFR*, *MET*) no posee valor pronóstico ni predictivo de beneficio en términos de supervivencia global o libre de progresión en adenocarcinoma gástrico con sobreexpresión y/o amplificación del oncogén *HER2* tratados con Trastuzumab.
5. La interacción entre la vía de PI3K/Akt/mTOR y la activación por amplificación de genes codificantes de receptores tirosina quinasa parece demostrarse como un posible mecanismo de resistencia a Trastuzumab, mereciendo ser explorada en estudios futuros.
6. El 69% de los pacientes diagnosticados de adenocarcinoma gástrico con sobreexpresión y/o amplificación del oncogén *HER2* pueden ser subclasificados de acuerdo a otras alteraciones moleculares concomitantes, siendo subsidiarios de diferentes terapias personalizadas en combinación o tras la administración de Trastuzumab.

Por todo lo anterior consideramos demostrado que el conocimiento de las alteraciones moleculares concurrentes con la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2*, en pacientes con adenocarcinoma gástrico avanzado tratados con Trastuzumab, permite identificar factores predictivos y pronósticos así como facilitar el hallazgo de terapias personalizadas para estos pacientes.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. GLOBOCAN 2012. Stomach Cancer. Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [Internet]. Lyon, Francia: International Agency for Research on Cancer [citado el 15 de junio de 2016]. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
2. Marugame T, Dongmei Q. Comparison of time trends in stomach cancer incidence (1973-1997) in East Asia, Europe and USA, from Cancer Incidence in Five Continents Vol. IV-VIII. *Jpn J Clin Oncol*. 2007;37(3):242-3.
3. Zhu AL, Sonnenberg A. Is gastric cancer again rising? *J Clin Gastroenterol*. 2012;46(9):804-6.
4. Correa P. Gastric cancer: two epidemics? *Dig Dis Sci*. 2011;56(5):1585-6.
5. Sonnenberg A. Time trends of mortality from gastric cancer in Europe. *Dig Dis Sci*. 2011;56(4):1112-8.
6. Schlansky B, Sonnenberg A. Epidemiology of noncardia gastric adenocarcinoma in the United States. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(11):1978-85.
7. Haenszel W, Kurihara M. Studies of Japanese migrants. I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst*. 1968;40(1):43-68.
8. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*. 2010;46(4):765-81.
9. Henson DE, Dittus C, Younes M, Nguyen H, Albores-Saavedra J. Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: increase in the signet ring cell type. *Arch Pathol Lab Med*. 2004;128(7):765-70.
10. Kaneko S, Yoshimura T. Time trend analysis of gastric cancer incidence in Japan by histological types, 1975-1989. *Br J Cancer*. 2001;84(3):400-5.
11. Laurén PA, Nevalainen TJ. Epidemiology of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. A time-trend study in Finland with comparison between studies from high- and low-risk areas. *Cancer*. 1993;71(10):2926-33.

12. Hansen S, Wiig JN, Giercksky KE, Tretli S. Esophageal and gastric carcinoma in Norway 1958-1992: incidence time trend variability according to morphological subtypes and organ subsites. *Int J Cancer*. 1997;71(3):340-4.
13. Botterweck AA, Schouten LJ, Volovics A, Dorant E, van Den Brandt PA. Trends in incidence of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia in ten European countries. *Int J Epidemiol*. 2000;29(4):645-54.
14. Liu Y, Kaneko S, Sobue T. Trends in reported incidences of gastric cancer by tumour location, from 1975 to 1989 in Japan. *Int J Epidemiol*. 2004;33(4):808-15.
15. Steevens J, Botterweck AA, Dirx MJ, van den Brandt PA, Schouten LJ. Trends in incidence of oesophageal and stomach cancer subtypes in Europe. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010;22(6):669-78.
16. Cabanes A, Pérez-Gómez B, Aragonés N, Pollán M, López-Abente G. La situación del cáncer en España, 1975-2006. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, 2009.
17. Mortalidad por cáncer y otras causas en España [Internet]. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. ISCIII [citado el 15 de junio de 2016]. Disponible en: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-epidemiologia-ambiental-y-cancer/Mortal_2013.pdf.
18. Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China. *World J Gastroenterol*. 2006;12(1):17-20.
19. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res*. 1992;52(24):6735-40.
20. Hill MJ. Diet and cancer: a review of scientific evidence. *Eur J Cancer Prev*. 1995;4 Suppl 2:3-42.
21. Tsugane S, Sasazuki S. Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. *Gastric Cancer*. 2007;10(2):75-83.
22. Inoue M, Tajima K, Kobayashi S, Suzuki T, Matsuura A, Nakamura T, et al. Protective factor against progression from atrophic gastritis to gastric cancer-data from a cohort study in Japan. *Int J Cancer*. 1996;66(3):309-14.

23. Avital I, Pisters PWT, Kelsen DP, Willett C. Chapter 80. Cancer of the stomach. In: De Vita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. 9th edition ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer; 2011. p. 925.
24. Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol*. 2003;56(1):1-9.
25. Volumen 83. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France, 2004.
26. Ladeiras-Lopes R, Pereira AK, Nogueira A, Pinheiro-Torres T, Pinto I, Santos-Pereira R, et al. Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Cancer Causes Control*. 2008;19(7):689-701.
27. Sjødahl K, Lu Y, Nilsen TI, Ye W, Hveem K, Vatten L, et al. Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study. *Int J Cancer*. 2007;120(1):128-32.
28. Tramacere I, Negri E, Pelucchi C, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, et al. A meta-analysis on alcohol drinking and gastric cancer risk. *Ann Oncol*. 2012;23(1):28-36.
29. Steevens J, Schouten LJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Alcohol consumption, cigarette smoking and risk of subtypes of oesophageal and gastric cancer: a prospective cohort study. *Gut*. 2010;59(1):39-48.
30. Yang P, Zhou Y, Chen B, Wan HW, Jia GQ, Bai HL, et al. Overweight, obesity and gastric cancer risk: results from a meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer*. 2009;45(16):2867-73.
31. Turati F, Tramacere I, La Vecchia C, Negri E. A meta-analysis of body mass index and esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Ann Oncol*. 2013;24(3):609-17.
32. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1983;1(8336):1273-5.
33. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, et al. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med*. 1991;325(16):1127-31.

34. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med*. 1991;325(16):1132-6.
35. Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N, et al. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ*. 1991;302(6788):1302-5.
36. Forman D, Webb P, Parsonnet J. *H pylori* and gastric cancer. *Lancet*. 1994;343(8891):243-4.
37. Group HaCC. Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut*. 2001;49(3):347-53.
38. Parsonnet J. The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 1995;9 Suppl 2:45-51.
39. Kikuchi S, Ohgihara A, Hasegawa A, Miki K, Kaneko E, Mizukoshi H. Seroconversion and seroreversion of *Helicobacter pylori* antibodies over a 9-year period and related factors in Japanese adults. *Helicobacter*. 2004;9(4):335-41.
40. Forman D, Sierra M. The current and projected global burden of gastric cancer (IARC Working Group Reports, No. 8). IARC *Helicobacter pylori* Working Group *Helicobacter pylori* eradication as a strategy for preventing gastric cancer. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2014.
41. Ford AC, Forman D, Hunt RH, Yuan Y, Moayyedi P. *Helicobacter pylori* eradication therapy to prevent gastric cancer in healthy asymptomatic infected individuals: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*. 2014;348:3174.
42. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med*. 2001;345(11):784-9.
43. Kuipers EJ, Pérez-Pérez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(23):1777-80.

44. Franco AT, Johnston E, Krishna U, Yamaoka Y, Israel DA, Nagy TA, et al. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. *Cancer Res.* 2008;68(2):379-87.
45. Cover TL, Cao P, Lind CD, Tham KT, Blaser MJ. Correlation between vacuolating cytotoxin production by *Helicobacter pylori* isolates in vitro and in vivo. *Infect Immun.* 1993;61(12):5008-12.
46. Ferreira RM, Machado JC, Figueiredo C. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes in gastric carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2014;28(6):1003-15.
47. González CA, Figueiredo C, Lic CB, Ferreira RM, Pardo ML, Ruiz Liso JM, et al. *Helicobacter pylori* cagA and vacA genotypes as predictors of progression of gastric preneoplastic lesions: a long-term follow-up in a high-risk area in Spain. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(5):867-74.
48. Matos JI, de Sousa HA, Marcos-Pinto R, Dinis-Ribeiro M. *Helicobacter pylori* CagA and VacA genotypes and gastric phenotype: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2013;25(12):1431-41.
49. Bravo LE, van Doorn LJ, Realpe JL, Correa P. Virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori*: do they explain the African enigma? *Am J Gastroenterol.* 2002;97(11):2839-42.
50. Mannick EE, Bravo LE, Zarama G, Realpe JL, Zhang XJ, Ruiz B, et al. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Res.* 1996;56(14):3238-43.
51. Felley CP, Pignatelli B, Van Melle GD, Crabtree JE, Stolte M, Diezi J, et al. Oxidative stress in gastric mucosa of asymptomatic humans infected with *Helicobacter pylori*: effect of bacterial eradication. *Helicobacter.* 2002;7(6):342-8.
52. Hanada K, Graham DY. *Helicobacter pylori* and the molecular pathogenesis of intestinal-type gastric carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2014;14(8):947-54.
53. Toller IM, Neelsen KJ, Steger M, Hartung ML, Hottiger MO, Stucki M, et al. Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks

and a DNA damage response in its host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(36):14944-9.

54. Shimizu T, Marusawa H, Endo Y, Chiba T. Inflammation-mediated genomic instability: roles of activation-induced cytidine deaminase in carcinogenesis. *Cancer Sci*. 2012;103(7):1201-6.

55. Honjo T, Kobayashi M, Begum N, Kotani A, Sabouri S, Nagaoka H. The AID dilemma: infection, or cancer? *Adv Cancer Res*. 2012;113:1-44.

56. Kurdistani SK. Histone modifications as markers of cancer prognosis: a cellular view. *Br J Cancer*. 2007;97(1):1-5.

57. Nardone G, Compare D, De Colibus P, de Nucci G, Rocco A. *Helicobacter pylori* and epigenetic mechanisms underlying gastric carcinogenesis. *Dig Dis*. 2007;25(3):225-9.

58. Graham DY. *Helicobacter pylori* update: gastric cancer, reliable therapy, and possible benefits. *Gastroenterology*. 2015;148(4):719-31.e3.

59. Shiotani A, Uedo N, Iishi H, Murao T, Kanzaki T, Kimura Y, et al. *H. pylori* eradication did not improve dysregulation of specific oncogenic miRNAs in intestinal metaplastic glands. *J Gastroenterol*. 2012;47(9):988-98.

60. Bonney GE, Elston RC, Correa P, Haenszel W, Zavala DE, Zarama G, et al. Genetic etiology of gastric carcinoma: I. Chronic atrophic gastritis. *Genet Epidemiol*. 1986;3(4):213-24.

61. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*. 2000;404(6776):398-402.

62. Thye T, Burchard GD, Nilius M, Müller-Myhsok B, Horstmann RD. Genomewide linkage analysis identifies polymorphism in the human interferon-gamma receptor affecting *Helicobacter pylori* infection. *Am J Hum Genet*. 2003;72(2):448-53.

63. Zintzaras E. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms with genetic susceptibility to gastric cancer: a meta-analysis. *J Hum Genet*. 2006;51(7):618-24.

64. Aird I, Bentall HH, Robert JA. A relationship between cancer of stomach and the ABO blood groups. *Br Med J.* 1953;1(4814):799-801.
65. Edgren G, Hjalgrim H, Rostgaard K, Norda R, Wikman A, Melbye M, et al. Risk of gastric cancer and peptic ulcers in relation to ABO blood type: a cohort study. *Am J Epidemiol.* 2010;172(11):1280-5.
66. Oliveira C, Pinheiro H, Figueiredo J, Seruca R, Carneiro F. Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *Lancet Oncol.* 2015;16(2):e60-70.
67. Sereno M, Aguayo C, Guillén Ponce C, Gómez-Raposo C, Zambrana F, Gómez-López M, et al. Gastric tumours in hereditary cancer syndromes: clinical features, molecular biology and strategies for prevention. *Clin Transl Oncol.* 2011;13(9):599-610.
68. Park JG, Yang HK, Kim WH, Caldas C, Yokota J, Guilford PJ. Report on the first meeting of the International Collaborative Group on Hereditary Gastric Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(21):1781-2.
69. Guilford PJ, Hopkins JB, Grady WM, Markowitz SD, Willis J, Lynch H, et al. E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. *Hum Mutat.* 1999;14(3):249-55.
70. Graziano F, Humar B, Guilford P. The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice. *Ann Oncol.* 2003;14(12):1705-13.
71. Barber M, Murrell A, Ito Y, Maia AT, Hyland S, Oliveira C, et al. Mechanisms and sequelae of E-cadherin silencing in hereditary diffuse gastric cancer. *J Pathol.* 2008;216(3):295-306.
72. Oliveira C, Pinheiro H, Figueiredo J, Seruca R, Carneiro F. Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *Lancet Oncol.* 2015 Feb;16(2):e60-70.
73. Brooks-Wilson AR, Kaurah P, Suriano G, Leach S, Senz J, Grehan N, et al. Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *J Med Genet.* 2004;41(7):508-17.

74. Pinheiro H, Bordeira-Carriço R, Seixas S, Carvalho J, Senz J, Oliveira P, et al. Allele-specific CDH1 downregulation and hereditary diffuse gastric cancer. *Hum Mol Genet.* 2010;19(5):943-52.
75. Majewski IJ, Kluijdt I, Cats A, Scerri TS, de Jong D, Kluin RJ, et al. An α -E-catenin (CTNNA1) mutation in hereditary diffuse gastric cancer. *J Pathol.* 2013;229(4):621-9.
76. Gylling A, Abdel-Rahman WM, Juhola M, Nuorva K, Hautala E, Järvinen HJ, et al. Is gastric cancer part of the tumour spectrum of hereditary non-polyposis colorectal cancer? A molecular genetic study. *Gut.* 2007;56(7):926-33.
77. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996;87(2):159-70.
78. Aarnio M, Salovaara R, Aaltonen LA, Mecklin JP, Järvinen HJ. Features of gastric cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Int J Cancer.* 1997;74(5):551-5.
79. Hofgärtner WT, Thorp M, Ramus MW, Delorefice G, Chey WY, Ryan CK, et al. Gastric adenocarcinoma associated with fundic gland polyps in a patient with attenuated familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol.* 1999;94(8):2275-81.
80. Shinmura K, Goto M, Tao H, Shimizu S, Otsuki Y, Kobayashi H, et al. A novel STK11 germline mutation in two siblings with Peutz-Jeghers syndrome complicated by primary gastric cancer. *Clin Genet.* 2005;67(1):81-6.
81. Worthley DL, Phillips KD, Wayte N, Schrader KA, Healey S, Kaurah P, et al. Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS): a new autosomal dominant syndrome. *Gut.* 2012;61(5):774-9.
82. Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, Yokota J, Wiesner GL, Powell SM, et al. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *J Med Genet.* 1999;36(12):873-80.
83. Borrmann R. Geschwulste des magens and duodenums. In: Henke F, Lubarsch O, editors. *Handbuch der speziellen pathologischen anatomie and histology.* Berlin: Springer-Verlag; 1926. p. 865.

84. Hirota T, Ming S, Itabashi M. Pathology of Early gastric cancer. In: Nishi M, Ichikawa H, Kakajima T, editors. Gastric Cancer. Tokyo: Springer-Verlag; 1993. p. 66-86.
85. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese Classification of Gastric Carcinoma - 2nd English Edition -. Gastric Cancer. 1998;1(1):10-24.
86. Chapter 4. Tumours of the stomach. In: Bosman F, Carneiro F, Hruban R, Theise N, editors. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. World Health Organisation Classification of Tumours. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2010. p. 46-63.
87. Lauren P. The two histologically main types of gastric carcinoma. Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histological classification. Acta Pathol Microbiol Scand. 1965;64:31-49.
88. Ming SC. Gastric carcinoma. A pathobiological classification. Cancer. 1977;39(6):2475-85.
89. Nakamura K, Sugano H, Takagi K. Carcinoma of the stomach in incipient phase: its histogenesis and histological appearances. Gan. 1968;59(3):251-8.
90. Goseki N, Takizawa T, Koike M. Differences in the mode of the extension of gastric cancer classified by histological type: new histological classification of gastric carcinoma. Gut. 1992;33(5):606-12.
91. Carneiro F, Seixas M, Sobrinho-Simões M. New elements for an updated classification of the carcinomas of the stomach. Pathol Res Pract. 1995;191(6):571-84.
92. Antonioli DA, Goldman H. Changes in the location and type of gastric adenocarcinoma. Cancer. 1982;50(4):775-81.
93. Siewert JR, Stein HJ. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. Br J Surg. 1998;85(11):1457-9.
94. Curtis NJ, Noble F, Bailey IS, Kelly JJ, Byrne JP, Underwood TJ. The relevance of the Siewert classification in the era of multimodal therapy for adenocarcinoma of the gastro-oesophageal junction. J Surg Oncol. 2014;109(3):202-7.

95. Mariette C, Piessen G, Briez N, Gronnier C, Triboulet JP. Oesophagogastric junction adenocarcinoma: which therapeutic approach? *Lancet Oncol.* 2011;12(3):296-305.
96. American Joint Committee on Cancer Staging Manual. 7th ed. New York: Springer; 2010. 117 p.
97. Santiago JM, Sasako M, Osorio J. [TNM-7th edition 2009 (UICC/AJCC) and Japanese Classification 2010 in Gastric Cancer. Towards simplicity and standardisation in the management of gastric cancer]. *Cir Esp.* 2011;89(5):275-81.
98. Huang B, Zheng X, Wang Z, Wang M, Dong Y, Zhao B, et al. Prognostic significance of the number of metastatic lymph nodes: is UICC/TNM node classification perfectly suitable for early gastric cancer? *Ann Surg Oncol.* 2009;16(1):61-7.
99. Renovanz M, Kim EL. Intratumoral heterogeneity, its contribution to therapy resistance and methodological caveats to assessment. *Front Oncol.* 2014;4:142.
100. Zheng L, Wang L, Ajani J, Xie K. Molecular basis of gastric cancer development and progression. *Gastric Cancer.* 2004;7(2):61-77.
101. Ku GY, Ilson DH. Esophagogastric cancer: targeted agents. *Cancer Treat Rev.* 2010;36(3):235-48.
102. Cappetta A, Lonardi S, Pastorelli D, Bergamo F, Lombardi G, Zagonel V. Advanced gastric cancer (GC) and cancer of the gastro-oesophageal junction (GEJ): focus on targeted therapies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012;81(1):38-48.
103. Marano L, Chiari R, Fabozzi A, De Vita F, Boccardi V, Roviello G, et al. c-Met targeting in advanced gastric cancer: An open challenge. *Cancer Lett.* 2015;365(1):30-6.
104. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet.* 2010;376(9742):687-97.

105. Gomez-Martin C, Plaza JC, Pazo-Cid R, Salud A, Pons F, Fonseca P, et al. Level of HER2 gene amplification predicts response and overall survival in HER2-positive advanced gastric cancer treated with trastuzumab. *J Clin Oncol*. 2013;31(35):4445-52.
106. Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ, Dumitru F, Passalacqua R, Goswami C, et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2014;383(9911):31-9.
107. Wilke H, Muro K, Van Cutsem E, Oh SC, Bodoky G, Shimada Y, et al. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(11):1224-35.
108. Wang K, Kan J, Yuen ST, Shi ST, Chu KM, Law S, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. *Nat Genet*. 2011;43(12):1219-23.
109. Deng N, Goh LK, Wang H, Das K, Tao J, Tan IB, et al. A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. *Gut*. 2012;61(5):673-84.
110. Wang K, Yuen ST, Xu J, Lee SP, Yan HH, Shi ST, et al. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet*. 2014;46(6):573-82.
111. Matsumoto K, Arao T, Hamaguchi T, Shimada Y, Kato K, Oda I, et al. FGFR2 gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer. *Br J Cancer*. 2012;106(4):727-32.
112. Jang JH, Shin KH, Park JG. Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res*. 2001;61(9):3541-3.
113. Liu YC, Shen CY, Wu HS, Hsieh TY, Chan DC, Chen CJ, et al. Mechanisms inactivating the gene for E-cadherin in sporadic gastric carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2006;12(14):2168-73.

114. Zheng H, Takahashi H, Nakajima T, Murai Y, Cui Z, Nomoto K, et al. MUC6 down-regulation correlates with gastric carcinoma progression and a poor prognosis: an immunohistochemical study with tissue microarrays. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2006;132(12):817-23.
115. Chen X, Leung SY, Yuen ST, Chu KM, Ji J, Li R, et al. Variation in gene expression patterns in human gastric cancers. *Mol Biol Cell.* 2003;14(8):3208-15.
116. Shah MA, Khanin R, Tang L, Janjigian YY, Klimstra DS, Gerdes H, et al. Molecular classification of gastric cancer: a new paradigm. *Clin Cancer Res.* 2011;17(9):2693-701.
117. Leung SY, Chen X, Chu KM, Yuen ST, Mathy J, Ji J, et al. Phospholipase A2 group IIA expression in gastric adenocarcinoma is associated with prolonged survival and less frequent metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(25):16203-8.
118. Ganesan K, Ivanova T, Wu Y, Rajasegaran V, Wu J, Lee MH, et al. Inhibition of gastric cancer invasion and metastasis by PLA2G2A, a novel beta-catenin/TCF target gene. *Cancer Res.* 2008;68(11):4277-86.
119. Sakamoto H, Yoshimura K, Saeki N, Katai H, Shimoda T, Matsuno Y, et al. Genetic variation in PSCA is associated with susceptibility to diffuse-type gastric cancer. *Nat Genet.* 2008;40(6):730-40.
120. Ali SM, Sanford EM, Klempner SJ, Rubinson DA, Wang K, Palma NA, et al. Prospective comprehensive genomic profiling of advanced gastric carcinoma cases reveals frequent clinically relevant genomic alterations and new routes for targeted therapies. *Oncologist.* 2015;20(5):499-507.
121. Bose R, Kavuri SM, Searleman AC, Shen W, Shen D, Koboldt DC, et al. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer. *Cancer Discov.* 2013;3(2):224-37.
122. Network CGAR. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014;513(7517):202-9.

123. Murphy G, Pfeiffer R, Camargo MC, Rabkin CS. Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location. *Gastroenterology*. 2009;137(3):824-33.
124. Matsusaka K, Kaneda A, Nagae G, Ushiku T, Kikuchi Y, Hino R, et al. Classification of Epstein-Barr virus-positive gastric cancers by definition of DNA methylation epigenotypes. *Cancer Res*. 2011;71(23):7187-97.
125. Geddert H, zur Hausen A, Gabbert HE, Sarbia M. EBV-infection in cardiac and non-cardiac gastric adenocarcinomas is associated with promoter methylation of p16, p14 and APC, but not hMLH1. *Cell Oncol (Dordr)*. 2011;34(3):209-14.
126. Sukawa Y, Yamamoto H, Nosho K, Kunimoto H, Suzuki H, Adachi Y, et al. Alterations in the human epidermal growth factor receptor 2-phosphatidylinositol 3-kinase-v-Akt pathway in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2012;18(45):6577-86.
127. Bernal M, Ruiz-Cabello F, Concha A, Paschen A, Garrido F. Implication of the β 2-microglobulin gene in the generation of tumor escape phenotypes. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(9):1359-71.
128. Greulich H, Kaplan B, Mertins P, Chen TH, Tanaka KE, Yun CH, et al. Functional analysis of receptor tyrosine kinase mutations in lung cancer identifies oncogenic extracellular domain mutations of ERBB2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(36):14476-81.
129. Dulak AM, Stojanov P, Peng S, Lawrence MS, Fox C, Stewart C, et al. Exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity. *Nat Genet*. 2013;45(5):478-86.
130. Chen BJ, Chapuy B, Ouyang J, Sun HH, Roemer MG, Xu ML, et al. PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies. *Clin Cancer Res*. 2013;19(13):3462-73.
131. Schwartz GK, Ilson D, Saltz L, O'Reilly E, Tong W, Maslak P, et al. Phase II study of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol administered to patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin Oncol*. 2001;19(7):1985-92.

132. Maehara Y, Kakeji Y, Oda S, Takahashi I, Akazawa K, Sugimachi K. Time trends of surgical treatment and the prognosis for Japanese patients with gastric cancer. *Br J Cancer*. 2000;83(8):986-91.
133. Kattan MW, Karpeh MS, Mazumdar M, Brennan MF. Postoperative nomogram for disease-specific survival after an R0 resection for gastric carcinoma. *J Clin Oncol*. 2003;21(19):3647-50.
134. Peeters KC, Kattan MW, Hartgrink HH, Kranenbarg EK, Karpeh MS, Brennan MF, et al. Validation of a nomogram for predicting disease-specific survival after an R0 resection for gastric carcinoma. *Cancer*. 2005;103(4):702-7.
135. Lo SS, Kuo HS, Wu CW, Hsieh MC, Shyr YM, Wang HC, et al. Poorer prognosis in young patients with gastric cancer? *Hepatogastroenterology*. 1999;46(28):2690-3.
136. Maguire A, Porta M, Sanz-Anquela JM, Ruano I, Malats N, Piñol JL. Sex as a prognostic factor in gastric cancer. *Eur J Cancer*. 1996;32A(8):1303-9.
137. Maehara Y, Watanabe A, Kakeji Y, Emi Y, Moriguchi S, Anai H, et al. Prognosis for surgically treated gastric cancer patients is poorer for women than men in all patients under age 50. *Br J Cancer*. 1992;65(3):417-20.
138. Songun I, van de Velde CJ, Arends JW, Blok P, Grond AJ, Offerhaus GJ, et al. Classification of gastric carcinoma using the Goseki system provides prognostic information additional to TNM staging. *Cancer*. 1999;85(10):2114-8.
139. Martin IG, Dixon MF, Sue-Ling H, Axon AT, Johnston D. Goseki histological grading of gastric cancer is an important predictor of outcome. *Gut*. 1994;35(6):758-63.
140. Chiaravalli AM, Klersy C, Tava F, Manca R, Fiocca R, Capella C, et al. Lower- and higher-grade subtypes of diffuse gastric cancer. *Hum Pathol*. 2009;40(11):1591-9.
141. Chiaravalli AM, Klersy C, Vanoli A, Ferretti A, Capella C, Solcia E. Histotype-based prognostic classification of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2012;18(9):896-904.
142. Radi MJ, Fenoglio-Preiser CM, Bartow SA, Key CR, Pathak DR. Gastric carcinoma in the young: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Am J Gastroenterol*. 1986;81(9):747-56.

143. Bunt AM, Hogendoorn PC, van de Velde CJ, Bruijn JA, Hermans J. Lymph node staging standards in gastric cancer. *J Clin Oncol.* 1995;13(9):2309-16.
144. Li C, Oh SJ, Kim S, Hyung WJ, Yan M, Zhu ZG, et al. Macroscopic Borrmann type as a simple prognostic indicator in patients with advanced gastric cancer. *Oncology.* 2009;77(3-4):197-204.
145. Carriaga MT, Henson DE. The histologic grading of cancer. *Cancer.* 1995;75(1 Suppl):406-21.
146. Scartozzi M, Galizia E, Verdecchia L, Berardi R, Graziano F, Catalano V, et al. Lymphatic, blood vessel and perineural invasion identifies early-stage high-risk radically resected gastric cancer patients. *Br J Cancer.* 2006;95(4):445-9.
147. Kim JJ, Song KY, Hur H, Hur JI, Park SM, Park CH. Lymph node micrometastasis in node negative early gastric cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2009;35(4):409-14.
148. Lee HE, Chae SW, Lee YJ, Kim MA, Lee HS, Lee BL, et al. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *Br J Cancer.* 2008;99(10):1704-11.
149. Takagane A, Terashima M, Abe K, Araya M, Irinoda T, Yonezawa H, et al. Evaluation of the ratio of lymph node metastasis as a prognostic factor in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer.* 1999;2(2):122-8.
150. Lagarde SM, ten Kate FJ, Reitsma JB, Busch OR, van Lanschot JJ. Prognostic factors in adenocarcinoma of the esophagus or gastroesophageal junction. *J Clin Oncol.* 2006;24(26):4347-55.
151. Gholami S, Janson L, Worhunsky DJ, Tran TB, Squires MH, Jin LX, et al. Number of Lymph Nodes Removed and Survival after Gastric Cancer Resection: An Analysis from the US Gastric Cancer Collaborative. *J Am Coll Surg.* 2015;221(2):291-9.
152. Eloubeidi MA, Desmond R, Arguedas MR, Reed CE, Wilcox CM. Prognostic factors for the survival of patients with esophageal carcinoma in the U.S.: the importance of tumor length and lymph node status. *Cancer.* 2002;95(7):1434-43.

153. van Sandick JW, van Lanschot JJ, ten Kate FJ, Tijssen JG, Obertop H. Indicators of prognosis after transhiatal esophageal resection without thoracotomy for cancer. *J Am Coll Surg.* 2002;194(1):28-36.
154. Hölscher AH, Bollschweiler E, Bumm R, Bartels H, Höfler H, Siewert JR. Prognostic factors of resected adenocarcinoma of the esophagus. *Surgery.* 1995;118(5):845-55.
155. Chau I, Norman AR, Cunningham D, Waters JS, Oates J, Ross PJ. Multivariate prognostic factor analysis in locally advanced and metastatic esophago-gastric cancer--pooled analysis from three multicenter, randomized, controlled trials using individual patient data. *J Clin Oncol.* 2004;22(12):2395-403.
156. Chau I, Ashley S, Cunningham D. Validation of the Royal Marsden hospital prognostic index in advanced esophagogastric cancer using individual patient data from the REAL 2 study. *J Clin Oncol.* 2009;27(19):e3-4.
157. Maehara Y, Kusumoto T, Takahashi I, Kakeji Y, Baba H, Akazawa K, et al. Predictive value of preoperative carcinoembryonic antigen levels for the prognosis of patients with well-differentiated gastric cancer. A multivariate analysis. *Oncology.* 1994;51(3):234-7.
158. Sakamoto J, Nakazato H, Teramukai S, Ohashi Y, Takahashi Y, Mai M, et al. Association between preoperative plasma CEA levels and the prognosis of gastric cancer following curative resection. Tumor Marker Committee, Japanese Foundation for Multidisciplinary Treatment of Cancer, Tokyo, Japan. *Surg Oncol.* 1996;5(3):133-9.
159. Hermanek P, Wittekind C. News of TNM and its use for classification of gastric cancer. *World J Surg.* 1995;19(4):491-5.
160. Bachmann MO, Alderson D, Edwards D, Wotton S, Bedford C, Peters TJ, et al. Cohort study in South and West England of the influence of specialization on the management and outcome of patients with oesophageal and gastric cancers. *Br J Surg.* 2002;89(7):914-22.
161. Birkmeyer JD, Stukel TA, Siewers AE, Goodney PP, Wennberg DE, Lucas FL. Surgeon volume and operative mortality in the United States. *N Engl J Med.* 2003;349(22):2117-27.

162. Becker KF, Keller G, Hoefler H. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Surg Oncol.* 2000;9(1):5-11.
163. Scartozzi M, Galizia E, Freddari F, Berardi R, Cellerino R, Cascinu S. Molecular biology of sporadic gastric cancer: prognostic indicators and novel therapeutic approaches. *Cancer Treat Rev.* 2004;30(5):451-9.
164. Sunakawa Y, Lenz HJ. Molecular classification of gastric adenocarcinoma: translating new insights from the cancer genome atlas research network. *Curr Treat Options Oncol.* 2015;16(4):17.
165. Cho JY, Lim JY, Cheong JH, Park YY, Yoon SL, Kim SM, et al. Gene expression signature-based prognostic risk score in gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(7):1850-7.
166. Sakai H, Okamoto E. [Clinical importance of serum anti-p53 antibodies as tumor markers]. *Rinsho Byori.* 2002;50(10):970-5.
167. Feng CW, Wang LD, Jiao LH, Liu B, Zheng S, Xie XJ. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. *BMC Cancer.* 2002;2:8.
168. Okuyama T, Maehara Y, Kabashima A, Takahashi I, Kakeji Y, Sugimachi K. Combined evaluation of expressions of p53 and p21 proteins as prognostic factors for patients with gastric carcinoma. *Oncology.* 2002;63(4):353-61.
169. Durães C, Almeida GM, Seruca R, Oliveira C, Carneiro F. Biomarkers for gastric cancer: prognostic, predictive or targets of therapy? *Virchows Arch.* 2014;464(3):367-78.
170. Corso G, Carvalho J, Marrelli D, Vindigni C, Carvalho B, Seruca R, et al. Somatic mutations and deletions of the E-cadherin gene predict poor survival of patients with gastric cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31(7):868-75.
171. Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, Soares P, Bex G, Caldas C, et al. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene.* 2001;20(12):1525-8.

172. Tanaka M, Kitajima Y, Sato S, Miyazaki K. Combined evaluation of mucin antigen and E-cadherin expression may help select patients with gastric cancer suitable for minimally invasive therapy. *Br J Surg.* 2003;90(1):95-101.
173. Zhang HK, Zhang QM, Zhao TH, Li YY, Yi YF. Expression of mucins and E-cadherin in gastric carcinoma and their clinical significance. *World J Gastroenterol.* 2004;10(20):3044-7.
174. Jin Z, Jiang W, Wang L. Biomarkers for gastric cancer: Progression in early diagnosis and prognosis (Review). *Oncol Lett.* 2015;9(4):1502-8.
175. Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, et al. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol.* 2002;8(6):987-93.
176. Rhyu MG, Park WS, Meltzer SJ. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene.* 1994;9(1):29-32.
177. Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, et al. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res.* 1999;59(5):1090-5.
178. Wu MS, Lee CW, Shun CT, Wang HP, Lee WJ, Chang MC, et al. Distinct clinicopathologic and genetic profiles in sporadic gastric cancer with different mutator phenotypes. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;27(4):403-11.
179. Oliveira C, Seruca R, Seixas M, Sobrinho-Simões M. The clinicopathological features of gastric carcinomas with microsatellite instability may be mediated by mutations of different "target genes": a study of the TGFbeta RII, IGFII R, and BAX genes. *Am J Pathol.* 1998;153(4):1211-9.
180. Choi YY, Bae JM, An JY, Kwon IG, Cho I, Shin HB, et al. Is microsatellite instability a prognostic marker in gastric cancer? A systematic review with meta-analysis. *J Surg Oncol.* 2014;110(2):129-35.
181. Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, Castellano P, Mura AL, Pinto M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor

receptor (EGFR) is an independent prognostic indicator of worse outcome in gastric cancer patients. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(1):69-79.

182. Kim MA, Lee HS, Lee HE, Jeon YK, Yang HK, Kim WH. EGFR in gastric carcinomas: prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number. *Histopathology*. 2008;52(6):738-46.

183. Tokunaga A, Onda M, Okuda T, Teramoto T, Fujita I, Mizutani T, et al. Clinical significance of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor, and c-erbB-2 in human gastric cancer. *Cancer*. 1995;75(6 Suppl):1418-25.

184. García I, del Casar JM, Corte MD, Allende MT, García-Muñiz JL, Vizoso F. Epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 contents in unresectable (UICC R1 or R2) gastric cancer. *Int J Biol Markers*. 2003;18(3):200-6.

185. Matsubara J, Nishina T, Yamada Y, Moriwaki T, Shimoda T, Kajiwara T, et al. Impacts of excision repair cross-complementing gene 1 (ERCC1), dihydropyrimidine dehydrogenase, and epidermal growth factor receptor on the outcomes of patients with advanced gastric cancer. *Br J Cancer*. 2008;98(4):832-9.

186. Sanz-Ortega J, Steinberg SM, Moro E, Saez M, Lopez JA, Sierra E, et al. Comparative study of tumor angiogenesis and immunohistochemistry for p53, c-ErbB2, c-myc and EGFr as prognostic factors in gastric cancer. *Histol Histopathol*. 2000;15(2):455-62.

187. Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol*. 2008;19(9):1523-9.

188. Hofmann M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van de Vijver M, Kim W, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology*. 2008;52(7):797-805.

189. Tanner M, Hollmén M, Junttila TT, Kapanen AI, Tammola S, Soini Y, et al. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol*. 2005;16(2):273-8.

190. Barros-Silva JD, Leitão D, Afonso L, Vieira J, Dinis-Ribeiro M, Fragoso M, et al. Association of ERBB2 gene status with histopathological parameters and disease-specific survival in gastric carcinoma patients. *Br J Cancer*. 2009;100(3):487-93.
191. Park DI, Yun JW, Park JH, Oh SJ, Kim HJ, Cho YK, et al. HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Dig Dis Sci*. 2006;51(8):1371-9.
192. Aizawa M, Nagatsuma AK, Kitada K, Kuwata T, Fujii S, Kinoshita T, et al. Evaluation of HER2-based biology in 1,006 cases of gastric cancer in a Japanese population. *Gastric Cancer*. 2014;17(1):34-42.
193. Grabsch H, Sivakumar S, Gray S, Gabbert HE, Müller W. HER2 expression in gastric cancer: Rare, heterogeneous and of no prognostic value - conclusions from 924 cases of two independent series. *Cell Oncol*. 2010;32(1-2):57-65.
194. Okines AF, Thompson LC, Cunningham D, Wotherspoon A, Reis-Filho JS, Langley RE, et al. Effect of HER2 on prognosis and benefit from peri-operative chemotherapy in early oesophago-gastric adenocarcinoma in the MAGIC trial. *Ann Oncol*. 2013;24(5):1253-61.
195. Rüschoff J, Hanna W, Bilous M, Hofmann M, Osamura RY, Penault-Llorca F, et al. HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Mod Pathol*. 2012;25(5):637-50.
196. Janjigian YY, Werner D, Pauligk C, Steinmetz K, Kelsen DP, Jäger E, et al. Prognosis of metastatic gastric and gastroesophageal junction cancer by HER2 status: a European and USA International collaborative analysis. *Ann Oncol*. 2012;23(10):2656-62.
197. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249-57.
198. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011;146(6):873-87.
199. Vidal O, Metges JP, Elizalde I, Valentíni M, Volant A, Molina R, et al. High preoperative serum vascular endothelial growth factor levels predict poor clinical outcome after curative resection of gastric cancer. *Br J Surg*. 2009;96(12):1443-51.

200. Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, Zbar A, Kouraklis G, Simopoulos C, et al. Circulating VEGF levels in the serum of gastric cancer patients: correlation with pathological variables, patient survival, and tumor surgery. *Ann Surg.* 2002;236(1):37-42.
201. Fondevila C, Metges JP, Fuster J, Grau JJ, Palacín A, Castells A, et al. p53 and VEGF expression are independent predictors of tumour recurrence and survival following curative resection of gastric cancer. *Br J Cancer.* 2004;90(1):206-15.
202. Van Cutsem E, de Haas S, Kang YK, Ohtsu A, Tebbutt NC, Ming Xu J, et al. Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a biomarker evaluation from the AVAGAST randomized phase III trial. *J Clin Oncol.* 2012;30(17):2119-27.
203. Kilgour RD, Vigano A, Trutschnigg B, Lucar E, Borod M, Morais JA. Handgrip strength predicts survival and is associated with markers of clinical and functional outcomes in advanced cancer patients. *Support Care Cancer.* 2013;21(12):3261-70.
204. Jung EJ, Min SY, Kim MA, Kim WH. Fibroblast growth factor receptor 2 gene amplification status and its clinicopathologic significance in gastric carcinoma. *Hum Pathol.* 2012;43(10):1559-66.
205. Kim C, Mulder K, Spratlin J. How prognostic and predictive biomarkers are transforming our understanding and management of advanced gastric cancer. *Oncologist.* 2014;19(10):1046-55.
206. Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, Watanabe A, Tatsumi M, Yamashita J, et al. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer.* 1999;85(9):1894-902.
207. Lennerz JK, Kwak EL, Ackerman A, Michael M, Fox SB, Bergethon K, et al. MET amplification identifies a small and aggressive subgroup of esophagogastric adenocarcinoma with evidence of responsiveness to crizotinib. *J Clin Oncol.* 2011;29(36):4803-10.
208. Amemiya H, Kono K, Itakura J, Tang RF, Takahashi A, An FQ, et al. c-Met expression in gastric cancer with liver metastasis. *Oncology.* 2002;63(3):286-96.

209. Peng Z, Zhu Y, Wang Q, Gao J, Li Y, Ge S, et al. Prognostic significance of MET amplification and expression in gastric cancer: a systematic review with meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(1):e84502.
210. Shi J, Yao D, Liu W, Wang N, Lv H, Zhang G, et al. Highly frequent PIK3CA amplification is associated with poor prognosis in gastric cancer. *BMC Cancer*. 2012;12:50.
211. Okines AF, Gonzalez de Castro D, Cunningham D, Chau I, Langley RE, Thompson LC, et al. Biomarker analysis in oesophagogastric cancer: Results from the REAL3 and TransMAGIC trials. *Eur J Cancer*. 2013;49(9):2116-25.
212. Murakami D, Tsujitani S, Osaki T, Saito H, Katano K, Tatebe S, et al. Expression of phosphorylated Akt (pAkt) in gastric carcinoma predicts prognosis and efficacy of chemotherapy. *Gastric Cancer*. 2007;10(1):45-51.
213. Martín ME, Pérez MI, Redondo C, Alvarez MI, Salinas M, Fando JL. 4E binding protein 1 expression is inversely correlated to the progression of gastrointestinal cancers. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000;32(6):633-42.
214. Yu G, Wang J, Chen Y, Wang X, Pan J, Li G, et al. Overexpression of phosphorylated mammalian target of rapamycin predicts lymph node metastasis and prognosis of chinese patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(5):1821-9.
215. Hino R, Uozaki H, Murakami N, Ushiku T, Shinozaki A, Ishikawa S, et al. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of PTEN gene in gastric carcinoma. *Cancer Res*. 2009;69(7):2766-74.
216. Li M, Sun H, Song L, Gao X, Chang W, Qin X. Immunohistochemical expression of mTOR negatively correlates with PTEN expression in gastric carcinoma. *Oncol Lett*. 2012;4(6):1213-8.
217. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-64.

218. Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J, Zhang XG, Xu N. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem.* 2006;108(1):19-24.
219. Eto S, Yoshikawa K, Nishi M, Higashijima J, Tokunaga T, Nakao T, et al. Programmed cell death protein 1 expression is an independent prognostic factor in gastric cancer after curative resection. *Gastric Cancer.* 2015.
220. Ouban A, Ahmed AA. Claudins in human cancer: a review. *Histol Histopathol.* 2010;25(1):83-90.
221. Liu JX, Wei ZY, Chen JS, Lu HC, Hao L, Li WJ. Prognostic and clinical significance of claudin-4 in gastric cancer: a meta-analysis. *World J Surg Oncol.* 2015;13:207.
222. Sanada Y, Oue N, Mitani Y, Yoshida K, Nakayama H, Yasui W. Down-regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in gastric cancer with an intestinal phenotype. *J Pathol.* 2006;208(5):633-42.
223. Matsuda Y, Semba S, Ueda J, Fuku T, Hasuo T, Chiba H, et al. Gastric and intestinal claudin expression at the invasive front of gastric carcinoma. *Cancer Sci.* 2007;98(7):1014-9.
224. Chon HJ, Kim HR, Shin E, Kim C, Heo SJ, Lee CK, et al. The Clinicopathologic Features and Prognostic Impact of ALK Positivity in Patients with Resected Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2015;22(12):3938-45.
225. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol.* 2009;27(26):4247-53.
226. Inada T, Kikuyama S, Ichikawa A, Igarashi S, Ogata Y. Bcl-2 expression as a prognostic factor of survival of gastric carcinoma. *Anticancer Res.* 1998;18(3B):2003-10.
227. Aizawa K, Ueki K, Suzuki S, Yabusaki H, Kanda T, Nishimaki T, et al. Apoptosis and Bcl-2 expression in gastric carcinomas: correlation with clinicopathological

variables, p53 expression, cell proliferation and prognosis. *Int J Oncol.* 1999;14(1):85-91.

228. Osaki M, Kase S, Kodani I, Watanabe M, Adachi H, Ito H. Expression of Fas and Fas ligand in human gastric adenomas and intestinal-type carcinomas: correlation with proliferation and apoptosis. *Gastric Cancer.* 2001;4(4):198-205.

229. Song KY, Jung CK, Park WS, Park CH. Expression of the antiapoptosis gene Survivin predicts poor prognosis of stage III gastric adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2009;39(5):290-6.

230. Ernst M, Putoczki TL. Molecular pathways: IL11 as a tumor-promoting cytokine-translational implications for cancers. *Clin Cancer Res.* 2014;20(22):5579-88.

231. Putoczki TL, Thiem S, Loving A, Busuttill RA, Wilson NJ, Ziegler PK, et al. Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically. *Cancer Cell.* 2013;24(2):257-71.

232. Necula LG, Chivu-Economescu M, Stanciulescu EL, Bleotu C, Dima SO, Alexiu I, et al. IL-6 and IL-11 as markers for tumor aggressiveness and prognosis in gastric adenocarcinoma patients without mutations in Gp130 subunits. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2012;21(1):23-9.

233. Tenderenda M. A study on the prognostic value of cyclins D1 and E expression levels in resectable gastric cancer and on some correlations between cyclins expression, histoclinical parameters and selected protein products of cell-cycle regulatory genes. *J Exp Clin Cancer Res.* 2005;24(3):405-14.

234. Ichiyoshi Y, Oiwa H, Tomisaki S, Sakaguchi Y, Ohno S, Maehara Y, et al. Overexpression of p53 is associated with growth pattern and prognosis in advanced gastric cancer. *Hepatogastroenterology.* 1997;44(14):546-53.

235. Gonçalves AR, Carneiro AJ, Martins I, de Faria PA, Ferreira MA, de Mello EL, et al. Prognostic significance of p53 protein expression in early gastric cancer. *Pathol Oncol Res.* 2011;17(2):349-55.

236. Corso G, Velho S, Paredes J, Pedrazzani C, Martins D, Milanezi F, et al. Oncogenic mutations in gastric cancer with microsatellite instability. *Eur J Cancer*. 2011;47(3):443-51.
237. Warneke VS, Behrens HM, Haag J, Balschun K, Böger C, Becker T, et al. Prognostic and putative predictive biomarkers of gastric cancer for personalized medicine. *Diagn Mol Pathol*. 2013;22(3):127-37.
238. Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol*. 2010;11(2):136-46.
239. Kim BH, Hong SW, Kim A, Choi SH, Yoon SO. Prognostic implications for high expression of oncogenic microRNAs in advanced gastric carcinoma. *J Surg Oncol*. 2013;107(5):505-10.
240. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):330-8.
241. Boku N, Chin K, Hosokawa K, Ohtsu A, Tajiri H, Yoshida S, et al. Biological markers as a predictor for response and prognosis of unresectable gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil and cis-platinum. *Clin Cancer Res*. 1998;4(6):1469-74.
242. Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Groshen S, Cohen H, et al. Thymidylate synthase mRNA level in adenocarcinoma of the stomach: a predictor for primary tumor response and overall survival. *J Clin Oncol*. 1996;14(1):176-82.
243. Yeh KH, Shun CT, Chen CL, Lin JT, Lee WJ, Lee PH, et al. High expression of thymidylate synthase is associated with the drug resistance of gastric carcinoma to high dose 5-fluorouracil-based systemic chemotherapy. *Cancer*. 1998;82(9):1626-31.
244. Alexander HR, Grem JL, Hamilton JM, Pass HI, Hong M, Fraker DL, et al. Thymidylate synthase protein expression: Association with response to neoadjuvant chemotherapy and resection for locally advanced gastric and gastroesophageal adenocarcinoma. *Cancer J Sci Am*. 1995;1(1):49-54.

245. Liu XF, Zhang H, Sun JQ, Yin C, Liu TF, Yang H, et al. Correlation between expression of thymidylate synthase and clinical outcome of advanced gastric cancer treated with capecitabine alone chemotherapy. *Tumour Biol.* 2014;35(12):12409-14.
246. Suda Y, Kuwashima Y, Tanaka Y, Uchida K, Akazawa S. Immunohistochemical detection of thymidylate synthase in advanced gastric cancer: a prognostic indicator in patients undergoing gastrectomy followed by adjuvant chemotherapy with 5-fluoropyrimidines. *Anticancer Res.* 1999;19(1B):805-10.
247. Hua D, Huang ZH, Mao Y, Deng JZ. Thymidylate synthase and thymidine phosphorylase gene expression as predictive parameters for the efficacy of 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2007;13(37):5030-4.
248. Milano G, Etienne MC, Pierrefite V, Barberi-Heyob M, Deporte-Fety R, Renée N. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity. *Br J Cancer.* 1999;79(3-4):627-30.
249. Ezzeldin H, Diasio R. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency, a pharmacogenetic syndrome associated with potentially life-threatening toxicity following 5-fluorouracil administration. *Clin Colorectal Cancer.* 2004;4(3):181-9.
250. Scartozzi M, Bittoni A, Pistelli M, Galizia E, Berardi R, Giampieri R, et al. Toward molecularly selected chemotherapy for advanced gastric cancer: state of the art and future perspectives. *Cancer Treat Rev.* 2009;35(5):451-62.
251. Ajani JA, Rodriguez W, Bodoky G, Moiseyenko V, Lichinitser M, Gorbunova V, et al. Multicenter phase III comparison of cisplatin/S-1 with cisplatin/infusional fluorouracil in advanced gastric or gastroesophageal adenocarcinoma study: the FLAGS trial. *J Clin Oncol.* 2010;28(9):1547-53.
252. Shen XM, Zhou C, Lian L, Li LQ, Li W, Tao M. Relationship Between the DPD and TS mRNA Expression and the Response to S-1-Based Chemotherapy and Prognosis in Patients with Advanced Gastric Cancer. *Cell Biochem Biophys.* 2014.
253. Sasako M, Terashima M, Ichikawa W, Ochiai A, Kitada K, Kurahashi I, et al. Impact of the expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase genes on survival in stage II/III gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2015;18(3):538-48.

254. Ferreira P, Oliveira MJ, Beraldi E, Mateus AR, Nakajima T, Gleave M, et al. Loss of functional E-cadherin renders cells more resistant to the apoptotic agent taxol in vitro. *Exp Cell Res*. 2005;310(1):99-104.
255. Xin HW, Yang JH, Nguyen DM. Sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor requires E-cadherin in esophageal cancer and malignant pleural mesothelioma. *Anticancer Res*. 2013;33(6):2401-8.
256. Xing RC, Zheng J, Zheng WH, Qin ZP, Liu W, Yao RC. Relevance of E-cadherin expression to EGFR-TKI molecular targeted therapy sensitivity/resistance and its clinical significance. *Genet Mol Res*. 2015;14(2):5785-92.
257. Witta SE, Gemmill RM, Hirsch FR, Coldren CD, Hedman K, Ravdel L, et al. Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines. *Cancer Res*. 2006;66(2):944-50.
258. Witta SE, Dziadziuszko R, Yoshida K, Hedman K, Varella-Garcia M, Bunn PA, et al. ErbB-3 expression is associated with E-cadherin and their coexpression restores response to gefitinib in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol*. 2009;20(4):689-95.
259. Heindl S, Eggenstein E, Keller S, Kneissl J, Keller G, Mutze K, et al. Relevance of MET activation and genetic alterations of KRAS and E-cadherin for cetuximab sensitivity of gastric cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(5):843-58.
260. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2003;349(3):247-57.
261. Gulley ML. Genomic assays for Epstein-Barr virus-positive gastric adenocarcinoma. *Exp Mol Med*. 2015;47:e134.
262. Yamamoto H, Imai K. Microsatellite instability: an update. *Arch Toxicol*. 2015;89(6):899-921.
263. Rojo F, Tabernero J, Albanell J, Van Cutsem E, Ohtsu A, Doi T, et al. Pharmacodynamic studies of gefitinib in tumor biopsy specimens from patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(26):4309-16.

264. Han SW, Oh DY, Im SA, Park SR, Lee KW, Song HS, et al. Phase II study and biomarker analysis of cetuximab combined with modified FOLFOX6 in advanced gastric cancer. *Br J Cancer*. 2009;100(2):298-304.
265. Luber B, Deplazes J, Keller G, Walch A, Rauser S, Eichmann M, et al. Biomarker analysis of cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric and oesophago-gastric junction cancer: results from a phase II trial of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *BMC Cancer*. 2011;11:509.
266. Pirker R, Pereira JR, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, Park K, et al. EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol*. 2012;13(1):33-42.
267. Morishita A, Gong J, Masaki T. Targeting receptor tyrosine kinases in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(16):4536-45.
268. Waddell T, Chau I, Cunningham D, Gonzalez D, Okines AF, Frances A, et al. Epirubicin, oxaliplatin, and capecitabine with or without panitumumab for patients with previously untreated advanced oesophagogastric cancer (REAL3): a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(6):481-9.
269. Lordick F, Kang YK, Chung HC, Salman P, Oh SC, Bodoky G, et al. Capecitabine and cisplatin with or without cetuximab for patients with previously untreated advanced gastric cancer (EXPAND): a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(6):490-9.
270. Klapper LN, Waterman H, Sela M, Yarden Y. Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2. *Cancer Res*. 2000;60(13):3384-8.
271. Junttila TT, Akita RW, Parsons K, Fields C, Lewis Phillips GD, Friedman LS, et al. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell*. 2009;15(5):429-40.
272. Zhang S, Huang WC, Li P, Guo H, Poh SB, Brady SW, et al. Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nat Med*. 2011;17(4):461-9.

273. Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001;61(12):4744-9.
274. Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature.* 2002;416(6878):279-80.
275. Scartozzi M, Giampieri R, Del Prete M, Faloppi L, Bianconi M, Vincenzi B, et al. Selected gastrointestinal cancer presentations from the American Society of Clinical Oncology annual meeting 2013 in review: it is not about the destination, it is about the journey. *Expert Opin Pharmacother.* 2014;15(1):143-50.
276. Satoh T, Xu RH, Chung HC, Sun GP, Doi T, Xu JM, et al. Lapatinib plus paclitaxel versus paclitaxel alone in the second-line treatment of HER2-amplified advanced gastric cancer in Asian populations: TyTAN--a randomized, phase III study. *J Clin Oncol.* 2014;32(19):2039-49.
277. Shen K, Ma X, Zhu C, Wu X, Jia H. Safety and Efficacy of Trastuzumab Emtansine in Advanced Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: a Meta-analysis. *Sci Rep.* 2016;6:23262.
278. Barok M, Tanner M, Köninki K, Isola J. Trastuzumab-DM1 is highly effective in preclinical models of HER2-positive gastric cancer. *Cancer Lett.* 2011;306(2):171-9.
279. Yoon-Koo Kang MAS, Atsushi Ohtsu, Eric Van Cutsem, Jaffer A. Ajani, Tina van der Horst, Marie-Laurence Harle-Yge, Yongzhe Piao, Betsy Althaus and Peter C. Thuss-Patience. A randomized, open-label, multicenter, adaptive phase 2/3 study of trastuzumab emtansine (T-DM1) versus a taxane (TAX) in patients (pts) with previously treated HER2-positive locally advanced or metastatic gastric/gastroesophageal junction adenocarcinoma (LA/MGC/GEJC) [abstract]. *Journal of Clinical Oncology* 2016;34 (Suppl 4s, abstract 5).
280. Baselga J, Cortés J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(2):109-19.

281. Swain SM, Kim SB, Cortés J, Ro J, Semiglazov V, Campone M, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2013;14(6):461-71.
282. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Roman L, Tseng LM, Liu MC, et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(1):25-32.
283. Varadan V, Sandoval M, Harris LN. Biomarkers for Predicting Response to Anti-HER2 Agents. *Adv Exp Med Biol.* 2016;882:155-67.
284. De P, Hasmann M, Leyland-Jones B. Molecular determinants of trastuzumab efficacy: What is their clinical relevance? *Cancer Treat Rev.* 2013;39(8):925-34.
285. Gagliato DM, Jardim DL, Marchesi MS, Hortobagyi GN. Mechanisms of resistance and sensitivity to anti-HER2 therapies in HER2+ breast cancer. *Oncotarget.* 2016.
286. Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J, Guzman M, Cortes J, et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(8):628-38.
287. Nagy P, Friedländer E, Tanner M, Kapanen AI, Carraway KL, Isola J, et al. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res.* 2005;65(2):473-82.
288. Alimandi M, Romano A, Curia MC, Muraro R, Fedi P, Aaronson SA, et al. Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene.* 1995;10(9):1813-21.
289. Gori S, Sidoni A, Colozza M, Ferri I, Mameli MG, Fenocchio D, et al. EGFR, pMAPK, pAkt and PTEN status by immunohistochemistry: correlation with clinical outcome in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab. *Ann Oncol.* 2009;20(4):648-54.

290. Gallardo A, Lerma E, Escuin D, Tibau A, Muñoz J, Ojeda B, et al. Increased signalling of EGFR and IGF1R, and deregulation of PTEN/PI3K/Akt pathway are related with trastuzumab resistance in HER2 breast carcinomas. *Br J Cancer*. 2012;106(8):1367-73.
291. Browne BC, Crown J, Venkatesan N, Duffy MJ, Clynes M, Slamon D, et al. Inhibition of IGF1R activity enhances response to trastuzumab in HER-2-positive breast cancer cells. *Ann Oncol*. 2011;22(1):68-73.
292. Nahta R, Yuan LX, Zhang B, Kobayashi R, Esteva FJ. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res*. 2005;65(23):11118-28.
293. Agarwal S, Zerillo C, Kolmakova J, Christensen JG, Harris LN, Rimm DL, et al. Association of constitutively activated hepatocyte growth factor receptor (Met) with resistance to a dual EGFR/Her2 inhibitor in non-small-cell lung cancer cells. *Br J Cancer*. 2009;100(6):941-9.
294. Minuti G, Cappuzzo F, Duchnowska R, Jassem J, Fabi A, O'Brien T, et al. Increased MET and HGF gene copy numbers are associated with trastuzumab failure in HER2-positive metastatic breast cancer. *Br J Cancer*. 2012;107(5):793-9.
295. Wang Y, Liu Y, Du Y, Yin W, Lu J. The predictive role of phosphatase and tensin homolog (PTEN) loss, phosphoinositol-3 (PI3) kinase (PIK3CA) mutation, and PI3K pathway activation in sensitivity to trastuzumab in HER2-positive breast cancer: a meta-analysis. *Curr Med Res Opin*. 2013;29(6):633-42.
296. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*. 2004;6(2):117-27.
297. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*. 2007;12(4):395-402.
298. Baselga J, Cortés J, Im SA, Clark E, Ross G, Kiermaier A, et al. Biomarker analyses in CLEOPATRA: a phase III, placebo-controlled study of pertuzumab in human

epidermal growth factor receptor 2-positive, first-line metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2014;32(33):3753-61.

299. Mukohara T. PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2015;7:111-23.

300. Zuo Q, Liu J, Zhang J, Wu M, Guo L, Liao W. Development of trastuzumab-resistant human gastric carcinoma cell lines and mechanisms of drug resistance. *Sci Rep*. 2015;5:11634.

301. Sukawa Y, Yamamoto H, Nosho K, Ito M, Igarashi H, Naito T, et al. HER2 expression and PI3K-Akt pathway alterations in gastric cancer. *Digestion*. 2014;89(1):12-7.

302. Lee JY, Hong M, Kim ST, Park SH, Kang WK, Kim KM, et al. The impact of concomitant genomic alterations on treatment outcome for trastuzumab therapy in HER2-positive gastric cancer. *Sci Rep*. 2015;5:9289.

303. Zhang X, Park JS, Park KH, Kim KH, Jung M, Chung HC, et al. PTEN deficiency as a predictive biomarker of resistance to HER2-targeted therapy in advanced gastric cancer. *Oncology*. 2015;88(2):76-85.

304. Singh SS, Yap WN, Arfuso F, Kar S, Wang C, Cai W, et al. Targeting the PI3K/Akt signaling pathway in gastric carcinoma: A reality for personalized medicine? *World J Gastroenterol*. 2015;21(43):12261-73.

305. Oliveira C, Pinto M, Duval A, Brennetot C, Domingo E, Espín E, et al. BRAF mutations characterize colon but not gastric cancer with mismatch repair deficiency. *Oncogene*. 2003;22(57):9192-6.

306. Brennetot C, Duval A, Hamelin R, Pinto M, Oliveira C, Seruca R, et al. Frequent Ki-ras mutations in gastric tumors of the MSI phenotype. *Gastroenterology*. 2003;125(4):1282.

307. Queirós P, Pinheiro H, Carvalho J, Oliveira P, Gullo I, Carneiro F, et al. KRAS mutations in microsatellite instable gastric tumours: impact of targeted treatment and intratumoural heterogeneity. *Virchows Arch*. 2015;467(4):383-92.

308. Erber R, Thurnher A, Katsen AD, Groth G, Kerger H, Hammes HP, et al. Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J*. 2004;18(2):338-40.
309. Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, et al. Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell*. 2007;131(3):463-75.
310. Bang YJ, Kang YK, Kang WK, Boku N, Chung HC, Chen JS, et al. Phase II study of sunitinib as second-line treatment for advanced gastric cancer. *Invest New Drugs*. 2011;29(6):1449-58.
311. Sun W, Powell M, O'Dwyer PJ, Catalano P, Ansari RH, Benson AB. Phase II study of sorafenib in combination with docetaxel and cisplatin in the treatment of metastatic or advanced gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma: ECOG 5203. *J Clin Oncol*. 2010;28(18):2947-51.
312. Xie L, Su X, Zhang L, Yin X, Tang L, Zhang X, et al. FGFR2 gene amplification in gastric cancer predicts sensitivity to the selective FGFR inhibitor AZD4547. *Clin Cancer Res*. 2013;19(9):2572-83.
313. Iveson T, Donehower RC, Davidenko I, Tjulandin S, Deptala A, Harrison M, et al. Rilotumumab in combination with epirubicin, cisplatin, and capecitabine as first-line treatment for gastric or oesophagogastric junction adenocarcinoma: an open-label, dose de-escalation phase 1b study and a double-blind, randomised phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2014;15(9):1007-18.
314. Doshi S, Gisleskog PO, Zhang Y, Zhu M, Oliner KS, Loh E, et al. Rilotumumab exposure-response relationship in patients with advanced or metastatic gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(11):2453-61.
315. Zhu M, Tang R, Doshi S, Oliner KS, Dubey S, Jiang Y, et al. Exposure-response analysis of rilotumumab in gastric cancer: the role of tumour MET expression. *Br J Cancer*. 2015;112(3):429-37.

316. Shah MA, Wainberg ZA, Catenacci DV, Hochster HS, Ford J, Kunz P, et al. Phase II study evaluating 2 dosing schedules of oral foretinib (GSK1363089), cMET/VEGFR2 inhibitor, in patients with metastatic gastric cancer. *PLoS One*. 2013;8(3):e54014.
317. Shah MA, Bang Y-J, Lordick F, Tabernero J, Chen M, Hack SP, et al., editors. METGastric: A phase III study of onartuzumab plus mFOLFOX6 in patients with metastatic HER2-negative (HER2-) and MET-positive (MET+) adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction (GEC)2015.
318. Eunice Lee Kwak PL, Omid Hamid, Filip Janku, Muaiad Kittaneh, Daniel Virgil Thomas Catenacci et al. Clinical activity of AMG 337, an oral MET kinase inhibitor, in adult patients (pts) with MET-amplified gastroesophageal junction (GEJ), gastric (G), or esophageal (E) cancer. *J Clin Oncol* 2015, 33 (suppl 3; abstract 1).
319. Ying J, Xu Q, Liu B, Zhang G, Chen L, Pan H. The expression of the PI3K/AKT/mTOR pathway in gastric cancer and its role in gastric cancer prognosis. *Onco Targets Ther*. 2015;8:2427-33.
320. Ohtsu A, Ajani JA, Bai YX, Bang YJ, Chung HC, Pan HM, et al. Everolimus for previously treated advanced gastric cancer: results of the randomized, double-blind, phase III GRANITE-1 study. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3935-43.
321. Markman B, Dienstmann R, Tabernero J. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway--beyond rapalogs. *Oncotarget*. 2010;1(7):530-43.
322. Markman B, Tao JJ, Scaltriti M. PI3K pathway inhibitors: better not left alone. *Curr Pharm Des*. 2013;19(5):895-906.
323. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515(7528):563-7.
324. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2443-54.
325. Homet Moreno B, Parisi G, Robert L, Ribas A. Anti-PD-1 therapy in melanoma. *Semin Oncol*. 2015;42(3):466-73.

326. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(21):2018-28.
327. Expanding the Reach of Anti-PD-1 Therapy. *Cancer Discov.* 2015;5(7):684-5.
328. Weber JS, Kudchadkar RR, Yu B, Gallenstein D, Horak CE, Inzunza HD, et al. Safety, efficacy, and biomarkers of nivolumab with vaccine in ipilimumab-refractory or -naive melanoma. *J Clin Oncol.* 2013;31(34):4311-8.
329. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(2):123-35.
330. Freidin MB, Bhudia N, Lim E, Nicholson AG, Cookson WO, Moffatt MF. Impact of collection and storage of lung tumor tissue on whole genome expression profiling. *J Mol Diagn.* 2012;14(2):140-8.
331. Hölscher AH, Drebber U, Mönig SP, Schulte C, Vallböhmer D, Bollschweiler E. Early gastric cancer: lymph node metastasis starts with deep mucosal infiltration. *Ann Surg.* 2009;250(5):791-7.
332. Bollschweiler E, Boettcher K, Hoelscher AH, Sasako M, Kinoshita T, Maruyama K, et al. Is the prognosis for Japanese and German patients with gastric cancer really different? *Cancer.* 1993;71(10):2918-25.
333. Noguchi Y, Yoshikawa T, Tsuburaya A, Motohashi H, Karpeh MS, Brennan MF. Is gastric carcinoma different between Japan and the United States? *Cancer.* 2000;89(11):2237-46.
334. Sano T, Katai H, Sasako M, Maruyama K. The management of early gastric cancer. *Surg Oncol.* 2000;9(1):17-22.
335. Nieminen A, Kokkola A, Ylä-Liedenpohja J, Louhimo J, Mustonen H, Puolakkainen P. Early gastric cancer: clinical characteristics and results of surgery. *Dig Surg.* 2009;26(5):378-83.
336. Bennett C, Wang Y, Pan T. Endoscopic mucosal resection for early gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009(4):CD004276.

337. Kim JJ, Lee JH, Jung HY, Lee GH, Cho JY, Ryu CB, et al. EMR for early gastric cancer in Korea: a multicenter retrospective study. *Gastrointest Endosc.* 2007;66(4):693-700.
338. Othman MO, Wallace MB. Endoscopic mucosal resection (EMR) and endoscopic submucosal dissection (ESD) in 2011, a Western perspective. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2011;35(4):288-94.
339. Manner H, Rabenstein T, May A, Pech O, Gossner L, Werk D, et al. Long-term results of endoscopic resection in early gastric cancer: the Western experience. *Am J Gastroenterol.* 2009;104(3):566-73.
340. Maruyama K, Sasako M, Kinoshita T, Sano T, Katai H. Surgical treatment for gastric cancer: the Japanese approach. *Semin Oncol.* 1996;23(3):360-8.
341. Gouzi JL, Huguier M, Fagniez PL, Launois B, Flamant Y, Lacaine F, et al. Total versus subtotal gastrectomy for adenocarcinoma of the gastric antrum. A French prospective controlled study. *Ann Surg.* 1989;209(2):162-6.
342. Bozzetti F, Marubini E, Bonfanti G, Miceli R, Piano C, Gennari L. Subtotal versus total gastrectomy for gastric cancer: five-year survival rates in a multicenter randomized Italian trial. Italian Gastrointestinal Tumor Study Group. *Ann Surg.* 1999;230(2):170-8.
343. Nakajima T. Gastric cancer treatment guidelines in Japan. *Gastric Cancer.* 2002;5(1):1-5.
344. Kitano S, Shiraishi N, Fujii K, Yasuda K, Inomata M, Adachi Y. A randomized controlled trial comparing open vs laparoscopy-assisted distal gastrectomy for the treatment of early gastric cancer: an interim report. *Surgery.* 2002;131(1 Suppl):S306-11.
345. Lee JH, Han HS. A prospective randomized study comparing open vs laparoscopy-assisted distal gastrectomy in early gastric cancer: early results. *Surg Endosc.* 2005;19(2):168-73.
346. Kim YW, Baik YH, Yun YH, Nam BH, Kim DH, Choi IJ, et al. Improved quality of life outcomes after laparoscopy-assisted distal gastrectomy for early gastric cancer: results of a prospective randomized clinical trial. *Ann Surg.* 2008;248(5):721-7.

347. Chen K, Pan Y, Cai JQ, Xu XW, Wu D, Mou YP. Totally laparoscopic gastrectomy for gastric cancer: a systematic review and meta-analysis of outcomes compared with open surgery. *World J Gastroenterol.* 2014;20(42):15867-78.
348. de Steur WO, Dikken JL, Hartgrink HH. Lymph node dissection in resectable advanced gastric cancer. *Dig Surg.* 2013;30(2):96-103.
349. Wu CW, Hsiung CA, Lo SS, Hsieh MC, Chen JH, Li AF, et al. Nodal dissection for patients with gastric cancer: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2006;7(4):309-15.
350. Dent DM, Madden MV, Price SK. Randomized comparison of R1 and R2 gastrectomy for gastric carcinoma. *Br J Surg.* 1988;75(2):110-2.
351. Robertson CS, Chung SC, Woods SD, Griffin SM, Raimes SA, Lau JT, et al. A prospective randomized trial comparing R1 subtotal gastrectomy with R3 total gastrectomy for antral cancer. *Ann Surg.* 1994;220(2):176-82.
352. Cuschieri A, Fayers P, Fielding J, Craven J, Bancewicz J, Joypaul V, et al. Postoperative morbidity and mortality after D1 and D2 resections for gastric cancer: preliminary results of the MRC randomised controlled surgical trial. The Surgical Cooperative Group. *Lancet.* 1996;347(9007):995-9.
353. Bonenkamp JJ, Songun I, Hermans J, Sasako M, Welvaart K, Plukker JT, et al. Randomised comparison of morbidity after D1 and D2 dissection for gastric cancer in 996 Dutch patients. *Lancet.* 1995;345(8952):745-8.
354. Hartgrink HH, van de Velde CJ, Putter H, Bonenkamp JJ, Klein Kranenbarg E, Songun I, et al. Extended lymph node dissection for gastric cancer: who may benefit? Final results of the randomized Dutch gastric cancer group trial. *J Clin Oncol.* 2004;22(11):2069-77.
355. Roukos DH, Lorenz M, Encke A. Evidence of survival benefit of extended (D2) lymphadenectomy in western patients with gastric cancer based on a new concept: a prospective long-term follow-up study. *Surgery.* 1998;123(5):573-8.
356. Brennan MF. Lymph-node dissection for gastric cancer. *N Engl J Med.* 1999;340(12):956-8.

357. Mocellin S, McCulloch P, Kazi H, Gama-Rodrigues JJ, Yuan Y, Nitti D. Extent of lymph node dissection for adenocarcinoma of the stomach. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;8:CD001964.
358. Galizia G, Lieto E, De Vita F, Castellano P, Ferraraccio F, Zamboli A, et al. Modified versus standard D2 lymphadenectomy in total gastrectomy for nonjunctional gastric carcinoma with lymph node metastasis. *Surgery.* 2015;157(2):285-96.
359. Rougier P, Lasser P, Ducreux M, Mahjoubi M, Bognel C, Elias D. Preoperative chemotherapy of locally advanced gastric cancer. *Ann Oncol.* 1994;5 Suppl 3:59-68.
360. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJ, Nicolson M, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(1):11-20.
361. Ychou M, Boige V, Pignon JP, Conroy T, Bouché O, Lebreton G, et al. Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial. *J Clin Oncol.* 2011;29(13):1715-21.
362. De Vita F, Giuliani F, Orditura M, Maiello E, Galizia G, Di Martino N, et al. Adjuvant chemotherapy with epirubicin, leucovorin, 5-fluorouracil and etoposide regimen in resected gastric cancer patients: a randomized phase III trial by the Gruppo Oncologico Italia Meridionale (GOIM 9602 Study). *Ann Oncol.* 2007;18(8):1354-8.
363. Cascinu S, Labianca R, Barone C, Santoro A, Carnaghi C, Cassano A, et al. Adjuvant treatment of high-risk, radically resected gastric cancer patients with 5-fluorouracil, leucovorin, cisplatin, and epidoxorubicin in a randomized controlled trial. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(8):601-7.
364. Bouché O, Ychou M, Burtin P, Bedenne L, Ducreux M, Lebreton G, et al. Adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil and cisplatin compared with surgery alone for gastric cancer: 7-year results of the FFCD randomized phase III trial (8801). *Ann Oncol.* 2005;16(9):1488-97.
365. Sakuramoto S, Sasako M, Yamaguchi T, Kinoshita T, Fujii M, Nashimoto A, et al. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. *N Engl J Med.* 2007;357(18):1810-20.

366. Bang YJ, Kim YW, Yang HK, Chung HC, Park YK, Lee KH, et al. Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): a phase 3 open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2012;379(9813):315-21.
367. Noh SH, Park SR, Yang HK, Chung HC, Chung IJ, Kim SW, et al. Adjuvant capecitabine plus oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): 5-year follow-up of an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(12):1389-96.
368. Diaz-Nieto R, Orti-Rodríguez R, Winslet M. Post-surgical chemotherapy versus surgery alone for resectable gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;9:CD008415.
369. Paoletti X, Oba K, Burzykowski T, Michiels S, Ohashi Y, Pignon JP, et al. Benefit of adjuvant chemotherapy for resectable gastric cancer: a meta-analysis. *JAMA*. 2010;303(17):1729-37.
370. Sun P, Xiang JB, Chen ZY. Meta-analysis of adjuvant chemotherapy after radical surgery for advanced gastric cancer. *Br J Surg*. 2009;96(1):26-33.
371. Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann GN, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med*. 2001;345(10):725-30.
372. Smalley SR, Benedetti JK, Haller DG, Hundahl SA, Estes NC, Ajani JA, et al. Updated analysis of SWOG-directed intergroup study 0116: a phase III trial of adjuvant radiochemotherapy versus observation after curative gastric cancer resection. *J Clin Oncol*. 2012;30(19):2327-33.
373. Lee J, Lim dH, Kim S, Park SH, Park JO, Park YS, et al. Phase III trial comparing capecitabine plus cisplatin versus capecitabine plus cisplatin with concurrent capecitabine radiotherapy in completely resected gastric cancer with D2 lymph node dissection: the ARTIST trial. *J Clin Oncol*. 2012;30(3):268-73.
374. D'Angelica M, Gonen M, Brennan MF, Turnbull AD, Bains M, Karpeh MS. Patterns of initial recurrence in completely resected gastric adenocarcinoma. *Ann Surg*. 2004;240(5):808-16.

375. Murad AM, Santiago FF, Petroianu A, Rocha PR, Rodrigues MA, Rausch M. Modified therapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and methotrexate in advanced gastric cancer. *Cancer*. 1993;72(1):37-41.
376. Glimelius B, Ekström K, Hoffman K, Graf W, Sjöden PO, Haglund U, et al. Randomized comparison between chemotherapy plus best supportive care with best supportive care in advanced gastric cancer. *Ann Oncol*. 1997;8(2):163-8.
377. Wagner AD, Grothe W, Haerting J, Kleber G, Grothey A, Fleig WE. Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data. *J Clin Oncol*. 2006;24(18):2903-9.
378. Wagner AD, Unverzagt S, Grothe W, Kleber G, Grothey A, Haerting J, et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010(3):CD004064.
379. Ezdinli EZ, Gelber R, Desai DV, Falkson G, Moertel CG, Hahn RG. Chemotherapy of advanced esophageal carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group experience. *Cancer*. 1980;46(10):2149-53.
380. Whittington RM, Close HP. Clinical experience with mitomycin C (NSC-26980). *Cancer Chemother Rep*. 1970;54(3):195-8.
381. Beer M, Cocconi G, Ceci G, Varini M, Cavalli F. A phase II study of cisplatin in advanced gastric cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1983;19(6):717-20.
382. Alberts AS, Schoeman L, Burger W, Greef F, Falkson G. A phase II study of 5-fluorouracil and leucovorin in advanced carcinoma of the esophagus. *Am J Clin Oncol*. 1992;15(1):35-6.
383. Study of the clinical efficiency of bleomycin in human cancer. *Br Med J*. 1970;2(5710):643-5.
384. Ilson DH, Wadleigh RG, Leichman LP, Kelsen DP. Paclitaxel given by a weekly 1-h infusion in advanced esophageal cancer. *Ann Oncol*. 2007;18(5):898-902.
385. Einzig AI, Neuberg D, Remick SC, Karp DD, O'Dwyer PJ, Stewart JA, et al. Phase II trial of docetaxel (Taxotere) in patients with adenocarcinoma of the upper gastrointestinal tract previously untreated with cytotoxic chemotherapy: the Eastern

Cooperative Oncology Group (ECOG) results of protocol E1293. *Med Oncol.* 1996;13(2):87-93.

386. Köhne CH, Catane R, Klein B, Ducreux M, Thuss-Patience P, Niederle N, et al. Irinotecan is active in chemo-naïve patients with metastatic gastric cancer: a phase II multicentric trial. *Br J Cancer.* 2003;89(6):997-1001.

387. Kulke MH, Muzikansky A, Clark J, Enzinger PC, Fidias P, Kinsella K, et al. A Phase II trial of vinorelbine in patients with advanced gastroesophageal adenocarcinoma. *Cancer Invest.* 2006;24(4):346-50.

388. Hong YS, Song SY, Lee SI, Chung HC, Choi SH, Noh SH, et al. A phase II trial of capecitabine in previously untreated patients with advanced and/or metastatic gastric cancer. *Ann Oncol.* 2004;15(9):1344-7.

389. Lee JL, Kang YK, Kang HJ, Lee KH, Zang DY, Ryou BY, et al. A randomised multicentre phase II trial of capecitabine vs S-1 as first-line treatment in elderly patients with metastatic or recurrent unresectable gastric cancer. *Br J Cancer.* 2008;99(4):584-90.

390. Levi JA, Fox RM, Tattersall MH, Woods RL, Thomson D, Gill G. Analysis of a prospectively randomized comparison of doxorubicin versus 5-fluorouracil, doxorubicin, and BCNU in advanced gastric cancer: implications for future studies. *J Clin Oncol.* 1986;4(9):1348-55.

391. Douglass HO, Lavin PT, Goudsmit A, Klaassen DJ, Paul AR. An Eastern Cooperative Oncology Group evaluation of combinations of methyl-CCNU, mitomycin C, Adriamycin, and 5-fluorouracil in advanced measurable gastric cancer (EST 2277). *J Clin Oncol.* 1984;2(12):1372-81.

392. Wils JA, Klein HO, Wagener DJ, Bleiberg H, Reis H, Korsten F, et al. Sequential high-dose methotrexate and fluorouracil combined with doxorubicin--a step ahead in the treatment of advanced gastric cancer: a trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Tract Cooperative Group. *J Clin Oncol.* 1991;9(5):827-31.

393. Wilke H, Preusser P, Fink U, Achterrath W, Meyer HJ, Stahl M, et al. New developments in the treatment of gastric carcinoma. *Semin Oncol.* 1990;17(1 Suppl 2):61-70.

394. Findlay M, Cunningham D, Norman A, Mansi J, Nicolson M, Hickish T, et al. A phase II study in advanced gastro-esophageal cancer using epirubicin and cisplatin in combination with continuous infusion 5-fluorouracil (ECF). *Ann Oncol.* 1994;5(7):609-16.
395. Kim NK, Park YS, Heo DS, Suh C, Kim SY, Park KC, et al. A phase III randomized study of 5-fluorouracil and cisplatin versus 5-fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin C versus 5-fluorouracil alone in the treatment of advanced gastric cancer. *Cancer.* 1993;71(12):3813-8.
396. Vanhoefer U, Rougier P, Wilke H, Ducreux MP, Lacave AJ, Van Cutsem E, et al. Final results of a randomized phase III trial of sequential high-dose methotrexate, fluorouracil, and doxorubicin versus etoposide, leucovorin, and fluorouracil versus infusional fluorouracil and cisplatin in advanced gastric cancer: A trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Tract Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol.* 2000;18(14):2648-57.
397. Webb A, Cunningham D, Scarffe JH, Harper P, Norman A, Joffe JK, et al. Randomized trial comparing epirubicin, cisplatin, and fluorouracil versus fluorouracil, doxorubicin, and methotrexate in advanced esophagogastric cancer. *J Clin Oncol.* 1997;15(1):261-7.
398. Cunningham D, Starling N, Rao S, Iveson T, Nicolson M, Coxon F, et al. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. *N Engl J Med.* 2008;358(1):36-46.
399. Kang YK, Kang WK, Shin DB, Chen J, Xiong J, Wang J, et al. Capecitabine/cisplatin versus 5-fluorouracil/cisplatin as first-line therapy in patients with advanced gastric cancer: a randomised phase III noninferiority trial. *Ann Oncol.* 2009;20(4):666-73.
400. Kollmannsberger C, Quietzsch D, Haag C, Lingenfelser T, Schroeder M, Hartmann JT, et al. A phase II study of paclitaxel, weekly, 24-hour continuous infusion 5-fluorouracil, folinic acid and cisplatin in patients with advanced gastric cancer. *Br J Cancer.* 2000;83(4):458-62.

401. Gadgeel SM, Shields AF, Heilbrun LK, Labadidi S, Zalupski M, Chaplen R, et al. Phase II study of paclitaxel and carboplatin in patients with advanced gastric cancer. *Am J Clin Oncol*. 2003;26(1):37-41.
402. Ajani JA, Fodor MB, Tjulandin SA, Moiseyenko VM, Chao Y, Cabral Filho S, et al. Phase II multi-institutional randomized trial of docetaxel plus cisplatin with or without fluorouracil in patients with untreated, advanced gastric, or gastroesophageal adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2005;23(24):5660-7.
403. Ajani JA, Moiseyenko VM, Tjulandin S, Majlis A, Constenla M, Boni C, et al. Clinical benefit with docetaxel plus fluorouracil and cisplatin compared with cisplatin and fluorouracil in a phase III trial of advanced gastric or gastroesophageal cancer adenocarcinoma: the V-325 Study Group. *J Clin Oncol*. 2007;25(22):3205-9.
404. Roth AD, Fazio N, Stupp R, Falk S, Bernhard J, Saletti P, et al. Docetaxel, cisplatin, and fluorouracil; docetaxel and cisplatin; and epirubicin, cisplatin, and fluorouracil as systemic treatment for advanced gastric carcinoma: a randomized phase II trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research. *J Clin Oncol*. 2007;25(22):3217-23.
405. Ajani JA, Faust J, Ikeda K, Yao JC, Anbe H, Carr KL, et al. Phase I pharmacokinetic study of S-1 plus cisplatin in patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin Oncol*. 2005;23(28):6957-65.
406. Koizumi W, Narahara H, Hara T, Takagane A, Akiya T, Takagi M, et al. S-1 plus cisplatin versus S-1 alone for first-line treatment of advanced gastric cancer (SPIRITS trial): a phase III trial. *Lancet Oncol*. 2008;9(3):215-21.
407. Ajani JA, Lee FC, Singh DA, Haller DG, Lenz HJ, Benson AB, et al. Multicenter phase II trial of S-1 plus cisplatin in patients with untreated advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(4):663-7.
408. Lenz HJ, Lee FC, Haller DG, Singh D, Benson AB, Strumberg D, et al. Extended safety and efficacy data on S-1 plus cisplatin in patients with untreated, advanced gastric carcinoma in a multicenter phase II study. *Cancer*. 2007;109(1):33-40.

409. Polyzos A, Tsavaris N, Kosmas C, Polyzos K, Giannopoulos A, Felekouras E, et al. Subsets of patients with advanced gastric cancer responding to second-line chemotherapy with docetaxel-cisplatin. *Anticancer Res.* 2006;26(5B):3749-53.
410. Kodera Y, Ito S, Mochizuki Y, Fujitake S, Koshikawa K, Kanyama Y, et al. A phase II study of weekly paclitaxel as second-line chemotherapy for advanced gastric Cancer (CCOG0302 study). *Anticancer Res.* 2007;27(4C):2667-71.
411. Wilson D, Hiller L, Geh JI. Review of second-line chemotherapy for advanced gastric adenocarcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2005;17(2):81-90.
412. Iacovelli R, Pietrantonio F, Farcomeni A, Maggi C, Palazzo A, Ricchini F, et al. Chemotherapy or targeted therapy as second-line treatment of advanced gastric cancer. A systematic review and meta-analysis of published studies. *PLoS One.* 2014;9(9):e108940.
413. Martinelli E, De Palma R, Orditura M, De Vita F, Ciardiello F. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clin Exp Immunol.* 2009;158(1):1-9.
414. Saltz LB, Lenz HJ, Kindler HL, Hochster HS, Wadler S, Hoff PM, et al. Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: the BOND-2 study. *J Clin Oncol.* 2007;25(29):4557-61.
415. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2008;359(11):1116-27.
416. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009;360(14):1408-17.
417. Moehler M, Mueller A, Trarbach T, Lordick F, Seufferlein T, Kubicka S, et al. Cetuximab with irinotecan, folinic acid and 5-fluorouracil as first-line treatment in advanced gastroesophageal cancer: a prospective multi-center biomarker-oriented phase II study. *Ann Oncol.* 2011;22(6):1358-66.

418. Park SR, Kook MC, Choi IJ, Kim CG, Lee JY, Cho SJ, et al. Predictive factors for the efficacy of cetuximab plus chemotherapy as salvage therapy in metastatic gastric cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;65(3):579-87.
419. Dragovich T, McCoy S, Fenoglio-Preiser CM, Wang J, Benedetti JK, Baker AF, et al. Phase II trial of erlotinib in gastroesophageal junction and gastric adenocarcinomas: SWOG 0127. *J Clin Oncol.* 2006;24(30):4922-7.
420. Dutton SJ, Ferry DR, Blazeby JM, Abbas H, Dahle-Smith A, Mansoor W, et al. Gefitinib for oesophageal cancer progressing after chemotherapy (COG): a phase 3, multicentre, double-blind, placebo-controlled randomised trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(8):894-904.
421. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(26):2733-43.
422. Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2003;9(7):1421-6.
423. Kothari N, Almhanna K. Current status of novel agents in advanced gastroesophageal adenocarcinoma. *J Gastrointest Oncol.* 2015;6(1):60-74.
424. Shah MA, Ramanathan RK, Ilson DH, Levnor A, D'Adamo D, O'Reilly E, et al. Multicenter phase II study of irinotecan, cisplatin, and bevacizumab in patients with metastatic gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(33):5201-6.
425. Shah MA, Jhaver M, Ilson DH, Lefkowitz RA, Robinson E, Capanu M, et al. Phase II study of modified docetaxel, cisplatin, and fluorouracil with bevacizumab in patients with metastatic gastroesophageal adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2011;29(7):868-74.
426. Shen L, Li J, Xu J, Pan H, Dai G, Qin S, et al. Bevacizumab plus capecitabine and cisplatin in Chinese patients with inoperable locally advanced or metastatic gastric or gastroesophageal junction cancer: randomized, double-blind, phase III study (AVATAR study). *Gastric Cancer.* 2015;18(1):168-76.

427. Yi JH, Lee J, Park SH, Park JO, Yim DS, Park YS, et al. Randomised phase II trial of docetaxel and sunitinib in patients with metastatic gastric cancer who were previously treated with fluoropyrimidine and platinum. *Br J Cancer*. 2012;106(9):1469-74.
428. Martin-Richard M, Gallego R, Pericay C, Garcia Foncillas J, Queralt B, Casado E, et al. Multicenter phase II study of oxaliplatin and sorafenib in advanced gastric adenocarcinoma after failure of cisplatin and fluoropyrimidine treatment. A GEMCAD study. *Invest New Drugs*. 2013;31(6):1573-9.
429. Pavlakis N, Sjoquist KM, Tsobanis E, Martin A, Kang Y, Bang Y, et al. INTEGRATE: A randomized phase II double-blind placebo-controlled study of regorafenib in refractory advanced esophagogastric cancer (AOGC)—A study by the Australasian Gastrointestinal Trials Group (AGITG). *J Clin Oncol*. 2013;31(15 Suppl).
430. Takeda M, Arao T, Yokote H, Komatsu T, Yanagihara K, Sasaki H, et al. AZD2171 shows potent antitumor activity against gastric cancer over-expressing fibroblast growth factor receptor 2/keratinocyte growth factor receptor. *Clin Cancer Res*. 2007;13(10):3051-7.
431. Xie L, Su X, Zhang D, Tang L, Xu J, Wang M, et al. AZD4547, a potent and selective inhibitor of FGF-receptor tyrosine kinases 1, 2 and 3, inhibits the growth of FGF-receptor 2 driven gastric cancer models in vitro and in vivo. *Cancer Research*. 2011;71(8 Supplement):1643-.
432. Smyth EC, Turner NC, Peckitt C, Pearson A, Brown G, Chua S, et al., editors. Phase II multicenter proof of concept study of AZD4547 in FGFR amplified tumours2015.
433. Cunningham D, Tebbutt NC, Davidenko I, Murad AM, Al-Batran S-E, Ilson DH, et al., editors. Phase III, randomized, double-blind, multicenter, placebo (P)-controlled trial of rilotumumab (R) plus epirubicin, cisplatin and capecitabine (ECX) as first-line therapy in patients (pts) with advanced MET-positive (pos) gastric or gastroesophageal junction (G/GEJ) cancer: RILOMET-1 study2015.

434. Doi T, Muro K, Boku N, Yamada Y, Nishina T, Takiuchi H, et al. Multicenter phase II study of everolimus in patients with previously treated metastatic gastric cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(11):1904-10.
435. Lin J, Sampath D, Nannini MA, Lee BB, Degtyarev M, Oeh J, et al. Targeting activated Akt with GDC-0068, a novel selective Akt inhibitor that is efficacious in multiple tumor models. *Clin Cancer Res*. 2013;19(7):1760-72.
436. Foulstone E, Prince S, Zaccheo O, Burns JL, Harper J, Jacobs C, et al. Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer. *J Pathol*. 2005;205(2):145-53.
437. Matsubara J, Yamada Y, Nakajima TE, Kato K, Hamaguchi T, Shirao K, et al. Clinical significance of insulin-like growth factor type 1 receptor and epidermal growth factor receptor in patients with advanced gastric cancer. *Oncology*. 2008;74(1-2):76-83.
438. Bang YJ, Im SA, Lee KW, Cho JY, Song EK, Lee KH, et al. Randomized, Double-Blind Phase II Trial With Prospective Classification by ATM Protein Level to Evaluate the Efficacy and Tolerability of Olaparib Plus Paclitaxel in Patients With Recurrent or Metastatic Gastric Cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(33):3858-65.
439. Thomas JP, Tutsch KD, Cleary JF, Bailey HH, Arzoomanian R, Alberti D, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2002;50(6):465-72.
440. Rathkopf D, Dickson MA, Feldman DR, Carvajal RD, Shah MA, Wu N, et al. Phase I study of flavopiridol with oxaliplatin and fluorouracil/leucovorin in advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2009;15(23):7405-11.
441. Dickson MA, Shah MA, Rathkopf D, Tse A, Carvajal RD, Wu N, et al. A phase I clinical trial of FOLFIRI in combination with the pan-cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor flavopiridol. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;66(6):1113-21.
442. Nomura H, Sato H, Seiki M, Mai M, Okada Y. Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Res*. 1995;55(15):3263-6.

443. Mönig SP, Baldus SE, Hennecken JK, Spiecker DB, Grass G, Schneider PM, et al. Expression of MMP-2 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Histopathology*. 2001;39(6):597-602.
444. Bramhall SR, Hallissey MT, Whiting J, Scholefield J, Tierney G, Stuart RC, et al. Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomised trial. *Br J Cancer*. 2002;86(12):1864-70.
445. Patel NM, Nozaki S, Shortle NH, Bhat-Nakshatri P, Newton TR, Rice S, et al. Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF-kappaB is enhanced by IkappaBalpha super-repressor and parthenolide. *Oncogene*. 2000;19(36):4159-69.
446. Shah MA, Power DG, Kindler HL, Holen KD, Kemeny MM, Ilson DH, et al. A multicenter, phase II study of bortezomib (PS-341) in patients with unresectable or metastatic gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma. *Invest New Drugs*. 2011;29(6):1475-81.
447. Shank BR, Brown VT, Schwartz RN. Multiple myeloma maintenance therapy: a review of the pharmacologic treatment. *J Oncol Pharm Pract*. 2015;21(1):36-51.
448. Claerhout S, Lim JY, Choi W, Park YY, Kim K, Kim SB, et al. Gene expression signature analysis identifies vorinostat as a candidate therapy for gastric cancer. *PLoS One*. 2011;6(9):e24662.
449. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-70.
450. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2521-32.
451. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(17):1627-39.

452. Barbee MS, Ogunniyi A, Horvat TZ, Dang TO. Current status and future directions of the immune checkpoint inhibitors ipilimumab, pembrolizumab, and nivolumab in oncology. *Ann Pharmacother*. 2015;49(8):907-37.
453. Ralph C, Elkord E, Burt DJ, O'Dwyer JF, Austin EB, Stern PL, et al. Modulation of lymphocyte regulation for cancer therapy: a phase II trial of tremelimumab in advanced gastric and esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2010;16(5):1662-72.
454. Muro K, Bang YJ, Shankaran V, Geva R, Thomas DV, Gupta S. Relationship between PD-L1 expression and clinical outcomes in patients with advanced gastric cancer treated with the anti-PD-1 monoclonal antibody pembrolizumab in KEYNOTE-012. *J Clin Oncol*. 2015;33(Suppl 3):abstr-3.
455. Matsueda S, Graham DY. Immunotherapy in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(7):1657-66.
456. Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(9):642-62.
457. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2517-26.
458. Lynch TJ, Bondarenko I, Luft A, Serwatowski P, Barlesi F, Chacko R, et al. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. *J Clin Oncol*. 2012;30(17):2046-54.
459. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(1):118-45.
460. Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1323-33.

461. Albanell J, Andreu X, Calasanz MJ, Concha A, Corominas JM, García-Caballero T, et al. Guidelines for HER2 testing in breast cancer: a national consensus of the Spanish Society of Pathology (SEAP) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM). *Clin Transl Oncol*. 2009;11(6):363-75.
462. Takehana T, Kunitomo K, Kono K, Kitahara F, Iizuka H, Matsumoto Y, et al. Status of c-erbB-2 in gastric adenocarcinoma: a comparative study of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization and enzyme-linked immunosorbent assay. *Int J Cancer*. 2002;98(6):833-7.
463. Aoyagi K, Kohfuji K, Yano S, Murakami N, Miyagi M, Takeda J, et al. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and c-erbB-2 in superspreading-type and penetrating-type gastric carcinoma. *Kurume Med J*. 2001;48(3):197-200.
464. Gómez-Martín C, Concha A, Corominas JM, García-Caballero T, García-García E, Iglesias M, et al. Consensus of the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM) and Spanish Society of Pathology (SEAP) for HER2 testing in gastric carcinoma. *Clin Transl Oncol*. 2011;13(9):636-51.
465. Netto GJ, Saad RD, Dysert PA. Diagnostic molecular pathology: current techniques and clinical applications, part I. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 162003. p. 379-83.
466. Laakso M, Tanner M, Isola J. Dual-colour chromogenic in situ hybridization for testing of HER-2 oncogene amplification in archival breast tumours. *J Pathol*. 2006;210(1):3-9.
467. García-Caballero T, Grabau D, Green AR, Gregory J, Schad A, Kohlwes E, et al. Determination of HER2 amplification in primary breast cancer using dual-colour chromogenic in situ hybridization is comparable to fluorescence in situ hybridization: a European multicentre study involving 168 specimens. *Histopathology*. 2010;56(4):472-80.
468. Akhdar A, Bronsard M, Lemieux R, Geha S. [HER-2 oncogene amplification assessment in invasive breast cancer by dual-color in situ hybridization (dc-CISH): a comparative study with fluorescent in situ hybridization (FISH)]. *Ann Pathol*. 2011;31(6):472-9.

469. Denoux Y, Arnould L, Fiche M, Lannes B, Couturier J, Vincent-Salomon A, et al. [HER2 gene amplification assay: is CISH an alternative to FISH?]. *Ann Pathol*. 2003;23(6):617-22.
470. Dietel M, Ellis IO, Höfler H, Kreipe H, Moch H, Dankof A, et al. Comparison of automated silver enhanced in situ hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. *Virchows Arch*. 2007;451(1):19-25.
471. Francis GD, Jones MA, Beadle GF, Stein SR. Bright-field in situ hybridization for HER2 gene amplification in breast cancer using tissue microarrays: correlation between chromogenic (CISH) and automated silver-enhanced (SISH) methods with patient outcome. *Diagn Mol Pathol*. 2009;18(2):88-95.
472. García-García E, Gómez-Martín C, Angulo B, Conde E, Suárez-Gauthier A, Adrados M, et al. Hybridization for human epidermal growth factor receptor 2 testing in gastric carcinoma: a comparison of fluorescence in-situ hybridization with a novel fully automated dual-colour silver in-situ hybridization method. *Histopathology*. 2011;59(1):8-17.
473. Wang T, Amemiya Y, Henry P, Seth A, Hanna W, Hsieh ET. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification Can Clarify HER2 Status in Gastric Cancers with "Polysomy 17". *J Cancer*. 2015;6(5):403-8.
474. Moelans CB, de Weger RA, Van der Wall E, van Diest PJ. Current technologies for HER2 testing in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011;80(3):380-92.
475. Tabarestani S, Ghaderian SM, Rezvani H. Detection of Gene Amplification by Multiplex Ligation- Dependent Probe Amplification in Comparison with In Situ Hybridization and Immunohistochemistry. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(17):7997-8002.
476. Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, Machida N, Chong JM, Fukayama M, et al. Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. *Cancer Res*. 2002;62(1):233-40.

477. Ojetti V, Persiani R, Cananzi FC, Sensi C, Piscaglia AC, Saulnier N, et al. cDNA-microarray analysis as a new tool to predict lymph node metastasis in gastric cancer. *World J Surg.* 2014;38(8):2058-64.
478. El-Rifai W, Frierson HF, Harper JC, Powell SM, Knuutila S. Expression profiling of gastric adenocarcinoma using cDNA array. *Int J Cancer.* 2001;92(6):832-8.
479. Jin Y, Da W. Screening of key genes in gastric cancer with DNA microarray analysis. *Eur J Med Res.* 2013;18:37.
480. Cho JY. Molecular diagnosis for personalized target therapy in gastric cancer. *J Gastric Cancer.* 2013;13(3):129-35.
481. Wang Y, Gao S, Liu G, Jia R, Fan D, Feng X. Microarray expression profile analysis of long non-coding RNAs in human gastric cardiac adenocarcinoma. *Cell Physiol Biochem.* 2014;33(4):1225-38.
482. Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science.* 2003;300(5617):286-90.
483. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:251364.
484. Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP. High-throughput sequencing technologies. *Mol Cell.* 2015;58(4):586-97.
485. Haas J, Katus HA, Meder B. Next-generation sequencing entering the clinical arena. *Mol Cell Probes.* 2011;25(5-6):206-11.
486. Singh RR, Patel KP, Routbort MJ, Aldape K, Lu X, Manekia J, et al. Clinical massively parallel next-generation sequencing analysis of 409 cancer-related genes for mutations and copy number variations in solid tumours. *Br J Cancer.* 2014;111(10):2014-23.
487. Luthra R, Chen H, Roy-Chowdhuri S, Singh RR. Next-Generation Sequencing in Clinical Molecular Diagnostics of Cancer: Advantages and Challenges. *Cancers (Basel).* 2015;7(4):2023-36.

488. LeBlanc VG, Marra MA. Next-Generation Sequencing Approaches in Cancer: Where Have They Brought Us and Where Will They Take Us? *Cancers (Basel)*. 2015;7(3):1925-58.
489. Hudson TJ, Anderson W, Artez A, Barker AD, Bell C, Bernabé RR, et al. International network of cancer genome projects. *Nature*. 2010;464(7291):993-8.
490. Zang ZJ, Cutcutache I, Poon SL, Zhang SL, McPherson JR, Tao J, et al. Exome sequencing of gastric adenocarcinoma identifies recurrent somatic mutations in cell adhesion and chromatin remodeling genes. *Nat Genet*. 2012;44(5):570-4.
491. Zang ZJ, Ong CK, Cutcutache I, Yu W, Zhang SL, Huang D, et al. Genetic and structural variation in the gastric cancer kinome revealed through targeted deep sequencing. *Cancer Res*. 2011;71(1):29-39.
492. Holbrook JD, Parker JS, Gallagher KT, Halsey WS, Hughes AM, Weigman VJ, et al. Deep sequencing of gastric carcinoma reveals somatic mutations relevant to personalized medicine. *J Transl Med*. 2011;9:119.
493. Kim YH, Liang H, Liu X, Lee JS, Cho JY, Cheong JH, et al. AMPK α modulation in cancer progression: multilayer integrative analysis of the whole transcriptome in Asian gastric cancer. *Cancer Res*. 2012;72(10):2512-21.
494. Rüschoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, et al. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch*. 2010;457(3):299-307.
495. Nitta H, Hauss-Wegrzyniak B, Lehrkamp M, Murillo AE, Gaire F, Farrell M, et al. Development of automated brightfield double in situ hybridization (BDISH) application for HER2 gene and chromosome 17 centromere (CEN 17) for breast carcinomas and an assay performance comparison to manual dual color HER2 fluorescence in situ hybridization (FISH). *Diagn Pathol*. 2008;3:41.
496. Domenech Massons J, Navarro Pastor J. Análisis de la supervivencia y modelo de riesgos proporcionales de Cox. Barcelona: Signo; 2016. p. 95-110.
497. van Grieken NC, Aoyama T, Aoyama T, Chambers PA, Bottomley D, Ward LC, et al. KRAS and BRAF mutations are rare and related to DNA mismatch repair deficiency

in gastric cancer from the East and the West: results from a large international multicentre study. *Br J Cancer*. 2013;108(7):1495-501.

498. Hartgrink HH, Jansen EP, van Grieken NC, van de Velde CJ. Gastric cancer. *Lancet*. 2009;374(9688):477-90.

499. Catalano V, Labianca R, Beretta GD, Gatta G, de Braud F, Van Cutsem E. Gastric cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009;71(2):127-64.

500. Polkowski W, van Sandick JW, Offerhaus GJ, ten Kate FJ, Mulder J, Obertop H, et al. Prognostic value of Laurén classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Ann Surg Oncol*. 1999;6(3):290-7.

501. Esaki Y, Hirayama R, Hirokawa K. A comparison of patterns of metastasis in gastric cancer by histologic type and age. *Cancer*. 1990;65(9):2086-90.

502. Ock CY, Lee KW, Kim JW, Kim JS, Kim TY, Lee KH, et al. Optimal Patient Selection for Trastuzumab Treatment in HER2-Positive Advanced Gastric Cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(11):2520-9.

503. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457):214-8.

504. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, Kim KM, Ting JC, Wong SS, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med*. 2015;21(5):449-56.

505. Varna M, Bousquet G, Plassa LF, Bertheau P, Janin A. TP53 status and response to treatment in breast cancers. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:284584.

506. Kandath C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013;502(7471):333-9.

507. Muller PA, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell*. 2014;25(3):304-17.

508. Dobes P, Podhorec J, Coufal O, Jureckova A, Petrakova K, Vojtesek B, et al. Influence of mutation type on prognostic and predictive values of TP53 status in primary breast cancer patients. *Oncol Rep.* 2014;32(4):1695-702.
509. Kim JY, Park K, Jung HH, Lee E, Cho EY, Lee KH, et al. Association Between Mutation and Expression of TP53 as a Potential Prognostic Marker of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res Treat.* 2016.
510. Babacan NA, Egilmez HR, Yücel B, Ilknur P, Seker MM, Kacan T, et al. The prognostic value of UHRF-1 and p53 in gastric cancer. *Saudi J Gastroenterol.* 2016;22(1):25-9.
511. Kuboki Y, Yamashita S, Niwa T, Ushijima T, Nagatsuma A, Kuwata T, et al. Comprehensive analyses using next-generation sequencing and immunohistochemistry enable precise treatment in advanced gastric cancer. *Ann Oncol.* 2016;27(1):127-33.
512. Velho S, Oliveira C, Ferreira A, Ferreira AC, Suriano G, Schwartz S, et al. The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. *Eur J Cancer.* 2005;41(11):1649-54.
513. Chong ML, Loh M, Thakkar B, Pang B, Iacopetta B, Soong R. Phosphatidylinositol-3-kinase pathway aberrations in gastric and colorectal cancer: meta-analysis, co-occurrence and ethnic variation. *Int J Cancer.* 2014;134(5):1232-8.
514. Ma PC, Tretiakova MS, MacKinnon AC, Ramnath N, Johnson C, Dietrich S, et al. Expression and mutational analysis of MET in human solid cancers. *Genes Chromosomes Cancer.* 2008;47(12):1025-37.
515. Wang LH, Kim SH, Lee JH, Choi YL, Kim YC, Park TS, et al. Inactivation of SMAD4 tumor suppressor gene during gastric carcinoma progression. *Clin Cancer Res.* 2007;13(1):102-10.
516. Chiurillo MA. Role of the Wnt/ β -catenin pathway in gastric cancer: An in-depth literature review. *World J Exp Med.* 2015;5(2):84-102.
517. Lu W, Wei H, Li M, Wang H, Liu L, Zhang Q, et al. Identification of KRAS and PIK3CA but not BRAF mutations in patients with gastric cancer. *Mol Med Rep.* 2015;12(1):1219-24.

518. Takahashi N, Yamada Y, Taniguchi H, Fukahori M, Sasaki Y, Shoji H, et al. Clinicopathological features and prognostic roles of KRAS, BRAF, PIK3CA and NRAS mutations in advanced gastric cancer. *BMC Res Notes*. 2014;7:271.
519. Matsusaka S, Kobunai T, Yamamoto N, Chin K, Ogura M, Tanaka G, et al. Prognostic impact of KRAS mutant type and MET amplification in metastatic and recurrent gastric cancer patients treated with first-line S-1 plus cisplatin chemotherapy. *Genes Cancer*. 2016;7(1-2):27-35.
520. Therkildsen C, Bergmann TK, Henrichsen-Schnack T, Ladelund S, Nilbert M. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol*. 2014;53(7):852-64.
521. Du X, Cheng Z, Wang YH, Guo ZH, Zhang SQ, Hu JK, et al. Role of Notch signaling pathway in gastric cancer: a meta-analysis of the literature. *World J Gastroenterol*. 2014;20(27):9191-9.
522. Yang Z, Guo L, Liu D, Sun L, Chen H, Deng Q, et al. Acquisition of resistance to trastuzumab in gastric cancer cells is associated with activation of IL-6/STAT3/Jagged-1/Notch positive feedback loop. *Oncotarget*. 2015;6(7):5072-87.
523. Xie M, He CS, Wei SH, Zhang L. Notch-1 contributes to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor acquired resistance in non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *Eur J Cancer*. 2013;49(16):3559-72.
524. Cao Z, Song JH, Kim CJ, Cho YG, Kim SY, Nam SW, et al. Genetic and epigenetic analysis of the VHL gene in gastric cancers. *Acta Oncol*. 2008;47(8):1551-6.
525. Su X, Zhan P, Gavine PR, Morgan S, Womack C, Ni X, et al. FGFR2 amplification has prognostic significance in gastric cancer: results from a large international multicentre study. *Br J Cancer*. 2014;110(4):967-75.
526. Ha SY, Lee J, Jang J, Hong JY, Do IG, Park SH, et al. HER2-positive gastric cancer with concomitant MET and/or EGFR overexpression: a distinct subset of patients for dual inhibition therapy. *Int J Cancer*. 2015;136(7):1629-35.

527. Ritter CA, Perez-Torres M, Rinehart C, Guix M, Dugger T, Engelman JA, et al. Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin Cancer Res.* 2007;13(16):4909-19.
528. Shattuck DL, Miller JK, Carraway KL, Sweeney C. Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res.* 2008;68(5):1471-7.
529. Yang ZY, Shen WX, Hu XF, Zheng DY, Wu XY, Huang YF, et al. EGFR gene copy number as a predictive biomarker for the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR monoclonal antibodies: a meta-analysis. *J Hematol Oncol.* 2012;5:52.
530. Nadauld LD, Ford JM. Molecular profiling of gastric cancer: toward personalized cancer medicine. *J Clin Oncol.* 2013;31(7):838-9.
531. Cheng JC, Chang HM, Leung PC. Egr-1 mediates epidermal growth factor-induced downregulation of E-cadherin expression via Slug in human ovarian cancer cells. *Oncogene.* 2013;32(8):1041-9.
532. Lafky JM, Wilken JA, Baron AT, Maihle NJ. Clinical implications of the ErbB/epidermal growth factor (EGF) receptor family and its ligands in ovarian cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1785(2):232-65.
533. Riquelme I, Saavedra K, Espinoza JA, Weber H, García P, Nervi B, et al. Molecular classification of gastric cancer: Towards a pathway-driven targeted therapy. *Oncotarget.* 2015;6(28):24750-79.
534. Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature.* 2006;439(7078):871-4.
535. Matsukawa Y, Semba S, Kato H, Ito A, Yanagihara K, Yokozaki H. Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer. *Cancer Sci.* 2006;97(6):484-91.

536. Valtorta E, Misale S, Sartore-Bianchi A, Nagtegaal ID, Paraf F, Lauricella C, et al. KRAS gene amplification in colorectal cancer and impact on response to EGFR-targeted therapy. *Int J Cancer*. 2013;133(5):1259-65.
537. Yang X, Song JH, Cheng Y, Wu W, Bhagat T, Yu Y, et al. Long non-coding RNA HNF1A-AS1 regulates proliferation and migration in oesophageal adenocarcinoma cells. *Gut*. 2014;63(6):881-90.
538. Dang Y, Lan F, Ouyang X, Wang K, Lin Y, Yu Y, et al. Expression and clinical significance of long non-coding RNA HNF1A-AS1 in human gastric cancer. *World J Surg Oncol*. 2015;13:302.
539. Luo Z, Li Y, Wang H, Fleming J, Li M, Kang Y, et al. Hepatocyte nuclear factor 1A (HNF1A) as a possible tumor suppressor in pancreatic cancer. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121082.
540. Mina S, Bohn BA, Simon R, Krohn A, Reeh M, Arnold D, et al. PTEN deletion is rare but often homogeneous in gastric cancer. *J Clin Pathol*. 2012;65(8):693-8.
541. Kang YH, Lee HS, Kim WH. Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Lab Invest*. 2002;82(3):285-91.
542. Wang X, Trotman LC, Koppie T, Alimonti A, Chen Z, Gao Z, et al. NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell*. 2007;128(1):129-39.
543. Wang Q, Zhou Y, Wang X, Chung DH, Evers BM. Regulation of PTEN expression in intestinal epithelial cells by c-Jun NH2-terminal kinase activation and nuclear factor-kappaB inhibition. *Cancer Res*. 2007;67(16):7773-81.
544. Schlessinger J. Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science*. 2004;306(5701):1506-7.
545. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(5):283-96.
546. Vasudevan KM, Barbie DA, Davies MA, Rabinovsky R, McNear CJ, Kim JJ, et al. AKT-independent signaling downstream of oncogenic PIK3CA mutations in human cancer. *Cancer Cell*. 2009;16(1):21-32.

547. Salvesen HB, Carter SL, Mannelqvist M, Dutt A, Getz G, Stefansson IM, et al. Integrated genomic profiling of endometrial carcinoma associates aggressive tumors with indicators of PI3 kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(12):4834-9.
548. Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, et al. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet*. 1999;21(1):99-102.
549. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res*. 2008;68(15):6084-91.
550. Hafsi S, Pezzino FM, Candido S, Ligresti G, Spandidos DA, Soua Z, et al. Gene alterations in the PI3K/PTEN/AKT pathway as a mechanism of drug-resistance (review). *Int J Oncol*. 2012;40(3):639-44.
551. Kim J, Fox C, Peng S, Pusung M, Pectasides E, Matthee E, et al. Preexisting oncogenic events impact trastuzumab sensitivity in ERBB2-amplified gastroesophageal adenocarcinoma. *J Clin Invest*. 2014;124(12):5145-58.
552. Dulak AM, Schumacher SE, van Lieshout J, Imamura Y, Fox C, Shim B, et al. Gastrointestinal adenocarcinomas of the esophagus, stomach, and colon exhibit distinct patterns of genome instability and oncogenesis. *Cancer Res*. 2012;72(17):4383-93.
553. Ciriello G, Miller ML, Aksoy BA, Senbabaoglu Y, Schultz N, Sander C. Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat Genet*. 2013;45(10):1127-33.
554. Sleijfer S, Ballman K, Verweij J. The future of drug development? Seeking evidence of activity of novel drugs in small groups of patients. *J Clin Oncol*. 2013;31(18):2246-8.
555. Le Tourneau C, Delord JP, Gonçalves A, Gavoille C, Dubot C, Isambert N, et al. Molecularly targeted therapy based on tumour molecular profiling versus conventional therapy for advanced cancer (SHIVA): a multicentre, open-label, proof-of-concept, randomised, controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(13):1324-34.
556. Do K, O'Sullivan Coyne G, Chen AP. An overview of the NCI precision medicine trials-NCI MATCH and MPACT. *Chin Clin Oncol*. 2015;4(3):31.

557. André F, Bachelot T, Commo F, Campone M, Arnedos M, Dieras V, et al. Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER). *Lancet Oncol.* 2014;15(3):267-74.
558. Hecht JR, Bang YJ, Qin SK, Chung HC, Xu JM, Park JO, et al. Lapatinib in Combination With Capecitabine Plus Oxaliplatin in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Advanced or Metastatic Gastric, Esophageal, or Gastroesophageal Adenocarcinoma: TRIO-013/LOGiC--A Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol.* 2016;34(5):443-51.
559. Arienti C, Zanoni M, Pignatta S, Del Rio A, Carloni S, Tebaldi M, et al. Preclinical evidence of multiple mechanisms underlying trastuzumab resistance in gastric cancer. *Oncotarget.* 2016.
560. Okutur K, Bassulu N, Dalar L, Aydin K, Bozkurt M, Pilanci KN, et al. Predictive and prognostic significance of p27, Akt, PTEN and PI3K expression in HER2-positive metastatic breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(7):2645-51.
561. Esteva FJ, Guo H, Zhang S, Santa-Maria C, Stone S, Lanchbury JS, et al. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Pathol.* 2010;177(4):1647-56.
562. Majewski IJ, Nuciforo P, Mittempergher L, Bosma AJ, Eidtmann H, Holmes E, et al. PIK3CA mutations are associated with decreased benefit to neoadjuvant human epidermal growth factor receptor 2-targeted therapies in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(12):1334-9.
563. André F, O'Regan R, Ozguroglu M, Toi M, Xu B, Jerusalem G, et al. Everolimus for women with trastuzumab-resistant, HER2-positive, advanced breast cancer (BOLERO-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(6):580-91.
564. Wilks ST. Potential of overcoming resistance to HER2-targeted therapies through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Breast.* 2015;24(5):548-55.

565. Zheng L, Tan W, Zhang J, Yuan D, Yang J, Liu H. Combining trastuzumab and cetuximab combats trastuzumab-resistant gastric cancer by effective inhibition of EGFR/ErbB2 heterodimerization and signaling. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63(6):581-6.
566. Eto K, Iwatsuki M, Watanabe M, Ida S, Ishimoto T, Iwagami S, et al. The microRNA-21/PTEN pathway regulates the sensitivity of HER2-positive gastric cancer cells to trastuzumab. *Ann Surg Oncol.* 2014;21(1):343-50.
567. Kawakami H, Okamoto I. MET-targeted therapy for gastric cancer: the importance of a biomarker-based strategy. *Gastric Cancer.* 2016;19(3):687-95.
568. Kawakami H, Okamoto I, Arao T, Okamoto W, Matsumoto K, Taniguchi H, et al. MET amplification as a potential therapeutic target in gastric cancer. *Oncotarget.* 2013;4(1):9-17.
569. Dasari A, Messersmith WA. New strategies in colorectal cancer: biomarkers of response to epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies and potential therapeutic targets in phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *Clin Cancer Res.* 2010;16(15):3811-8.
570. Stern HM. Improving treatment of HER2-positive cancers: opportunities and challenges. *Sci Transl Med.* 2012;4(127):127rv2.
571. Nahta R. Molecular Mechanisms of Trastuzumab-Based Treatment in HER2-Overexpressing Breast Cancer. *ISRN Oncol.* 2012;2012:428062.
572. Zhang Z, Wang J, Ji D, Wang C, Liu R, Wu Z, et al. Functional genetic approach identifies MET, HER3, IGF1R, INSR pathways as determinants of lapatinib unresponsiveness in HER2-positive gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2014;20(17):4559-73.
573. Chen CT, Kim H, Liska D, Gao S, Christensen JG, Weiser MR. MET activation mediates resistance to lapatinib inhibition of HER2-amplified gastric cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(3):660-9.
574. Davidson M, Okines AF, Starling N. Current and Future Therapies for Advanced Gastric Cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2015;14(4):239-50.

575. Yashiro M, Matsuoka T. Fibroblast growth factor receptor signaling as therapeutic targets in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2016;22(8):2415-23.
576. Jamal-Hanjani M, Quezada SA, Larkin J, Swanton C. Translational implications of tumor heterogeneity. *Clin Cancer Res*. 2015;21(6):1258-66.
577. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*. 2013;501(7467):338-45.
578. Stahl P, Seeschaaf C, Lebok P, Kutup A, Bockhorn M, Izbicki JR, et al. Heterogeneity of amplification of HER2, EGFR, CCND1 and MYC in gastric cancer. *BMC Gastroenterol*. 2015;15:7.
579. Gomez-Martín C, Lopez-Rios F, Aparicio J, Barriuso J, García-Carbonero R, Pazo R, et al. A critical review of HER2-positive gastric cancer evaluation and treatment: from trastuzumab, and beyond. *Cancer Lett*. 2014;351(1):30-40.
580. Grillo F, Fassan M, Sarocchi F, Fiocca R, Mastracci L. HER2 heterogeneity in gastric/gastroesophageal cancers: From benchside to practice. *World J Gastroenterol*. 2016;22(26):5879-87.
581. Ye P, Zhang M, Fan S, Zhang T, Fu H, Su X, et al. Intra-Tumoral Heterogeneity of HER2, FGFR2, cMET and ATM in Gastric Cancer: Optimizing Personalized Healthcare through Innovative Pathological and Statistical Analysis. *PLoS One*. 2015;10(11):e0143207.
582. McGranahan N, Swanton C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. *Cancer Cell*. 2015;27(1):15-26.
583. Sun XX, Yu Q. Intra-tumor heterogeneity of cancer cells and its implications for cancer treatment. *Acta Pharmacol Sin*. 2015;36(10):1219-27.
584. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(3):205-16.

IX. ANEXOS

ANEXO I

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST) Versión 1.0

Therasse P. et al (584).

Evaluación de la respuesta	Criterios RECIST versión 1.0
Lesiones diana (2 lesiones por órgano y 5 lesiones en total)	
Respuesta completa (RC)	Desaparición de todas las lesiones diana
Respuesta parcial (RP)	Disminución de al menos el 30% en la suma de los diámetros mayores de las lesiones diana con respecto a la obtenida en el estudio basal
Progresión de la enfermedad (PE)	Aumento de al menos el 20% en la suma de los diámetros mayores de las lesiones diana tomando como referencia la menor suma obtenida durante el seguimiento (incluido el estudio basal) Aparición de una o más lesiones nuevas
Enfermedad estable (EE)	No cumple ninguno de los criterios anteriores
Lesiones no diana	
Respuesta completa (RC)	Desaparición de todas las lesiones no diana y normalización de los marcadores tumorales
Respuesta incompleta/Enfermedad estable (IR/EE)	Persistencia de una o más lesiones no diana y/o mantenimiento de los marcadores tumorales por encima del límite alto de la normalidad
Progresión de la enfermedad (PE)	Aparición de una o más lesiones nuevas y/o progresión inequívoca de las lesiones no diana existentes

Lesiones diana	Lesiones no diana	Nuevas lesiones	Categorización final de la respuesta
RC	RC	No	RC
RC	IR/EE	No	RP
RP	IR/EE	No	RP
EE	IR/EE	No	EE
PE	Cualquiera	Cualquiera	PE
Cualquiera	PE	Cualquiera	PE
Cualquiera	Cualquiera	Sí	PE