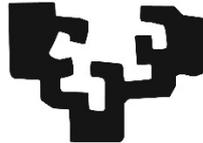


Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

eman ta zabal zazu



**Universidad del País Vasco Euskal Herriko
Unibertsitatea**

**Departamento de Neurociencias
Facultad de Medicina y Odontología
Área de Innovación en Cirugía, Trasplante
y Tecnologías para la salud
Instituto BioCruces**

"Proteómica dirigida en la cirugía del cáncer gástrico"

SOLEDAD UGARTE SIERRA

2015

"Proteómica dirigida en la cirugía del cáncer gástrico"

Tesis Doctoral

SOLEDAD UGARTE SIERRA

DIRECTORES

Dr. Joaquín Losada Rodríguez

Dr. Rafael Sarria Arostegui

Departamento de Neurociencias, Facultad de Medicina y Odontología

**Área de Innovación en Cirugía, Trasplante y Tecnologías para la Salud, Instituto
BioCruces**



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Cruces, 2015

AGRADECIMIENTOS

Como ha sido un camino tan largo y tortuoso el que nos ha llevado hasta este punto, es muy difícil para mí pensar cuánta gente he conocido a lo largo de estos años, a los que debería agradecer su ayuda desinteresada sin tener la sensación de olvidarme de muchos que fueron cruciales en algún momento determinado, tanto para éste como para otros proyectos anteriores.

No creo que sea capaz de plasmar a todos ellos, a jefes, compañeros cirujanos, enfermeras, auxiliares, secretarias, investigadores, financiadores... algunos de ellos ni siquiera están ya en los departamentos en los que los conocí, e incluso algunos, están disfrutando de una merecida jubilación.

Quiero pedir de antemano disculpas por los olvidos que pueda cometer, porque aunque mi torpeza no me permita expresar mi más sincero recuerdo y agradecimiento a todos, siempre tendréis un lugar en mi corazón.

En primer lugar, y sin ninguna duda, debo agradecer la consecución de esta tesis doctoral al doctor Joaquín Losada, porque sin su vehemencia, perseverancia y fe en este proyecto, jamás habríamos llegado hasta aquí.

A la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea, por confiar en nosotros y en este proyecto.

A Pedro Grandes, Rafa Sarria, Delbiñe Zarraga... y al resto de compañeras del departamento de Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad de País Vasco, de los que hemos aprendido tanto ahora y en nuestros inicios.

A Kerman Aloria, Jabi Beaskoetxea y Jesus Mari Arizmendi del Departamento de Proteómica SGIKER de Servicios Centrales de la Universidad de País Vasco, por tener la paciencia de enseñarme un mundo tan distante de mi día a día.

A Miguel Losada, y en su nombre al Grupo de Dinámica de Flujos Ambientales del Instituto CEAMA de la Universidad de Granada, por su rigor, y su desinteresada dedicación en el análisis de los datos de este trabajo.

A mi jefe, Javier Ibáñez, y en su nombre, al Servicio de Cirugía General del Hospital de Galdakao, por apoyar este proyecto de investigación desde sus inicios.

A Pilar, Susana, Rosa M, Rosa G, Emi, las hermanas Gazteluiturri, Amaia, Esti, Ainara, Loli, Esther, Merche, Yolanda... en definitiva a todas las enfermeras, auxiliares y celadores del quirófano y la planta de hospitalización de Cirugía General del Hospital de Galdakao por su necesaria e inestimable ayuda, y por aguantarme día sí y día también. Un pequeño gesto de la enfermería...

Igualmente, a los cirujanos, enfermeras, auxiliares y celadores del quirófano y la planta de hospitalización del Servicio de Cirugía General del Hospital de Cruces, y a los técnicos y patólogos del Servicio de Anatomía Patológica, por ser todos ellos “colaboradores necesarios”.

A Iñaki Zabalza, Jefe del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Galdakao, y a sus patólogos y técnicos, en especial a Gontzal, por resolver mil dudas y hacer gala ambos de una paciencia infinita.

A Roberto Bilbao, director científico del biobanco vasco para la investigación (o+ehun), a sus técnicos (en especial a Anna y a Laura) y a sus secretarias, que están realizando una labor fundamental para el desarrollo de proyectos de investigación estandarizados y de calidad.

A los miembros del comité ético y del departamento de investigación del Hospital de Galdakao por su orientación y ayuda constante.

A Carmen Mar y a Lola Boyano por orientarnos en el comienzo de este proyecto.

A Arrate Losada, por sus “excel vinculados” que nos salvaron la vida.

A Alberto Ugarte, por saber de todo de lo que yo no sé, e incluso, de lo que ni siquiera quiero saber.

A Mari Asun, por las horas robadas.

A mis amigos, en especial a Bea, Vir, Bea N, Iratxe, Susana, Naia, Nuria, Noelia, Nerea y Aitor, por soportarme estoicamente en estos últimos tiempos y en otros momentos más complejos de la vida. Mi verdadera teoría del círculo.

A Miren. A Sam... Gracias por el viaje.

Y por último, me gustaría agradecer especialmente su implicación en éste y otros proyectos, a la verdadera razón de los mismos, nuestros pacientes y sus familias, porque en un momento de sus vidas en que la angustia, la frustración y el miedo lo invadían todo, tuvieron la generosidad de creer firmemente que otro mundo es posible.

A todos ellos, muchas gracias.

A Alberto Ugarte y María Jesús Sierra,
luz entre mis sombras.

Con amor, ahora y siempre

Bakame

FPN

“Si no hubiera sido por la gran variabilidad entre individuos,
la medicina sería una ciencia y no un arte”

William Osler (1849-1919)

ÍNDICE:

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	13
A. Incidencia y mortalidad del cáncer gástrico	15
B. Guía de práctica clínica en el diagnóstico y tratamiento	17
1. Diagnóstico y anatomía patológica	17
2. Niveles de evidencia	18
C. Estratificación. Fragilidad y senilidad	25
D. Medicina personalizada y de precisión	26
E. Biomarcadores OMICS	28
F. Biobanco	30
G. Clasificación del cáncer gástrico	33
H. Mecanismos patogénicos en el cáncer gástrico	34
1. Genómica en el cáncer gástrico	34
2. Proteómica en el cáncer gástrico	37
➤ Biomarcadores proteómicos en el cáncer gástrico y en sus precursores	39
➤ Características del proteoma humano	42
3. Vías de señalización celular	44
➤ Características de las proteínas y péptidos de las vías de señalización celular seleccionadas para el análisis de proteómica dirigida en el cáncer gástrico	45
Vía de señalización con receptores tirosin-kinasa (RTKS)	46
• P00533/EGFR_HUMAN (Epidermal growth factor receptor), secuencias peptídicas IPLENLQIRG y SPSDCCHNQCAAGCTGPR	46

• P28482-MK01_HUMAN (Protein kinasa mitógeno activada)	51
• P27361 MK03_HUMAN (Mitogen-activated protein kinase 3)	54
Vía de señalización PI3K/AKT (fosfoinositol 3-kinasa, con receptores serine/treonine-protein kinase)	56
• P31749-AKT1_HUMAN (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase).	56
Vía de señalización con respuesta al estímulo del TGF beta (factor transformante del crecimiento), con receptores serina/threonina kinasa)	58
• P62942- FKB1A_HUMAN (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A)	58
4. Biomarcadores del estado de la inmunidad del huésped en el cáncer gástrico	59
III. OBJETIVOS	61
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	65
A. Selección de pacientes incluidos en el estudio	67
B. Metodología de recogida de muestras	68
C. Criterios de selección de proteínas y péptidos	68
D. Metodología de cuantificación de los péptidos seleccionados mediante técnicas de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tandem	69
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
A. Datos epidemiológicos de los pacientes incluidos en el estudio	77
B. Tratamiento médico crónico de los pacientes incluidos en el estudio	82
C. Tratamiento quirúrgico de los pacientes incluidos en el estudio	84
D. Tratamiento oncológico de los pacientes incluidos en el estudio	85
E. Localización tumoral, clasificación histopatológica y grado de diferenciación de los pacientes incluidos en el estudio	88
F. Clasificación TNM y datos histopatológicos relacionados de los pacientes incluidos en el estudio	89

G. Clasificación TNM y estadíos UICC de los pacientes incluidos en el estudio	93
H. Datos del estudio proteómico	94
1. Proteómica del descubrimiento	94
➤ Proteómica de tejido gástrico en el ratón	94
➤ Proteómica del cáncer gástrico en humanos	96
2. Proteómica dirigida del cancer gástrico	101
➤ Proteómica dirigida: fase 1	101
➤ Proteómica dirigida: fase 2	107
I. Datos de cuantificación de los diferentes péptidos de las proteínas analizadas en el tejido sano y tumoral de los pacientes incluidos en el estudio	117
J. Análisis de datos y resultados de la cuantificación de las proteínas analizadas	122
1. Relaciones funcionales de los valores de los cocientes de cuantificación de las diferentes proteínas con los del EGFR1.	127
2. Análisis del comportamiento del cociente de cuantificación en función del estadio tumoral del paciente	133
3. Simulación de los cocientes de cuantificación de los diferentes péptidos según el estadio del paciente con las tres primeras autofunciones	140
4. Potencial utilización de los datos obtenidos en el análisis estadístico	146
➤ Caracterización del proteoma de una neoplasia gástrica multifocal en paciente con inmunodeficiencia común variable	147
➤ Caracterización del proteoma del adenocarcinoma gástrico con diferente fenotipo celular y estadio tumoral	163
➤ Proteómica dirigida en el cáncer gástrico. Relación con la clasificación molecular. Guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento. Niveles de evidencia y objetivos de mejora.	175

VI. CONCLUSIONES	195
VII. ANEXOS	201
ANEXO A	203
Consideraciones éticas: comité de ética de investigación clínica.	
ANEXO B	209
Normas de buena práctica clínica: consentimiento informado.	
ANEXO C	223
Documentación de financiación de proyecto EHU11/25	
VIII. BIBLIOGRAFÍA	227

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Tasa de mortalidad por cáncer ajustada por edad. Fuente: American Cancer Society ³ .	15
FIGURA 2. Aspectos relacionados con la medicina personalizada. Fuente: Personalized Medicine Coalition ²⁸ .	27
FIGURA 3. Modelo propuesto para una medicina y cirugía genómica personalizadas. Fuente: Brunicardi FCH ³⁰ .	28
FIGURA 4. Tipos de muestra, técnicas de determinación y análisis de datos para las distintas OMICs. Fuente: Davis VW ³¹ .	29
FIGURA 5. Pilares de trabajo de los grupos de investigación del HPP: espectrometría de masas, aislamiento de anticuerpos y herramientas bioinformáticas. Fuente: Legrain P ⁴⁸ .	38
FIGURA 6. Diagrama de flujo de trabajo. Fuente: Paik YK ⁵¹ .	39
FIGURA 7. Detección y análisis de proteínas expresadas diferencialmente en gastritis atrófica crónica. Fuente: Zhang L ⁵² .	40
FIGURA 8. a. Diagrama de flujo experimental para la identificación y cuantificación proteica. b. Estructura y características de la de la base de datos Proteomics DB. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	42
FIGURA 9. Análisis global de la expresión proteica, con su caracterización en el proteoma humano en diferentes tejidos. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	43
FIGURA 10. Estructura del receptor del factor de crecimiento epidérmico. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	46
FIGURA 11. Intensidad media del EGFR en el estómago humano. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	47
FIGURA 12. Estructura del dominio FU en el que se encuentra la secuencia peptídica PSDCCHNQAAGCTGPR. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	48
FIGURA 13. Fragmentos ionizados del péptido SPSDCCHNQAAGCTGPR. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	49
FIGURA 14. Receptor L-dominio (IPR000494). Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	50
FIGURA 15. Fragmentos ionizados del péptido IPLENLQIIR 100-110. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	50

FIGURA 16. Estructura de la proteína MK01. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	51
FIGURA 17. Masa de la proteína MK01_Human de 5,82 en el estómago de mujer. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	52
FIGURA 18. Estructura del dominio serina threonina kinasa. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	53
FIGURA 19. Fragmento ionizado del péptido VADPHDHTGFLTEYVATR. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	54
FIGURA 20. Expresión media de la proteína MK03 en el estómago en el hombre. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	55
FIGURA 21. Estructura de la proteína MK03. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	55
FIGURA 22. Fragmento ionizado del péptido RTEGVGPGVPGEVEMVK. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	56
FIGURA 23. Estructura de la proteína AKT1. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	56
FIGURA 24. Estructura del dominio SMART PH. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	57
FIGURA 25. Fragmento ionizado del péptido EEWTTAIQTVADGLK. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	57
FIGURA 26. Estructura de la proteína FKBP1A. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	59
FIGURA 27. Fragmento ionizado del péptido GWEEGVAQMSVGQR. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	59
FIGURA 28. Determinantes genéticos y ambientales de las variaciones del inmunofenotipo en estado de salud. Fuente: Galon J ⁶¹ .	60
FIGURA 29. Imágenes del proceso de limpieza de las muestras.	69
FIGURA 30. Proceso de homogenizado de los tejidos analizados.	70
FIGURA 31. Flujo de trabajo llevado a cabo en este estudio.	74
FIGURA 32. Cromatograma TIC (Total Ion Current) (verde) y BPI (Base Peak Intensity) (rojo) de la muestra de tejido gástrico murino analizada el espectrómetro de masas SYNAPT HDMS.	95
FIGURA 33. Diagrama de Venn: número de grupos de proteínas identificados en las muestras de tejido gástrico procesadas con CARNOY y con PBS.	97
FIGURA 34. Extracción de las proteínas: tejido sano conservado en OCT y lavado en PBS.	98

FIGURA 35. Extracción de las proteínas: tejido sano y tumoral conservado en OCT y lavado en Carnoy.	99
FIGURA 36. Análisis diferencial en relación con las proteínas identificadas y la función que realizan, entre las dos formas de lavado PBS y Carnoy.	100
FIGURA 37 (A-B). Figura A: cromatograma para 3 fragmentos del péptido VNQIGTLSESIK. Figura B: cuantificación del área del cromatograma correspondiente a cada fragmento y los tiempos de retención correspondientes.	103
FIGURA 38. Valor de los cocientes sano/tumor de los péptidos analizados para cada paciente.	106
FIGURA 39 (A-B-C). A-B: Espectros de fragmentación del péptido GWEEGVAQMSVGQR pesado y nativo. C: Error en la masa (ppm) de los fragmentos identificados.	109
FIGURA 40 (A-B). Cuantificación de los péptidos pesados SPSDCCHNQCAAGCTGPR (A) Fase I y RTEGVGPGVPGEVEMVK (B) Fase II.	111
FIGURA 41. Representación gráfica de los cocientes sano/tumor de los valores de cuantificación de los péptidos monitorizados.	116
FIGURA 42. Valores de los péptidos MK01/EGFR1.	128
FIGURA 43. Valores de los péptidos MK03/EGFR1.	128
FIGURA 44. Valores de los péptidos FKBP1A/EGFR1.	128
FIGURA 45. Valores de los péptidos AKT1/EGFR1.	129
FIGURA 46. Caso(1): Terna MK01, MK03 y EGFR.	131
FIGURA 47. Caso(2): Terna FKBP1A, AKT y EGFR.	132
FIGURA 48. Recta regresión lineal EGFR-AKT para valores acotados del Cc del FKBP1A.	133
FIGURA 49. Valores medios de los cocientes de cuantificación en función de los estadios del paciente.	136
FIGURA 50. Representa los valores de los cocientes de cuantificación de las 5 proteínas analizadas, en relación con el estadio tumoral de cada paciente. Variación media de todos los datos en función del estadio.	138
FIGURA 51. Valor de la Autofunción 1 en relación con los estadios.	139
FIGURA 52. Valor de la Autofunción 2 en relación con los estadios.	139

FIGURA 53. Valor de la Autofunción 3 en relación con los estadíos.	139
FIGURA 54. Variabilidad explicada en función del número de autofunciones.	140
FIGURA 55. Reconstrucción de la curva del péptido EGFR1 por estadíos del paciente con las 3 primeras autofunciones.	143
FIGURA 56. Reconstrucción de la curva del péptido MK01 por estadíos del paciente con las 3 primeras autofunciones.	143
FIGURA 57. Reconstrucción de la curva del péptido AKT por estadíos del paciente con las 3 primeras autofunciones.	144
FIGURA 58. Reconstrucción de la curva del péptido MK03 por estadíos del paciente con las 3 primeras autofunciones.	144
FIGURA 59. Reconstrucción de la curva del péptido FKBP1A por estadíos del paciente con las 3 primeras autofunciones.	145
FIGURA 60. Reconstrucción de la curva del péptido MK01 por estadíos del paciente con las 5 autofunciones	145

CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA DE UNA NEOPLASIA GÁSTRICA MULTIFOCAL EN PACIENTE CON INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE

	Página
FIGURA 1. Valores medios de los cocientes de cuantificación en función de los estadíos del paciente.	149
FIGURA 2. Aspecto intraoperatorio macroscópico del tumor.	150
FIGURA 3. Pieza de gastrectomía total y omentectomía abierta por curvatura mayor.	150
FIGURA 4. Técnicas de Clustering para el análisis de datos de cuantificación proteica	152
FIGURA 5. Valores de los CCs del EGFR1 obtenidos experimentalmente (eje x) frente a los valores predichos por el modelo de regresión lineal.	157
FIGURA 6. Relación entre los valores de MK03 y FKBP1A con el EGFR 1 bloqueado al valor 1.25 (línea azul) y para un valor del EGFR1 igual a cero (línea verde).	158

CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO CON DIFERENTE FENOTIPO CELULAR Y ESTADÍO TUMORAL

	Página
FIGURA 1. Cociente de cuantificación de EGFR1 en relación al estadio tumoral según la clasificación UICC.	171
FIGURA 2. Cociente de cuantificación de MK03 en relación al estadio tumoral según la clasificación UICC.	172
FIGURA 3. Cociente de cuantificación de FKBP1A en relación al estadio tumoral según la clasificación UICC.	172

PROTEÓMICA DIRIGIDA EN EL CANCER GÁSTRICO. RELACIÓN CON LA CLASIFICACIÓN MOLECULAR. GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO. NIVELES DE EVIDENCIA Y OBJETIVOS DE MEJORA

	Página
FIGURA 1. Valores medios de los cocientes de cuantificación en función de los estadios del paciente.	176
FIGURA 2. Evolución de los Ccs de la proteína EGFR 1 en relación con el estadio tumoral en pacientes no tratados y tratados con quimioterapia preoperatoria (Qx).	185
FIGURA 3. Evolución de los Ccs de la proteína MK03 en relación con el estadio tumoral en pacientes no tratados y tratados con quimioterapia preoperatoria (Qx).	186
FIGURA 4. Evolución de los Ccs de la proteína FKBP1A en relación con el estadio tumoral en pacientes no tratados y tratados con quimioterapia preoperatoria (Qx).	187

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
TABLA I. Diagnóstico y estadificación del cáncer gástrico. AJCC Cancer Staging Manual. Fuente: Edge S ⁶ .	17
TABLA II. Clasificación TNM. AJCC Cancer Staging Manual. Fuente: Edge S ⁶ .	19
TABLA III. Clasificación TNM por estadíos. AJCC Cancer Staging Manual. Fuente: Edge S ⁶ .	20
TABLA IV. Grupos ganglionares para linfadenectomía D1, D2 en función del tipo de gastrectomía. Japanese Classification 2010. Fuente: Rodríguez JM, Sasako M ¹³ .	22
TABLA V. Supervivencia observada a 5 años por estadíos. Fuente: The American Cancer Society ¹⁹ .	23
TABLA VI. Ensayos clínicos en cáncer gástrico resecable. Fuente: Cunningham D ²² .	24
TABLA VII. Correlación de las clasificaciones de Lauren y de las OMS. Fuente: Berlth F ⁴⁴ .	33
TABLA VIII. Alteraciones genéticas del cáncer gástrico. Fuente: Shi J ⁴⁶ .	35
TABLA IX. Alteraciones genéticas somáticas recurrentes del cáncer gástrico. Fuente: Shi J ⁴⁶ .	36
TABLA X. Alteraciones epigenéticas del cáncer gástrico. Fuente: Shi J ⁴⁶ .	37
TABLA XI. Taxonomía de la proteína EGFR (p00533) con sus isoformas. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	46
TABLA XII. Características de la secuencia peptídica SPSDCCHNQCAAGCTGPR. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	47
TABLA XIII. Características de la secuencia peptídica IPLENLQIIR. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	49
TABLA XIV. Características de la secuencia peptídica VADPHDHTGFLTEYVATR. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	52
TABLA XV. Características de la proteína FKBP1A. Fuente: Wilhelm M ⁵⁸ .	58
TABLA XVI. Secuencia de los péptidos cuantificados e información de la proteína a la que pertenecen.	68
TABLA XVII. Combinaciones de equipos y modos de adquisición utilizados en	71

este estudio.

TABLA XVIII-XIX-XX-XXI. Datos epidemiológicos de los pacientes incluidos en el estudio.	79-81
TABLA XXII. Tratamientos crónicos recibidos por los pacientes incluidos en el estudio.	83
TABLA XXIII. Tratamientos quirúrgicos realizados en los pacientes incluidos en el estudio.	84
TABLA XXIV. Neoadyuvancia y adyuvancia de los pacientes incluidos en el estudio.	86
TABLA XXV. Pronóstico de los pacientes incluidos en el estudio a cierre del mismo (Diciembre 2014)	87
TABLA XXVI. Datos histopatológicos de los pacientes incluidos en el estudio.	88
TABLA XXVII-XXVIII-XXIX. Características TNM-datos histopatológicos.	90-92
TABLA XXX. Clasificación TNM. Estadío UICC	93-134
TABLA XXXI. Lista de péptidos monitorizados con su correspondiente carga y m/z indicándose la proteína a la que pertenecen. El péptido RTEGVGPGVPGEVEMVK se ha monitorizado con 2 y 3 cargas.	102
TABLA XXXII. Valores de cuantificación y factor de corrección o normalización a aplicar en cada muestra.	104
TABLA XXXIII. Área normalizada de todos los péptidos monitorizados.	105
TABLA XXXIV. Lista de péptidos monitorizados con su correspondiente carga y m/z indicándose la proteína a la que pertenecen.	108
TABLA XXXV. Valores de cuantificación una vez normalizados de los péptidos indicados en cada una de las muestras analizadas.	113
TABLA XXXVI. Valores de los cocientes sano/tumor de los péptidos nativos para cada paciente.	114
TABLA XXXVII. Cocientes de cuantificación de los péptidos (pep1: SPSDCCHNQCAAGCTGPR y pep2: IPLENLQIIR) de la proteína P00533 EGFR en el tejido sano y tumoral, en pacientes con cáncer gástrico humano.	118

TABLA XXXVIII. Cocientes de cuantificación de la proteína MK01 (secuencia peptídica VADPDHDHTGFLTEYVATR) y MK03 (secuencia peptídica RTEGVGPGVPGEVEMVK) en el tejido sano y tumoral, en pacientes con cáncer gástrico humano.	119
TABLA XXXIX. Cocientes de cuantificación del péptido GWEEGVAQMSVGQR de la proteína P62942 FKBP1A_HUMAN (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1a), entre el tejido sano y tumoral, en el cáncer gástrico.	120
TABLA XL. Cocientes de cuantificación del péptido EEWTTAIQTVADGLK de la proteína AKT1, en el tejido sano y tumoral en pacientes con cáncer gástrico humano.	121
TABLA XLI. Valor medio de los cocientes de cuantificación de los péptidos (pep1: SPSDCCHNQCAAGCTGPR y pep2: IPLENLQIIR) de la proteína P00533 EGFR en el tejido sano y tumoral, en pacientes con cáncer gástrico humano.	123
TABLA XLII. Cocientes de cuantificación de la proteína EGFR1 (secuencias peptídicas SPSDCCHNQCAAGCTGPR, IPLENLQIIR), proteína MK03 (secuencia peptídica RTEGVGPGVPGEVEMVK), proteína MK01 (secuencia peptídica VADPDHDHTGFLTEYVATR), péptido GWEEGVAQMSVGQR de la proteína P62942 FKBP1A_HUMAN (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A), péptido EEWTTAIQTVADGLK de la proteína AKT1, en el tejido sano y tumoral, en pacientes con cáncer gástrico humano.	124
TABLA XLIII. Valores medios de los cocientes de cuantificación en función de los estadios del paciente	135
TABLA XLIV. Valor de cada autofunción según el estadio del paciente	141
TABLA XLV. Pesos de cada autofunción para cada péptido	141
TABLA XLVI. Valor medio muestral en función del estadio.	142

CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA DE UNA NEOPLASIA GÁSTRICA MULTIFOCAL EN PACIENTE CON INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE

	Página
TABLA I. Datos de los coeficientes de cuantificación de los diferentes péptidos en los tres tumores agrupados por estadios AJCC.	154
TABLA II. (Ccs) de las proteínas del EGFR1, MK01, MK03, FKBP1A y AKT1, analizados en las tres neoplasias epiteliales, según el estadio tumoral y su fenotipo celular.	155

CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO CON DIFERENTE FENOTIPO CELULAR Y ESTADÍO TUMORAL

	Página
TABLA I. Relación entre el subtipo molecular y el fenotipo celular. Fuente: Cristescu R ² .	163
TABLA II. Datos histopatológicos de los pacientes incluidos en el estudio.	166
TABLA III. Clasificación TNM. Estadío UICC.	167
TABLA IV. TABLA IV. Pacientes con cáncer gástrico: relación tipo anatómo-patológico, estadío tumoral III-IV de la clasificación TNM, cocientes de cuantificación de las proteínas analizadas y supervivencia en meses.	168
TABLA V. Pronóstico: Estadío UICC y supervivencia en meses.	169
TABLA VI. Estadío histopatológico, simulado y evolución del paciente.	173

PROTEÓMICA DIRIGIDA EN EL CANCER GÁSTRICO. RELACIÓN CON LA CLASIFICACIÓN MOLECULAR. GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO. NIVELES DE EVIDENCIA Y OBJETIVOS DE MEJORA

	Página
TABLA I. Tratamiento quirúrgicos realizados en los pacientes incluidos en el estudio.	178
TABLA II. Clasificación TNM. Estadío UICC.	180
TABLA III. Pacientes tratados con neoadyuvancia (quimioterapia), adyuvancia (radioterapia y quimioterapia) y supervivencia en meses.	182
TABLA IV. Tipo anatómo-patológico, estadío y los datos de cuantificación de las proteínas-péptidos analizados de los pacientes que no recibieron neoadyuvancia.	183
TABLA V. Tipo anatómo-patológico, estadío y los datos de cuantificación de las proteínas-péptidos analizados de los pacientes que recibieron neoadyuvancia.	184
TABLA VI. Recurrencia, tratamiento de rescate y pronóstico de los pacientes incluidos en el estudio a cierre del mismo (Diciembre 2014)	190
TABLA VII. Coeficientes de cuantificación de los péptidos del EGFR Y MK01, MK03, FKBP1A Y AKT en los adenocarcinomas gástricos sufrieron recurrencia.	190

I. RESUMEN

La estrategia de tratamiento quirúrgico para el cáncer gástrico se realiza en la actualidad en base a criterios de selección de pacientes según la estadificación de la clasificación TNM y/o la clasificación de Lauren y han sido clásicamente el “global gold standard” en la toma de decisiones clínicas.

Las tres principales sociedades oncológicas europeas, ESMO (Sociedad Europea de Oncología Médica), ESO (Sociedad Europea de Oncología Quirúrgica) y ESTRO (Sociedad Europea de Radioterapia y Oncología), han publicado las directrices conjuntas para el manejo del cáncer gástrico, analizando las evidencias actuales en los niveles de recomendación tanto para el diagnóstico como para el tratamiento.

Sin embargo, los cambios más significativos en los cuidados de salud, se han producido con el desarrollo de una medicina personalizada y de precisión, que redefine el diagnóstico, estratifica a los pacientes, dirige la selección de la terapia óptima, informa de la sensibilidad individual a la quimio-radioterapia y establece el pronóstico.

Brunnicardi ya propone en 2011 como estrategia básica en la práctica de una medicina y cirugía personalizadas un modelo basado en el perfil molecular del paciente, tanto para las guías de elección terapéutica, como para la mejora en el seguimiento de los pacientes quirúrgicos.

Genómica, proteómica y metabolómica, conforman un conjunto de estudios OMICs, que han modificado la forma de diagnosticar y clasificar el cáncer gástrico.

En la clasificación molecular basada en los patrones de expresión génica, se han identificado tres subtipos de adenocarcinoma gástrico, denominados mesenquimal, proliferativo, y metabólico.

Por otro lado, con el fin de mejorar la clasificación del cáncer gástrico, identificar las claves de sus vías de señalización, dianas terapéuticas y biomarcadores, la “Cancer Genome Atlas Research Network”, ha dividido el cáncer gástrico en cuatro subtipos moleculares distintos.

El primer subtipo lo configuran los pacientes infectados por “ErbB2 +” (asociados a mutaciones del gen PIK3CA (fosfo inositol 3 kinasa)), un segundo subtipo presenta alta “inestabilidad de microsatélites (MSI)”, un tercer subtipo “genómicamente estable” (relacionados con el subtipo difuso y con mutaciones del gen “RHOA”), y, un cuarto subtipo “cromosómicamente inestable” (relacionado subtipo intestinal y con amplificaciones de los genes que codifican proteínas para los receptores tirosin-kinasa).

En este sentido, datos clínicos de gran cantidad de pacientes obtenidos de la historia clínica electrónica, son integrados con los datos de sus procesos biológicos realizados a través de los análisis OMICs.

Estudios observacionales durante el curso normal de los cuidados clínicos en relación con el diagnóstico y tratamiento han sido integrados para formar redes de conocimiento con los datos obtenidos de la investigación OMICs.

Desde hace varios años, se vienen realizando enfoques de proteómica del descubrimiento, para analizar los perfiles de proteínas de muestras quirúrgicas con adenocarcinoma gástrico primario y mucosa gástrica no tumoral, con el objetivo de identificar las proteínas específicas asociadas a la enfermedad, como potenciales biomarcadores clínicos, dianas terapéuticas y sus mecanismos moleculares.

En los últimos años, se ha desarrollado una proteómica dirigida cuantitativa, que permite seleccionar determinadas proteínas y sus péptidos correspondientes que ayudan a conocer la participación de éstas en la carcinogénesis o como dianas terapéuticas.

Con estos antecedentes planteamos como hipótesis de trabajo para el desarrollo del proyecto en el que se fundamenta esta tesis doctoral que, si realizáramos un análisis clínico exhaustivo de los pacientes que habitualmente diagnosticamos y tratamos de cáncer gástrico y lo integráramos con los datos obtenidos de la cuantificación proteica por proteómica dirigida, podríamos mejorar nuestras decisiones terapéuticas para esta enfermedad.

Con este fin se seleccionaron prospectivamente diecinueve pacientes intervenidos por adenocarcinoma gástrico, que cumplieran criterios de inclusión para este estudio, realizándose un análisis exhaustivo de toda su información clínica.

El material utilizado procedente de las intervenciones quirúrgicas realizadas (tejido gástrico sano y tumoral de cada paciente), fueron vehiculizados a través del Biobanco Vasco para su conservación a -80°C en OCT (Optimal Cutting Culture) hasta su utilización.

El flujo de trabajo fue completado, con la retirada del OCT, homogeneización, digestión trípica, adición de péptidos pesados y análisis de proteómica dirigida y cuantificación de proteínas por la plataforma proteómica, y simultáneamente fue elaborada una base de datos para la recogida de los datos clínicos de los pacientes.

Como primer paso de puesta a punto de la metodología proteómica dirigida, con el fin de estandarizar los métodos de digestión y homogenización en la preparación de muestras complejas y heterogéneas se comenzaron las pruebas con tejido de murinos en Marzo 2013.

Concluyéndose de esta fase que la homogeneización con el sistema Precellys, así como la digestión de las proteínas mediante el método FASP, sirven de manera óptima para su utilización con muestras tisulares de ratón y que el número de proteínas identificadas por proteómica del descubrimiento obtenida por cromatografía líquida y espectrometría de masas, es similar al número de proteínas que se obtienen con los flujos de trabajo habituales.

A finales de Abril 2013, tras la puesta a punto de la metodología y los resultados obtenidos en el procesamiento del tejido gástrico en murinos se decidió trasladar el

análisis del ratón al humano, para lo que se seleccionó uno de los diecinueve pacientes que conforman parte de este estudio.

La finalidad de esta fase del estudio fue obtener información experimental de un panel extenso de proteínas y péptidos de tejido gástrico humano por proteómica del descubrimiento para seleccionar las más adecuadas y realizar el estudio de proteómica dirigida posterior.

En cuanto a la metodología de esta fase, en lo referente al tratamiento de las muestras incluidas en OCT para su conservación en los biobancos correspondientes, se concluye que no hay diferencias significativas en el número de proteínas obtenidas con los procedimientos de limpieza utilizados, tanto con PBS o con carnosol y que la funcionalidad de estas proteínas en los tejidos analizados, permanece intacta.

Los criterios de selección de proteínas y péptidos para hacer el análisis de proteómica dirigida fueron, en primer lugar, proteínas con probada participación en el proceso de carcinogénesis gástrica y/o dianas terapéuticas y, en segundo lugar, péptidos que identifiquen específicamente a las proteínas seleccionadas y que hayan sido detectados por espectrometría de masas en el Servicio de Proteómica.

En base a los criterios mencionados se han seleccionado las siguientes proteínas y péptidos:

Péptido	Proteína	Código uniprot	Descripción
IPLNLQIIRG	EGFR_HUMAN	P00533	Epidermal growth factor receptor
SPSDCCHNQCAAGCTGPR	EGFR_HUMAN	P00533	Epidermal growth factor receptor
VADPDHDHTGFLTEYVATR	MK01_HUMAN	P28482	Mitogen-activated protein kinase 1
RTEGVGPGVPGEVEMVK	MK03_HUMAN	P27361	Mitogen-activated protein kinase 3
EEWTTAIQTVADGLK	AKT1_HUMAN	P31749	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
GWEEGVAQMSVGQR	FKB1A_HUMAN	P62942	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A

Las proteínas seleccionadas EGFR, MK01, MK03 pertenecen a la vía de señalización RAS-RAF-MEK-ERK1/2 con receptores tirosin kinasa (RTKs).

La proteína AKT1 pertenece a la vía de señalización PI3K/AKT (fosfo inositol 3-kinasa, con receptores serine/treonine-protein kinase).

Y, por último, la proteína seleccionada FKB1A pertenece a la vía de señalización del TGF β (factor transformante del crecimiento), con receptores serina/threonina kinasa.

En una primera fase del desarrollo de la metodología de la proteómica dirigida puesta en marcha, se plantea la posibilidad de la utilización de un péptido común, como el péptido de la levadura ENO1_YEAST, para normalizar la cuantificación peptídica en el tejido humano con cáncer gástrico.

Éste no ha sido un procedimiento fiable para obtener resultados homogéneos de cuantificación y con tiempos de elución similares, por lo que se decidió, en una segunda fase, utilizar para la normalización del procedimiento un péptido pesado.

La presencia de un péptido marcado ayuda a determinar la presencia del péptido natural y permite normalizar la intensidad del péptido natural frente al péptido pesado y, en principio, obtener una cuantificación más fiable.

De las proteínas y péptidos descritos previamente, hemos analizado los cocientes de cuantificación (relación tejido sano-tejido tumoral) agrupándolos por estadios tumorales.

En el análisis de datos de los resultados de los cocientes de cuantificación de los péptidos de las proteínas estudiadas, hemos analizado en primer lugar, las relaciones entre los valores de sus cocientes de cuantificación (Ccs), mediante métodos de regresión lineal y múltiple.

En segundo lugar, hemos analizado la variabilidad de esta muestra agrupada por estadios mediante el método de las funciones empíricas ortogonales.

Y, en tercer lugar, con los datos obtenidos hemos realizado una simulación de curvas de los valores de los Ccs para cada proteína, para cada uno de los estadios tumorales, mediante el método de las autofunciones.

Los resultados de los análisis de regresión lineal y regresión múltiple obtenidos para las ternas (MK01, EGFR1-MK03) y (FKBP1A, EGFR1-AKT), confirman la relación lineal entre los valores de los cocientes de cuantificación de las proteínas analizadas y que, conocidos los valores de dos de ellos, se puede obtener el cociente de cuantificación del tercero, con un error máximo acotado.

El siguiente paso, ha consistido en unir los datos experimentales proteómicos con los datos clínicos relativos a los estadios tumorales de cada paciente.

Se han agrupado los valores de cuantificación de las proteínas por estadios tumorales, calculado el valor medio de los datos disponibles para cada proteína y analizado la dependencia funcional de estos valores medios con el estadio tumoral.

Como resultado de lo anteriormente expuesto, se pueden identificar cuatro regiones de comportamiento del cociente de cuantificación de cada uno de los péptidos: decaimiento, valor mínimo, crecimiento y dominio tumoral.

La región de decaimiento se corresponde con los estadios I-A/II-A, la región de valores mínimos, con los estadios II-A/II-B, la región de crecimiento con los estadios II-C/III-C y, por último, la región de "dominio tumoral" con los estadios III-C/IV.

Este patrón de comportamiento de los valores medios de los Ccs, puede ser de aplicación en la práctica clínica. A medida que evoluciona en el tiempo el cáncer gástrico, podemos predecir, según el estadio tumoral en el que se encuentra la enfermedad, el Cc de cada proteína, para cada paciente y viceversa.

Así mismo, a partir de los valores de cuantificación obtenidos se han confeccionado unas curvas de simulación predictiva para cada proteína en cada uno de los estadios tumorales del paciente, lo que tendría una potencial aplicabilidad práctica.

Por un lado, conocido el estadio tumoral clínico del paciente previo a iniciar el tratamiento, podemos conocer los valores simulados de los Ccs de las cinco proteínas estudiadas en esta tesis (utilizando las tablas y calculando el valor, o simplemente, entrando en la gráfica de cada proteína y midiendo su valor).

Así, si comparáramos el resultado de estadiaje de nuestra simulación y el obtenido tras el análisis proteómico del paciente a estudio, en el caso de que ambos resultados fueran "aproximadamente" coincidentes, las curvas simuladas se podrían utilizar en el seguimiento del paciente, tomando a aquellos como valores de referencia.

Y, por otro lado, estas curvas también se podrían utilizar para verificar la respuesta de un paciente a los fármacos administrados, ya que con las autofunciones se dispone de la respuesta (evolutiva) estándar del paciente con cáncer gástrico; de tal manera que, cuando los resultados del seguimiento del paciente se desviaran claramente de estas curvas, entonces, se dispondría de una información bien referenciada e identificada para determinar el efecto de un determinado tratamiento.

Por último, se han desarrollado en esta tesis, tres escenarios distintos para la utilización potencial de los datos obtenidos en el análisis estadístico.

Como primer escenario tendríamos la caracterización del proteoma de una neoplasia gástrica multifocal en una paciente con inmunodeficiencia común variable (ICDV).

La IDCV, que cursa entre otros cuadros con hipogammaglobulinemia, había aparecido en la tercera década de vida, desarrollando su carcinoma gástrico dos décadas después. En su historia clínica, están reflejados factores de riesgo, que han actuado sobre la mucosa gástrica normal, hasta llegar al desarrollo del carcinoma gástrico multifocal.

La peculiaridad de este caso concreto, y por lo que se decidió su análisis en solitario, es que se trata de una paciente con un alteración de la inmunidad que presenta tres tumores de distintas características histopatológicas. Por tanto, hemos tenido ante nosotros, una oportunidad única, de analizar el comportamiento a nivel proteómico de tres tumores diferentes expuestos a un entorno idéntico.

Para su análisis, se han aplicado técnicas de clustering (que consisten en agrupar aquellas proteínas cuyos valores de los cocientes de cuantificación se comportan de manera similar a lo largo de los diferentes estadios) y se ha estudiado, también, la variabilidad de esta muestra agrupada por estadios mediante el método de las funciones empíricas ortogonales anteriormente descritas.

Cabría destacar, cómo siendo dos de los tres tumores, carcinomas intramucosos en el mismo estadio IA, sus (Ccs) son totalmente diferentes, estando éste en relación, probablemente, con los subtipos celulares que los componen (carcinoma intramucoso papilo-vellositario versus carcinoma intramucoso de células en anillo de sello). Sin embargo, el resultado de nuestro análisis, valores del EGFR1 menores de 1 a través del análisis de regresión múltiple, sitúan, el comportamiento desde el punto de vista proteómico, al carcinoma intramucoso de células en anillo de sello más próximo al tercero de ellos, carcinoma intestinal invasivo.

De lo anteriormente expuesto, y desde el punto de vista meramente quirúrgico, tratándolos como casos independientes por su pronóstico esperable, se podría plantear que el abordaje de cada caso diferiría de los otros. Así, en el carcinoma intramucoso papilo-vellositario se podría plantear la resección local, en el carcinoma intramucoso de células en anillo de sello deberíamos ofertarle una gastrectomía con linfadenectomía D1, según sus criterios de riesgo, y, en el caso del adenocarcinoma intestinal infiltrante, la gastrectomía con linfadenectomía D2 debería ser el procedimiento de elección.

Además, en cuanto al análisis de los Ccs del AKT1, el carcinoma intramucoso papilo-vellositario presenta valores mayores a la unidad. Ésto podría reflejar una hiperactivación constitutiva del AKT1, para activar y diferenciar a los linfocitos, mientras que en los otros dos casos los valores están amortiguados, con inhibición progresiva de los valores del AKT1, indicándonos la progresión tumoral y empeoramiento del pronóstico, con un grado de agotamiento de la producción constitutiva del AKT1, en el tejido sano y tumoral.

En un segundo escenario, hemos estudiado la caracterización del proteoma del adenocarcinoma gástrico con diferente fenotipo celular y estadio tumoral.

El análisis de los datos lo hemos realizado agrupando a los pacientes que se encontraban en estadios tumorales III y IV.

La alta expresión del EGFR1 se correlaciona positivamente con la localización y tamaño tumoral, grado de diferenciación celular, profundidad de invasión, metástasis linfáticas, estadio TNM. Tumores mayores de 5 cm, localizados en la parte distal, pobremente diferenciados, con invasión hasta la serosa y con metástasis linfáticas, en estadio III-IV, tienen una mayor expresión del EGFR1.

Los cocientes de cuantificación experimentales obtenidos a partir de las autofunciones, añaden un nuevo elemento de contraste con el que podemos simular datos y pueden ser una información adicional del paciente que ayude a la verificación, el seguimiento y el pronóstico de la evolución más probable de la enfermedad.

La integración de los datos relacionados con el tipo histopatológico, el estadio tumoral y la supervivencia en meses del cáncer gástrico, además de los cocientes de cuantificación de las proteínas seleccionadas (determinados por cromatografía líquida y espectrometría de masas), son componentes de datos relevantes para, mejorar la identificación del estadio tumoral de estos pacientes, seleccionar mejor el tipo de cirugía y terapia médica a utilizar y, previsiblemente, mejorar la significación estadística de las tasas de supervivencia global.

Para concluir, como tercer escenario, se analizan los datos clínicos, anatomía patológica, valores de los Ccs y el comportamiento de estos datos en pacientes tratados sólo con cirugía o con neoadyuvancia previa a la cirugía y su relación con la clasificación molecular.

En nuestro estudio se han podido identificar cuatro regiones de comportamiento del valor de los Ccs de cada uno de las proteínas: decaimiento, valor mínimo, crecimiento y dominio tumoral (descrito previamente).

No existe todavía ningún régimen de tratamiento universalmente aceptado para el cáncer gástrico y diferentes países y centros ofrecen opciones de tratamiento distintas.

Trabajos previos han demostrado que los subtipos de líneas celulares de cáncer gástrico con distintos patrones de expresión génica, están asociados al pronóstico y la respuesta a la quimioterapia de los pacientes. Las de tipo intestinal, fueron significativamente más sensibles a 5-FU y oxaliplatino, pero más resistentes a cisplatino, que las líneas de celulares con tipo difuso.

En relación con el TNM, no se ha observado una ventaja en la supervivencia global de los pacientes tratados con quimioterapia preoperatoria. ($p=0,36$), ni en la supervivencia libre de enfermedad ($p=0,20$), ni modifica la tasa de resección R0 ($p=0,36$).

Tampoco se han encontrado diferencias significativas, ni en la supervivencia, ni en la recurrencia tumoral en relación con el subtipo molecular. La inestabilidad de microsatélites tiene una mayor tendencia a la recurrencia que el resto de los subgrupos, aunque no es significativa.

En nuestro estudio se han utilizado dos esquemas diferentes de tratamiento, por un lado, los pacientes 2, 3, 4, 5 y 10 fueron tratados con una pauta de tratamiento de quimioterapia adyuvante postoperatoria (5-Fluorouracilo y Leucovorin x 6 ciclos) y el paciente 11 con 5-Fluorouracilo y folinato cálcico.

Asociado con la quimioterapia, los pacientes 2, 3, 4, 5 y 10 recibieron radioterapia a una dosis total máxima de 45 Gy según el ensayo SWOG/ Intergroup-0116.

Y, por otro lado, los pacientes nº 12, 13, 14 y 15, fueron tratados con EOX x 3 ciclos (Epirrubucina, Oxaliplatino, Capecitabina), en forma de quimioterapia preoperatoria, completando la adyuvancia con el mismo esquema todos ellos, menos el nº 12 por morbilidad asociada. Esquema de tratamiento sugerido por el ensayo holandés CRITICS (NCT00407186).

En este trabajo hemos realizado una comparativa de los resultados obtenidos a nivel del estudio proteómico en los pacientes que han sido tratados con quimioterapia preoperatoria y los que no, correlacionándolo con sus estadios tumorales.

Hay discrepancia al correlacionar el estadio tumoral y los Ccs de las proteínas analizadas en los enfermos tratados con quimioterapia, cuando se utilizan como referencia las curvas de los valores de los Ccs de pacientes sin tratar con quimioterapia y se observa la evolución y supervivencia de estos pacientes.

Los Ccs de la proteína EGFR1 crecen a partir de los estadios IIA y IIB, tanto para los pacientes tratados, como sin tratar, pero lo hacen más rápidamente en los tratados con quimioterapia, al menos hasta el estadio III C.

Los valores de los Ccs de la proteína MK03 tratados con quimioterapia y reclasificados en estadios IIA, IIB, son mayores que los correspondientes a los valores de los pacientes sin tratar con quimioterapia.

Además, su tasa de crecimiento en relación al estadio tumoral, es muy baja, a diferencia de los pacientes que no fueron tratados con quimioterapia, que tienen un crecimiento muy alto del Ccs a partir del estadio III.

Los valores de los Ccs de la proteína FKBP1A, tratados con quimioterapia y reclasificados en estadios II (IIB), son mayores que los correspondientes a los valores de los pacientes sin tratar con quimioterapia, siguiendo el mismo patrón que los Ccs de la proteína MK03.

De forma análoga su tasa de crecimiento es muy baja, al menos hasta el estadio IIIB.

La determinación de los cocientes de cuantificación de las proteínas analizadas en este estudio, junto con la determinación del estadio tumoral en pacientes tratados con quimioterapia preoperatoria, permite diagnosticar con menor incertidumbre su estadio tumoral y en consecuencia ayuda a decidir con más información y precisión el tipo de cirugía a realizar.

No hay globalmente aceptado un estándar de tratamiento para el cáncer gástrico resecable. En lo que se refiere a la linfadenectomía D2, por ejemplo, la clasificación por estadio tumoral preoperatoria, no es capaz de definir el tipo de linfadenectomía a realizar. De hecho, en nuestro trabajo, de los pacientes sometidos a neoadyuvancia se les realiza una linfadenectomía D2 a los pacientes 13 y 15.

La cuantificación por metodología proteómica de las proteínas implicadas en las vías de señalización de la carcinogénesis del cáncer gástrico, podría contribuir a seleccionar mejor las pautas de tratamiento de nuestros pacientes y ayudar a establecer mejor su estadio tumoral y definir su pronóstico.

A efectos prácticos, se podría plantear una linfadenectomía D2, en aquellos tumores de la clasificación molecular de Bass, de tipo cromosómicamente inestables, que tengan una localización antral y con previsibles amplificaciones de los genes, que codifican proteínas para la activación de los receptores tirosin kinasa, responsables de una proliferación celular aberrante.

Desde nuestro punto de vista, la metodología proteómica dirigida junto con el estadio tumoral, ayudaría en una más correcta selección de un tratamiento personalizado para nuestros pacientes.

II. INTRODUCCIÓN

A. INCIDENCIA Y MORTALIDAD DEL CÁNCER GÁSTRICO

El cáncer gástrico es una enfermedad heterogénea de origen multifactorial. Constituye el cuarto cáncer más común, y la segunda causa de muerte por cáncer en ambos sexos en todo el mundo, por lo que aunque las tasas de incidencia y mortalidad estén disminuyendo lentamente, sigue constituyendo un problema significativo de salud pública¹.

EUROPA

La incidencia de cáncer gástrico en Europa en relación al número estimado de nuevos casos en el año 2012 a partir de tasas de incidencia y mortalidad de 40 países europeos, ascendió a 139.600, siendo la mortalidad estimada en ese mismo año de 107.300 casos².

EEUU

La evolución en la distribución de mortalidad referida al cáncer gástrico ajustada por sexo y edad entre los años 1930-2010, es mostrada a continuación donde se puede observar la tendencia descendente de esta enfermedad³. FIGURA 1.

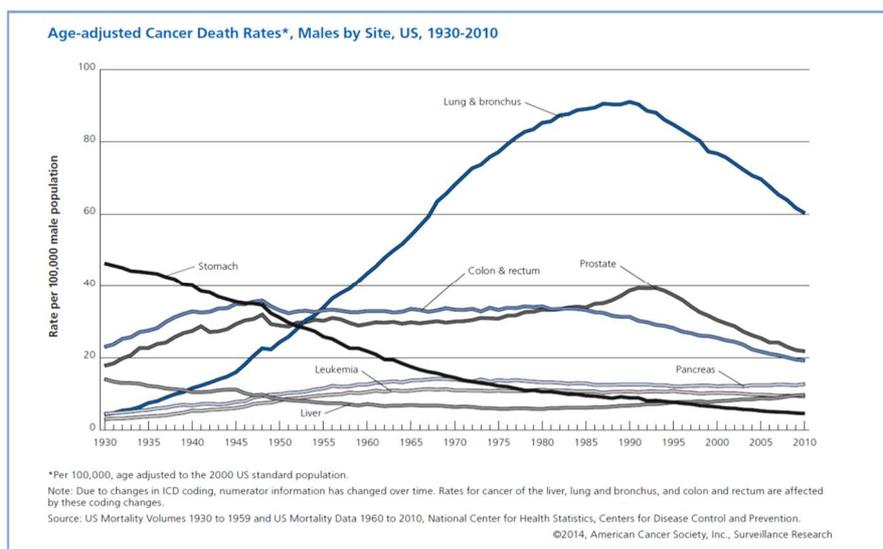


FIGURA 1. Tasa de mortalidad por cáncer ajustada por edad.
 Fuente: American Cancer Society³.

ASIA

Globalmente el cáncer gástrico constituye en la actualidad el 7,8% del total de neoplasias a nivel mundial. Ésto significa un total de 989.000 nuevos casos en el mundo, de los que 463.000 se presentan únicamente en China, con un total de 737.000 muertes anuales. El 70% de los casos se dan en países en vías de desarrollo, concentrándose el 50% en Asia¹.

EUSKADI

En nuestro ámbito, las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer gástrico han ido disminuyendo progresivamente a lo largo de los años.

Los datos registrados entre 1986-2008 en nuestra comunidad, revelan que los hombres presentan tasas ajustadas de incidencia significativamente disminuidas (2,9% anual) pasando de 41,7 casos por 100.000 habitantes a 22,8 casos por 100.000, en el periodo comprendido entre 1986-2006; mientras que en las mujeres, el descenso ha sido de un 3,3% anual.

Por otro lado, en relación a las tasas de mortalidad, en los hombres han disminuido significativamente un 3,3% anual a lo largo de todo el periodo (de 26,8 en 1986 a 14,4 en 2008), mientras que en las mujeres, el descenso de la tasa de mortalidad ha sido mayor, un 4,2% al año (pasando las tasas de mortalidad de 12,6 en 1986 a 4,7 en 2008)⁴.

A pesar de esta disminución progresiva de tanto la incidencia como la mortalidad del cáncer gástrico a lo largo de estos últimos años, la realidad es que apenas 1 de cada 4 o 5 pacientes sobrevivirán a los 5 años tras el diagnóstico, lo que hace mandatorio la búsqueda de nuevos biomarcadores que supongan una diferencia en el diagnóstico precoz, el tratamiento y el pronóstico de nuestros pacientes.

B. GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

Las tres principales sociedades oncológicas europeas, ESMO (Sociedad Europea de Oncología Médica), ESO (Sociedad Europea de Oncología Quirúrgica) y ESTRO (Sociedad Europea de Radioterapia y Oncología), han publicado recientemente las directrices conjuntas para el manejo del cáncer gástrico (CG), analizando las evidencias actuales en los niveles de recomendación⁵.

1. DIAGNÓSTICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

El diagnóstico clínico del cáncer gástrico se basa en parte en las modalidades de imagen, incluyendo la ecografía endoscópica, TAC/PET y el análisis anátomo-patológico de las biopsias tumorales⁶. TABLA I.

DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER GÁSTRICO

Procedimiento	Propósito
Análisis de sangre de rutina	Comprobación de evidencia de anemia por deficiencia de hierro
	Comprobación de la función hepática y renal para determinar las opciones terapéuticas apropiadas
Biopsia endoscopia +	Obtención de tejido para el diagnóstico, la clasificación histológica y la determinación de biomarcadores moleculares por ejemplo, HER-2
TAC de tórax + abdomen ± pelvis	Estadificación del tumor: especialmente para detectar linfadenopatía local / a distancia y sitios de enfermedad metastásica
Ecografía endoscópica (EE)	Evaluación precisa de los estadios T y N en los tumores potencialmente operables
	Determinación de la extensión proximal y distal del tumor
Laparoscopia + lavados	Exclusión de enfermedad metastásica oculta que implique diafragma / peritoneo
La tomografía por emisión de positrones (PET) en su caso	Mejora de la detección de enfermedad metastásica oculta en algunos casos

TABLA I. Diagnóstico y estadificación del cáncer gástrico. AJCC Cancer Staging Manual. Fuente: Edge S⁶.

2. NIVELES DE EVIDENCIA DE ALGUNAS DE ESTAS RECOMENDACIONES

DIAGNÓSTICO POR IMAGEN

La ecografía endoscópica (EE) es útil para determinar los extremos proximal y distal de la extensión del tumor y ofrece una nueva evaluación del tumor y de los ganglios linfáticos (T y N), aunque es menos útil en tumores antrales [III, B].

La laparoscopia con o sin lavado peritoneal de células malignas se recomienda en todos los cánceres gástricos estadio IB a III que se consideren potencialmente resecables para excluir enfermedad metastásica oculta [III, B]⁶.

CLASIFICACIÓN TNM Y POR ESTADÍOS

La estrategia de tratamiento quirúrgico para el cáncer gástrico ha sido realizada en base a criterios de selección de pacientes según la estadificación de la clasificación TNM y/o la clasificación de Lauren y han sido el “global gold standard” en la toma de decisiones clínicas.

La clasificación TNM y los estadios correspondientes determinados con arreglo a la séptima edición de la Unión Internacional contra el Cáncer (AJCC/UICC), que es la utilizada en esta guía de práctica clínica, son mostrados a continuación⁶. TABLA II-III.

CLASIFICACIÓN TNM DE CÁNCER GÁSTRICO (7ª edición de las directrices AJCC / UICC)

Tumor primario (T)		Ganglios linfáticos regionales (N)		Metástasis	distancia (M)
TX	El tumor primario no puede ser evaluado	NX	Ganglios linfáticos regionales (s) no puede evaluarse	MX	La metástasis a distancia no puede ser evaluada
T0	No hay evidencia de tumor primario	N0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales	M0	No hay metástasis a distancia
Tis	Carcinoma in situ: tumor intraepitelial sin invasión de la lámina propia	N1	Metástasis en 1-2 ganglios linfáticos regionales	M1	Metástasis a distancia o citología peritoneal positiva
T1a	El tumor invade la lámina propia o la muscular de la mucosa	N2	Metástasis en 3-6 ganglios linfáticos regionales		
T1b	Tumor que invade la submucosa	N3	Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales		
T2	Tumor que invade la muscular propia				
T3	Tumor penetra en el tejido conectivo de la subserosa sin invasión del peritoneo visceral o estructuras adyacentes				
T4a	El tumor invade la serosa (peritoneo visceral)				
T4b	Tumor que invade estructuras adyacentes				

TABLA II. Clasificación TNM. AJCC Cancer Staging Manual.

Fuente: Edge S⁶.

Tabla Clasificación por estadíos , AJCC / UICC (7^a edición)

Clasificación de los estadíos	T	N	M
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadio IIA	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIB	T1	N3	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4a	N0	M0
Etapa IIIA	T2	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N1	M0
Etapa IIIB	T3	N3	M0
	T4a	N2	M0
	T4b	N0-1	M0
Estadio IIIC	T4a	N3	M0
	T4b	N2-3	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

TABLA III. Clasificación TNM por estadíos. AJCC Cancer Staging Manual
Fuente: Edge S⁶.

MANEJO DE LA ENFERMEDAD LOCAL / LOCORREGIONAL

NIVELES DE EVIDENCIA QUIRÚRGICA

Los criterios actuales para la selección del tratamiento quirúrgico del cáncer gástrico están basados en la clasificación clínica de cáncer precoz o avanzado. La enfermedad precoz está limitada a la mucosa / submucosa y el carcinoma avanzado invade la muscular propia pudiéndola sobrepasar.

El carcinoma gástrico, a su vez, se subdivide histológicamente en tipo intestinal, el cual está asociado con la metaplasia intestinal y la infección por *Helicobacter Pylori* y el tipo difuso, que se relaciona a menudo con trastornos genéticos familiares, tales como mutaciones en línea germinal de la E-cadherina (CDH1) o en genes de reparación (Síndrome de Lynch)⁷.

Los tumores considerados como cáncer gástrico precoz (T1a) pueden ser susceptibles de resección endoscópica, si están bien diferenciados, miden menos de 2 cm, están localizados en la mucosa y no están ulcerados [III, B]⁸.

Los tumores T1 son subsidiarios de resección gástrica parcial y de una disección de los ganglios linfáticos limitada a los ganglios perigástricos, de acuerdo con la localización del tumor primario. El mapeo del ganglio centinela puede modificar aún más estos enfoques.

La gastrectomía radical está indicada para la enfermedad resecable con estadios comprendidos del IB a III.

La gastrectomía subtotal puede llevarse a cabo si el margen proximal macroscópico de resección entre el tumor y la unión esófago-gástrica, es de 5 cm. Un margen de 8 cm se ha recomendado para los cánceres de tipo difuso, de lo contrario estaría indicado una gastrectomía total [III, A].

La extensión de la disección ganglionar acompañando a la gastrectomía radical ha sido ampliamente debatida, desde una disección y resección D1 (extirpación de los ganglios linfáticos perigástricos) hasta una linfadenectomía D2 (extirpación de los ganglios linfáticos perigástricos junto a los linfáticos de los territorios vasculares correspondientes a lo largo de la arteria gástrica izquierda, hepática común, arteria esplénica y tronco celíaco).

Las recomendaciones de clasificación UICC/AJCC TNM actual (séptima edición) incluyen la extirpación de un mínimo de 15 ganglios linfáticos para permitir una estadificación fiable.

La experiencia de los ensayos, tanto observacionales como aleatorizados, en los países asiáticos ha demostrado que la disección D2 conduce a resultados superiores en comparación con el D1 [II, B].

Trabajos realizados en Europa en los años 90, no demostraron ninguna ventaja de supervivencia inicial con la resección D2^{9,10}.

Sin embargo, tras 15 años de seguimiento de los resultados de Bonenkamp, Songun ha demostrado un menor número de recurrencias locorregionales y muertes relacionadas con el cáncer gástrico con resección D2, aunque ésto fue ligeramente compensado por el aumento de la mortalidad y la morbilidad postoperatoria¹¹.

Un meta-análisis reciente confirmó que no existe beneficio sobre la supervivencia general para la linfadenectomía D2, aunque sí se observaba beneficio cuando la linfadenectomía D2 se realizaba con preservación esplénica y pancreática¹².

Desde su inicio, la Clasificación Japonesa del Cáncer Gástrico (JGCA) ha utilizado un criterio anatómico que definía la pN, según la localización de los ganglios afectados en relación al tumor primario y su grado de afectación.

Así la no evidencia de invasión ganglionar, corresponde a N0, la afectación de ganglios de los grupos ganglionares perigástricos catalogados como primer nivel es N1, los localizados en las ramas del tronco celíaco segundo nivel, N2 o a distancia tercer nivel, N3.

Existe suficiente evidencia científica, basada en la acumulación de datos suministrados por los registros japoneses, que demuestra la fiabilidad de este criterio pronóstico¹³.

La JGCA ha establecido una nueva definición de los diferentes tipos de linfadenectomías (D). TABLA IV.

GASTRECTOMÍA	LINFADENECTOMÍA		
	D1 α	D1 β	D2
GRUPOS GANGLIONARES			
Distal subtotal			
Distal con preservación pilórica o Proximal	1, 3, 4a, 4b, 5, 6, 7	(D1), 8a, 9	(D1)+8a, 9, 11p, 12a
Total	1, 2, 3, 4a, 4b, 5, 6, 7	(D1), 8a, 9, 11p	(D1)+8a, 9, 10, 11p, 11d, 12a

TABLA IV: Grupos ganglionares para linfadenectomía D1, D2 en función del tipo de gastrectomía. Japanese Classification 2010.

Fuente: Rodríguez JM, Sasako M¹³.

Otra novedad es la eliminación del concepto de linfadenectomía D3, como resultado del ensayo en que se demostraba que la linfadenectomía paraaórtica aumentaba la morbilidad sin mejorar la supervivencia. No obstante, en los casos en que la disección incluya los grupos 13, 14v y/o 16, se permite recoger la información como linfadenectomía D2+¹⁴.

La cirugía laparoscópica ha sido evaluada como una alternativa a la cirugía abierta con los beneficios potenciales de la disminución de la morbilidad operatoria y con unos tiempos de recuperación más reducidos.

Meta-análisis y revisiones sistémicas en los últimos años confirman los beneficios de la gastrectomía distal por laparoscopia, aunque existen algunas dudas con respecto a los resultados a largo plazo y la posibilidad de obtener un menor número de ganglios linfáticos con el abordaje laparoscópico [I, A]^{15,16}.

En relación a los resultados oncológicos a largo plazo de la gastrectomía laparoscópica (90% de localización distal) fueron comparables a los de la gastrectomía abierta en un estudio multicéntrico y retrospectivo¹⁷.

Además, la morbilidad operatoria es mayor sobre todo en la gastrectomía total y sigue habiendo una falta de consenso sobre el enfoque preferido para la técnica de la anastomosis después de una gastrectomía total laparoscópica.

Los pacientes con cáncer gástrico precoz que no cumplan los criterios de disección submucosa endoscópica son aquellos que más pueden beneficiarse de un abordaje laparoscópico.

La gastrectomía D2 totalmente laparoscópica para los estadios II y III de la enfermedad es un procedimiento muy exigente. La seguridad y la eficiencia de este enfoque requiere de la habilidad del cirujano, su experiencia y de un más tiempo de prolongado¹⁸.

Según la Sociedad Americana del Cáncer, el porcentaje de supervivencias a 5 años de pacientes tratados con cirugía de un cáncer gástrico por estadios, es como sigue¹⁹:
TABLA V.

Estadio	Supervivencia observada 5 años
IA	71%
IB	57%
IIA	46%
IIB	33%
IIIA	20%
IIIB	14%
IIIC	9%
IV	4%

Tabla V. Supervivencia observada a 5 años por estadios.
Fuente: The American Cancer Society¹⁹.

QUIMIORRADIOTERAPIA ADYUVANTE

El ensayo clínico en Fase III del North American Intergroup-0116 demostró que la terapia adyuvante con cinco ciclos de 5-FU/leucovorin, además de la radioterapia concomitante (45 Gy en 25 fracciones durante 5 semanas) durante los ciclos 2 y 3 se traduce en una mejoría de la supervivencia global a los 5 años, en comparación con la cirugía sola.

Tras 10 años de seguimiento, esta diferencia sigue siendo significativa a favor de la quimiorradioterapia adyuvante [I, A]^{20,21}.

QUIMIOTERAPIA PERIOPERATORIA

En el cáncer de la unión esófago-gástrica, el ensayo Magic fue el primero en evaluar el papel de la quimioterapia perioperatoria en comparación con la cirugía sola en pacientes con cáncer gástrico resecable en estadio II y III. Los resultados demostraron que la quimioterapia mejora la supervivencia a los 5 años del 23% al 36%, con efectos tóxicos tolerables^{21,22}.

El tratamiento con quimioterapia preoperatoria se ha defendido como la vía de tratamiento preferido para la enfermedad operable en estadio > T1N0⁶.

No existe evidencia actualmente a favor de la superioridad de un esquema de quimioterapia preoperatoria (3 ciclos), seguido de cirugía y quimioterapia adyuvante frente a quimiorradioterapia adyuvante, estando pendientes de los resultados que se obtendrán de un estudio en Fase III que aleatoriza este esquema de tratamiento (Ensayo CRITICS)²².

A continuación se muestran los futuros y actuales ensayos clínicos referidos a la quimiorradioterapia en el cáncer gástrico resecable. TABLA VI.

Trial	Patient population	Treatment	Planned patients (N)	Primary endpoint	Secondary endpoint(s)	Status
CRITICS (NCT00407186) [55]						
The Netherlands	Preoperative ECC × 3 cycles → surgical resection with adequate lymphadenectomy	Postoperative chemotherapy: ECC × 3 cycles Postoperative chemoradiation with XP (capecitabine/cisplatin)	788	OS	DFS, toxicity, QOL, prediction of response, recurrence risk	Recruiting
TOP GEAR [68]						
Australia/New Zealand/Europe/Canada	Resectable gastric adenocarcinoma	Perioperative chemotherapy only: ECF × 3 cycles → surgery → ECF × 3 cycles Perioperative chemotherapy and preoperative chemoradiation: ECF × 2 cycles → XRT + 5-FU → surgery → ECF × 3 cycles	752	OS	DFS, toxicity, pathologic response rate	Recruiting
MAGIC B/ST03 (NCT00450203) [75]						
United Kingdom	Resectable gastric, gastroesophageal or lower esophageal adenocarcinoma	Perioperative chemotherapy without bevacizumab: ECX × 3 cycles → surgery → ECX × 3 cycles Perioperative chemotherapy with bevacizumab: ECX + bevacizumab × 3 cycles → surgery → ECX + bevacizumab × 3 cycles → maintenance bevacizumab × 6 cycles	1100	OS	DFS, response rate, surgical complete resection rate, treatment-related morbidity, QOL, cost-effectiveness	Recruiting
ARTIST-II						
Korea	D2 resected lymph node-positive patients	Adjuvant chemotherapy or adjuvant chemoradiation				Planned

Abbreviations: 5-FU, 5-fluorouracil; DFS, disease-free survival; ECC, epirubicin, capecitabine, cisplatin; ECF, epirubicin, cisplatin, 5-FU; ECX, epirubicin, cisplatin, capecitabine; QOL, quality of life; XRT, radiation therapy.

TABLA VI. Ensayos clínicos en cáncer gástrico resecable.
Fuente: Cunningham D²².

C. ESTRATIFICACIÓN. FRAGILIDAD Y SENILIDAD.

El concepto de estratificación consiste en la identificación de un grupo de pacientes con características "biológicas" comunes mediante el uso de técnicas de diagnóstico molecular, bioquímico y/o por imagen.

Para una correcta estratificación de los pacientes, un concepto fundamental a tener en cuenta es la fragilidad, y más, si cabe, cuando en nuestro medio (concretamente en Bizkaia) más del 50% de las personas diagnosticadas de cáncer gástrico tienen una edad superior a los 70 años entre los hombres y a los 75 entre las mujeres⁴.

Hoy en día, existen diferentes definiciones para la fragilidad, pudiéndose considerar como un síndrome clínico en el que se encuentren presentes tres o más de los siguientes criterios: pérdida intencionada de peso, agotamiento, debilidad, velocidad de marcha lenta o baja actividad física.

El aumento de la fragilidad está directamente asociado con un alto riesgo de mortalidad, institucionalización, caídas, y hospitalización de los pacientes²³.

La prevalencia de la fragilidad en los pacientes (incluyendo todas las edades) para los procedimientos quirúrgicos está entre 4,1 y 50,3%²⁴.

La mortalidad a los 30 días de la cirugía por complicación en pacientes mayores de 80 años se encuentra alrededor de un 26%²⁵.

Distintos estudios han demostrado que las personas mayores pueden correr el riesgo de sobretatamiento o, por el contrario, de un tratamiento insuficiente a causa de distintos factores, tales como sus comorbilidades, la fragilidad, la disminución de su esperanza de vida o, incluso, la percepción clínica del propio profesional.

D. MEDICINA PERSONALIZADA Y DE PRECISIÓN

La adaptación de los tratamientos médicos y quirúrgicos al perfil molecular único de cada individuo, es la base de la medicina personalizada²⁶.

Además con ella, se pueden clasificar las personas en sub-poblaciones que difieren entre sí en su susceptibilidad a padecer una enfermedad concreta y/o determinar la predisposición a la enfermedad de la población y realizar su oportuna prevención dirigida.

La estrategia de tratamiento para la enfermedad oncológica se determina según el tipo histológico y la clasificación TNM. Esta clasificación está basada en factores clínico-patológicos y son el “global gold standard” en la toma de decisiones clínicas.

Sin embargo, los cambios más significativos en los cuidados de salud, se han producido con la medicina de precisión, que redefine el diagnóstico, estratifica a los pacientes, informa de la sensibilidad individual a la quimio-radioterapia y establece el pronóstico; en definitiva, aporta ahorro y eficiencia al sistema y reduce al mínimo los acontecimientos adversos.

Un pensamiento clave en el modelo que implementa la estrategia práctica de la cirugía “personalizada y de precisión”, es el conocimiento de la complejidad molecular de la iniciación y progresión tumorales.

La oncología personalizada incluye el concepto de que cada tumor de cada individuo, es único en la causa, la tasa de progresión y la capacidad de respuesta a la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia.

Entre los principales argumentos a favor de una medicina personalizada, con los consiguientes potenciales beneficios, tanto clínicos para el paciente, como en el campo de la eficiencia para los sistemas sanitarios, podríamos destacar los siguientes:

- Se centra en la prevención y predicción de la enfermedad en lugar de en la reacción a la misma.
- Dirige la selección de la terapia óptima y reduce la prescripción por ensayo-error, tomando las decisiones médicas con mejor información.
- Hay más posibilidades de actuar en estadios precoces de la enfermedad que en el pasado.
- Mayor probabilidad de obtener buenos resultados gracias a las terapias mejor dirigidas.
- Reducir las posibilidades de reacciones adversas a los medicamentos.
- Aumentar la adherencia del paciente al tratamiento.
- Mejorar la calidad de vida.
- Revelar usos adicionales o alternativos para medicamentos y fármacos candidatos.
- Ayuda a controlar el costo general de la atención de salud.

En la figura mostrada a continuación, se pueden observar algunos de los aspectos no resueltos o en vías de resolución, relacionados con la medicina personalizada, como la propiedad intelectual, la ética y privacidad, la formación y adopción en los sistemas de salud, entre otros^{27,28}. FIGURA 2.

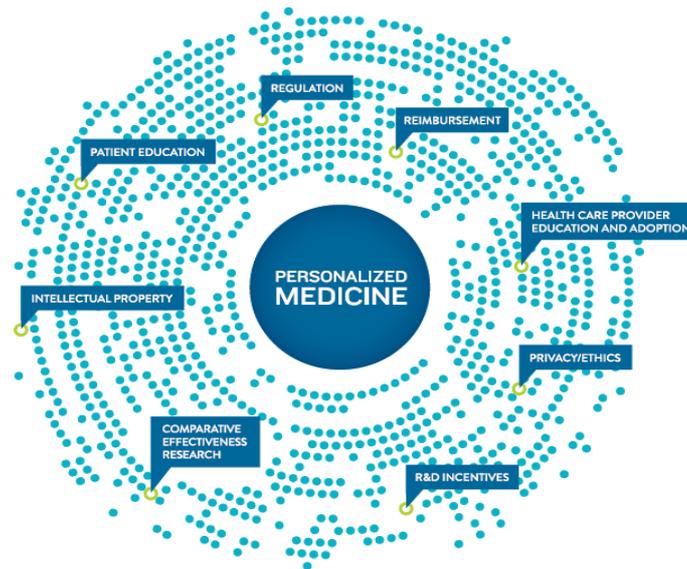


FIGURA 2. Aspectos relacionados con la medicina personalizada.
Fuente: Personalized Medicine Coalition²⁸.

E. BIOMARCADORES OMICS

En distintos ámbitos científicos, se considera a la genómica como la anatomía del siglo XXI y por consiguiente a la epigenética y a las vías de señalización celular, como la fisiología de este siglo. Los cirujanos deberíamos conocer la anatomía y la fisiología, antes de implementar los cuidados en nuestros pacientes.

La secuenciación del genoma individual posee la clave para llevar a cabo la llamada medicina genómica personalizada²⁹.

El modelo que implementa una estrategia práctica de medicina y cirugía personalizada, ha sido propuesta por Brunnicardi 2011, siendo su base conceptual, que el “perfil molecular del paciente marca tanto las guías de elección terapéutica, como la mejora en el seguimiento de los pacientes quirúrgicos”.

En la figura siguiente se muestra el modelo de medicina y cirugía genómica propuesto por Brunnicardi en 2011³⁰. FIGURA 3.

G.I.F.T. Model For Personalized Genomic Medicine and Surgery

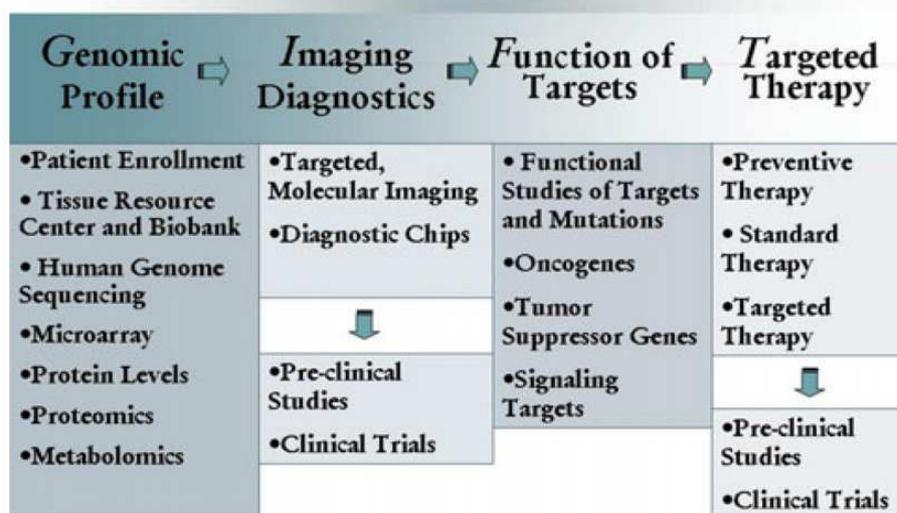


FIGURA 3. Modelo propuesto para una medicina y cirugía genómica personalizadas.

Fuente: Brunnicardi FCH³⁰.

Genotipo-fenotipo, genómica, proteómica y metabolómica, conforman un conjunto de estudios OMICs, que han modificado la forma en la que clasificamos, diagnosticamos y tratamos las enfermedades, mejorando la investigación biomédica y los cuidados de la salud.

En la figura mostrada a continuación, se esquematiza, el tipo de muestra a analizar, las distintas técnicas de determinación y el análisis de datos obtenidos para cada una de las diferentes OMICs³¹. FIGURA 4.

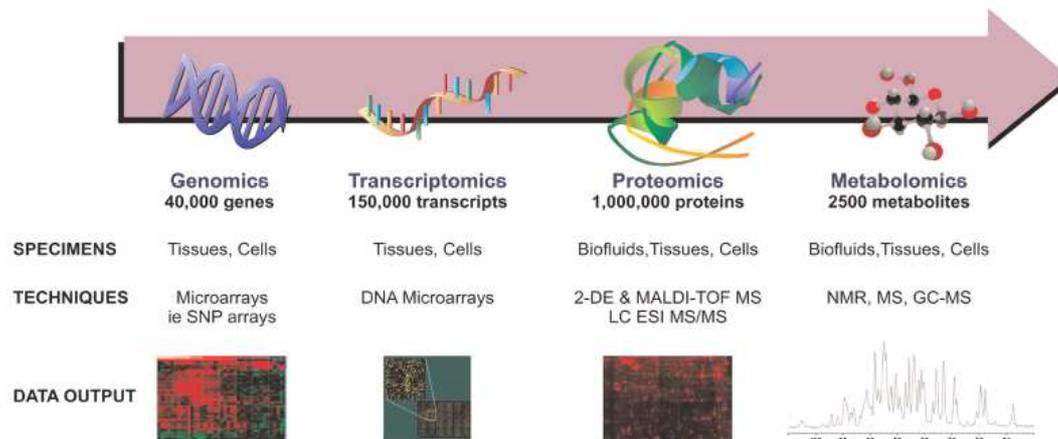


FIGURA 4. Tipos de muestra, técnicas de determinación y análisis de datos para las distintas OMICs.

Fuente: Davis VW³¹.

Este método, representa un enfoque más preciso, en comparación con la medicina clínica actual, basada hasta el momento en las pautas diagnóstico-terapéuticas obtenidas a partir de estudios realizados en poblaciones heterogéneas de pacientes³².

F. BIOBANCO

ESTANDARIZACIÓN Y UTILIZACIÓN DE LOS RECURSOS DEL BIOBANCO EN LA APLICACIÓN CLÍNICA DE LA PROTEÓMICA DEL CÁNCER GÁSTRICO

Los estudios iniciales para el desarrollo de nuevos biomarcadores presentaron en el pasado una gran variabilidad entre los diferentes laboratorios. Esta situación afectó directamente al desarrollo de la investigación clínica traslacional, por lo que ha sido fundamental el desarrollo de infraestructuras, como son los biobancos, para el manejo estandarizado de las muestras biológicas³³.

Los biobancos han adquirido una verdadera relevancia clínica con el desarrollo de las distintas -OMICS, principalmente de la genómica y la proteómica³⁴.

Para el seguimiento longitudinal de las cohortes de pacientes, los biobancos utilizan registros vinculados de dichos pacientes a sus muestras biológicas, las cuales se podrían obtener secuencialmente, incluso, a lo largo de su enfermedad³⁵.

Los avances en la secuenciación del genoma y del mapa del proteoma humano, los bancos de tejidos y los registros médicos electrónicos, sitúan la medicina personalizada a la vanguardia de la atención sanitaria.

En Europa, se ha desarrollado el BBMRI (Biobanking and Biomolecular Resources Research Infra-structure) para la estandarización a gran escala de 280 biobancos en más de 30 países.

Se requieren, tanto en genómica como en proteómica, métodos estandarizados en relación con la recogida, el almacenamiento y la utilización de muestras clínicas con un mayor control de calidad e idoneidad de la muestra, para asegurar la integridad de los datos y establecer contextos comunes para la interpretación de los resultados, de manera que los conjuntos de datos sean comparables entre sí³⁶.

MUESTRAS: RECOGIDA Y CONSERVACIÓN.

RECOGIDA

Las colecciones de muestras a custodiar en los biobancos, deben ante todo, ser representativas de una manera cualitativa y cuantitativa de los posibles cambios en los patrones de expresión peptídica que se asocian a los cambios observados en el estado de salud de nuestros pacientes³⁷.

El tejido muestral puede no ser homogéneo, siendo constituido por una mezcla de células del parénquima, estroma, sanas, enfermas, reactivas, inflamatorias, con necrosis... por lo que es de gran importancia tener una imagen microscópica para documentar la complejidad presente en la muestra³⁸.

Deben ser procesadas inmediatamente por medios automatizados de separación, alicuotado y almacenaje, de tal manera que se preserve la integridad de la estructura y función presentes en el momento de la recogida muestral.

Como la adquisición de un número suficiente de muestras puede llevar meses e incluso años, se ha de idear un sistema de almenaje estandarizado a largo plazo.

Igualmente, se deben registrar los parámetros clínicos, radiológicos, anatómo-patológicos... del paciente y su enfermedad, para luego poder ser evaluados junto con los hallazgos de laboratorio objeto de estudio, e incluso se podrían coleccionar muestras de los pacientes a lo largo de la evolución de su enfermedad y correlacionarlo con los hallazgos clínicos de respuesta al tratamiento para avanzar en el estudio de biomarcadores futuros³⁷.

ALMACENAMIENTO

Los tejidos que se aíslan durante la cirugía, deben ser conservados tan pronto como sea posible, después del aislamiento.

La regla general es que la ruptura e inestabilidad de la muestra aumentarán con el tiempo³⁶.

Durante el procedimiento quirúrgico, el tejido tendrá que ser transportado al servicio de anatomía patológica, donde un patólogo lo inspeccionará, realizará los cortes adecuados para el diagnóstico histopatológico y luego congelará el tejido restante para su uso futuro. Es por lo tanto inevitable que trascurra cierto tiempo entre la cirugía y la congelación de la muestra.

El análisis de proteínas, es un procedimiento exigente ya que requiere tejido sin fijación en fresco o fresco congelado, y no existe ningún método de amplificación (PCR o similar) por lo que debe ser extraído el material suficiente para su análisis del propio tejido, tras el propio acto quirúrgico.

Para que dicho análisis proteómico sea relevante, el tejido necesita ser manejado de una forma reproducible de manera que se preserven los aspectos importantes de su proteoma intactos. Para ello es fundamental el desarrollo de protocolos normalizados de trabajo. En la actualidad el método de conservación más compatible con el posterior análisis proteómico es el de tejido fresco congelado ya que la fijación por reticulación de formaldehído, tal como se ha hecho tradicionalmente en histopatología, es incompatible con algunos análisis proteómicos, lo que exige un cambio en las rutinas de manipulación de las muestras histopatológicas³⁸.

La temperatura de almacenaje es un factor crítico en la preservación de la estructura y la función de los materiales almacenados.

A este respecto se pueden dividir los biobancos en dos categorías, los desarrollados antes del año 2000, que en su gran mayoría llevan a cabo un procesamiento manual de la muestra y su posterior congelación a -20°C o -80°C en congeladores localizados en laboratorios generales o como colecciones de tejidos en bloque en laboratorios de anatomía patológica; y los desarrollados a partir del año 2000 con un procesamiento automatizado de la muestra y su posterior congelación y almacenaje a temperaturas de -80°C y -260°C .

Se ha determinado que a una temperatura de -80°C , la mayoría de las actividades biológicas, tales como la actividad enzimática y la degradación metabólica son inexistentes³⁶.

IDENTIFICACIÓN ELECTRÓNICA

El código de barras en sí es único para cada muestra. Este código establecerá una trazabilidad de la muestra durante su vida útil y es un importante elemento de control para asegurar la integridad de la misma. Contiene información extensa, no sólo de los datos del paciente, sino también de un potencial proyecto en concreto, de los parámetros del mismo y de la relación con el tiempo de procesamiento de la muestra³⁶.

PRÓXIMA GENERACIÓN DE BIOBANCOS

El sistema de biobancos tradicional se enfrenta a una serie de desafíos como consecuencia del desarrollo de la investigación basada en biomarcadores, así son, el aumento de exigencias en seguridad y cumplimiento de cuestiones reglamentarias y de control de la privacidad, el aumento de la externalización y de la colaboración con socios, proveedores... y el aumento de las expectativas científicas, dejando de centrarse en actividades meramente de gestión del inventario muestral³³.

Los biobancos y los registros del cáncer tienen una responsabilidad colectiva para desarrollar la normalización en el tratamiento de los datos y las muestras, y alcanzar así una medicina traslacional con éxito y comparable en los resultados de la investigación³⁵.

Así mismo, la necesidad de desarrollo de esta nueva generación de biobancos es mandatoria, ya que en los actuales únicamente se custodian muestras relacionadas con el tumor primario y dada la alta heterogeneidad detectada en los tumores y su comportamiento, es prioritario un cambio de planteamiento con la realización de biopsias seriadas a lo largo de la enfermedad metastásica y así vincular la huella molecular real con los requerimientos terapéuticos adecuados para cada paciente en cada momento de su enfermedad³⁹.

La enfermedad es un proceso, no un estado; por lo que, las muestras clínicas son temporales y unidimensionales en un contexto dinámico de desarrollo de enfermedad⁴⁰.

G. CLASIFICACIÓN CÁNCER GÁSTRICO

Se han propuesto diversos sistemas de clasificación para ayudar a la descripción del cáncer gástrico, ya sea, a través de aspectos macroscópicos (Borrmann) o en base a su configuración microscópica (Ming, Carniero y Goseki)⁴¹.

Sin embargo, varias de las guías existentes para el tratamiento del cáncer gástrico consideran a la clasificación de Lauren o la de la OMS como referente en la toma de decisiones terapéuticas, lo cual incide sobre la importancia de un sistema de clasificación fiable.

Durante el último medio siglo, la clasificación histológica del carcinoma gástrico se ha basado en gran medida en los criterios de Lauren, siendo los dos principales subtipos histológicos, el tipo intestinal y el tipo difuso. Las frecuencias relativas son aproximadamente el 54% de tipo intestinal, el 32% del tipo difuso y el 15% para el tipo indeterminado⁴².

La clasificación de la OMS 2010 del fenotipo celular reconoce cuatro grandes patrones histológicos de cáncer gástrico: tubular, papilar, anillo de sello, mucinoso y carcinoma de células mal cohesionado, además de variantes histológicas poco comunes⁴³.

A continuación mostramos una tabla que correlaciona los tipos histológicos según la clasificación de Lauren y la clasificación de la OMS⁴⁴. TABLA VII.

Laurén classification	World Health Organization classification
Intestinal type	Papillary adenocarcinoma
	Tubular adenocarcinoma
	Mucinous adenocarcinoma
Diffuse type	Signet-ring cell carcinoma and other poorly cohesive carcinomas
Indeterminate type	Mixed carcinoma
	Adenosquamous Carcinoma
	Squamous cell carcinoma
	Hepatoid adenocarcinoma
	Carcinoma with lymphoid stroma
	Choriocarcinoma
	Carcinosarcoma
	Parietal cell carcinoma
	Malignant rhabdoid tumor
	Mucoepidermoid carcinoma
	Paneth cell carcinoma
	Undifferentiated carcinoma
	Mixed adeno-neuroendocrine carcinoma
	Endodermal sinus tumor
	Embryonal carcinoma
Pure gastric yolk sac tumor	
Oncocytic adenocarcinoma	

TABLA VII. Correlación de las clasificaciones de Lauren y de las OMS.

Fuente: Berlth F⁴⁴.

H. MECANISMOS PATOGENICOS EN EL CÁNCER GÁSTRICO

1. GENÓMICA EN EL CÁNCER GÁSTRICO

La patogenia del cáncer gástrico implica tanto factores ambientales, tales como la infección por *Helicobacter Pylori* o la susceptibilidad genética.

Entre las influencias genéticas clave, contribuyen al desarrollo del cáncer gástrico, la inestabilidad cromosomal, la inestabilidad de microsatélites, los cambios en el perfil epigenético, incluyendo el perfil de microRNA, las mutaciones genéticas somáticas, estudios de asociación del genoma o polimorfismo de un solo nucleótido^{45,46}.

CÁNCER GÁSTRICO HEREDITARIO

La mayoría de los cánceres gástricos se producen de manera esporádica, mientras que entre un 8% y un 10% presentan un componente familiar hereditario, en relación con mutaciones germinales en el p53 (síndrome de Li-Fraumeni) y en el BRCA2.

Entre el 1 y el 3% de los cánceres gástricos, se describen mutaciones en la línea germinal del gen, que codifica la proteína de adhesión celular E-cadherina, provocando una predisposición autosómica dominante al cáncer gástrico difuso hereditario, con una penetrancia aproximada del 70%.

Así mismo el cáncer gástrico puede desarrollarse como parte del síndrome de cáncer de colon hereditario sin poliposis (HNPCC), del síndrome de poliposis adenomatosa familiar, incluyendo poliposis (FAP) y el síndrome de Peutz-Jeghers⁴².

CÁNCER GÁSTRICO ESPORÁDICO

ALTERACIONES GENÓMICAS Y EPIGENÓMICAS ADQUIRIDAS DURANTE LA CARCINOGENESIS

Las nuevas tecnologías de diagnóstico del cáncer basadas en los perfiles "OMICS" de los pacientes y sus interacciones, han llevado a una explosión de información molecular relevante de la enfermedad, con potencial para mejorar el cuidado de los mismos.

La inestabilidad genómica se subclasifica en inestabilidad cromosómica (CIN) e inestabilidad de microsatélites (MSI), siendo esta última una vía principal implicada en la carcinogénesis gástrica y produciéndose en algo menos del 20% de todos los cánceres gástricos.

La inestabilidad cromosómica ha sido considerada durante mucho tiempo como un rasgo distintivo de malignidad y puede ocurrir como un evento, tanto temprano como tardío, en la progresión de la enfermedad.

La inestabilidad de microsatélites se encuentra en un 50% de los cánceres gástricos esporádicos y en gran medida es causada por cambios epigenéticos de los genes por desajuste en la reparación, particularmente el MSH1.

El cambio más común epigenético es la hipermetilación, que deteriora la reparación del ADN, con mutaciones por repetición a nivel de los nucleótidos, afectando así a los niveles de expresión de muchos genes.

El consenso general es que los cánceres gástricos con altos niveles de inestabilidad de microsatélites son más propensos a exhibir una localización antral, subtipo intestinal y una mejor supervivencia que los tumores con inestabilidad de microsatélites estable o baja⁴⁵.

A continuación se muestran alguna de las alteraciones genéticas y epigenéticas del cáncer gástrico en relación con la expresión del gen, tipo de alteración genética, anatomía patológica y el pronóstico. TABLA VIII-IX-X⁴⁶.

Genes	Alterations	Function	Pathology	Prognosis
Tumor suppressor genes				
<i>TP53</i>	Mutation/LOH	Transcription factor	Both	Association with poor survival
<i>APC</i>	Mutation/ LOH	Signal transduction	Intestinal	Association with poor survival
<i>CDHI</i>	Mutations/LOH	Adhesion	Diffuse	Association with poor survival
<i>hMLH1/hMSH2</i>	Mutations	DNA mismatch repair	Both	Association with poor survival and microsatellite instability
<i>p16</i>	Mutations/LOH	Cell cycle	Both	LOH of p16 association with lymph metastasis
<i>RIZ</i>	Mutations/LOH	Nuclear histone/protein methyltransferase	-	Association with microsatellite instability
<i>hMSH3</i>	Mutations	DNA mismatch repair	-	Association with microsatellite instability
<i>hMSH6</i>	Mutations	DNA mismatch repair	-	Association with microsatellite instability
<i>PTEN</i>	Mutations/LOH	protein tyrosine phosphatases	Both	Association with TNM stage, lymph node metastasis and poor survival
<i>bcl-2</i>	LOH	Apoptosis inhibitor	Intestinal	Association with invasion depth and lymph node metastasis
<i>DCC</i>	LOH	Cell adhesion	Intestinal	Association with poor survival
<i>NM23</i>	LOH	Nucleoside diphosphate kinase	Both	Association with metastasis and poor survival
<i>p21</i>	Loss	Cell cycle	Both	Association with poor survival
<i>FHIT</i>	LOH	Purine metabolism	Both	Association with invasive depth and microsatellite instability
<i>BRCA1</i>	LOH	Genetic instability	Both	Association with poor survival
Oncogenes				
<i>β-Catenin</i>	Mutations	Adhesion, Signal transduction	Intestinal	Association with poor survival and EBV-associated GC
<i>BRAF</i>	Mutations	Signal transduction	Both	Association with microsatellite instability
<i>K-Ras</i>	Mutations	Signal transduction	Intestinal	Association with poor prognosis and microsatellite instability
<i>PIK3CA</i>	Amplification	Signal transduction	Both	Association with poor survival
<i>EGFR</i>	Mutations	Growth factor receptor	Both	Association with poor survival
<i>ERBB2</i>	Amplification	Tyrosine kinases Growth factor Receptor	Intestinal	Association with poor survival
<i>ERBB3</i>	Mutations	Tyrosine kinases	Diffuse	Association with poor survival
<i>ERBB4</i>	Overexpression	Growth factor receptor Tyrosine kinases	Diffuse	Association with poor survival
<i>c-Met</i>	Amplification	Growth factor receptor	Intestinal	Association with poor survival
<i>KSAM</i>	Amplification	Growth factor receptor	Diffuse	Association with poor survival
<i>VEGF</i>	Overexpression	Growth factor	Intestinal	Association with metastasis and poor survival
<i>CD44</i>	Amplification	Cell adhesion	Both	Association with metastasis and poor survival
<i>PRL3</i>	Amplification	Cell signaling molecules	Both	Association with metastasis and poor survival
<i>c-Myc</i>	Amplification	Transcription factor	Intestinal	Association with poor survival
<i>Cyclin E</i>	Amplification	Cell cycle regulator	Both	Association with poor survival

LOH: Loss of heterozygosity.

TABLA VIII. Alteraciones genéticas del cáncer gástrico.

Fuente: Shi J⁴⁶.

Gene	Type of alteration	Frequency	Major cellular process	FDA-approved agent	Overall survival benefit
<i>TP53</i>	Mutation	43.80%	DNA damage response	None	Not tested
<i>CDKN2B</i>	Homozygous deletion	9.60%	DNA damage response	None	Not tested
<i>BRCA2</i>	Mutation	8.20%	DNA damage response	None	Not tested
<i>BRCA1</i>	Mutation	5.90%	DNA damage response	None	Not tested
<i>MDM1</i>	Mutation	7.30%	DNA damage response	None	Not tested
<i>PIK3CA</i>	Mutation	21.00%	Signal transduction, growth	None	Not tested
<i>PIK3CA</i>	Amplification	5.00%	Signal transduction, growth	None	Not tested
<i>PTEN</i>	Mutation	5.90%	Signal transduction, growth	None	Not tested
<i>PIK3CG</i>	Mutation	6.40%	Signal transduction, growth	None	Not tested
<i>mTOR</i>	Mutation	8.20%	Signal transduction, growth	Everolimus, temsirolimus	No (Ref. [83])
<i>RPTOR</i>	Mutation	5.50%	Signal transduction, growth	everolimus, temsirolimus	No (Ref. [83])
<i>RICTOR</i>	Amplification	7.70%	Signal transduction, growth	everolimus, temsirolimus	No (Ref. [83])
<i>MYC</i>	Amplification	11.90%	Cell cycle control	None	Not tested
<i>CDKN2A</i>	Homozygous Deletion	10.50%	Cell cycle control	None	Not tested
<i>CDK6</i>	Amplification	7.30%	Cell cycle control	None	Not tested
<i>CCND1</i>	Amplification	6.40%	Cell cycle control	None	Not tested
<i>E2F7</i>	Mutation	6.40%	Cell cycle control	None	Not tested
<i>ERBB2</i>	Amplification	10.50%	RTK, growth	Trastuzumab	Yes (Ref. [19])
<i>ERBB2</i>	Mutation	5%	RTK, growth	None	Not tested
<i>ERBB3</i>	Mutation	10.50%	RTK, growth	pertuzumab	Not tested
<i>ERBB4</i>	Mutation	9.40%	RTK, growth	None	Not tested
<i>IGF1R</i>	Mutation	5.90%	RTK, growth	None	Not tested
<i>EGFR</i>	Mutation	5%	RTK, growth	Erlotinib, gefitinib, afatinib	Not tested
<i>EGFR</i>	Amplification	5.40%	RTK, growth	Cetuxumab, panitumumab	No (Refs. [11,20])
<i>KRAS</i>	Mutation	11.40%	Ras-Raf-MEK-ERK	None	Not tested
<i>KRAS</i>	Amplification	5.40%	Ras-Raf-MEK-ERK	None	Not tested
<i>DAB2</i>	Amplification	8.20%	Ras-Raf-MEK-ERK	None	Not tested
<i>PEG3</i>	Mutation	9.60%	Survival-death regulation	None	Not tested
<i>WWOX</i>	Homozygous deletion	6.80%	Survival-death regulation	None	Not tested
<i>CDH1</i>	Mutation	7.80%	Invasion-metastasis	None	Not tested
<i>AURKA</i>	Amplification	7.30%	Growth	None	Not tested
<i>ARID1A</i>	Mutation	19.80%	Chromatin remodeling	None	Not tested
<i>FBXW7</i>	Mutation	7.80%	Ubiquitin ligase	None	Not tested

Comprehensive gene lists are not presented due to space constraints, and can be found in the TCGA and COSMIC databases. Data are derived from the cancer genome atlas (TCGA) and catalog of somatic mutations in cancer (COSMIC) databases, accessed 2/2014.

TABLA IX. Alteraciones genéticas somáticas recurrentes del cáncer gástrico.
Fuente: Shi J⁴⁶.

Genes	Function	Prognosis	Detected in serum
DNA methylation			
<i>BRCA1</i>	DNA repair	Association with age	-
<i>hMLH1</i>	DNA repair	Association with poor survival	Yes
<i>MGMT</i>	DNA repair	Association with poor survival	-
<i>RASSF1A</i>	DNA repair/Cell cycle	Association with poor survival	Yes
<i>CDH1</i>	Cell invasion/Metastasis	Association with poor survival	Yes
<i>RASSF2</i>	DNA repair/Cell cycle	Association with poor survival	-
<i>P16</i>	Cell cycle	Association with poor survival	Yes
<i>IGFBP3</i>	Cell cycle	Association with lymph node metastasis	-
<i>CHFR</i>	Cell cycle	Association with invasion depth, differentiation and lymph node metastasis	-
<i>P15</i>	Cell cycle	-	Yes
<i>ADAM23</i>	Cell invasion/metastasis	-	-
<i>APC</i>	Cell invasion, Metastasis, Signal transduction	Association with poor survival	Yes
<i>LOX</i>	Cell invasion and metastasis	Association with Helicobacter pylori-positive individuals	-
<i>TIMP3</i>	Cell invasion and metastasis	Association with poor survival	Yes
<i>HAND1</i>	Cell differentiation	Association with poor survival	-
<i>MLF1</i>	Cell differentiation	Association with lymph node metastasis	-
<i>PRDM5</i>	Cell differentiation	-	-
<i>RORA</i>	Cell differentiation	-	-
<i>NDRG2</i>	Cell differentiation	Association with lymph node metastasis	-
<i>BNIP3</i>	Apoptosis	Association with poor survival	-
<i>DAPK</i>	Apoptosis	Association with poor survival	Yes
<i>TMS</i>	Apoptosis	Association with poor survival	-
<i>FHIT</i>	Apoptosis	Association with lymph node metastasis	-
<i>GSTP1</i>	Apoptosis	Association with EBV-related gastric cancer	Yes
<i>FLNc</i>	Cell morphology	Association with poor survival	-
<i>RUNX3</i>	Transcriptional factor, Signal transduction	Association with poor survival	Yes
<i>ZNF545</i>	Transcriptional factor	Association with poor survival	-
<i>RARβ</i>	Signal transduction	Association with poor survival	Yes
<i>HRA5LS</i>	Signal transduction	-	-
<i>SFRP2</i>	Signal transduction	-	-
<i>SFRP1</i>	Signal transduction	Association with lymph node metastasis	-
MicroRNAs			
<i>let-7g</i>	Tumor suppressor	Association with invasion depth, lymph node metastasis	-
<i>miR-433</i>	Tumor suppressor	Association with invasion depth, lymph node metastasis	GREB2
<i>miR-1</i>	Tumor suppressor	Association with tumor stage	-
<i>miR-20a</i>	Tumor suppressor	Association with tumor stage	-
<i>miR-27a</i>	Tumor suppressor	Association with tumor stage	-
<i>miR-34</i>	Tumor suppressor	Association with tumor stage	Bcl-2, Notch, and HMGA2
<i>miR-423-5p</i>	Tumor suppressor	Association with tumor stage	-
<i>miR-125a-5p</i>	Tumor suppressor	Association with tumor size, invasion, liver metastasis, and poor survival	ERBB2
<i>miR-146a</i>	Tumor suppressor	Association with lymph node metastasis, venous invasion, and poor survival	EGFR, IRAK1
<i>miR-9</i>	Tumor suppressor	-	RAB34, CD α 2, and NF- κ B1
<i>miR-375</i>	Tumor suppressor	-	PDK1, 14-3-3zeta
<i>miR-433</i>	Tumor suppressor	-	GREB2
<i>miR-214</i>	Oncogenesis	Association with invasion depth and lymph node metastasis	-
<i>miR-130b</i>	Oncogenesis	-	RUN α 3

TABLA X. Alteraciones epigenéticas del cáncer gástrico.
Fuente: Shi J⁴⁶.

Estas alteraciones pueden ser utilizadas para la clasificación de la enfermedad en combinación con las clasificaciones morfológicas convencionales.

2. PROTEÓMICA EN EL CÁNCER GÁSTRICO

Defectos genéticos y epigenéticos tienen una correlación fenotípica, cuyo resultado son alteraciones en la función o regulación de determinadas proteínas.

Así mismo, este defecto primario puede tener consecuencias funcionales sobre las redes de señalización, ya sea dentro o entre las células.

Algunos de estos efectos secundarios pueden ser detectados únicamente a nivel proteico, así que sólo pueden ser estudiados mediante técnicas de proteómica³⁸.

La secuenciación completa del genoma humano hasta el momento, ha llevado a la identificación de aproximadamente 20.687 genes codificadores de proteínas.

A lo largo de los últimos años ha habido varias iniciativas importantes para la caracterización del proteoma humano, incluyendo la creación de un consorcio en 2001, llamado HUPO (Human Proteome Organization) cuya misión fue, definir y promover la proteómica a través de la cooperación y colaboración internacional, fomentando el desarrollo de nuevas tecnologías, técnicas y capacitación, para entender mejor las enfermedades humanas⁴⁷.

En este proyecto (centrado en el cromosoma), se propuso caracterizar los genes codificantes de las proteínas humanas, para comprender mejor la biología humana y la enfermedad.

Como estrategia experimental general, los grupos de investigación del HPP (Human Proteome Project) utilizaron tres pilares de trabajo: espectrometría de masas, aislamiento de anticuerpos y herramientas bioinformáticas con sus bases del conocimiento⁴⁸. FIGURA 5.

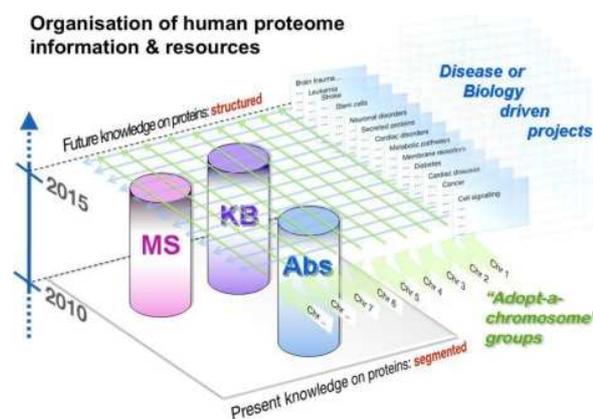


FIGURA 5. Pilares de trabajo de los grupos de investigación del HPP: espectrometría de masas, aislamiento de anticuerpos y herramientas bioinformáticas.

Fuente: Legrain P⁴⁸.

En relación a las bases de datos, la primera base de datos manual para un total de 20000 genes humanos, fue presentada en 2008 por el grupo UniProt/Swiss-Prot⁴⁹.

Además, NeXtProt (www.nextprot.org) es una base de datos de conocimiento desarrollado por el Instituto Suizo de Bioinformática (SIB, www.isb-sib.ch) para apoyar la investigación sobre las proteínas humanas.

Los datos básicos que figuran en NeXtProt tienen como base el cuerpo de conocimiento extraído de UniProtKB/Swiss-Prot sobre las proteínas humanas⁵⁰.

El diagrama de flujo⁵¹ propuesto para ese proyecto, se muestra a continuación. FIGURA 6.

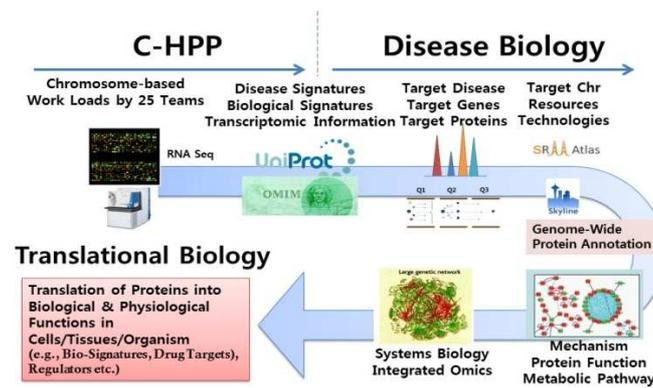


FIGURA 6. Diagrama de flujo de trabajo.
Fuente: Paik YK⁵¹.

➤ BIOMARCADORES PROTEÓMICOS EN EL CÁNCER GÁSTRICO Y EN SUS PRECURSORES

PROTEÓMICA EN LA GASTRITIS CRÓNICA ANTRAL

Se ha estudiado en diversos trabajos la proteómica diferencial de las proteínas expresadas en la mucosa gástrica sana en comparación con las expresadas en la gastritis crónica antral, en el que mostramos a continuación, fue realizada utilizando una electroforesis en gel bidimensional y espectrometría de masas⁵².

Se identificaron 18 proteínas expresadas diferencialmente en la gastritis crónica antral, en comparación con mucosa normal correspondiente. Algunos de los datos de este trabajo son mostrados en la FIGURA 7.

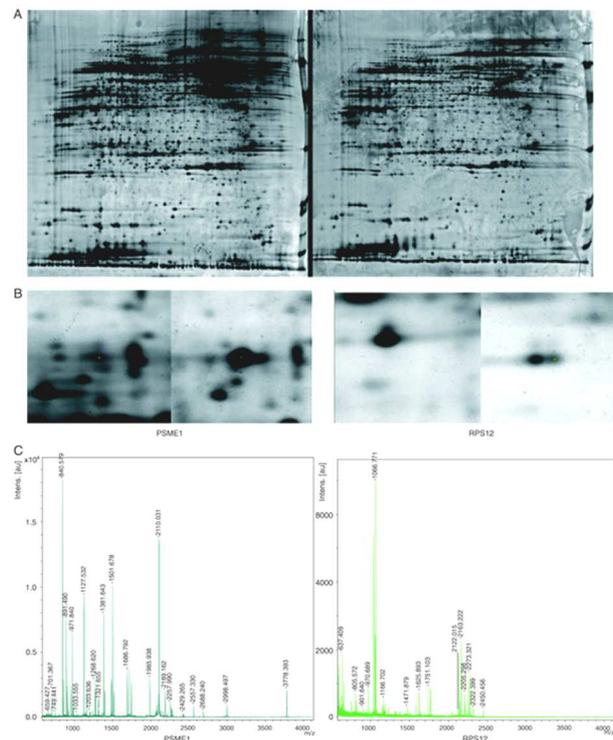


FIGURA 7. Detección y análisis de proteínas expresadas diferencialmente en gastritis atrófica crónica.

A. Electroforesis en 2D. Las proteínas expresadas en el tejido con gastritis crónica atrófica, se compararon con los expresados en el tejido normal correspondiente. 15 spots fueron identificados por espectrometría de masas de 18 spots de proteínas expresadas diferencialmente. B. Regiones ampliadas del gel 2-DE en la que se muestran los spots que se han seleccionado. C. Análisis del espectro de los péptidos identificados.

Fuente: Zhang L⁵².

Por técnicas de MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization_Time-Of-Flight), también ha sido determina la expresión diferencial de las proteínas identificadas en las células epiteliales de la mucosa gástrica infectadas por Epstein Barr⁵³.

ALTERACIÓN PROTEÓMICA EN EL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

Desde hace varios años, se vienen realizando enfoques de proteómica del descubrimiento, para analizar los perfiles de proteínas de muestras quirúrgicas con adenocarcinoma gástrico primario y mucosa gástrica no tumoral, con el objetivo de identificar las proteínas específicas asociadas a la enfermedad, como potenciales biomarcadores clínicos y para el estudio de carcinogénesis⁵⁴.

Se han encontrado múltiples alteraciones de proteínas en los tejidos tumorales, en comparación con los tejidos no tumorales.

Algunas de estas alteraciones implican variaciones en la expresión de las proteínas del citoesqueleto, incluyendo un aumento en la citoqueratina 8 y en una isoforma de la tropomiosina o una disminución en la citoqueratina 20, entre otras.

Se han observado en los tejidos tumorales, sobre-regulaciones de las proteínas de choque térmico y enzimas glucolíticas, indicando autoprotección contra las alteraciones de las células y la creciente demanda de energía durante la transformación maligna⁵⁵.

La mayoría de los biomarcadores tumorales en el diagnóstico del cáncer gástrico son glicoproteínas, siendo la más común la mucina-5AC (MUC5AC), habiendo sido así mismo identificadas las proteínas siguientes: IgG, mucina 1 (MUC1), IGHM, LRG1, haptoglobina (HP), albúmina (ALB), TF, quinínogeno-1 (KNG1), alfa-1-glicoproteína ácida (AGP), ceruloplasmina (CP), A1BG, proteína de unión a vitamina D (GC), alfa-1-antitripsina (SERPINA1), antitrombina (SERPINC1), angiotensina (AGT), CFB, inhibidor peptidasa serpina, Clade A (SERPINA3), alfa-2-HS-glicoproteína (AHSG), Zn-alfa-2-glicoproteína (AZGP1), CLU, ITIH2, complementan el factor H (CFH), interalpha-tripsina HCRP inhibidor, SERPING1 y variante de la proteína C4A (C4A)⁵⁶.

La aproximación proteómica facilita la investigación de nuevos potenciales biomarcadores.

Los análisis proteómica en diferentes muestras clínicas de cáncer gástrico, han sido explorados en la sangre, jugo gástrico y tejidos, así como en líneas celulares y modelos animales de xenoinjerto.

De las muestras en sangre, fueron identificados y validados con expresión diferencial de "caso-control", las siguientes proteínas: factor precursor del complemento (CIF), C9, IPO-38, inter- α -trypsin inhibidor H3 (ITIH3), SLe, ApoC1, ApoC3, thrombin light chain A y MIF.

En el jugo gástrico fueron identificados y confirmados con expresión diferencial: pepsinogen C (PGC), pepsin A, -defensin, -antitrypsin precursor y -antitrypsin, gastrokine-1 (GKN1), trefoil factor 1 (TFF1), y pepsinogen II.

La mayoría de los potenciales biomarcadores fueron determinados en muestras tisulares de caso y control, entre los que se encuentran: serum-binding protein 1, ENO1, glucose regulated proteins GRP78 and GRP94, cyclosporine A-binding-protein (PPIA), peroxiredoxin-1 (PRDX1), phosphatase and tensin homolog (PTEN), MAWD-binding protein; mitotic arrest-deficient 1-like 1 (MAD1L1), HSP27, protein CYR61, chloride intracellular channel 1 (CLIC1), cathepsin B, GKN1, ATP-dependent RNA helicase DDX39, lactate dehydrogenase A (LDHA), pyruvate dehydrogenase B (PDHB), hypoxia-inducible factor (HIF), cysteine-rich intestinal protein 1 (CRIP1), -defensin-1, -defensin-2, proteins S100A8, S100A6 and S100A9, PGC, human neutrophil peptides 1-3 (HNPs 1-3) and macrophage migration inhibitory factor, galectin-2, ApoA1, S100P, laminin gamma 2 chain monomer, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), glycolipid and GM2.

Los tejidos para el análisis proteómico fueron recogidos tras la resección quirúrgica del tumor, o la biopsia endoscópica. Las diferentes determinaciones proteómicas fueron realizadas con distinta metodología proteómica (2-DE, ProteinChip arrays, ICAT, iTRAQ) y comparadas con el estadio tumoral, el estado del HER 2 y la diseminación ganglionar⁵⁷.

PROTEÓMICA CUANTITATIVA

La información detallada a gran escala, obtenida por espectrometría de masas, sobre la abundancia de proteínas, el tipo celular, los patrones de expresión proteica en función del tiempo, las modificaciones postraduccionales y las interacciones proteína-proteína, han aportado recientemente información biológica.

Esta investigación ha permitido analizar la mayor cobertura del mapa del proteoma humano, del que disponemos hasta el momento. El diagrama de flujo para su realización se muestra a continuación⁵⁸. FIGURA 8.

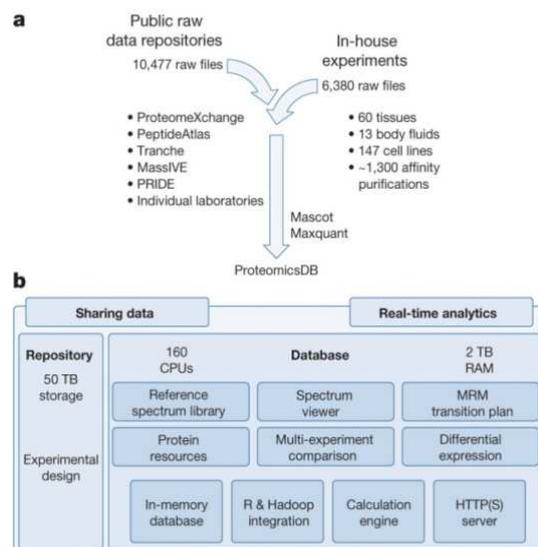


FIGURA 8. a. Diagrama de flujo experimental para la identificación y cuantificación proteica. b. Estructura y características de la de la base de datos Proteomics DB.

Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

➤ CARACTERÍSTICAS DEL PROTEOMA HUMANO

El análisis global de la expresión proteica, con su caracterización en el proteoma humano en diferentes tejidos, se describe a continuación en la FIGURA 9.

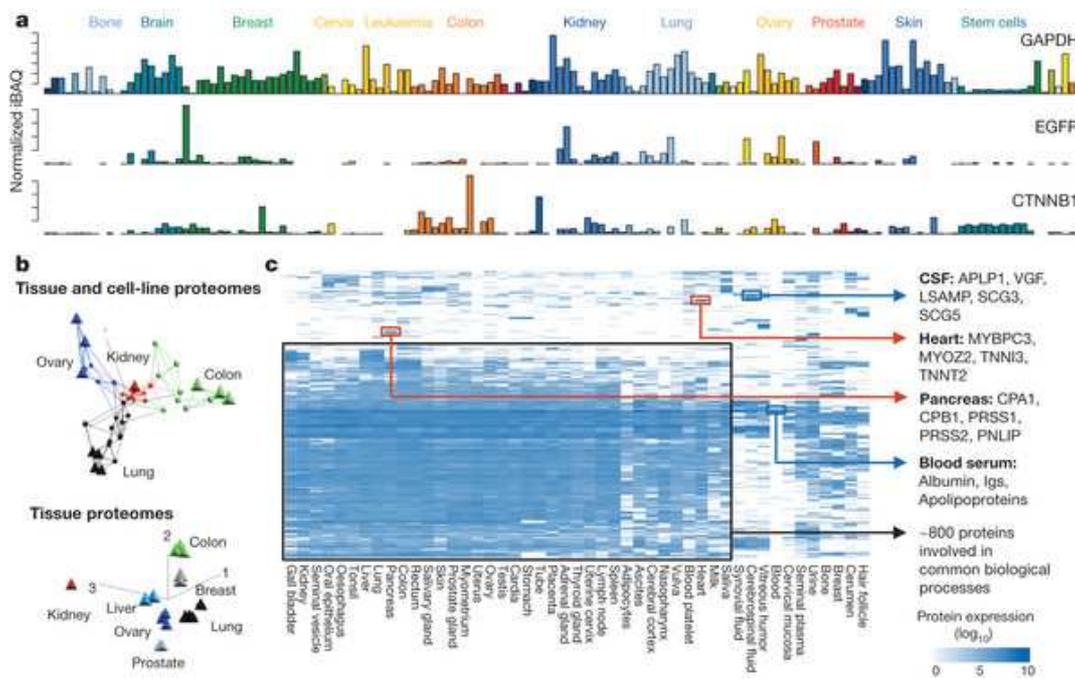


FIGURA 9. Análisis global de la expresión proteica, con su caracterización en el proteoma humano en diferentes tejidos.

Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

INTEGRACIÓN Y UTILIDAD DEL PROTEOMA (REDES BIOLÓGICAS)

En la biología molecular, el interactoma es todo el conjunto de interacciones moleculares en una determinada célula.

El término se refiere específicamente a las interacciones físicas entre las moléculas, pero también puede significar interacciones indirectas entre los genes y los productos de estos genes, mediados principalmente por proteínas. Por ello, los interactomas se describen como redes biológicas.

Existe en el momento actual la oportunidad de vincular datos procedentes de la identificación y cuantificación proteica, con los datos obtenidos a diferentes niveles con tecnologías OMICS y construir esquemas de las interacciones de las macromoléculas identificadas en las células y en los tejidos humanos y configurar redes de conocimiento.

Los complejos proteicos y sus secuenciación peptídicas, además de otras medidas directas de proteína-proteína, proteína-ácido nucleico y proteínas con sus interacciones lípidicas, hacen posible crear diagramas para la biología de sistemas.

Ejemplo de ello es la integración entre la proteína y el mRNA presentado por Kuster, 2014⁵⁸.

Las proteínas se pueden agrupar en dos categorías, unas proteínas expresadas en un único tipo de célula y otras que se encuentran en todos los tejidos comunes en diferentes órganos, como por ejemplo las células endoteliales.

Un mapa equivalente para el proteoma humano con mediciones directas de proteínas y péptidos, ha sido desarrollado recientemente, proporcionando además una base para la tecnología proteómica y recursos informáticos⁵⁹.

3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR

Las alteraciones genéticas y epigenéticas son mecanismos centrales de las alteraciones de las vías de señalización oncogénicas. Alteraciones en el p53, WNT/beta catenina, Factor Nuclear (NF)-KB y PI3K/AKT, son algunas de las alteraciones de las vías de señalización oncogénica canónica, que se encuentran desreguladas en el cáncer gástrico.

La vía de señalización fosfoinositol 3 kinasa (PI3K)/AKT regula el metabolismo y el crecimiento celular y juega un papel importante en la tumorigénesis.

PIK3CA es una subunidad catalítica de 110 kDa de la fosfoinositol-3-kinasa y un activador de la vía de señalización PI3K/AKT.

La amplificación PIK3CA, se asocia con una elevación p-Akt, lo que sugiere que esta alteración genética puede ser un mecanismo importante en la activación de la vía de señalización de la PI3K / AKT, que contribuye aún más a la tumorigénesis gástrico.

PTEN codifica una fosfatasa multifuncional que regula negativamente el crecimiento celular, la migración y la supervivencia a través de la vía de señalización PI3K / Akt.

La vía de señalización MAPK (Ras / Raf / Mek / Erk) regula una serie de actividades celulares, tales como la angiogénesis, la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y la migración.

La vía MAPK se compone de varias kinasas, incluyendo Ras, Raf y Mek, y es a menudo desregulada en el cáncer gástrico.

El gen Ras (H-, K-, N-isotipos), que codifica pequeñas proteínas G, pertenece a una familia de oncogenes comúnmente mutado y funcionan como interruptores moleculares de numerosas cascadas de señalización, incluyendo la vía MAPK.

La vía de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) regula la proliferación celular, la diferenciación y la supervivencia y se desregula frecuentemente en los cánceres gástricos.

En un grupo de población china constituida por 1758 casos de cáncer gástrico, fueron analizados los genes ligados a la vía EGFR. Una asociación entre genes específicos de la vía de señalización de EGFR y el riesgo de cáncer gástrico fue demostrada por Li, 2013⁶⁰.

EGFR es un miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento y funciona como un receptor de superficie celular de ligandos extracelulares, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la transformación del factor alfa de crecimiento.

La unión del EGF al dominio extracelular del receptor conduce a la fosforilación de su dominio de tirosin kinasa intracelular. Esto iniciará una serie de señales intracelulares, tales como la activación de la vía de señalización MAPK.

La sobreexpresión del EGFR se encuentra con frecuencia en cáncer gástrico y se asocia con la profundidad de la invasión y con pobre supervivencia de los pacientes con cáncer gástrico.

La amplificación del ERBB2, puede servir como un marcador pronóstico de la invasión tumoral, metástasis en los ganglios linfáticos y mal pronóstico.

Por otro lado, la sobreexpresión del ERBB3 se encuentra con frecuencia en el cáncer gástrico, particularmente en los tumores de tipo difuso, contribuyendo a la sobreactivación de la vía PI3K/AKT.

La amplificación del ERBB4 en cáncer gástrico está fuertemente asociada con baja supervivencia de los pacientes con cáncer gástrico⁴⁶.

➤ **CARACTERÍSTICAS DE LAS PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR SELECCIONADAS PARA EL ANÁLISIS DE PROTEOMICA DIRIGIDA EN EL CÁNCER GÁSTRICO**

PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS SELECCIONADOS

De la vía de señalización con receptores tirosin kinasa (RTKs), hemos seleccionado para su cuantificación las siguientes proteínas:

P00533/EGFR_HUMAN (Epidermal growth factor receptor), péptidos IPLENLQIIRG y SPSDCCHNQAAGCTGPR.

P28482-MK01_HUMAN, (Mitogen-activated protein kinase 1), péptido VADPDHHDHTGFLEYVATR.

P27361- MK03_HUMAN (Mitogen-activated protein kinase 3), peptide RTEGVGPGVPGEVEMVK.

De la vía de señalización PI3K/AKT (fosfo inositol 3-kinasa, con receptores serine/treonine-protein kinase), hemos seleccionado la proteína P31749-AKT1_HUMAN (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase), péptido EEWTTAIQTVADGLK.

Y por último, de la vía de señalización que responden al estímulo del TGFbeta (factor transformante del crecimiento), con receptores serina/threonina kinasa, hemos seleccionado la proteína P62942- FKBP1A_HUMAN (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A), péptido GWEEGVAQMSVGQR.

Algunos de los medicamentos citados a continuación, son dianas terapéuticas de las proteínas elegidas para su cuantificación por metodología proteómica dirigida del cáncer gástrico: Erlotinib (Tarceva) inhibidor del EGFR (con objetivo en las mutaciones del EGFR), Trametinib DMSO (Inhibidor de MEK, siendo sus objetivos la vía RAS-RAF/MEK) y el Everolimus (inhibidor de la vía mTOR, con objetivo en las mutaciones en la vía fosfoinositol 3 kinasa-AKT).

Mutaciones de genes reparadores del DNA presentes en el cáncer gástrico tienen como fármaco el Temozolomid, mientras que con el carboplatino pueden ser tratados los pacientes con mutaciones en la vías de reparación del DNA.

Para la identificación de su papel en el organismo humano, hemos utilizado la información de la base de datos [www: proteomicsdb.org](http://www.proteomicsdb.org)⁵⁸.

CARACTERÍSTICAS

VÍA DE SEÑALIZACIÓN CON RECEPTORES TIROSIN-KINASA (RTKS)

- **P00533/EGFR_HUMAN (Epidermal growth factor receptor), secuencias peptídicas IPLENLQIIRG y SPDCCHNQCAAGCTGPR**

El nombre del gen es “EGFR” (ERBB, ERBB1, HER1). Su acceso a UniProt AC/ID viene determinado por la denominación P00533/EGFR_HUMAN. En el homo sapiens está localizado en el cromosoma 7

Los dominios de la estructura del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano P00533-EGFR_HUMAN se muestran en la FIGURA 10.

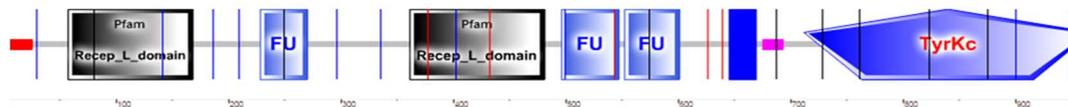


FIGURA 10. Estructura del receptor del factor de crecimiento epidérmico.
Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

El EGFR1 consta de las siguientes isoformas, que son mostradas en la TABLA XI.

PROTEIN	UNIPROT_AC	UNIPROT_ID	DESCRIPTION	LENGTH	MASS	UNIQUE_PEPTIDES
EGFR	EGFR_HUMAN	P00533-1	EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR	1210	1.342.761	HOMO SAPIENS (HUMAN)
EGFR	EGFR_HUMAN	P00533-3	ISOFORM 3 OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR	705	773.114	HOMO SAPIENS (HUMAN)
EGFR	EGFR_HUMAN	P00533-4	ISOFORM 4 OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR	628	692.274	HOMO SAPIENS (HUMAN)
EGFR	EGFR_HUMAN	P00533-2	ISOFORM 2 OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR	405	446.637	HOMO SAPIENS (HUMAN)

TABLA XI. Taxonomía de la proteína EGFR (p00533) con sus isoformas.
Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

La isoforma 1 (P00533-1) es conocida como p170. Ha sido considerada como la secuencia canónica y tiene una longitud de 1,210 y una masa (Da): 134,761.

La isoforma 2 (P00533-2) es conocida como p60, truncada, TEGFR. La secuencia de esta isoforma difiere de la secuencia canónica en 404-405: Tiene una longitud de 405 y una masa (Da) de 44,637.

La Isoforma 3 (P00533-3) es conocida como p110. La secuencia de esta isoforma también difiere de la secuencia canónica, tiene una longitud de 705 y una masa de 773.114

En la isoform 4 (P00533-4) la secuencia difiere también de la secuencia canónica y tiene una longitud de 628 y una masa (Da) de 692.274.

La intensidad media de EGFR P00533 en el estómago, tanto en el hombre como en la mujer, es de 4,43. FIGURA 11.

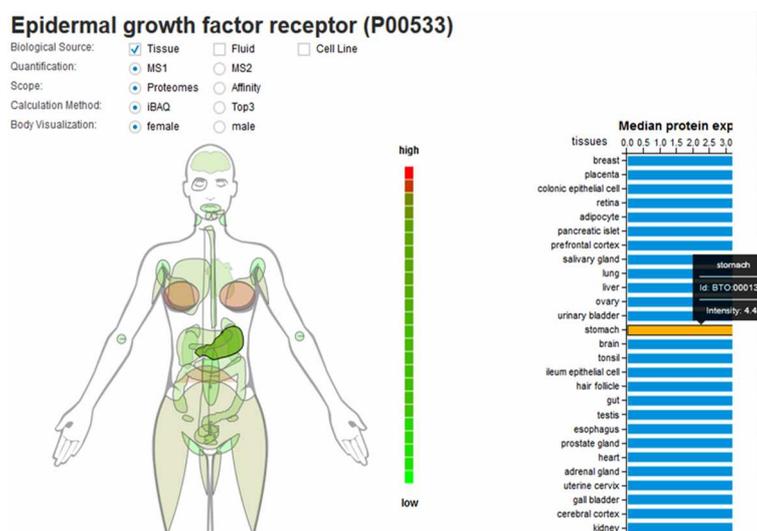


FIGURA 11. Intensidad media del EGFR en el estómago humano. Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

Péptido SPSDCCHNQCAAGCTGPR

La masa media de este péptido es de 1806.67 y la masa monoisotópica es de 1805.67. Su localización es entre 226-244.

Masa	Posición	Secuencia peptídica
1806.6775	226-244	SPSDCCHNQCAAGCTGPR

TABLA XII. Características de la secuencia peptídica SPSDCCHNQCAAGCTGPR Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

Se encuentra formando parte de la estructura del dominio Fu. FIGURA 12.

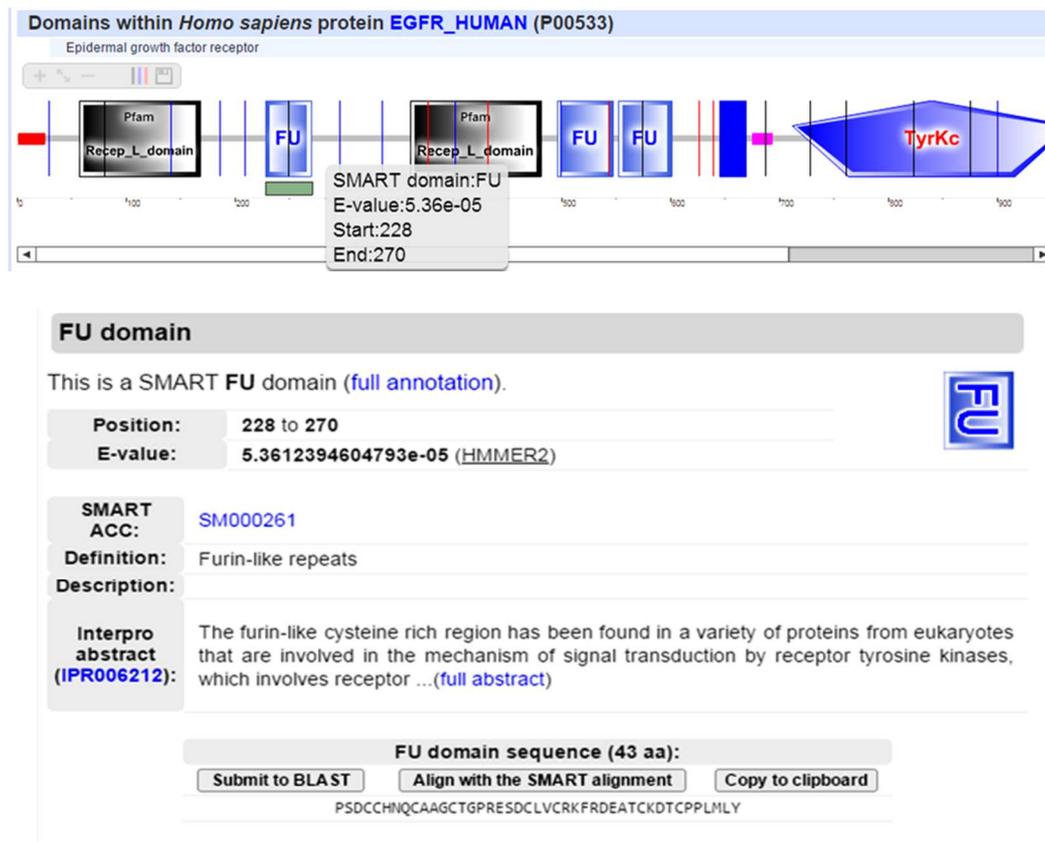


FIGURA 12. Estructura del dominio FU en el que se encuentra la secuencia peptídica PSDCCHNQCAAGCTGPR.

Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

En este dominio falta el aminoácido S del inicio de la secuencia

Dominio semejante al dominio FU, es el Pfam Furin like, no representado en el esquema. Está localizado entre el 177 y el 338 de la proteína EGFR P00533. Es una región también rica en cisteína.

Su secuencia peptídica está compuesta por los siguientes aminoácidos:

SMDFQNH~~S~~LGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRRCRGK**SPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPMLLY**NPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCP

Este dominio está implicado en el mecanismo de transducción de señales por los receptores tirosin kinasa, para la agregación del receptor. Es una proteína del receptor transmembrana para la fosforilación, que introduce grupos fosfato en la proteína y está vinculado al ATP.

La secuencia peptídica elegida para el análisis en el cáncer gástrico fue **SPSDCCHNQCAAGCTGPR**

El espectro de los fragmentos del péptido se muestra en el siguiente gráfico en relación con la intensidad relativa, la masa y la carga. FIGURA 13.

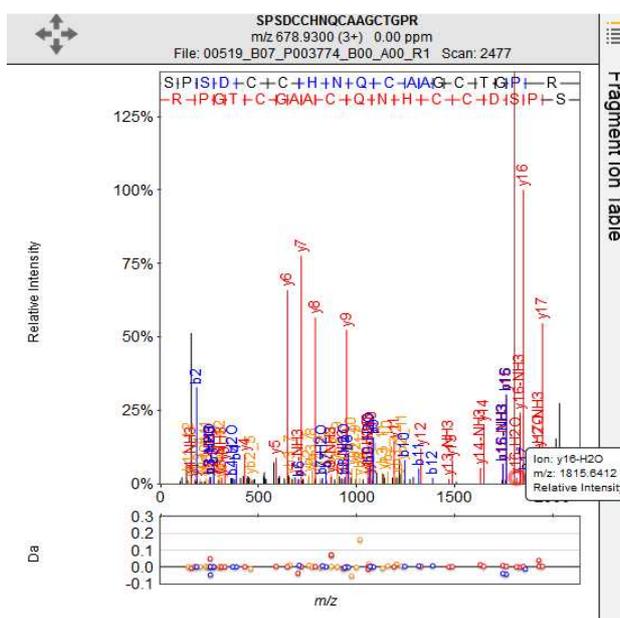


FIGURA 13. Fragmentos ionizados del péptido SPSDCCHNQCAAGCTGPR.
Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

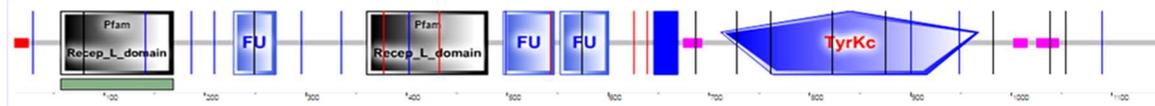
Péptido IPLENLQIIR

El péptido IPLENLQIIR tiene un Mw (masa media) de 1208.73 y Mw (masa monoisotópica): 1208.73] Está localizado en la posición 110. TABLA XIII.

Masa	Posición	Secuencia del péptido
1208.7361	110	IPLENLQIIR

TABLA XIII. Características de la secuencia peptídica IPLENLQIIR.
Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

La secuencia peptídica IPLENLQIIR se encuentra ubicada en el dominio Recep_L, (IPR000494); es un dominio de membrana Pfam y está localizado en el receptor entre el 57-168. FIGURA 14-15.



Recep_L_domain domain

This is a Pfam domain. Please see the [Recep_L_domain](#) entry in Pfam for full annotation.

Position: 57 to 168
E-value: 3.4e-33 (HMMER3)

Accession: PF01030
Description:
Interpro abstract (IPR000494): The type-1 insulin-like growth-factor receptor (IGF-1R) and insulin receptor (IR) are closely related members of the tyrosine-kinase receptor superfamily ...[\(full abstract\)](#)
GO component: membrane ([GO:0016020](#))

Pfam domain sequence (112 aa):

[Submit to BLAST](#) [Copy to clipboard](#)

NCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLNLQIIRGNMYYENS
 YALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIV

FIGURA 14. Receptor L-dominio (IPR000494). Nombre corto: Recep_L_dom
 Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

El receptor L del dominio Pfam del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se relaciona con otra porción extracelular de otros receptores tirosin kinasa, como el IGF-1R (receptor del factor de crecimiento similar a la insulina, tipo 1).

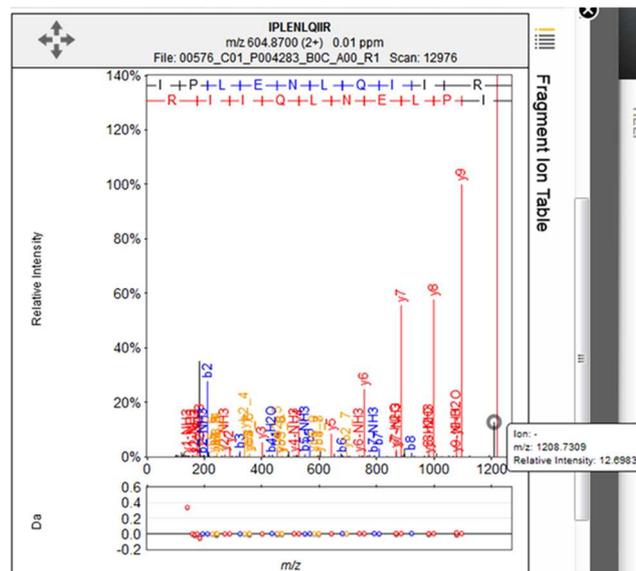


FIGURA 15. Fragmentos ionizados del péptido IPLENLQIIR 100-110
 Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

- **P28482-MK01_HUMAN (Protein kinasa mitógeno activada)**

En el organismo humano la protein kinasa mitógeno activada o P28482-MK01_HUMAN (Mitogen-activated protein kinase), está localizada en el cromosoma 22. El nombre del gen es MAPK1 (ERK2, PRKM1, PRKM2) y el acceso a UniProt AC/ID es P28482/MK01_HUMAN.

Esta proteína tiene una longitud de 360, una masa de 41.3892 Da. Hay otra isoforma descrita con la misma secuencia peptídica, isoform 2(P28482-2), que se produce por splicing alternativo. La estructura del MK01 con sus dominios está representada en la FIGURA 16.

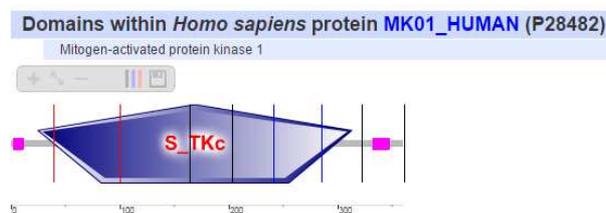


FIGURA 16. Estructura de la proteína MK01
Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

La cascada MAPK / ERK media diversas funciones biológicas tales como el crecimiento celular, adhesión, supervivencia y la diferenciación a través de la regulación de la transcripción, transducción y reordenamientos del citoesqueleto.

Juega también un papel en la iniciación y regulación de la meiosis, mitosis y las funciones postmitóticas en células diferenciadas mediante la fosforilación de factores de transcripción.

La masa media en el estómago de mujer de la proteína MK01 es de 5,82. FIGURA 17.

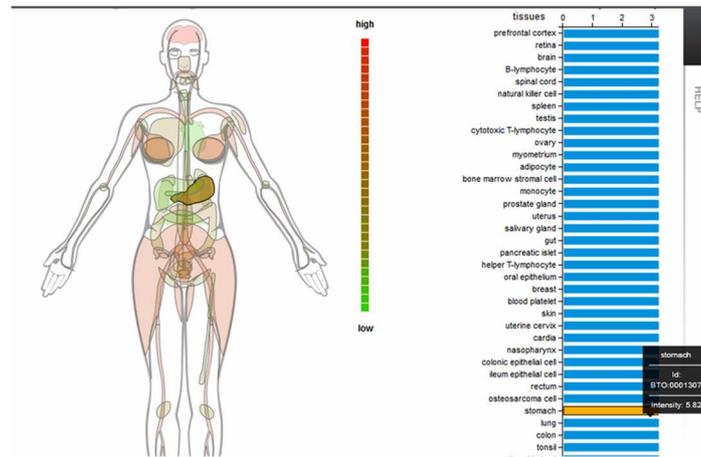


FIGURA 17. Masa de la proteína MK01_Human de 5,82 en el estómago de mujer.
Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

En la posición 173-191 de la secuencia peptídica completa de la Mitogen-activated protein kinase 1 (P28482), se encuentra localizado el péptido VADPDHHDHTGFLEYVATR, seleccionado para el análisis.

Péptido VADPHDHTGFLTEYVATR

La masa media de este péptido es de 2144.28, mientras que la monoisotópica es de 2143.00. TABLA XIV.

Masa	Posición	Secuencia péptido
2144.0043	173-194	VADPDHHDHTGFLTEYVATR

TABLA XIV. Características de la secuencia peptídica VADPHDHTGFLTEYVATR
Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

La posición es entre 173 -194 en el dominio serina threonina kinasa. FIGURA 18.

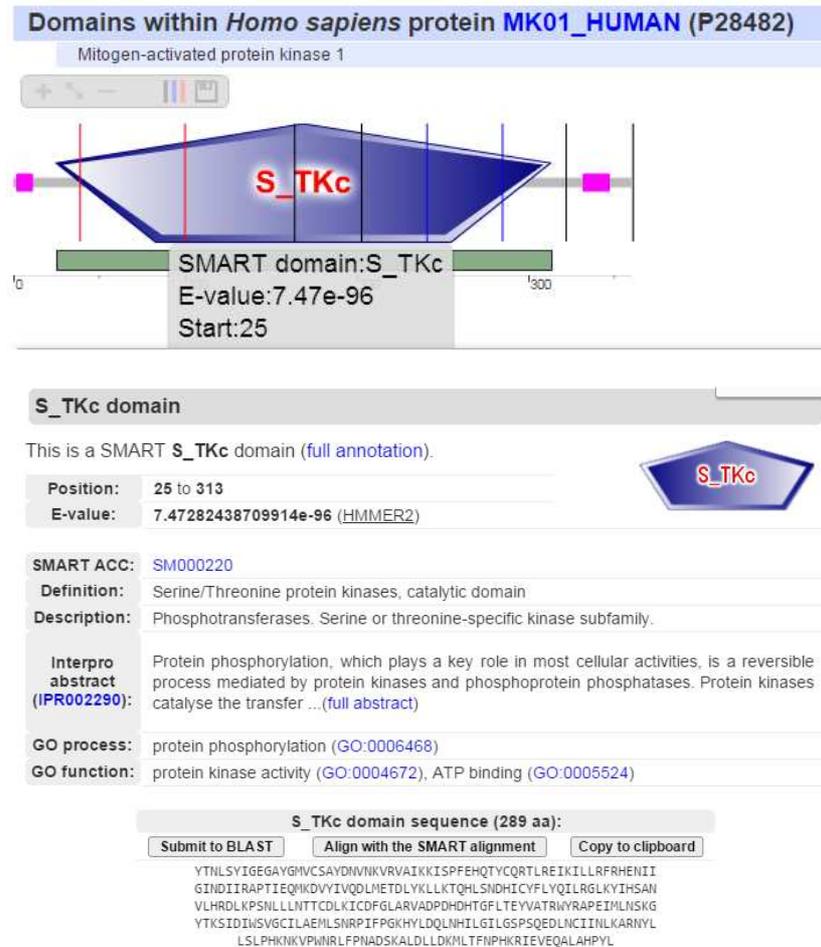


FIGURA 18. Estructura del dominio serina threonina kinasa.
Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

El espectro de los fragmentos del péptido se muestra en el siguiente gráfico en relación con la intensidad relativa, la masa y la carga. Figura 19.

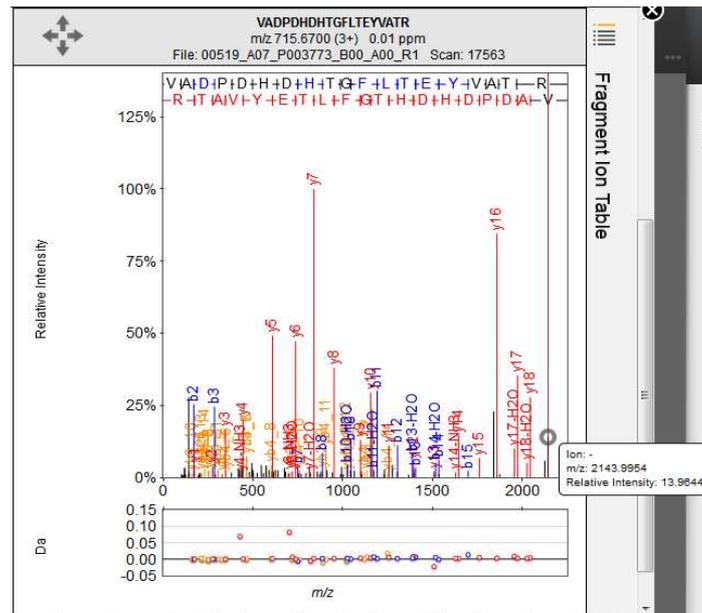


FIGURA 19. Fragmento ionizado del péptido VADPHDHTGFLTEYVATR.
Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

- **P27361 MK03_HUMAN (Mitogen-activated protein kinase 3)**

En el organismo humano esta proteína está localizada en el cromosoma 16. El nombre del gen es MAPK3 (ERK1, PRKM3) y el acceso a UniProt es AC/IDP27361/MK03_HUMAN

Entre los procesos biológicos, participa en el sistema de la coagulación, en la inmunidad innata, en el daño al DNA, en la condrogénesis, en la apoptosis y en el ciclo celular. La estructura y función es similar a la descrita para el MK01

Isoformas

En Uniprot, la isoform 1 (P27361-1) está considerada como la secuencia canónica. La longitud es de 379 y la masa total son 431.351 Da.

La Isoforma 2 (P27361-2): la secuencia de esta isoforma difiere de la secuencia canónica en la posición de la 259-302: missing. La longitud es de 335 y la masa (Da) es 38.275

La Isoforma 3 (P27361-3), también conocido como: ERK1b. La secuencia de esta isoforma difiere de la secuencia canónica en la posición 340-379. La longitud es de 357 y la masa (Da): 40.088

La expresión media de esta proteína en el estómago del hombre es de 5,6 . FIGURA 20.

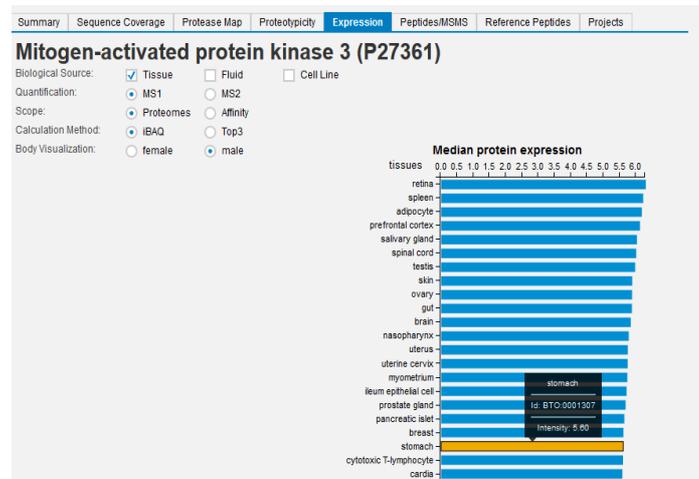


FIGURA 20. Expresión media de la proteína MK03 en el estómago en el hombre es de 5,6.
Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

La posición de la secuencia peptídica RTEGVGPGVPGVEVMVK de esta proteína es entre el 18-29. FIGURA 21-22

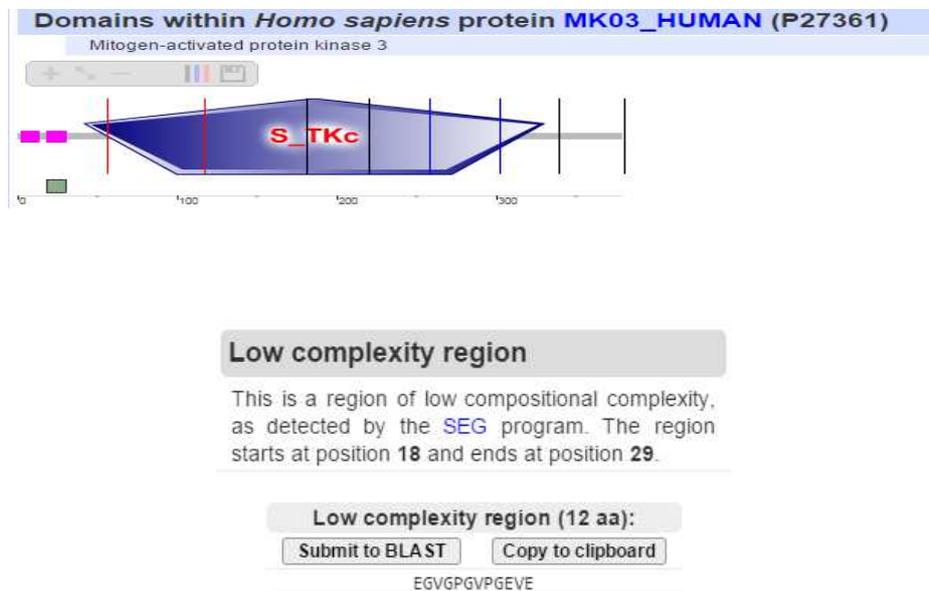


Figura 21. Estructura de la proteína MK03.
Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

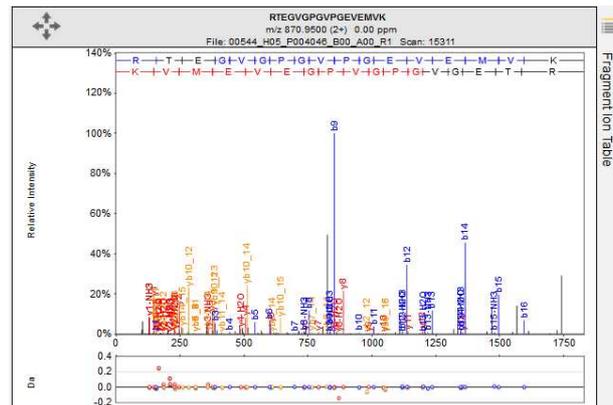


FIGURA 22. Fragmento ionizado del péptido RTEGVGPGVPGEVEMVK.
Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT (FOSFOINOSITOL 3-KINASA, CON RECEPTORES SERINE/TREONINE-PROTEIN KINASE)

- **P31749-AKT1_HUMAN (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase).**

En la especie humana está localizado en el cromosoma 14. El nombre del gen es AKT1(PKB, RAC). El acceso a UniProt AC/ID: P31749/AKT1_HUMAN

En los procesos biológicos se comporta como transductor, kinasa, participa en la diferenciación en la coagulación de la sanre, apoptosis, receptor acoplado a la proteína G, metabolismo de la glucosa, biosíntesis de glucógeno, en la respuesta inflamatoria en la biogénesis y degradación de los cilios y en la regulación de la translación.

Estructura del AKT1. FIGURA 23.

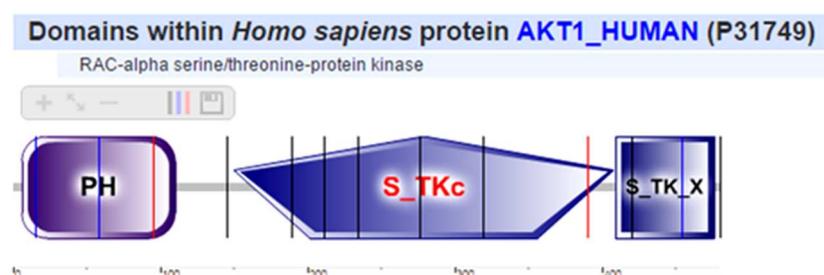


FIGURA 23. Estructura de la proteína AKT1.
Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

SMART PH dominio, se define como dominio de homología Pleckstrin

Localizada en 6 a 110., con 105 aminoácidos

El dominio PH posee múltiples funciones, incluyendo la capacidad para unirse al inositol fosfato y a varias proteínas. En el dominio PH, se describen mutaciones en el gen Brutons tirosin kinasa (Btk), ligado al cromosoma X, responsable de agammaglobulinemia en los pacientes. FIGURA 24.

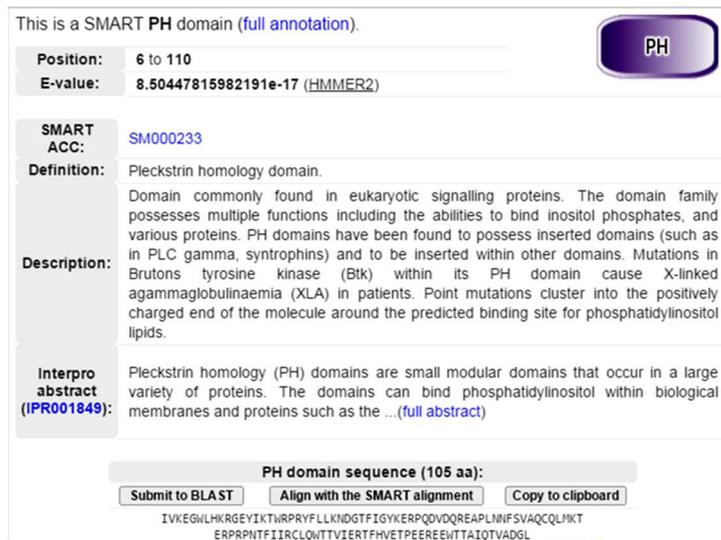


FIGURA 24. Estructura del dominio SMART PH.
Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

Secuencia peptídica EEWTTAIQTVADGLK. FIGURA 25.

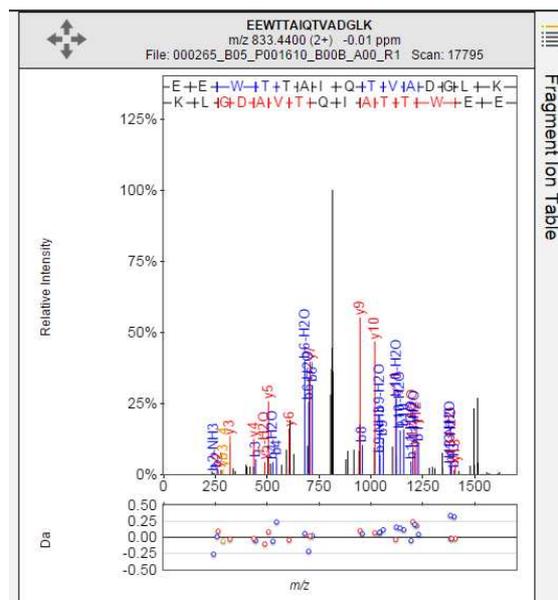


FIGURA 25. Fragmento ionizado del péptido EEWTTAIQTVADGLK.
Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

VÍA DE SEÑALIZACIÓN CON RESPUESTA AL ESTÍMULO DEL TGF BETA (FACTOR TRANSFORMANTE DEL CRECIMIENTO), CON RECEPTORES SERINA/THREONINA KINASA)

- **P62942- FKB1A_HUMAN (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A)**

El nombre de la proteína recomendado es Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A (EC: 5.2.1.8) y su nombre acortado PPIase FKBP1A

Son nombres alternativo(s): 12 kDa FK506-binding protein (12 kDa FKBP), FKBP-12, Calstabin-1, FK506-binding protein 1A(FKBP-1A), Immunophilina FKBP12, Rotamase.

Está localizada en el cromosoma 20. El nombre del gen es FKBP1A (FKBP1, FKBP12) y el acceso a UniProt AC/ID es P62942/FKB1A_HUMAN.

Son funciones de esta proteína:

La proteína es una prolil cis-trans isomerasa que se une a los inmunosupresores FK506 y rapamicina. Los dos fármacos inhiben la proliferación de células T mediante la detención de dos vías de transmisión de señales citoplasmáticas diferentes. Interactúa con varias proteínas de transducción de señales intracelulares que incluyen el receptor de TGF-beta tipo I. Mantiene inactivo el TGFBR1, TGF-beta tipo I del receptor serina/threonina kinasa. Previene la activación del receptor de TGF-beta en ausencia de ligando. Capta SMAD7 en el receptor activina 1B (ACVR1B) que impide la asociación de SMAD2 y SMAD3 con el receptor de activina, bloqueando de este modo la señal de activina. Puede modular la actividad de los canales de calcio RYR1.

Dentro de las funciones de regulación enzimática el FKBP1A es inhibido por el FK506 y la rapamicina. La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de las inmunofilinas, que desempeñan un papel en la inmunorregulación y en los procesos celulares básicos que implican plegamiento de proteínas.

La proteína tiene una longitud de 108 y una masa de 119.506. TABLA XV.

PROTEIN	UNIPROT_AC	UNIPROT_ID	DESCRIPTION	LENGTH	MASS
FKBP1A	FKB1A_HUMAN	P62942	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	108	119.506

TABLA XV. Características de la proteína FKBP1A.
Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

Localización en un dominio Pfam con una secuencia de 93 aminoácidos entre 13-105.

La secuencia peptídica elegida para el análisis GWEEGVAQMSVGQR está en posición 60 a 72. FIGURA 26-27.



FIGURA 26. Estructura de la proteína FKBP1A.
Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

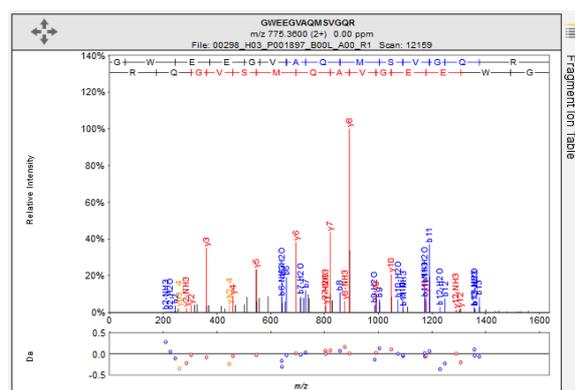


FIGURA 27. Fragmento ionizado del péptido GWEEGVAQMSVGQR.
Fuente: Wilhelm M⁵⁸.

4. BIOMARCADORES DEL ESTADO DE LA INMUNIDAD DEL HUÉSPED EN EL CÁNCER GÁSTRICO

Debido a la complejidad de la respuesta inmunitaria individual, así como a nivel de población en general, no ha sido posible hasta ahora definir los parámetros (genéticos o ambientales) que constituyen un sistema inmune sano y su variabilidad natural.

Un estudio poblacional sobre una población de 1000 personas, ha tenido como objetivo identificar los determinantes genéticos y ambientales de las variaciones del inmunofenotipo en estado de salud, lo que permite identificar la heterogeneidad de la respuesta inmune⁶¹. FIGURA 28.

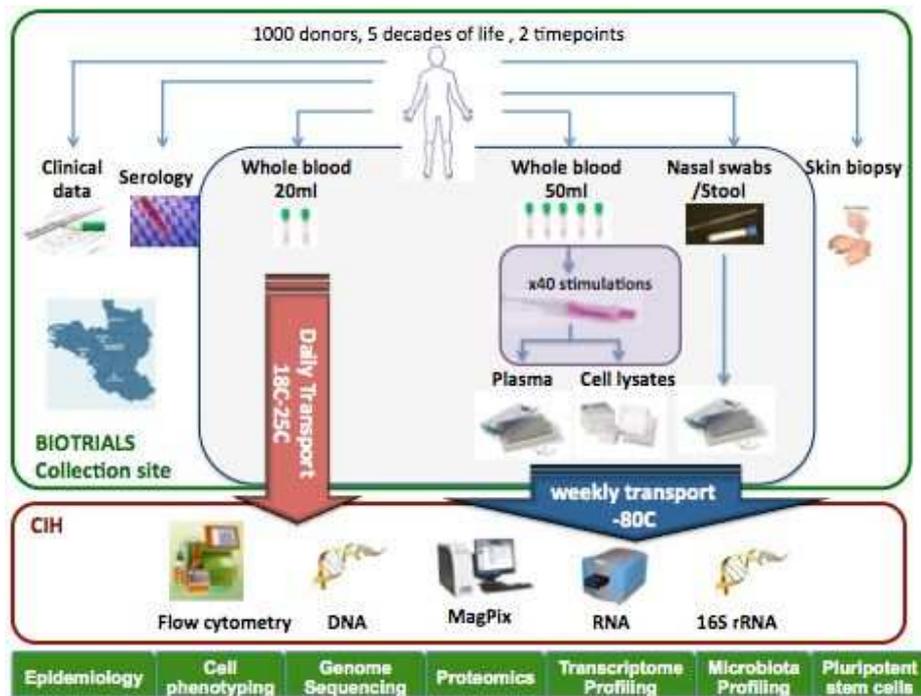


FIGURA 28. Determinantes genéticos y ambientales de las variaciones del inmunofenotipo en estado de salud.

Fuente: Galon J⁶¹.

La clasificación de tumores de la Organización Mundial de la Salud (OMS) propone una aproximación multiparamétrica al diagnóstico de las enfermedades, integrando datos clínicos, morfológicos, fenotípicos y genotípicos característicos de cada entidad, en la que se incluye el estudio del inmunofenotipo tumoral por citometría de flujo

Recientemente, se ha sugerido que el desarrollo del cáncer, es controlado por el sistema inmune del huésped, de ahí la importancia de incluir biomarcadores inmunológicos para la predicción de pronóstico y la respuesta a la terapia, un concepto que se ha denominado "immunoscore"⁶¹.

El desarrollo de un sistema de clasificación que además de los "Omics" incluye componentes inmunológicos podría ser una herramienta valiosa más allá de la evaluación histopatológica y del sistema de clasificación TNM empleados actualmente.

III. OBJETIVOS

En el momento actual, las plataformas OMICs, con tecnología genómica de alto rendimiento y/o tecnología proteómica, proporcionan una oportunidad única para identificar y generar hipótesis acerca de las enfermedades y dar respuesta a la eficacia de los tratamientos frente a nuevos biomarcadores.

Son los objetivos de nuestro proyecto.

- 1.- Analizar los mecanismos moleculares actualizados del cáncer gástrico.
- 2.- A partir de muestras procedentes de tejido gástrico de ratón, definir la metodología proteómica a emplear, en muestras biológicas heterogéneas como son las del tejido gástrico humano.
- 3.- Identificar proteínas con metodología proteómica del descubrimiento, la expresión proteica diferencial en el tejido sano y tumoral del estómago humano.
- 4.- Estratificar y clasificar estos tumores en base a criterios clínicos, anatomopatológicos y moleculares.
- 5.- Realizar por metodología proteómica dirigida, cuantificación de secuencias peptídicas de las proteínas implicadas en diferentes vías de señalización celular, que participan en la carcinogénesis gástrica.
- 6.- Desarrollar nuevos biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico, tratamiento y seguimiento del cáncer gástrico.
- 7.- Analizar sus implicaciones en las decisiones terapéuticas especialmente las quirúrgicas.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

A. SELECCIÓN DE PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Este trabajo se ha llevado a cabo mediante la colaboración de los Servicios de Cirugía General del Hospital de Galdakao, Hospital Universitario de Cruces y el Servicio de Proteómica SGIKER de la UPV/EHU (miembro de ProteoRed-ISCI) y del Grupo de Dinámica de Flujos Ambientales del Instituto CEAMA de la Universidad de Granada.

Para el estudio fueron recogidos diez y nueve pacientes afectados de cáncer gástrico.

Todos los pacientes dejaron constancia de su aceptación en la participación del proyecto mediante la firma de su consentimiento informado después de recibir un formulario estándar, que declara que las muestras de la biopsia serán analizadas y se utilizarán para fines de investigación.

El material utilizado procedente de las intervenciones quirúrgicas realizadas en estos centros, fueron vehiculizados a través de los biobancos de ambos hospitales.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Tuvieron criterios de inclusión, todos aquellos pacientes con diagnóstico anatómo-patológico de adenocarcinoma gástrico.

Como criterios de exclusión, se consideraron aquellos pacientes que no estuvieran dispuestos a firmar o dar el consentimiento informado, carcinomas metastásicos derivados de otros órganos, pacientes con tumores muy grandes o con posibilidades de sangrado del tracto gastrointestinal, que pudieran dificultar o imposibilitar la visualización de las lesiones, embarazadas o en fase de lactancia y pacientes menores de edad.

TAMAÑO MUESTRAL

Fueron analizados 19 casos de pacientes afectados de un carcinoma gástrico, mostrando uno de ellos un tumor múltiple, con tres carcinomas gástricos en diferente localización.

Además del análisis de los casos, como control fueron recogidas muestras de zonas de mucosa del propio paciente libres de infiltración tumoral, alejadas de la/las tumoraciones.

Factores de riesgo de carcinoma gástrico: infección por *Helicobacter Pylori*, gastritis atrófica, anemia perniciosa.

Localización tumoral

Clasificación de Bormann, Lauren y WHO

Sexo, edad, raza, bebedor, fumador, hipertensión, dislipemia, cardiopatía.

Antecedentes inmunológicos, oncológicos, otros.

Procedimientos quirúrgicos, quimioterapia y radioterápico. (Ver en capítulo de resultados de la tesis: datos epidemiológicos)

Consideraciones éticas: comité de ética de investigación clínica (estudio aprobado por el comité de ética y de investigación clínica de Euskadi). ANEXO A.

Normas de buena práctica clínica: consentimiento informado. ANEXO B.

Documentación de financiación de proyecto de investigación EHU11/25. ANEXO C.

B. METODOLOGÍA DE RECOGIDA DE MUESTRAS

El estómago extraído fue transportado en fresco tras su extirpación al biobanco-laboratorio de anatomía-patológica de cada uno de los hospitales previamente mencionados, donde tras ser examinado por el anatomopatólogo se procedió a embeber el tejido sano y tumoral de cada uno de los casos en parafina (para su estudio histológico habitual) y en OCT (para su conservación a -80°C por el biobanco correspondiente, hasta su utilización).

C. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS

A la hora de seleccionar las proteínas y péptidos a monitorizar en este estudio se han seguido 2 criterios:

- Proteínas con probada participación en procesos cancerígenos en general y/o dianas terapéuticas.

- Péptidos que identifiquen específicamente a las proteínas seleccionadas y que hayan sido detectados por espectrometría de masas en el Servicio de Proteómica de la UPV/EHU

En base a los criterios mencionados se han seleccionado las siguientes proteínas y péptidos: TABLA XVI

Péptido	Proteína	Código uniprot	Descripción
IPLNLQIIRG	EGFR_HUMAN	P00533	Epidermal growth factor receptor
SPSDCCHNQCAAGCTGPR	EGFR_HUMAN	P00533	Epidermal growth factor receptor
VADPDHDHTGFLTEYVATR	MK01_HUMAN	P28482	Mitogen-activated protein kinase 1
RTEGVGPGVPGEVEMVK	MK03_HUMAN	P27361	Mitogen-activated protein kinase 3
EEWTTAIQTVADGLK	AKT1_HUMAN	P31749	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
GWEEGVAQMSVGQR	FKB1A_HUMAN	P62942	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A

TABLA XVI. Secuencia de los péptidos cuantificados e información de la proteína a la que pertenecen.

D. METODOLOGÍA DE CUANTIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS SELECCIONADOS MEDIANTE TÉCNICAS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA-ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE TEJIDO.

Para homogeneizar el tejido hemos utilizado el homogeneizador Precellys®24 (Bertin Technologies). Los tejidos estaban incluidos en OCT (Optimal Cutting Temperature). Hemos cortado manualmente el exceso de OCT, para seleccionar únicamente la mayor parte de tejido, intentando conseguir un mínimo de 50 mg de tejido y hemos seguido dos protocolos de lavado diferentes:

- CARNOY: limpiezas consecutivas en etanol 70% durante 1 min, etanol 100% durante 1 min, CARNOY (etanol/cloroformo/ácido acético en proporción 6:3:1) durante 4 min, etanol 100% durante 1 min, ácido trifluoroacético 0.2% durante 1 min y etanol 100% durante 1 min.

- PBS: limpieza del tejido en PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄).

Cuando se comprobó que los resultados obtenidos con ambos métodos de limpieza eran muy similares (ver resultados) se decidió limpiar todas las muestras de este estudio con PBS solamente. FIGURA 29.

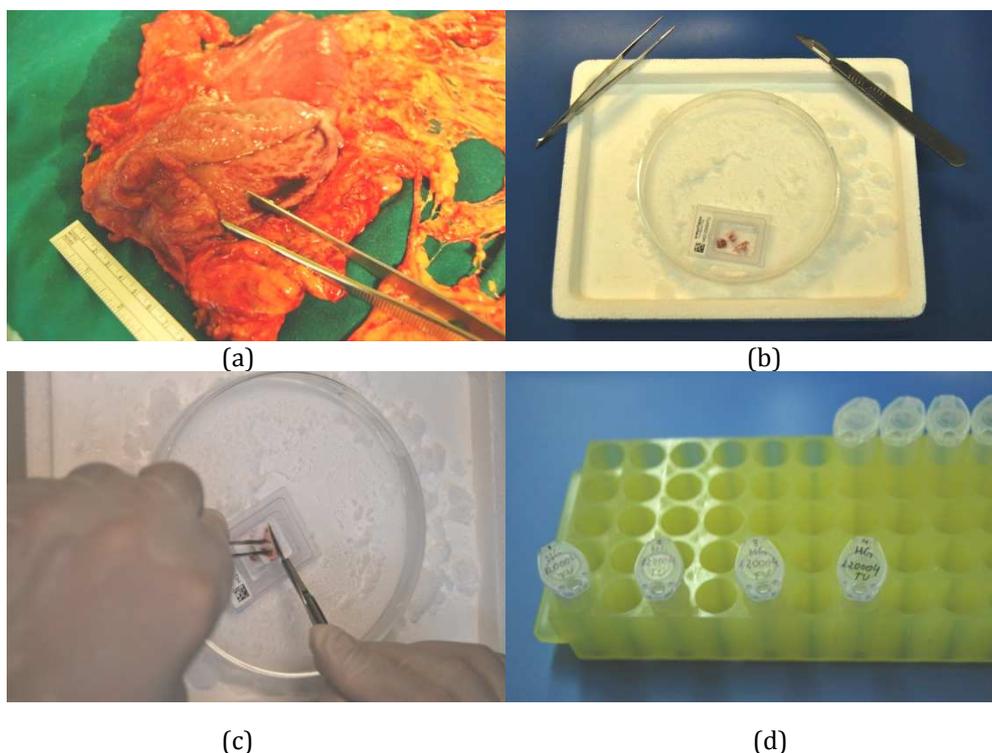


FIGURA 29. Imágenes del proceso de limpieza de las muestras. (a) Estómago con adenocarcinoma gástrico. (b) Tejido gástrico incluido en OCT. (c) Extirpación mecánica del excedente de OCT con bisturí. (d) 50 mg de tejido introducido en un tubo Eppendorf etiquetado con el n^o asignado al paciente, tumor/sano.

Una vez lavados los tejidos se han homogeneizado en la solución de lisis SDT (SDS 4% y DTT 0,1 M en Tris-HCl 0,1 M pH 7,6) con la ayuda de bolitas de zirconia/sílice de 1,0 mm de diámetro (BioSpec). Dependiendo del tejido analizado se han ajustado el número de ciclos, velocidad y tiempo de homogeneizado. FIGURA 30.

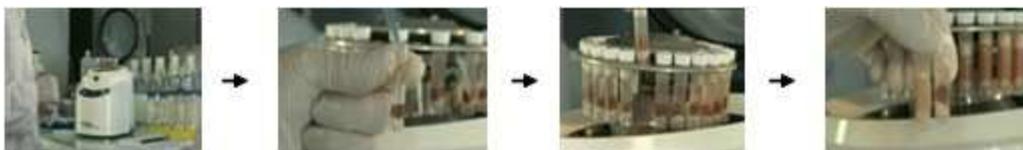


FIGURA 30. Proceso de homogeneizado de los tejidos analizados. De izquierda a derecha se muestra: una imagen del homogeneizador Precellys 24, la adición de la solución de lisis al tejido, la colocación de los tubos en el homogeneizador Precellys 24 y una imagen de la muestra antes (derecha) y después (izquierda) del homogeneizado.

<http://youtu.be/GteGuLN38SU>

Hemos sonicado el homogeneizado durante 3 minutos para reducir la viscosidad y a continuación lo hemos incubado a 95 °C durante 5 minutos. Finalmente, el extracto crudo fue centrifugado a 16000 × g durante 10 minutos a 20 °C, transfiriendo el sobrenadante a tubos Eppendorf de 1,5 ml para su almacenaje a -80 °C.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.

Hemos determinado la cantidad de proteína de los homogeneizados de los tejidos mediante el uso del kit BCA™ Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible (Thermo Scientific). Medimos a continuación la densidad óptica a una longitud de onda de 562 nm en el espectrofotómetro y calculamos la concentración proteica de cada muestra.

DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE FASP.

Hemos eliminado el detergente y realizado la digestión de las proteínas con tripsina mediante el protocolo FASP⁶². Para ello, hemos mezclado 400 µl de urea 8 M urea en Tris/HCl 0,1 M, pH 8,5 (UA) con alícuotas de los homogeneizados equivalentes a 100 µg de proteínas, en filtros Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-30 membrane (Millipore) y centrifugado a 14000 × g durante 15 minutos y a 20 °C. Hemos repetido este paso, pero añadiendo 300 µl de UA en vez de los 400 µl de la primera vez.

A continuación se añade 100 µl de iodoacetamida 50 mM en UA a los filtros y se incuban las muestras durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Lavamos los filtros tres veces con 200 µl de UA seguidos de tres lavados con 100 µL de NH₄HCO₃ 50 mM. Finalmente, hemos añadido 40 µL de tripsina (Roche) en NH₄HCO₃ 50 mM a cada filtro en una proporción de proteína enzima de 100:1.

Las muestras se incuban a 37 °C durante 16 horas y se recogen los péptidos mediante centrifugación y posterior lavado de los filtros con 50 µL de NH₄HCO₃ 50 mM.

Los filtrados resultantes son desalados mediante la utilización de columnas C-18 Micro SpinColumn™ (Harvard Apparatus). Para el análisis PRM, hemos añadido a la muestra el digerido de enolasa (MassPREP Enolase Digestion Standard, Waters) o los péptidos marcados isotópicamente (Thermo Scientific).

ANÁLISIS LC-MS/MS.

Para el análisis de los péptidos por espectrometría de masas se han utilizado dos equipos diferentes y 3 modos de adquisición dependiendo de los objetivos del análisis: TABLA XVII

Sistema de cromatografía	Espectrómetro de masas	Modo de adquisición
NanoAcquity (Waters)	SYNAPT HDMS (Waters)	MS ^E
EASY nLC-1000 (Thermo Scientific)	Q EXactive (Thermo Scientific)	DDA
EASY nLC-1000 (Thermo Scientific)	Q EXactive (Thermo Scientific)	Targeted-MS ²

Tabla XVII: Combinaciones de equipos y modos de adquisición utilizados en este estudio.

NanoAcquity-SYNAPT HDMS (Waters)

Los péptidos digeridos se cargaron en una precolumna Symmetry 300 C18 (180 µm x 20 mm) (Waters) conectada a una columna analítica BEH130 C18 (75 µm x 200 mm, 1.7 µm) (Waters). Los péptidos se eluyeron directamente al nanoemitter mediante un gradiente lineal de 3% a 40% de acetonitrilo en 0.1% de ácido fórmico durante 120 min y a un flujo de 300 nl/min.

Los espectros de masas se adquirieron usando el modo de adquisición independiente de datos (MSE-Data Independent Acquisition)⁶³. Brevemente, se realizaron adquisiciones de masa alternas de 1 s a baja (6 eV) y alta (12-35 eV) energía de colisión y el “offset” de radio frecuencia (RF) se ajustó de modo que los espectros se adquirieron en un rango de m/z de 350 a 1990. Los espectros se analizaron manualmente con el programa MassLynx 4.1 (Waters).

EASY nLC100-Q Exactive (Thermo Scientific)

Hemos realizado el análisis LC-MS/MS en un espectrómetro de masas Q Exactive (operado en modo “data dependent acquisition (DDA)” o “parallel reaction monitoring (PRM)”) acoplado a un sistema cromatográfico Easy-nLC 1000 nanoUPLC System.

Los péptidos digeridos se cargaron en una precolumna Acclaim PepMap100 (75 µm x 2 cm, Thermo Scientific) conectada a una columna analítica Acclaim PepMap RSLC (50 µm x 15 cm, Thermo Scientific). Los péptidos se eluyeron directamente al nanoES Emitter (Thermo Scientific) mediante un gradiente lineal de 5% a 30% de acetonitrilo en 0.1% de ácido fórmico durante 90 o 240 min y a un flujo de 300 nl/min.

Para el análisis DDA el Q Exactive se ha operado en modo Full MS/dd-MS² (Top15). Los espectros MS se adquirieron a una resolución de 70000 (m/z 200) y los espectros de fragmentación a 17500 (m/z 200). Para la selección de los péptidos hemos utilizado una ventana de 2.0 th y para la fragmentación de los péptidos hemos aplicado una energía de colisión normalizada de 28. El tiempo máximo de inyección fue de 120 ms para las adquisiciones MS y MS/MS y se utilizaron valores de AGC de 3e⁶ para las adquisiciones MS y de 5e⁵ para las MS/MS.

Los espectros fueron procesados con Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Scientific). Hemos seleccionado 10 ppm y 0.05 Da como tolerancia para los precursores y fragmentos respectivamente y se permitió un máximo de 1 omisión de corte para la tripsina. Hemos seleccionado la carbamidometilación de cisteínas como modificación fija y la oxidación de metioninas como modificación variable y hemos utilizado una base de datos SwissProt humana (versión 2013_05). Se permitió una tasa de falsos positivos máxima del 1 %.

Los resultados obtenidos los hemos exportado a Microsoft Office Excel (Microsoft) para su posterior análisis. Para el análisis funcional de las proteínas identificadas se ha utilizado el programa STRAP (Software Tool for Rapid Annotation of Proteins)⁶⁴. Se ha obtenido información de function, catalytic activity, GO-Biological Process, GO-cellular component, GO-Molecular Function.

Para el análisis PRM el Q Exactive se ha operado en modo "Targeted-MS2". Para la selección de los péptidos hemos utilizado una ventana de 2.0 th y para la fragmentación de los péptidos hemos aplicado una energía de colisión normalizada de 28. El tiempo máximo de inyección fue de 500 ms y hemos utilizado un valor de AGC de 5e⁵. Los espectros se adquirieron a una resolución de 17500 (m/z 200).

Los espectros fueron procesados con Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Scientific) para la identificación de los péptidos seleccionados. Hemos seleccionado 10 ppm y 0.05 Da como tolerancia para los precursores y fragmentos respectivamente y hemos permitido un máximo de 1 omisión de corte para la tripsina. Hemos seleccionado la carbamidometilación de cisteínas como modificación fija, la oxidación de metioninas y el marcaje isotópico pesado como modificaciones variables y también hemos utilizado una base de datos SwissProt humana (versión 2013_05). Para la cuantificación relativa de los péptidos hemos utilizado el programa Skyline v 2.5⁶⁵. Todos los picos integrados han sido inspeccionados de forma manual para verificar su correcta asignación y los valores totales del área del pico han sido exportados a Microsoft Office Excel (Microsoft) para su posterior análisis.

La normalización de la señal de los péptidos monitorizados se ha realizado de dos formas diferentes:

- Utilización de un péptido exógeno para normalizar todos los péptidos monitorizados: en este caso se añadió a cada muestra 100 fmol de un digerido de enolasa de levadura (MassPREP Enolase Digestion Standard, Waters) y se monitorizó la señal del péptido VNQIGTLESISK en todas las muestras. Las variaciones en la señal se cuantificaron y se utilizaron para normalizar la señal del resto de péptidos monitorizados.
- Utilización de péptidos pesados (marcaje amino-terminal ¹³C₆¹⁵N₄-R y ¹³C₆¹⁵N₂-K) específicos de todos los péptidos monitorizados. Los péptidos marcados los hemos

añadido a cada muestra en idéntica cantidad y tienen un comportamiento igual a los péptidos naturales. La presencia de los péptidos marcados nos ha permitido normalizar la intensidad del péptido natural frente al péptido pesado y obtener una cuantificación comparable y repetible. Para la optimización del método hemos analizado los péptidos marcados isotópicamente mediante aproximaciones “Full MS”, “Full MS/dd-MS²” y “Targeted-MS²”. Los m/z seleccionados se incluyeron en una lista de inclusión y se aplicaron las ventanas de tiempos de retención en base a los resultados obtenidos en la optimización del método.

En todos los casos hemos calculado los cocientes sano/tumor para cada péptido e individuo. Estos valores se han utilizado para la comparación de la cuantificación entre individuos.

Como resumen mostramos el flujo de trabajo desarrollado en este estudio.

La plataforma clínica, creada para el desarrollo del proyecto, de los Hospitales de Cruces y Galdakao, incluyen los datos clínicos de los pacientes, procedentes del Osabide Global y los estómagos extraídos por el grupo investigador de los pacientes intervenidos quirúrgicamente por cáncer gástrico.

Éstos, son remitidos a los biobancos correspondientes, donde el anatomopatólogo selecciona las muestras para el estudio histopatológico y para los análisis proteómicos.

Almacenadas a -80^o, se envían al Servicio de Proteómica-SGIKER UPV/EHU, para la limpieza del OCT, homogeinización, digestión trípica y adición de péptidos pesados, para el análisis de proteómica dirigida y cuantificación de las proteínas.

La información de los datos de los cocientes de cuantificación de los diferentes péptidos analizados son remitidos vía informática al Grupo de Dinámica de Flujos Ambientales de la Universidad de Granada, para el análisis de los datos. Posteriormente se integra la información de los datos clínicos, moleculares y proteicos. Finalmente se le explican los resultados de la investigación al paciente. FIGURA 31.

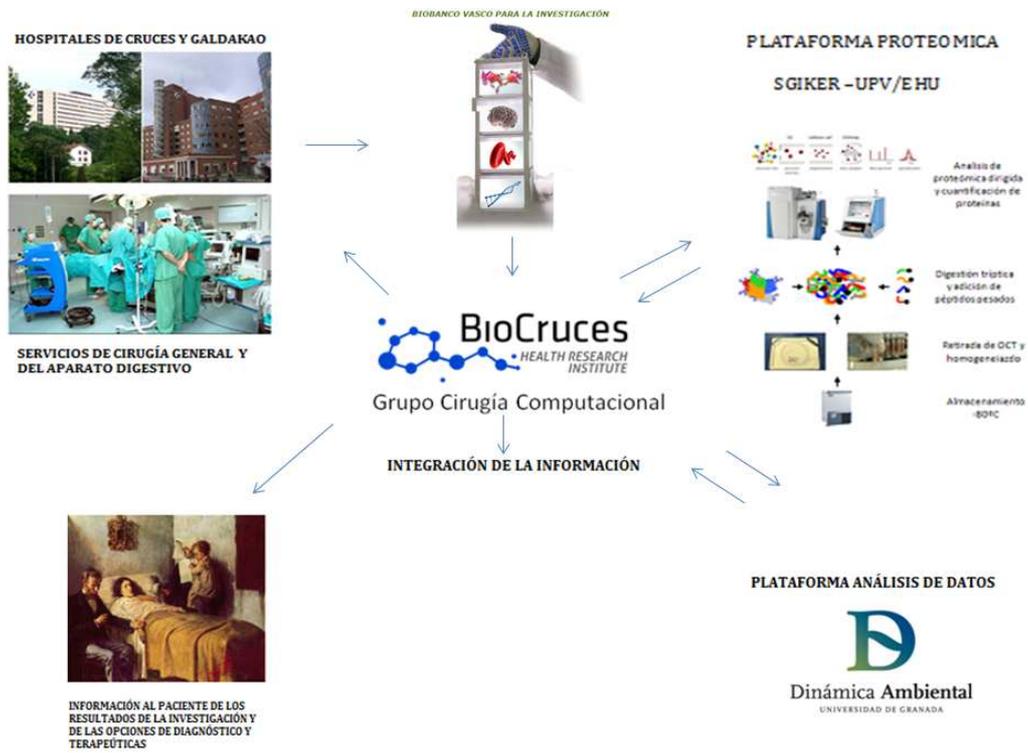


FIGURA 31. Flujo de trabajo llevado a cabo en este estudio.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Las características de los datos epidemiológicos de los 19 pacientes con cáncer gástrico analizados en función del sexo, edad, raza, estilos de vida, antecedentes personales de enfermedades, como hipertensión, diabetes, enfermedades inmunológicas u oncológicas y otras enfermedades se describen en la tabla mostrada a continuación. TABLA XVIII-XIX-XX-XXI.

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

PACIENTE	SEXO	EDAD	RAZA	BEBEDOR	FUMADOR	HIPERTENSIÓN ARTERIAL	DIABETES MELLITUS	DISLIPEMIA	CARDIO-RESPIRATORIO	ANTECEDENTE INMUNOLÓGICO	ANTECEDENTE ONCOLÓGICO	OTROS
1	HOMBRE	84	CAUCÁSICA	NO	EX	NO	SÍ	SÍ	ACFA	NO	T2N2M0 (2007) (NO OAT CELL) LSD+LINFADEN. RT ADY NO QMT (*)	ULCUS GASTRODUODENAL
2	HOMBRE	79	CAUCÁSICA	MODERADO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
3	HOMBRE	64	CAUCÁSICA	NO	EX	SÍ	NO	NO	MIOCARDIOPATÍA DILATADA	NO	NO	NO
4	MUJER	74	CAUCÁSICA	NO	NO	SÍ	SÍ	NO	FIBRILACIÓN AURICULAR MIOCARDIOPATÍA DILATADA	URTICARIA FACTICIA ERITEMA VASOMOTOR ROSÁCEA	NO	NO
5	HOMBRE	60	CAUCÁSICA	LEVE	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	METAPLASIA ANTRAL (2006)
6	HOMBRE	77	CAUCÁSICA	NO	NO	SÍ	NO	NO	EPOC SEVERO	NO	pT2cN0M0 PRÓSTATA (2004) BLOQUEO ANDROGÉNICO	ESQUIZOFRENIA
7	HOMBRE	80	CAUCÁSICA	LEVE	SÍ	SÍ	NO	SÍ	INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO-TRIPLE BYPASS (2006)	ALERGIA PENICILINA	NO	NO
8	MUJER	84	CAUCÁSICA	NO	NO	SÍ	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO
9	MUJER	91	CAUCÁSICA	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	OSTEOPOROSIS GONARTROSIS HISTERECTOMÍA + DOBLE ANEXECTOMÍA CATARATAS

(*) LOBECTOMÍA SUPERIOR DERECHA + LINFADENECTOMÍA. RADIOTERAPIA ADYUVANTE. NO QUIMIOTERAPIA

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

PACIENTE	SEXO	EDAD	RAZA	BEBEDOR	FUMADOR	HIPERTENSIÓN ARTERIAL	DIABETES MELLITUS	DISLIPEMIA	CARDIO-RESPIRATORIO	ANTECEDENTE INMUNOLÓGICO	ANTECEDENTE ONCOLÓGICO	OTROS
10	MUJER	74	CAUCÁSICA	NO	NO	SÍ	NO	NO	ACFA	NO	CARCINOMA PAPILAR TRANSICIONAL GRADO II NO INFILTRANTE VEJIGA Ta (1990) NO QMT (*)	NO
11	HOMBRE	75	CAUCÁSICA	NO	EX	SÍ	NO	NO	NO	NO	ADENOCARCINOMA TRASMURAL VESÍCULA BILIAR (1997) NO QMT (*)	BILLROTH II POR ULCUS DUODENAL (1996)
12	HOMBRE	77	CAUCÁSICA	NO	EX	SÍ	NO	SÍ	FIBRILACIÓN AURICULAR MARCAPASOS	NO	NO	ISQUEMIA LACUNAR (2002) BYPASS POR EMBOLIA FEMORAL
13	HOMBRE	54	CAUCÁSICA	NO	SÍ	NO	NO	NO	TEP (**) (MAYO 2013)	ALERGIA CROMO	NO	NEUMONÍA POR LEGIONELLA (2010)
14	HOMBRE	61	CAUCÁSICA	NO	EX	SÍ	NO	SÍ	NO	NO	RESECCIÓN TRANSANAL T3N0M0 (2005) -> AMPUTACIÓN ABDÓMINO-PERINEAL 5 FLUOURACILO-FOLÍNICO X6CICLOS RT: 45Gy (***)	GASTRITIS
15	MUJER	64	CAUCÁSICA	LEVE	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO

(*) NO QUIMIOTERAPIA (**) TROMBOEMBOLISMO PULMONAR DURANTE NEOADYUVANCIA (***) RADIOTERAPIA: 45 GRAYS

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

PACIENTE	SEXO	EDAD	RAZA	BEBEDOR	FUMADOR	HIPERTENSIÓN ARTERIAL	DIABETES MELLITUS	DISLIPEMIA	CARDIO-RESPIRATORIO	ANTECEDENTE INMUNOLÓGICO	ANTECEDENTE ONCOLÓGICO	OTROS
16	HOMBRE	82	CAUCÁSICA	NO	EX	NO	NO	NO	HIPERTROFIA VENTRICULAR IZQUIERDA	ANATOMÍA PATOLÓGICA GANGLIO LINFÁTICO CERVICAL DCHO: CD-45 (+) CD-20 (+) CD-10 (+) bcl-2 (+) INMUNOFENOTIPO DE MEDULA OSEA: 41% DE LINFOCITOS B Y CLONALES CD-19 (+) CD-20 (+) Y CADENA DE SUPERFICIE LAMBDA. DE ELLOS: 11% CD10 (+) bcl2 (+) Y 30% RESTANTE NEGATIVOS CARIOTIPO DE MEDULA OSEA: EN 4 METAFASES SE OBSERVA UNA TRASLOCACIÓN t(6;14)	LINFOMA NO HODGKIN FOLICULAR BAJO GRADO (1-2) ESTADÍO IVA R-CVP X5 CICLOS: HASTA 2010 (*) MANTENIMIENTO RITUXIMAB / 3 MESES X 8 CICLOS HASTA 2012 RECIDIVA MAYO 2014 ADENOPATÍA INGUINFEMORAL RT: 30Gy AGOSTO 2014 (*) + CICLOFOSFAMIDA + PREDNISONA INICIO OCTUBRE 2014	QUERATOSIS ACTÍNICA EPSTEIN BARR (-) CITOMEGALO VIRUS (+)

(*) R-CVP: RITUXIMAB + CICLOFOSFAMIDA + VINCRISTINA + PREDNISONA
 (***) RADIOTERAPIA: 30 GRAYS

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

PACIENTE	SEXO	EDAD	RAZA	BEBEDOR	FUMADOR	HIPERTENSIÓN ARTERIAL	DIABETES MELLITUS	DISLIPEMIA	CARDIO-RESPIRATORIO	ANTECEDENTE INMUNOLÓGICO	ANTECEDENTE ONCOLÓGICO	OTROS
17	MUJER	82	CAUCÁSICA	NO	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	QUERATOSIS ACTÍNICA PRÓTESIS TOTAL CADERA DCHA DEPRESIÓN
18-19-20 (*)	MUJER	52	CAUCÁSICA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE [1994]	NO	GASTRITIS CRÓNICA HELICOBACTER PYLORI (-) METAPLASIA PÓLIPOS ADENOMATOSOS GÁSTRICOS CONTROL ENDOSCÓPICO DE LARGA EVOLUCIÓN BRONQUIECTASIA LÓBULO INFERIOR IZQUIERDO OSTEOPOROSIS
21	HOMBRE	74	CAUCÁSICA	EX	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	HERNIOPLASTIA INGUINAL BILATERAL

(*) CATALOGADO COMO PACIENTE 18-19-20: SE REFIERE A UNA PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS.

TABLA XVIII-XIX-XX-XXI-XXI. Datos epidemiológicos de los pacientes incluidos en el estudio.

B. TRATAMIENTO MÉDICO CRÓNICO DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Las características de los tratamientos crónicos de los 19 pacientes con cáncer gástrico analizados se describen en la tabla mostrada a continuación.
TABLA XXII.

TRATAMIENTO CRÓNICO

PACIENTE	HIPERTENSIÓN ARTERIAL	DIABETES MELLITUS	DISLIPEMIA	CARDIOPATÍA	NEUMOPATÍA	GASTROPATÍA	INMUNOPATÍA	ONCOPATÍA	OTROS
1	NO	NO	SIMVASTATINA	MANIDON -R SEGURIL	PULMICORT	OMEPRAZOL	NO	RADIOTERAPIA (2007)	CONDROSAN
2	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
3	EMCONCOR ACOVIL	NO	BELMALIP	NO	NO	NO	NO	NO	NO
4	LOBIVON	NO	NO	SINTROM	SERETIDE	OLMESARTAN	LEVOCETIRIZINA	NO	LORAZEPAM NOLOTL
5	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
6	ENALAPRIL	NO	NO	NO	NO	OPIREN	NO	DECAPEPTYL DESDE 2004	AKINETON MODECATE FLUTANIDA OLANZAPINA HALOPERIDOL MOLAXOLE
7	LOVIBON	NO	ZARATOR EZETROL	PLAVIX	NO	ZANTAC	NO	NO	ZYLORIC NOLOTL
8	MOXON CAFENON	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	LORAZEPAM
9	AMERIDE	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	OSTINE PARACETAMOL
10	LOBIVON	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	LORAZEPAM
11	INDAPAMIDA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	TARDYFERON OPTOVITE
12	AMLODIPINO	NO	SIMVASTATINA	SINTROM	NO	NO	NO	NO	FINASTERIDE BIMATOPROST PARACETAMOL
13	NO	NO	NO	NO	CLEANE	OMEPRAZOL	NO	NO	NO
14	ENALAPRIL	NO	NO	NO	NO	OMEPRAZOL	NO	5FU-FOLÍNICO X6 CICLOS RT: 45Gy (2005) (*)	NO
15	NO	NO	NO	NO	NO	OMEPRAZOL	NO	NO	LORAZEPAM
16	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NEUPOGEN + R-CVP	R-CVP X5 (2010) R/S.M.X 8 (2012) RT (30Gy) + C/P (2014) (**)	OMNIC OAS
17	NO	METFORMINA	NO	NO	NO	OMEPRAZOL	NO	NO	OPTOVITE B12 LORAZEPAM CITALOPRAM
18-19-20 (***)	NO	NO	NO	NO	NO	NO	INMUNOGLOBULINA	NO	HIDROFEROL B12-MASTICAL
21	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO

(*) 5 FLUOURACILO-FOLÍNICO X6 CICLOS. RADIOTERAPIA: 45 GRAYS (2005). (**) RITUXIMAB + CICLOFOSFAMIDA + VINCISTINA + PREDNISONA X 5 CICLOS (2010). RITUXIMAB / 3 MESES X 8 CICLOS (2012). RADIOTERAPIA (30 GRAYS) + CICLOFOSFAMIDA/PREDNISONA (2014). (***) CATALOGADO COMO PACIENTE 18-19-20: SE REFIERE A 1 PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS.

TABLA XXII. Tratamientos crónicos recibidos por los pacientes incluidos en el estudio.

C. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Las características del tratamiento quirúrgico realizado, así como sus complicaciones postoperatorias de los 19 pacientes con cáncer gástrico analizados se describen en la tabla mostrada a continuación. TABLA XXIII.

PACIENTE	DÍA INTERVENCIÓN	GASTRECTOMÍA	LINFADENECTOMÍA	COMPLICACIÓN POSTOPERATORIA	ESTADÍO UICC
1	27/06/2012	SUBTOTAL + Y ROUX LAPAROSCÓPICA RECONVERTIDA	1	NO	IIA
2	24/07/2012	SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	2	NO	IIIB
3	23/08/2012	SUBTOTAL + Y ROUX LAPAROSCÓPICA RECONVERTIDA	1B	NO	IIIA
4	04/09/2012	TOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	2	NO	IIIA
5	13/09/2012	TOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	1B	NO	IIIC
6	23/10/2012	SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	1B	REINTERVENCIÓN SANGRADO LÍNEA GRAPAS PIE DE ASA	IA
7	13/11/2012	SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	1B	REINTERVENCIÓN ESPLENECTOMÍA	IIIC
8	20/11/2012	SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	1B	NO	IIA
9	29/11/2012	SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	1B	NO	IIA
10	15/05/2013	SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	2	NO	IIIB
11	21/05/2013	TOTAL + Y ROUX LAPAROTÓMICA + ESPLENECTOMÍA	2-RAÍZ MESO YEYUNO	NO	IV
12	18/06/2013	SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	1	NO	IIA
13	19/06/2013	SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	2	NO	IIIA
14	02/07/2013	TOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	1B	NO	IIIB
15	02/08/2013	SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	2	NO	IIA
16	12/11/2013	SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	1	NO	IB
17	27/05/2014	SUBTOTAL + Y ROUX LAPAROTÓMICA	1	NO	IIIB
18-19-20 (*)	09/06/2014	TOTAL + Y ROUX LAPAROTÓMICA	2	REINTERVENCIÓN POR FUGA MUÑÓN DUODENAL-DRENAJE PERCUTÁNEO	IIIB-IA-IA
21	29/10/2013	TOTAL + Y ROUX LAPAROTÓMICA + ESPLENECTOMÍA	2	NO	IIA

(PACIENTES 12-13-14-15 MARCADOS EN NEGRITA Y SUBRAYADO) HAN RECIBIDO ESQUEMA DE NEOADYUVANCIA. (*) CATALOGADA COMO N°18, 19 Y 20, SE REFIERE A UNA PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS.

TABLA XXIII. Tratamiento quirúrgicos realizados en los pacientes incluidos en el estudio.

D. TRATAMIENTO ONCOLÓGICO DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Las características del tratamiento neoadyuvante y adyuvante realizado, así como el pronóstico de los 19 pacientes con cáncer gástrico analizados se describen en las tablas A y B mostradas a continuación. TABLA XXIV.

PACIENTE	NEOADYUVANCIA		ESTADÍO UICC	ADYUVANCIA		RECURRENCIA	TRATAMIENTO RESCATE
	QUIMIO TERAPIA	RADIO TERAPIA		QUIMIOTERAPIA	RADIOTERAPIA		
1	NO	NO	IIA	NO	NO	NO	NO
2	NO	NO	IIIB	5-FU/LV X 6 (-)	45Gy (-)	JUNIO 2014: METÁSTASIS SUBMUCOSA RECTAL	CAPECITABINA + RADIOTERAPIA NOVIEMBRE 2014
3	NO	NO	IIIA	5-FU/LV X 6 (-)	45Gy (-)	JULIO 2014: METÁSTASIS HEPÁTICAS	EOX (-) SEPTIEMBRE 2014
4	NO	NO	IIIA	5-FU/LV X 6 (-)	45Gy (-)	AGOSTO 2014: METÁSTASIS SUPRARRENAL	DESESTIMADA ADYUVANCIA POR MORBILIDAD
5	NO	NO	IIIC	5-FU/LV (80%) X 6 (-)	45Gy (-)	NO	NO
6	NO	NO	IA	NO	NO	NO	NO
7	NO	NO	IIIC	NO	NO	FEBRERO 2013: CARCINOMATOSIS PERITONEAL.	FEBRERO 2013: XELOX (80%) + EPREX (...) ABRIL 2013: PACLITAXEL
8	NO	NO	IIA	NO	NO	NO	NO
9	NO	NO	IIA	NO	NO	NO	NO
10	NO	NO	IIIB	5-FU/LV X 6 (-)	45Gy (-)	NO	NO
11	NO	NO	IV	5-FU + FOLINATO CÁLCICO X 6 (-)	DESESTIMADA	NO	NO
12	EOX X 3 (-)	NO	IIA	DESESTIMADA POR MORBILIDAD	NO	SEPTIEMBRE 2014: OBSTRUCCIÓN INTESTINAL POR CARCINOMATOSIS PERITONEAL.	NO
13	EOX X 3 (-)	NO	IIIA	EOX X 3 (-)	NO	NO	NO
14	EOX X 3 (-)	NO	IIIB	EOX X 3 (-)	NO	JULIO 2014: PROGRESIÓN TUMORAL ADENOPÁTICA	JULIO 2014: XELIRI (80%) X 6 (...)
15	EOX X 3 (-)	NO	IIA	EOX X 3 (-)	NO	NO	NO
16	NO	NO	IB	NO	NO	NO	NO
17	NO	NO	IIIB	DESESTIMADA X CIRROSIS	DESESTIMADA	NO	NO
18-19-20 (*)	NO	NO	IIB-IA-IA	NO	NO	NO	NO
21	NO	NO	IIA	NO(&)	NO	NO (&)	NO (&)

TABLA XXIV. Neoadyuvancia y adyuvancia de los pacientes incluidos en el estudio.

PRONÓSTICO			
PACIENTE	ESTADÍO UICC	SUPERVIVENCIA DICIEMBRE 2014	ÉXITUS
1	IIA	30 MESES	NO
2	IIIB	29 MESES	NO
3	IIIA	28 MESES	NO
4	IIIA	27 MESES	NO
5	IIIC	27 MESES	NO
6	IA	26 MESES	NO
7	IIIC	25 MESES	11/06/2013
8	IIA	25 MESES	NO
9	IIA	25 MESES	NO
10	IIIB	19 MESES	NO
11	IV	19 MESES	NO
<u>12</u>	<u>IIA</u>	<u>18 MESES</u>	<u>26/09/2014</u>
<u>13</u>	<u>IIIA</u>	<u>18 MESES</u>	<u>NO</u>
<u>14</u>	<u>IIIB</u>	<u>17 MESES</u>	<u>NO</u>
15	IIA	15 MESES	NO
16	IB	13 MESES	NO
17	IIIB	7 MESES	NO
18-19-20 (*)	IIIB-IA-IA	6 MESES	NO
21	IIA	14 MESES	NO

(-) 5-FU/LV : 5 FLUOROURACILO + LEUCOVORIN DURANTE 6 CICLOS + RADIOTERAPIA: 45 GRAYS. (..) EOX : EPIRRUBICINA + OXALIPLATINO + XELODA (CAPECITABINA) DURANTE 3 CICLOS. (...) XELOX + EPREX: XELODA (CAPECITABINA) + OXALIPLATINO + ERITROPOYETINA. (....) XELIRI: XELODA (CAPECITABINA) + IRINOTECAN DURANTE 6 CICLOS. (&) PACIENTE 21 DESARROLLA UN CARCINOMA BRONQUIOLO-ALVEOLAR NO MUCINOSO ESTADÍO IV: CK7+/CK20-/TTF1+ TRATADO EN 1ª LÍNEA: GEFITINIB + ÁCIDO ZOLEDRÓNICO/2ª LÍNEA: PEMETREXEB + ÁCIDO ZOLEDRÓNICO -> GEN EGFR MUTADO (MUTACIÓN G719X EN EXÓN 18) POR TÉCNICA DE PCR. (PACIENTES 2-3-4-5-10-11 MARCADOS EN NEGRITA) HAN RECIBIDO ESQUEMA DE ADYUVANCIA. (PACIENTES 12-13-14-15 MARCADOS EN NEGRITA Y SUBRAYADO) HAN RECIBIDO ESQUEMA DE NEOADYUVANCIA. (*) CATALOGADA COMO Nª18, 19 Y 20, SE REFIERE A UNA PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS. (PACIENTES 7-12 SOMBREADOS) FALLECIERON A LOS 25 Y 18 MESES RESPECTIVAMENTE.

TABLA XXV. Pronóstico de los pacientes incluidos en el estudio a cierre del mismo (Diciembre 2014)

E. LOCALIZACIÓN TUMORAL, CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA Y GRADO DE DIFERENCIACIÓN DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Las características de estos datos de los 21 cánceres gástricos analizados se describen en la tabla mostrada a continuación. TABLA XXVI.

PACIENTE	HELICOBACTER PYLORI	EPSTEIN BARR	LOCALIZACIÓN	LAUREN-VIENA	BORMANN	WHO-JAPONESA	G
1	ND	ND	ANTRO	DIFUSO	II	POBREMENTE COHESIVO	3
2	ND	ND	ANTRO	INTESTINAL	II	TÚBULO-PAPILAR	2_3
3	ND	ND	INCISURA ANGULARIS	INTESTINAL	II	ND	2
4	ND	ND	CARDIAS SIEWERT II	INTESTINAL	II	TÚBULO-PAPILAR-MUCINOSO	2
5	(-)	ND	ANTRO	INTESTINAL	III	TÚBULO-PAPILAR	3
6	ND	ND	ANTRO	INTESTINAL	II	TÚBULO-MUCINOSO	2
7	ND	ND	ANTRO	INDETERMINADO	II	MIXTO (TÚBULO-PAPILAR/ANILLO DE SELLO)	3
8	ND	ND	CUERPO ANTRO	INTESTINAL	I	TÚBULO-PAPILAR	2
9	(+)	ND	ANTRO	INTESTINAL	II	PAPILAR	2
10	ND	ND	ANTRO	INDETERMINADO	II	MIXTO (TÚBULO-PAPILAR/POBREMENTE COHESIONADO)	3
11	ND	ND	CUERPO	INDETERMINADO	II	MIXTO ADENONEUROENDOCRINO	1_2_3
12	ND	ND	ANTRO	INTESTINAL	III	MUCINOSO	2
13	ND	ND	ANTRO	DIFUSO	II	POBREMENTE COHESIONADO	3
14	ND	ND	CUERPO	INTESTINAL	II	TUBULAR	2
15	ND	ND	ANTRO	INTESTINAL	II	TUBULAR	2
16	ND	ND	CUERPO	INTESTINAL	II	MUCINOSO	2
17	ND	(-)	ANTRO	INTESTINAL	I	TÚBULO-PAPILAR INFILTRANTE	3
18 (*)	(-)	ND	CUERPO	INTESTINAL	II	PAPILAR ULCERATIVO-INFILTRANTE	2
19 (*)	(-)	ND	ANTRO	INTRAMUCOSO	I	PAPILO-VELLOSITARIO	1
20 (*)	(-)	ND	CUERPO ANTRO	INTRAMUCOSO	I	ANILLO SELLO	1
21	ND	ND	FUNDUS CUERPO	INTESTINAL	II	INFILTRANTE	2

ND : NO DESCRITO. (-) AUSENTE. (+) PRESENTE. (*) CATALOGADO COMO PACIENTE 18-19-20: SE REFIERE A UNA PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS.

TABLA XXVI. Datos histopatológicos de los pacientes incluidos en el estudio.

F. CLASIFICACIÓN TNM Y DATOS HISTOPATOLÓGICOS RELACIONADOS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Las características de estos datos de los 21 cánceres gástricos analizados se describen en la tabla mostrada a continuación. TABLA XXVII-XXVIII-XXIX.

DATOS HISTOPATOLÓGICOS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

PACIENTE	TNM	INMUNOHISTOQUÍMICA	GASTRITIS ASOCIADA	INFILTRADO LINFOCITARIO	REACCIÓN DESMOPLÁSICA	BORDES RESECCIÓN
1	pT3N0M0 LVi-PN- (-)	NO	GASTRITIS CRÓNICA	-	+	LIBRES
2	pT4aN2M0 LVi- PN+ (-)	NO	GASTRITIS CRÓNICA METAPLASIA-DISPLASIA	-	-	PROXIMAL AFECTADO
3	pT3N2M0 LVi+ PN+ (-)	HER2 (2+) -> FISH (-) -> SISH NO VALORABLE (-)	NO	-	-	LIBRES
4	pT3N2M0 LVi+ PN+ (-)	NO	NO	-	-	LIBRES
5	pT4aN3aM0 LVi+ PN+ (-)	NO	GASTRITIS CRÓNICA-METAPLASIA	-	-	LIBRES
6	pT1bN0M0 LVi- PN- (-)	NO	GASTRITIS CRÓNICA-METAPLASIA	+	+	LIBRES
7	pT4aN3bM0 LVi+ PN+ (-)	HER2 (1+) (-)	GASTRITIS CRÓNICA-METAPLASIA	+	-	LIBRES
8	pT2N1M0 LVi+ PN- (-)	NO	GASTRITIS CRÓNICA-METAPLASIA	+	+	LIBRES
9	pT3N0M0 LVi- PN- (-)	NO	GASTRITIS CRÓNICA ACTIVA	+	+	LIBRES

(-) LVI / PN: INFILTRACIÓN VÁSULO-LINFÁTICA / INFILTRACIÓN PERINEURAL (-) AUSENTE. (+) PRESENTE. (-) HER2 (2+) INTERMEDIO: TINCIÓN DE MEMBRANA, AL MENOS LATERAL, MODERADA (VISIBLE CON LO OBJETIVOS DE X10-X20) EN AL MENOS EL 10% DE LAS CÉLULAS TUMORALES. ESTUDIO DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN ERBB2 POR HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH) CON HER-2 DNA PROBE KIT II (PATHVYSION). NEGATIVO: - ERBB2/CEP17 <2 Y SEÑALES ERBB2/CÉLULA <4. ESTUDIO DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN ERBB2 POR HIBRIDACIÓN IN SITU CON PLATA (SISH) DE LABORATORIOS ROCHE (DUAL ISH), CON SONDA DE DOBLE SEÑAL (GEN ERBB2 Y CROMOSOMA 17): NO VALORABLE. (-) HER2 (1+) NEGATIVO TINCIÓN DE MEMBRANA, AL MENOS LATERAL, CASI IMPERCEPTIBLE (VISIBLE SÓLO CON EL OBJETIVO DE X40) EN AL MENOS EL 10% DE LAS CÉLULAS TUMORALES.

DATOS HISTOPATOLÓGICOS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

PACIENTE	TNM	INMUNOHISTOQUÍMICA	GASTRITIS ASOCIADA	INFILTRADO LINFOCITARIO	REACCIÓN DESMOPLÁSICA	BORDES RESECCIÓN
10	pT3N1M0 LVi- PN+ (-)	NO	GASTRITIS CRÓNICA-METAPLASIA	+	-	LIBRES
11	pT3N0M1 LVi- PN- (-)	NO	GASTRITIS CRÓNICA-METAPLASIA-DISPLASIA	-	-	LIBRES
12	<u>γT3N0M0 LVi- PN- (-)</u>	HER2 (0) (-)	<u>GASTRITIS CRÓNICA-METAPLASIA-LAGOS MOCO EN UN GANGLIO</u>	-	+	LIBRES
13	<u>γT3N2M0 LVi- PN- (-)</u>	NO	<u>INFLAMACIÓN CRÓNICA-HIPERPLASIA DE CÉLULAS ENDOCRINA</u>	+	+	LIBRES
14	<u>γT3N3aM0 LVi+ PN- (-)</u>	HER 2 (0) (-)	<u>GASTRITIS CRÓNICA-METAPLASIA-DISPLASIA</u>	+	+	LIBRES
15	<u>γT3N0M0 LVi- PN- (-)</u>	NO	NO	-	+	LIBRES
16	pT2N0M0 LVi- PN- (-)	NO	METAPLASIA-DISPLASIA	-	-	LIBRES

(PACIENTES 12-13-14-15 MARCADOS EN NEGRITA Y SUBRAYADO) HAN RECIBIDO ESQUEMA DE NEOADYUVANCIA. (-) LVI / PN: INFILTRACIÓN VÁSULO-LINFÁTICA / INFILTRACIÓN PERINEURAL (-) AUSENTE. (+) PRESENTE. (-) (0) NEGATIVO AUSENCIA DE TINCIÓN O TINCIÓN EN MENOS DEL 10% DE LAS CÉLULAS TUMORALES.

DATOS HISTOPATOLÓGICOS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

PACIENTE	TNM	INMUNOHISTOQUÍMICA	GASTRITIS ASOCIADA	INFILTRADO LINFOCITARIO	REACCIÓN DESMOPLÁSICA	BORDES RESECCIÓN
17	pT2N2M0 LVi+ PN- (-)	MMR(MLH1-MSH2-MSH6-PMS2):INTACTA/VEB-/CA19.9+	GASTRITIS CRÓNICA-METAPLASIA-DISPLASIA/PÓLIPO HIPERPLÁSICO/2 PÓLIPOS METAPLASIA	-	EN ZONA MÁS PROFUNDA INFILTRANTE	LIBRES
18 (*)	pT4aN0M0 LVi+ PN+ (-)	NO	GASTRITIS CRÓNICA-DISPLASIA/ 3 ADENOMAS + DISPLASIA EN FUNDUS Y ANTRO	-	INFILTRANTE	LIBRES
19 (*)	pT1N0M0 LVi PN- (-)	NO	GASTRITIS CRÓNICA-DISPLASIA/ 3 ADENOMAS + DISPLASIA EN FUNDUS Y ANTRO	-	-	LIBRES
20 (*)	pT1N0M0 LVi- PN- (-)	NO	GASTRITIS CRÓNICA-DISPLASIA/ 3 ADENOMAS + DISPLASIA EN FUNDUS Y ANTRO	-	-	LIBRES
21	pT2N1M0 LVi- PN- (-)	NO-> para n. pulmón posteriorGEN EGFR MUTADO (MUTACIÓN G719X EN EXÓN 18) POR PCR	ZIEHL-NIEELEN-	-	-	LIBRES

(*) CATALOGADO COMO PACIENTE 18-19-20: SE REFIERE A UNA PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS. (-) LVI / PN: INFILTRACIÓN VÁSCULO-LINFÁTICA / INFILTRACIÓN PERINEURAL (-) AUSENTE. (+) PRESENTE.

TABLA XXVII-XXVIII-XXIX. Características TNM-datos histopatológicos.

G. CLASIFICACIÓN TNM Y ESTADÍOS UICC DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Las características de estos datos de los 21 cánceres gástricos analizados se describen en la tabla mostrada a continuación. TABLA XXX.

PACIENTE	TNM	ESTADÍO UICC
1	pT3N0M0 LVi- PN-	IIA
2	pT4aN2M0 LVi- PN+	IIIB
3	pT3N2M0 LVi+ PN+	IIIA
4	pT3N2M0 LVi+ PN+	IIIA
5	pT4aN3aM0 LVi+ PN+	IIIC
6	pT1bN0M0 LVi- PN-	IA
7	pT4aN3bM0 LVi+ PN+	IIIC
8	pT2N1M0 LVi+ PN-	IIA
9	pT3N0M0 LVi- PN-	IIA
10	pT3N1M0 LVi- PN+	IIIB
11	pT3N0M1 LVi- PN-	IV
12	<u>yT3N0M0 LVi- PN-</u>	IIA
13	<u>yT3N2M0 LVi- PN-</u>	IIIA
14	<u>yT3N3aM0 LVi+ PN-</u>	IIIB
15	<u>yT3N0M0 LVi- PN-</u>	IIA
16	pT2N0M0 LVi- PN-	IE
17	pT2N2M0 LVi+ PN-	IIIB
18(*)	pT4aN0M0 LVi+ PN+	IIIB
19(*)	pT1N0M0 LVi PN-	IA
20(*)	pT1N0M0 LVi- PN-	IA
21	pT2N1M0 LVi- PN-	IIA

ESTADÍOS ANATOMO-PATOLÓGICOS DE LOS TUMORES DE LOS 19 PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO. (PACIENTES MARCADOS p-TNM) SE CORRESPONDEN CON ESTADÍO ANATOMO-PATOLÓGICO SIN TRATAMIENTO PREVIO. (PACIENTES MARCADOS EN NEGRITA/SUBRAYADO/γ-TNM) HAN RECIBIDO NEOADYUVANCIA. (*) CATALOGADA COMO N^o18, 19 Y 20, SE REFIERE A UNA PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS.

TABLA XXX. Clasificación TNM. Estadío UICC.

H. DATOS DEL ESTUDIO PROTEÓMICO

1. PROTEÓMICA DEL DESCUBRIMIENTO

➤ PROTEÓMICA DE TEJIDO GÁSTRICO EN EL RATÓN

El Instituto Nacional del Cáncer⁶⁶ lanzó en el año 2004 una iniciativa, para la aplicación de la tecnología proteómica en el ratón. La finalidad fue utilizar estos modelos animales para desarrollar recursos tecnológicos estandarizados y así ayudar a mejorar la medición de las proteínas y péptidos ligados a los procesos tumorales.

Los objetivos de esta iniciativa fueron, estandarizar los métodos de detección y análisis de las proteínas y péptidos, identificar o caracterizar nuevos biomarcadores asociados con modelos de cáncer humano en el ratón, refinar y unificar los métodos de preparación de muestras complejas y heterogéneas.

De los resultados más relevantes de esta investigación, destaca el Sistema Computacional de Análisis Proteómico (CPAS). Una página Web de gestión de datos proteómicos, de utilización pública, que combina los sistemas de gestión de información de los laboratorios (LIMS) y modelos informáticos de experimentos de alto rendimiento realizados con cromatografía líquida en tándem con el espectrómetro de masas (LC / MS / MS).

Posteriormente esta idea ha permitido, así mismo, a la comunidad proteómica del cáncer almacenar, analizar y compartir datos de proteómica clínica.

En la plataforma de proteómica SGIKER de la UPV-EHU, se tenía experiencia en la investigación con proteína purificada, geles 1D y 2D, o extracto/lisado celular, pero no con tejidos obtenidos de piezas quirúrgicas humanas.

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Debido a estas circunstancias y teniendo en cuenta las orientaciones de la iniciativa del Instituto Nacional del Cáncer, en vez de comenzar las pruebas directamente en tejido humano, se decidió, hacer varias pruebas en tejidos de murinos para la puesta a punto de la metodología.

Las pruebas con tejido de murinos comienzan en Marzo 2013

RESULTADOS

Como primer paso, hemos procedido a homogenizar el tejido de ratón, probando con dos tejidos de distinta densidad (estómago y cerebro, uno duro y otro blando), para detectar las posibles dificultades inherentes a esta fase.

Para esta homogeneización utilizamos el sistema de Precellys, que consiste en un sistema de bolitas de cerámica u otro material, en vez del sistema ultra-turrax, utilizado habitualmente. El sistema de Precellys simplifica enormemente la homogeneización, puesto que cada muestra va en su tubo con su solución de lisis y sus bolitas, y no hay problemas de contaminación cruzada. De esta manera, no hay que manipular la muestra

más allá de pesarla y cortarla y no hay que preocuparse de limpiar el dispersor, como ocurría en el ultra-turrax.

Para evaluar la calidad de la muestra (cantidad de péptidos, ausencia de contaminantes y reproducibilidad entre diferentes preparaciones) se realizó un primer análisis en el espectrómetro de masas SYNAPT HDMS (Waters) acoplado a un sistema de cromatografía NanoAcquity (Waters), con el que se tenía en el laboratorio más experiencia previa. Se utilizó el modo de adquisición de espectros MSE (adquisición independiente de datos) que se puede utilizar tanto para la identificación como para la cuantificación sin marcaje de las proteínas.

En la FIGURA 32 se puede apreciar que se produce una distribución de la señal bastante homogénea a lo largo de todo el gradiente (cromatograma TIC) y que los picos individuales que se ven en el cromatograma BPI son picos bastante simétricos y sin ensanchamiento apreciable. Estos datos indican por un lado que la muestra está limpia y no tiene componentes contaminantes que alteran la cromatografía y la elución de los picos y, por otro, que los péptidos de la muestra se distribuyen de forma homogénea a lo largo de todo el gradiente.

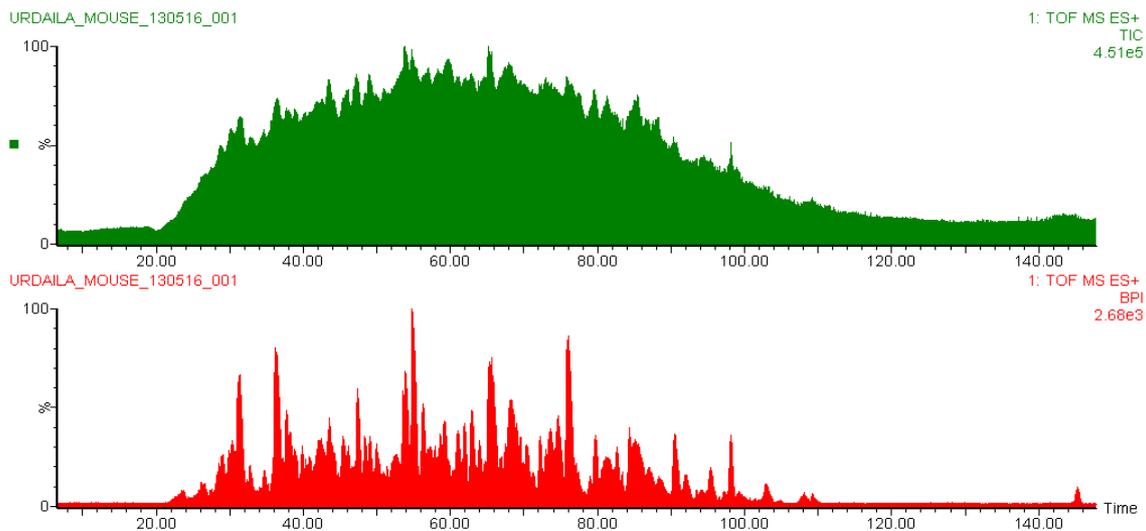


FIGURA 32. Cromatograma TIC (Total Ion Current) (verde) y BPI (Base Peak Intensity) (rojo) de la muestra de tejido gástrico murino analizada el espectrómetro de masas SYNAPT HDMS.

Tras estos resultados iniciales, se introdujeron dos comprobaciones más: se comparó la homogeneización/digestión de la muestra tal y como se había llevado a cabo con la homogeneización de la muestra con la solución de lisis RapidGest (Waters) y posterior digestión trípica con el protocolo habitual; y por otro lado, se procedió a procesar estas mismas muestras en el equipo de espectrometría de nueva adquisición Q Exactive (Thermo Scientific) acoplado a un sistema cromatográfico EASY n-LC 1000 (Thermo

Scientific). La diferencia fundamental entre las dos plataformas es la mayor resolución y rapidez de adquisición lo que conlleva un aumento considerable del número de proteínas identificadas. Además, el equipo Q Exactive tiene la capacidad de realizar experimentos de proteómica dirigida.

La lista de proteínas identificadas en la muestra de estómago de ratón se adjunta en Excel Ratón en formato digital. (EXCEL-1-ESTÓMAGO MURINO)

➤ **PROTEÓMICA DEL CÁNCER GÁSTRICO EN HUMANOS**

El reciente desarrollo metodológico y tecnológico de la espectrometría de masas para su aplicación al estudio de las proteínas a gran escala, ha hecho posible la extracción de datos cuantitativos en relación a la abundancia de las mismas, utilizando estrategias que incluyen técnicas de marcado así como libres de marcado y enfoques también dirigidos, como la “Selected Reaction Monitoring” (SRM).

El documento MIAPE-Quant ha sido elaborado por grupos de trabajo en espectrometría de masas y proteómica informática. La iniciativa de una proteómica estandarizada, ha sido desarrollada por la organización Proteoma Humano, la organización ProteoRed España y la comunidad proteómica.

Las directrices recogen la descripción del diseño experimental y las muestras, los datos de entrada, el algoritmo de cuantificación y resultando de los datos cuantitativos y estadísticos⁶⁷.

A finales de Abril 2013, tras la puesta a punto de la metodología y los resultados obtenidos en el procesamiento del tejido gástrico en murinos y el desarrollo de los biobancos hospitalarios para la recogida y conservación de las muestras humanas, se decidió trasladar el análisis del ratón al humano, para lo que se seleccionó uno de los nueve pacientes, que conformaban la primera campaña de este estudio.

Los objetivos concretos de esta fase del estudio fueron dos:

- Trasladar los buenos resultados a nivel de identificación de proteínas y péptidos obtenido con el tejido gástrico murino a tejido gástrico humano.
- Obtener información experimental de un panel extenso de proteínas y péptidos de tejido gástrico humano para seleccionar las más adecuadas y realizar el estudio de proteómica dirigida posterior.

RESULTADOS

Dado que había la posibilidad de tener que sacrificar la muestra en este proceso de puesta a punto metodológico, se eligió la que tenía mayor discordancia histológica y de localización con el resto de los tumores (Paciente nº4 - tejido sano), por lo que es en esta muestra, en la que hemos llevado a cabo la proteómica del descubrimiento, mientras que en el conjunto global se desarrolla la finalidad última de este proyecto, que es la proteómica dirigida.

La muestra la hemos obtenido vía biobanco vasco para la investigación (o+ehun)⁶⁸, donde se había congelado a -80°C previa inclusión en OCT y almacenado para su análisis posterior.

El OCT (Optimal Cutting Temperature) es un compuesto que preserva ultraestructuras y al tejido de la deshidratación y degradación y actúa como un aislante sobre las variaciones de temperatura, minimizando la formación de cristales. Es especialmente útil para la conservación tras la congelación del tejido fresco que debe ser seccionado.

Como uno de los componentes de este OCT es polietilenglicol, un contaminante para experimentos proteómicos, que es necesario eliminar de la muestra, hemos realizado dos preparaciones de muestra para eliminar el OCT (ver material y métodos).

Una vez lavados, homogeneizados y digeridos las muestras se han analizado en el espectrómetro Q Exactive, para valorar cada uno de los protocolos de lavado. Los resultados obtenidos no muestran diferencias entre los dos métodos de lavado en el número de proteínas identificadas. En ambas muestras se identifican aproximadamente 3000 grupos de proteínas y hay un solapamiento entre los dos análisis de alrededor del 80%. FIGURA 33.

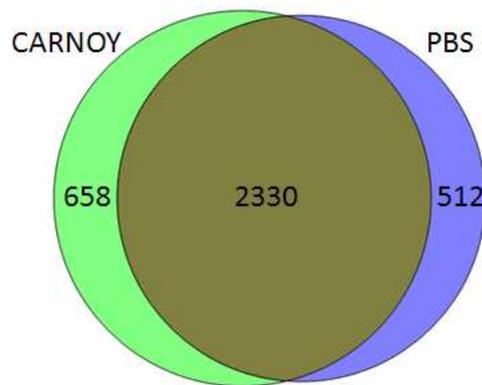


FIGURA 33. Diagrama de Venn donde se muestra el número de grupos de proteínas identificados en las muestras de tejido gástrico procesadas con CARNOY y con PBS.

También se realizó un análisis de integración funcional de las proteínas identificadas utilizando el programa STRAP (Software Tool for Rapid Annotation of Proteins)⁶⁴. En cada Excel adjunto hay 35 hojas, cada una con diferente información de las proteínas. En la primera hoja está la lista de proteínas identificadas. De cada una de las características de las proteínas identificadas mostramos información en relación a su función, catalytic activity, GO-Biological Process, GO-cellular component, GO-Molecular Function. También aparecen los códigos GO (Gene Ontology) y sus porcentajes correspondientes.

La lista de proteínas identificadas tras el lavado del OCT con PBS y Carnoy se adjunta en Excel PBS/Carnoy en formato digital.

(EXCEL-2-ESTÓMAGO PBS STRAP/EXCEL-3-ESTÓMAGO CARNOY STRAP)

En primer lugar mostramos el porcentaje de las funciones de las proteínas obtenidas tras la conservación en OCT y posterior lavado en PBS y Carnoy. FIGURA 34-35.

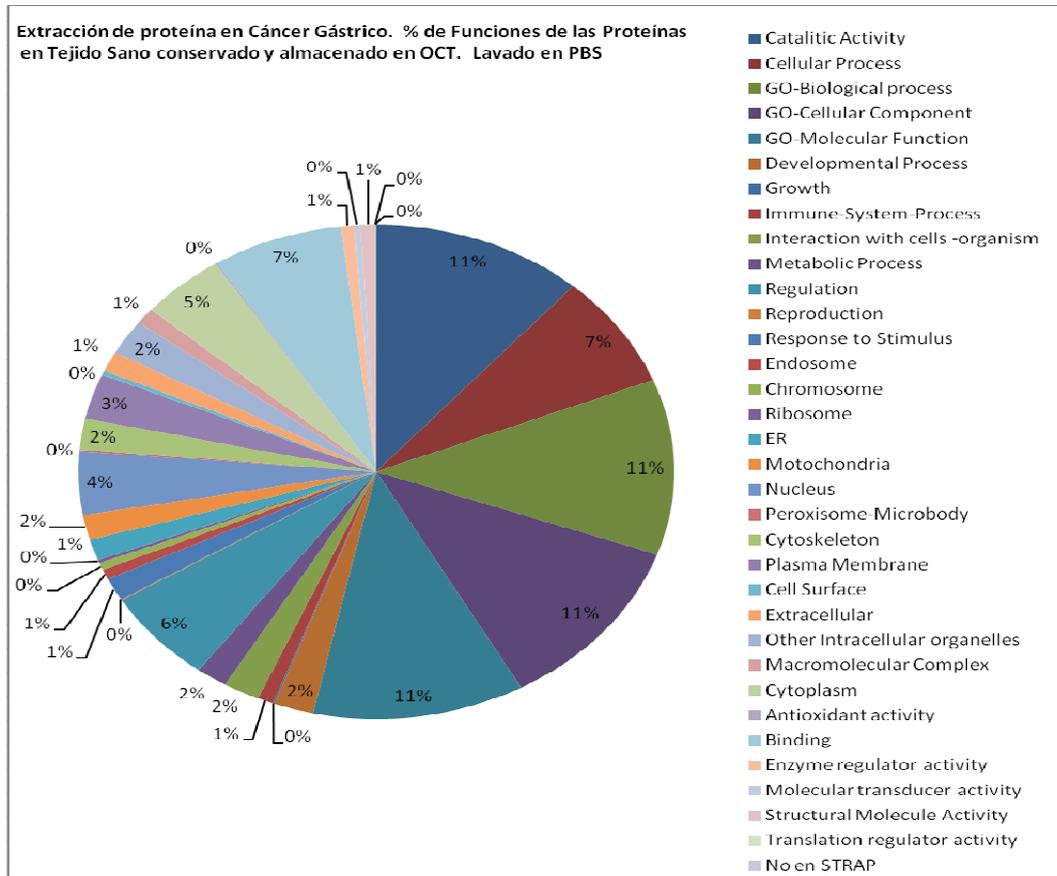


FIGURA 34. Extracción de las proteínas: tejido sano conservado en OCT y lavado en PBS.

La actividad catalítica, procesos biológicos, componentes celulares y la función molecular, representados en un 11 % respectivamente son las principales funciones observadas en las proteínas lavadas con PBS.

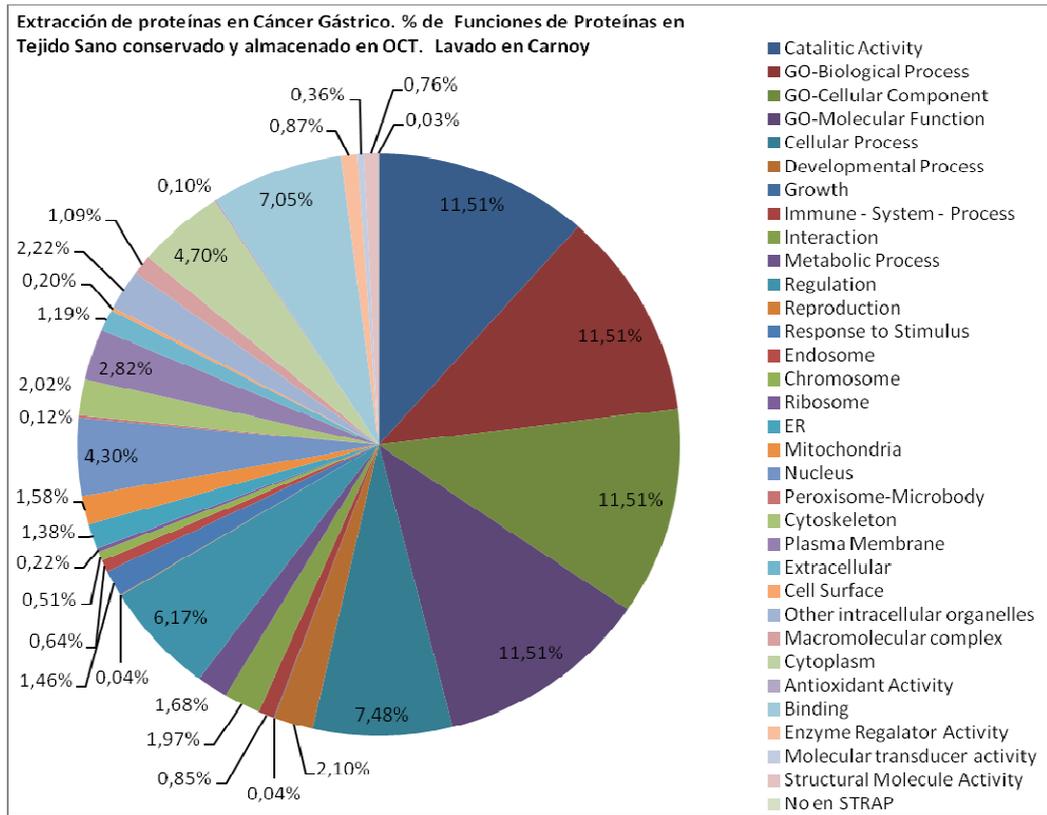


FIGURA 35. Extracción de las proteínas: tejido sano y tumoral conservado en OCT y lavado en Carnoy.

La actividad funcional de las proteínas lavadas con Carnoy y los porcentajes son similares a las de las proteínas lavadas con PBS. FIGURA 36.

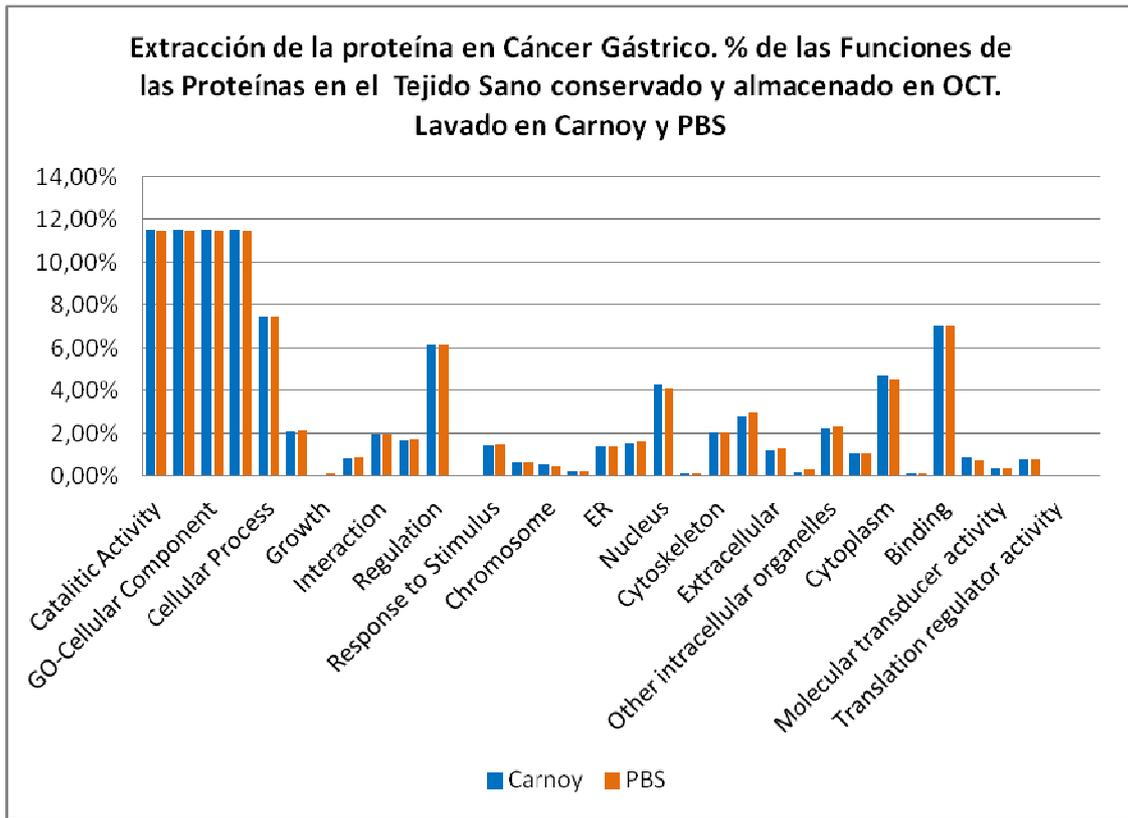


FIGURA 36. Análisis diferencial en relación con las proteínas identificadas y la función que realizan, entre las dos formas de lavado PBS y Carnoy.

De los resultados mostrados en la tabla, se desprende que no hay diferencias significativas en las proteínas obtenidas con los dos procedimientos de limpieza del tejido, permaneciendo intacta la funcionalidad de estas proteínas en los tejidos analizados.

2. PROTEÓMICA DIRIGIDA DEL CÁNCER GÁSTRICO

Los perfiles de expresión de proteínas en el cáncer, mejoran la propuesta de diagnóstico mediante la identificación de biomarcadores moleculares, mejoran la comprensión de la patología molecular identificando las vías de señalización celular, contribuyen al desarrollo de dianas terapéuticas, facilitan la integración del diagnóstico y del tratamiento, permiten una mejor clasificación de la enfermedad, pueden ayudar en el desarrollo de terapia biológica y permiten la monitorización del paciente⁶⁹.

PLANTEAMIENTO

La electroforesis bidimensional y la cromatografía líquida en tándem con el espectrómetro de masas, que fue clásicamente utilizada para determinar perfiles proteicos en la proteómica del descubrimiento y utilizada por nuestro grupo (Grupo de Investigación de Cirugía Computacional del Instituto BioCruces) en el cáncer de colon, se ha visto superada por la proteómica dirigida de cuantificación diferencial, para el análisis de biomarcadores de cáncer.

HIPOTESIS

La desregulación de los componentes dependientes de la vía de señalización EGFR-RAS-MAPK, son un requisito esencial para la tumorigénesis del cáncer gástrico. La cuantificación de estos componentes proteicos y peptídicos podría ayudar a seleccionar mejor a los pacientes para una terapia personalizada.

Nuestro objetivo ha sido, desarrollar por metodología proteómica dirigida, la cuantificación de secuencias peptídicas de las proteínas implicadas en diferentes vías de señalización celular, que participan en la carcinogénesis gástrica.

SELECCIÓN DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS

A la hora de seleccionar las proteínas y péptidos a monitorizar en este estudio se han seguido dos criterios:

- Proteínas con probada participación en procesos de cancerígenos en general y/o dianas terapéuticas.

- Péptidos que identifiquen específicamente a las proteínas seleccionadas y que hayan sido detectados por espectrometría de masas en el Servicio de Proteómica de la UPV/EHU, en experimentos de identificación masiva.

➤ PROTEOMICA DIRIGIDA: FASE 1

En una primera fase del estudio de proteómica dirigida se decidió cuantificar los péptidos seleccionados utilizando un péptido exógeno como péptido estándar para normalizar los resultados. A cada muestra se le ha añadido 100 fmol de una digestión de enolasa de levadura (MassPREP Enolase Digestion Standard, Waters) para cuantificar el péptido VNQIGTLESISK en todas las muestras y así poder normalizar los resultados frente a desviaciones derivadas de la metodología de análisis. El péptido VNQIGTLESISK es un

péptido específico de la enolasa de levaduras por lo que no es probable que su cuantificación se vea afectada por péptidos de la muestra humana.

En este primer análisis se monitorizaron 7 péptidos humanos correspondientes a 4 proteínas. TABLA XXXI.

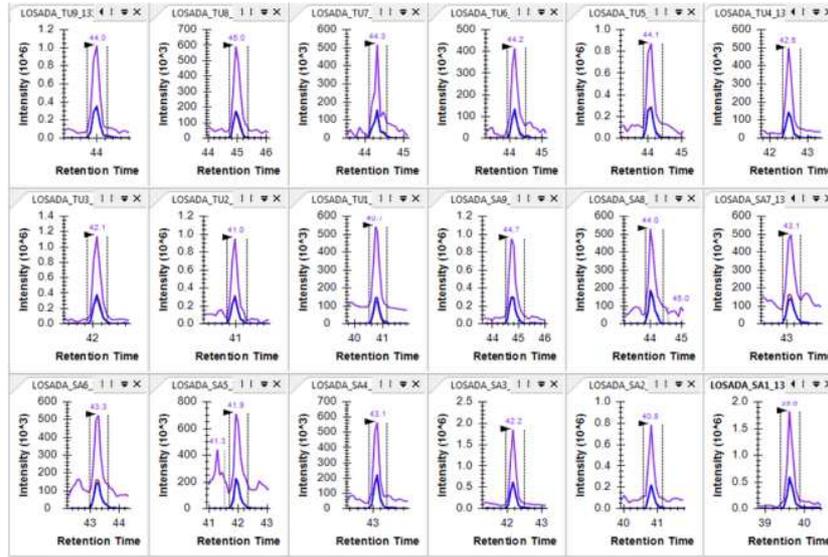
Proteína	Péptido	Carga	m/z
ENO1_YEAST	VNQIGTLSESIK	2	644.85899
EGFR_HUMAN	SPSDCCHNQCAAGCTGPR	3	678.92596
MK01_HUMAN	IEVEQALAHPLYLEQYYDPSDEPIAEAPFK	3	1121.54163
MK01_HUMAN	YTNLSYIGEGAYGMVCSAYDNVVK	2	1345.09908
MK03_HUMAN	RTEGVGPGVPGEVEMVK	2	870.95109
MK03_HUMAN	RTEGVGPGVPGEVEMVK	3	580.96982
FKB1A_HUMAN	GWEEGVAQM SVGQR	2	767.35936
FKB1A_HUMAN	RGQTCVVHYTG MLEDGK	3	650.97687

TABLA XXXI. Lista de péptidos monitorizados con su correspondiente carga y m/z indicándose la proteína a la que pertenecen. El péptido RTEGVGPGVPGEVEMVK se ha monitorizado con 2 y 3 cargas.

Para esta primera fase se han seleccionado los tejidos sanos y tumorales de 9 pacientes (primera campaña del estudio)

En primer lugar se muestran los resultados para la cuantificación del péptido VNQIGTLSESIK de la enolasa de levadura. FIGURA 37 (A-B).

A



B

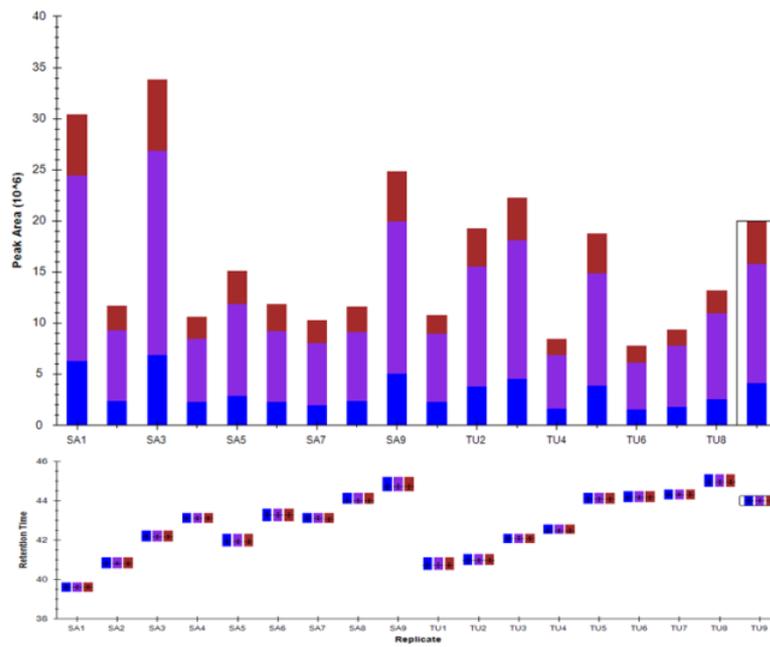


FIGURA 37 (A-B). En la figura A se muestra el cromatograma para 3 fragmentos (y9, y8, y5) para el péptido VNQIGTLESSEIK. En la figura B se muestra la cuantificación del área del cromatograma correspondiente a cada fragmento (y9 azul, y8 morado, y5 marrón) y los tiempos de retención correspondientes.

En primer lugar se observa que la cuantificación del péptido VNQIGTLSESIK no ha sido lo suficientemente reproducible (Figura 36B). Hay 11 muestras (SA2, SA4, SA5, SA6, SA7, SA8, TU1, TU4, TU6, TU7, TU8) que tienen unos valores bastante homogéneos, otras 5 muestras que tienen un valor bastante superior (SA9, TU2, TU3, TU5, TU9) y otras 2 (SA1, SA3) que estaban muy por encima de la media. Este resultado compromete bastante la interpretación del resto de cuantificaciones porque indica una falta de reproducibilidad en el análisis. En la TABLA XXXII se muestran los valores de cuantificación y el factor de corrección o normalización a aplicar en cada muestra (se ha considerado el valor de la muestra SA3 como 1). Como se puede comprobar los valores son muy dispares lo que limita completamente la interpretación de los resultados.

Muestra	Area total	Factor de normalización
SA1	30393842	1.11
SA2	11726601	2.89
SA3	33869356	1.00
SA4	10616346	3.19
SA5	15093185	2.24
SA6	11859913	2.86
SA7	10295996	3.29
SA8	11658924	2.91
SA9	24893908	1.36
TU1	10817264	3.13
TU2	19292056	1.76
TU3	22286176	1.52
TU4	8450679	4.01
TU5	18819688	1.80
TU6	7767944	4.36
TU7	9422633	3.59
TU8	13242249	2.56
TU9	20009618	1.69

TABLA XXXII. Valores de cuantificación y factor de corrección o normalización a aplicar en cada muestra

Una vez calculados los valores de normalización se procedió a calcular el área normalizada de todos los péptidos monitorizados (TABLA XXXIII). En algunas muestras alguno de los péptidos no fue detectado. Ese hecho no implica que la cantidad de péptido sea 0 en esa muestra, simplemente que su nivel está por debajo del límite de detección del equipo.

Muestra	Area total normalizada					
	EGFR_HUMAN	MK03_HUMAN	MK01_HUMAN		FKB1A_HUMAN	
	SPSDCCHNQCAAGCTGPR	RTEGVGPGVPGEVEMVK	YTNSYIGEGAYGMVCSAYDNV NK	IEVEQALAHPLYLEQYYDPSDEPIAEAPFK	RGQTCVVHYTGMLEDGK	GWEEGVAQMSVGQR
SA1	18008170.78	4029168.299	2322813.161	10966887.4	5098170.251	26636767.82
SA2	12171065.52	6499824.792	9805490.523	12562570.7	15058082.29	42468649.76
SA3	3137178	1315139	ND	736326	3125906	19559388
SA4	6308539.409	2993933.073	1201298.864	14204216.07	5370922.243	63193806.95
SA5	5518579.597	7623451.354	5759380.518	7607794.851	5523725.126	52187215.47
SA6	5743176.871	5431479.413	ND	3261720.015	3031626.6	62568171.33
SA7	10143741.19	6313742.53	9429892.261	3441112.774	13420671.74	87042337.89
SA8	5093105.29	758958.5634	ND	2964394.11	7582726.892	42933016.27
SA9	96887.34205	2085793.508	871822.8127	2752762.694	5021628.816	29799537.97
TU1	2879516.961	ND	ND	2465771.09	ND	64864812.14
TU2	8239534.359	4668566.078	1491056.675	11310200.75	11837988.49	38239343.47
TU3	3343693.318	3057526.419	1118613.046	12644945.02	3664466.382	16294826.39
TU4	5913964.081	4866992.1	ND	6930351.885	ND	18076286.18
TU5	4151595.239	2405624.388	5071937.36	13601906.91	6671608.885	41478015.21
TU6	9209234.977	5187507.726	ND	1989041.103	ND	32764168.45
TU7	6994612.533	1125244.719	13282164.39	21254314.15	6662566.331	34178519.82
TU8	4567389.369	ND	MD	ND	ND	27048162.2
TU9	1089874.394	688126.399	ND	9158541.797	ND	23855093.07

TABLA XXXIII. Área normalizada de todos los péptidos monitorizados

Con estos resultados se procedió a calcular el cociente SA/TU para cada uno de los péptidos.

El cociente entre la cantidad de proteína de cada tejido en un individuo, ofrece un valor de cuantificación más adecuado para la comparación posterior entre individuos, ya que en cierto grado, permite disminuir el efecto de la variabilidad de los niveles de proteína entre individuos.

En el caso de que la variabilidad de estas proteínas sea muy grande entre individuos o entre pacientes que tengan alterados los valores proteicos por causas ajenas al tumor, pueden tener valores de proteína dispares, pero mantener un cociente entre el tejido sano y tumoral, similar.

En la FIGURA 38 se muestran los resultados obtenidos para todos los péptidos analizados.

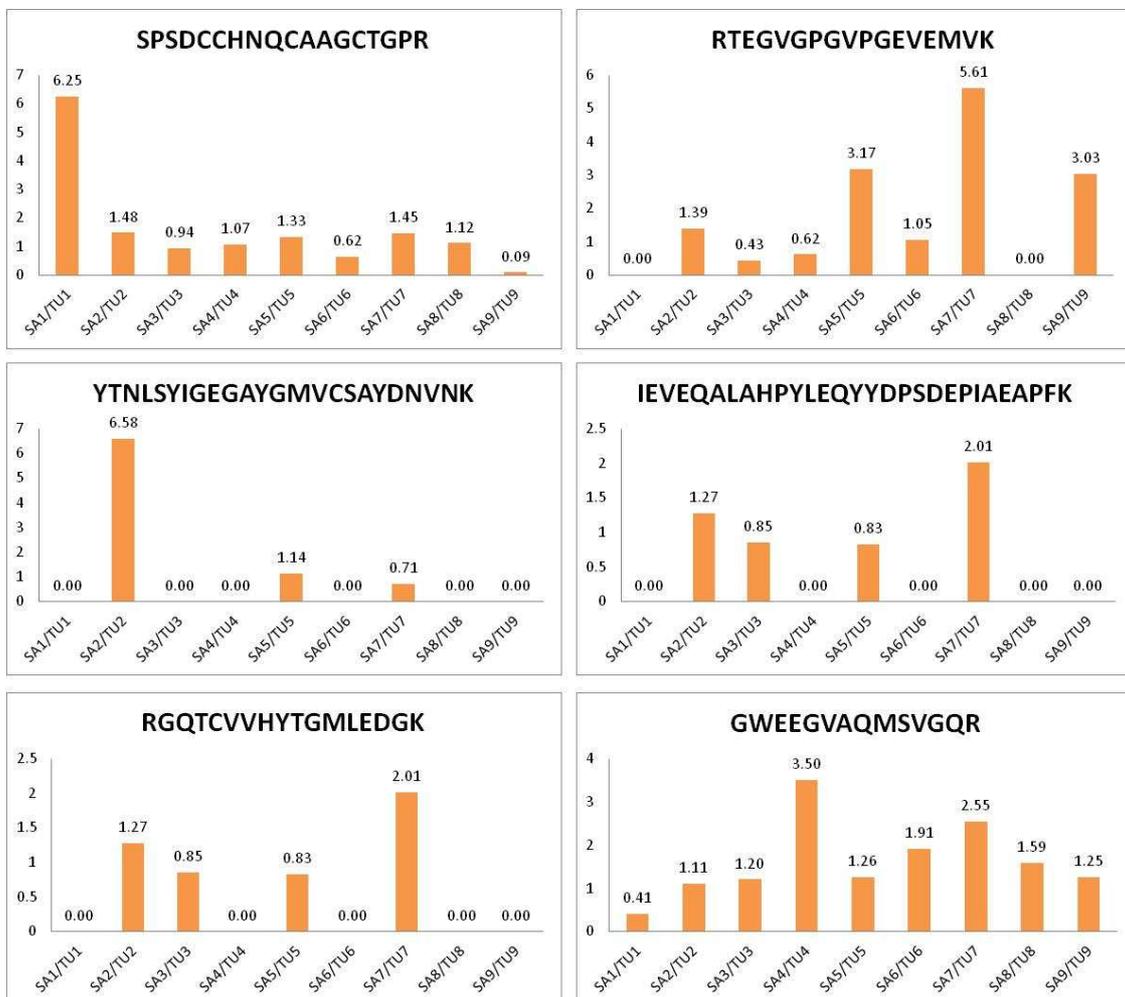


FIGURA 38. En los gráficos anteriores se muestra el valor de los cocientes sano/tumor de los péptidos analizados para cada paciente. En el caso en que el péptido no haya sido detectado el valor es 0.00.

Con los resultados obtenidos se intentaron agrupar los pacientes en base a diferentes datos clínicos (estadío del tumor, quimioterapia previa...) pero no encontramos ningún patrón de expresión proteica que pudiera agrupar los pacientes en base a criterios clínicos. Además, 9 casos y con significativa diferencia clínica entre ellos es un número muy escaso de casos para este tipo de abordaje.

En esta primera fase del estudio de proteómica dirigida hemos tenido problemas técnicos que nos han impedido obtener datos relevantes que permitan realizar una interpretación con unas mínimas garantías de fiabilidad.

Por lo tanto, en este punto se decidió cambiar la aproximación técnica de cuantificación de los péptidos y ampliar el número de pacientes de 9 a 19, si bien en uno de los casos se analizaron 3 tumores del mismo paciente por lo que el número de muestras analizadas han sido 21.

➤ **PROTEOMICA DIRIGIDA: FASE 2**

La proteómica ha sido cada vez más valiosa para examinar los cambios en tiempo real en la expresión de proteínas de diversos tejidos o fluidos corporales de pacientes con diversas enfermedades, especialmente el cáncer, lo que permite la identificación de biomarcadores clínicamente útiles para el diagnóstico, el pronóstico y la estadificación de la enfermedad.

HIPOTESIS

La desregulación de los componentes dependientes de la vía de señalización EGFR-RAS-MAPK, son un requisito esencial para la tumorigénesis del cáncer gástrico. La cuantificación de estos componentes proteicos y peptídicos podría ayudar a seleccionar mejor a los pacientes para una terapia personalizada.

Nuestro objetivo ha sido, desarrollar por metodología proteómica dirigida, la cuantificación de secuencias peptídicas de las proteínas implicadas en diferentes vías de señalización celular, que participan en la carcinogénesis gástrica.

SELECCIÓN DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS

A la hora de seleccionar las proteínas y péptidos a monitorizar en este estudio se han seguido dos criterios:

- Proteínas con probada participación en procesos de cancerígenos en general y/o dianas terapéuticas.

- Péptidos que identifiquen específicamente a las proteínas seleccionadas y que hayan sido detectados por espectrometría de masas en el Servicio de Proteómica de la UPV/EHU, en experimentos de identificación masiva.

Teniendo en cuenta los problemas surgidos con las muestras analizadas en la Fase 1, se decidió modificar la aproximación experimental y utilizar péptidos marcados isotópicamente para llevar a cabo la cuantificación de los péptidos y proteínas

seleccionadas. La utilización de péptidos marcados o péptidos pesados ofrece una serie de ventajas frente a la utilización de un péptido no marcado para la normalización:

- Los péptidos pesados tienen la misma secuencia aminoacídica que los péptidos endógenos que queremos monitorizar por lo que tienen el mismo comportamiento físico-químico durante el análisis.

- Permiten una puesta a punto del método de análisis mucho más fiable porque se pueden realizar análisis previos con mezclas de los péptidos pesados únicamente.

- Ofrecen una mayor fiabilidad a la hora de identificar y cuantificar los péptidos nativos ya que éstos tienen que compartir el mismo tiempo de elución y mismo patrón de fragmentación que los péptidos pesados.

Además, se amplió el número de casos de 9 a 21, aunque 3 tumores eran de un mismo paciente.

Se monitorizaron 6 péptidos correspondientes a 5 proteínas aunque el péptido EEWTTAIQTVADGLK solamente se cuantificó en los casos 10 a 21. Los péptidos monitorizados han sido los siguientes. TABLA XXXIV.

Proteína	Péptido	Carga	m/z
EGFR_HUMAN	IPLLENLQIIR	2	604.87171
EGFR_HUMAN	SPSDCCHNQCAAGCTGPR	3	678.92596
MK01_HUMAN	VADPDHDHTGFLTEYVATR	3	715.33963
MK03_HUMAN	RTEGVGPGVPGEVEMVK	3	580.96982
FKB1A_HUMAN	GWEEGVAQMSVGQR	2	767.35936
AKT1_HUMAN	EEWTTAIQTVADGLK	2	831.42268

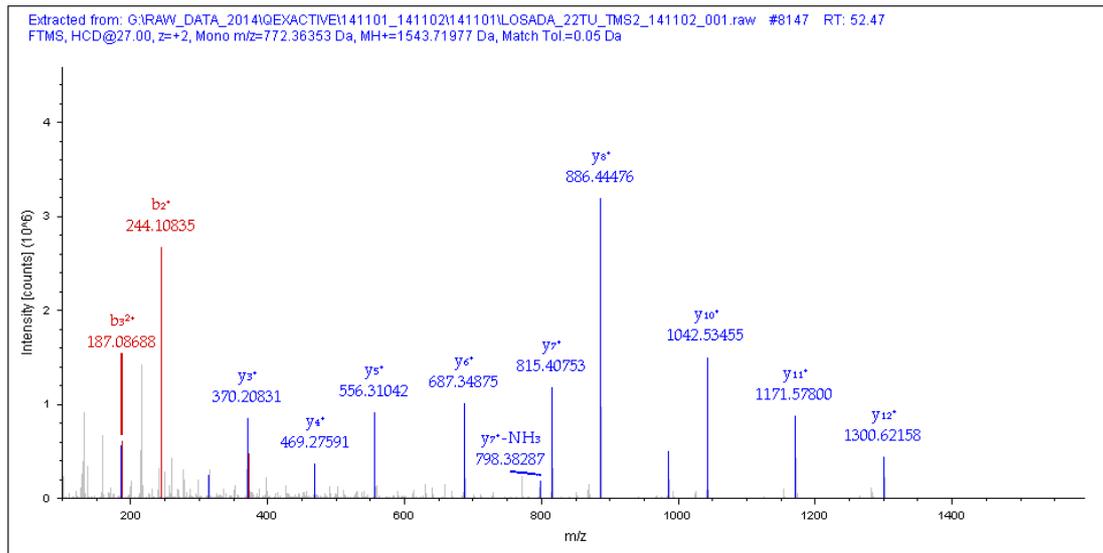
TABLA XXXIV. Lista de péptidos monitorizados con su correspondiente carga y m/z indicándose la proteína a la que pertenecen.

Una vez realizado el análisis se llevaron a cabo dos comprobaciones antes de pasar a cuantificar los péptidos endógenos.

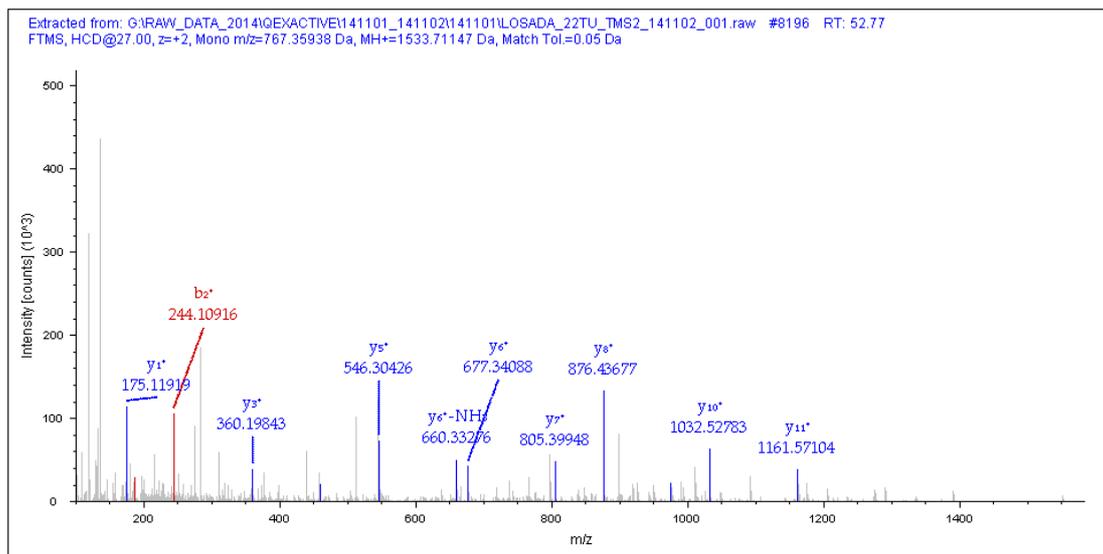
En primer lugar se identificaron al menos los péptidos pesados, se comprobó su espectro de fragmentación y en los casos en los cuales se detectó el péptido endógeno se compararon los tiempos de retención y los espectros de fragmentación de la pareja de péptidos.

En la FIGURA 39 (A-B-C) se muestra el espectro de fragmentación del péptido GWEEGVAQMSVGQR en su forma pesada (A) y en su forma nativa (B). También se muestra el error de la masa experimental frente a la teórica (en ppm) para cada uno de los fragmentos identificados (C). Además el tiempo de retención (RT) para ambos péptidos es muy similar, 52.47 minutos y 52.77 minutos. Todos estos datos confirman la presencia del péptido nativo en la muestra.

A



B



C

Seq.	y ⁺	#2	Seq.	y ⁺	#2
G		14	G		14
W		13	W		13
E	-1.97	12	E	-3.28	12
E	-1.35	11	E	-2.49	11
G	-0.70	10	G	-2.21	10
V	-1.10	9	V	-0.70	9
A	-0.94	8	A	-1.27	8
Q	-0.88	7	Q	-1.17	7
M	-0.76	6	M	-1.36	6
S	-4.83	5	S	-8.78	5
V	-0.45	4	V	-8.36	4
G	-2.78	3	G	+6.20	3
Q	-1.98	2	Q	-4.15	2
R-Label13...	-3.37	1	R	+3.72	1

FIGURA 39 (A-B-C). A-B: Espectros de fragmentación del péptido GWEEGVAQMSVGQR pesado y nativo respectivamente. C: Error en la masa (ppm) de los fragmentos identificados, péptido pesado izquierda y péptido nativo derecha.

La confirmación de la presencia del péptido nativo no es tan clara en todos los casos pero para proceder a la cuantificación del péptido nativo se ha requerido el cumplimiento de los siguientes requisitos:

- El tiempo de retención del punto más alto del área cromatográfica de los péptidos pesado y nativo no podía diferenciarse en más de 0.1 min.
- El error en la masa de los fragmentos del péptido nativo no podía ser superior a 10 ppm. Fragmentos con errores superiores a 10 ppm eran descartados.
- Hay que detectar al menos 3 fragmentos del péptido nativo.
- El patrón de intensidad de los fragmentos del péptido pesado y nativo deben ser muy similares.

Para realizar la cuantificación de los péptidos nativos se ha seguido el siguiente procedimiento. En primer lugar se ha cuantificado la cantidad de péptido pesado en cada muestra, que tiene que ser igual ya que se ha añadido la misma cantidad en todas las muestras. Posteriormente se ha calculado un factor de corrección para normalizar las variaciones técnicas del proceso de análisis y, por último, se ha aplicado ese factor de corrección a la cuantificación del péptido nativo.

En la FIGURA 40 se muestra la cuantificación del péptido pesado SPSDCCHNQCAAGCTGPR en las 18 muestras 9SA/9TU de los 9 pacientes correspondientes a la Fase 1 del experimento y del péptido RTEGVGPGVPGEVEMVK en las 22 muestras 10SA/12TU de los 10 pacientes restantes correspondientes a la Fase 2 del experimento. Como se puede comprobar en estos casos los valores obtenidos son bastante homogéneos. Aunque en algunos péptidos pesados las cuantificaciones hayan tenido una variabilidad mayor los resultados obtenidos nos han permitido realizar una normalización mucho más fiable que en el caso de las muestras de la Fase 1.

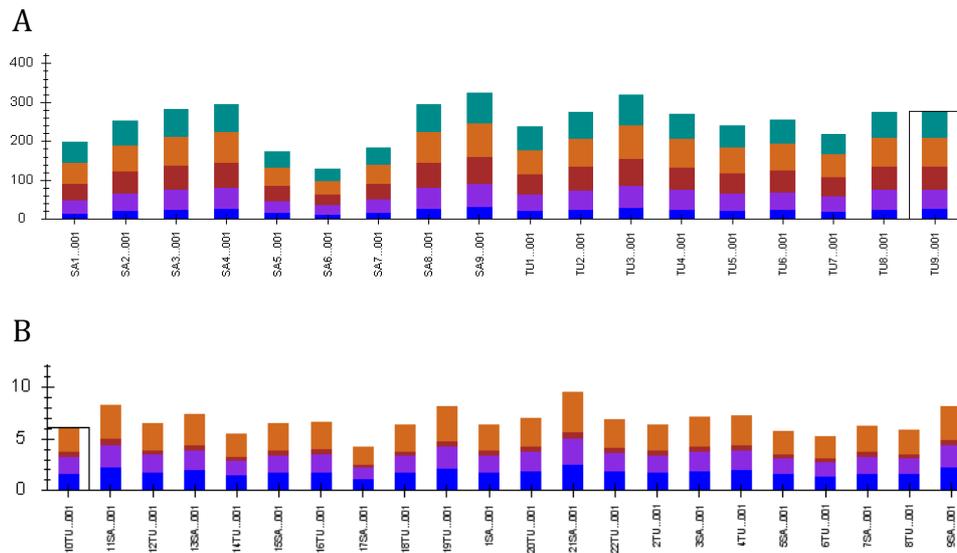


FIGURA 40 (A-B). Cuantificación de los péptidos pesados SPSDCCHNQAAGCTGPR (A) Fase I y RTEGVGPGVPGEVEMVK (B) Fase II. Cada color indica la cuantificación de un fragmento del péptido.

Una vez obtenida la cuantificación de todos los péptidos pesados se procedió a cuantificar los péptidos nativos siguiendo los criterios anteriormente expuestos y una vez normalizados los resultados se muestran en las siguientes tablas. TABLA XXXV.

MUESTRAS	SPSDCCHNQCAAGCTGPR	IPLNQLIIR	RTEGVGPGVPGEVEMVK	VADPDHDHTGFLTEYVATR	GWEEGVAQMSVGQR
SA-PACIENTE1	1318085.588	2199650.72	1347351.467	2930065.216	56120782.72
SA-PACIENTE2	1293187.841	2640412.585	1289661.138	4640364.592	63677479.41
SA-PACIENTE3	934977.9953	#N/A	574762.5386	2515892.159	37884921.63
SA-PACIENTE4	1398683.21	2705376.539	2399899.634	2144636.753	73231381.43
SA-PACIENTE5	1265056.97	2876059.531	2805439.577	2139328.578	98242053.15
SA-PACIENTE6	1488934.782	3320225.919	4606545.144	1728072.63	98888271.2
SA-PACIENTE7	1796399.087	3771691.269	2943022.939	4827238.542	98979477.08
SA-PACIENTE8	747607.393	1413719.682	201815.0036	2510172.529	40698775.54
SA-PACIENTE9	567744	993828	918333	2164833.698	42152880
SA-PACIENTE10	4304374.972	13820204.11	15733046.03	10457233.16	1924869.083
SA-PACIENTE11	2511021.981	5328674.095	34946258.07	6258925.91	3921919.979
SA-PACIENTE12	2896138.768	7817728.844	22440183.3	2452744.348	1692238.603
SA-PACIENTE13	2741262.735	6201941.87	26335684.21	12320922.12	5168707.712
SA-PACIENTE14	1848774.748	3388318.497	10720486.29	#N/A	578243.5095
SA-PACIENTE15	2529764.039	4282067.514	17231610	1511295.535	1941387.489
SA-PACIENTE16	3573963.522	11178595.58	23182854.44	#N/A	#N/A
SA-PACIENTE17	2734712.704	6780508.869	10343086.28	4745347.327	1030519.996
SA-PACIENTE18-19-20*	3108830.081	9179837.536	12978341.76	6301773.374	1207236.924
SA-PACIENTE21	2219177.222	5494554	7566890.449	#N/A	1172002
TU-PACIENTE1	495735.4666	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
TU-PACIENTE2	1442702.405	3715523.365	573408.354	2859461.582	83291956.36
TU-PACIENTE3	850501.4486	1765734.079	1195177.111	1455684.755	46221747.87
TU-PACIENTE4	622814.5031	#N/A	1466141.957	#N/A	60914689.6
TU-PACIENTE5	1087940.563	2095061.018	814993.1869	4900426	41482954.88
TU-PACIENTE6	950982.1242	#N/A	2823358.274	#N/A	71146716.44
TU-PACIENTE7	630061.2581	1275848.084	380139.2898	4333077.327	40604569.53
TU-PACIENTE8	919308.9342	#N/A	#N/A	#N/A	36084728.91
TU-PACIENTE9	346866.8557	722046.9817	335507.4043	2756692.761	34552725.2
TU-PACIENTE10	3735788.365	11744971.27	24482090.36	14205980.98	4249315.951
TU-PACIENTE11	2963309.365	8420784.405	20457613.75	7817050.102	4502254.446
TU-PACIENTE12	2916210.501	8606059.612	21801755.21	7740713.54	2552685.045
TU-PACIENTE13	2019670.489	3840388.433	20268869.35	21499521.14	3951313.946
TU-PACIENTE14	876007.4083	914638.9173	8360028.852	#N/A	#N/A
TU-PACIENTE15	2599774.881	6072252.761	24083785.59	4394028.359	1685868.908
TU-PACIENTE16	1539719.52	5769821.976	6757626.665	#N/A	5604446.73
TU-PACIENTE17	4346399.646	13787066.95	8528942.788	#N/A	1925660.72
TU-PACIENTE18*	3096735.479	12304019.22	27394113.56	9485742.731	3541171.108
TU-PACIENTE19*	720551.3614	2159539.047	2441100.435	1849734.759	1660508.435
TU-PACIENTE20*	3183088	11836957.54	12061194.32	5544103.696	5675681.035
TU-PACIENTE21	5294883.286	15778410.81	16266494.27	11795080	4588827.654

#N/A CUANTIFICACIÓN NO DETECTABLE. LAS MUESTRAS SA1/TU1 CORRESPONDEN AL PACIENTE 1 Y ASÍ SUCESIVAMENTE. LAS MUESTRAS SA18-19-20*-TU18*-TU19*-TU20* DEL ESTUDIO CORRESPONDEN AL MISMO PACIENTE CON 3 TUMORES DIFERENTES (EN ESTE CASO SE HA UTILIZADO LA CUANTIFICACIÓN DE UN ÚNICO TEJIDO SANO).

TABLA XXXV. Valores de cuantificación una vez normalizados de los péptidos indicados en cada una de las muestras analizadas.

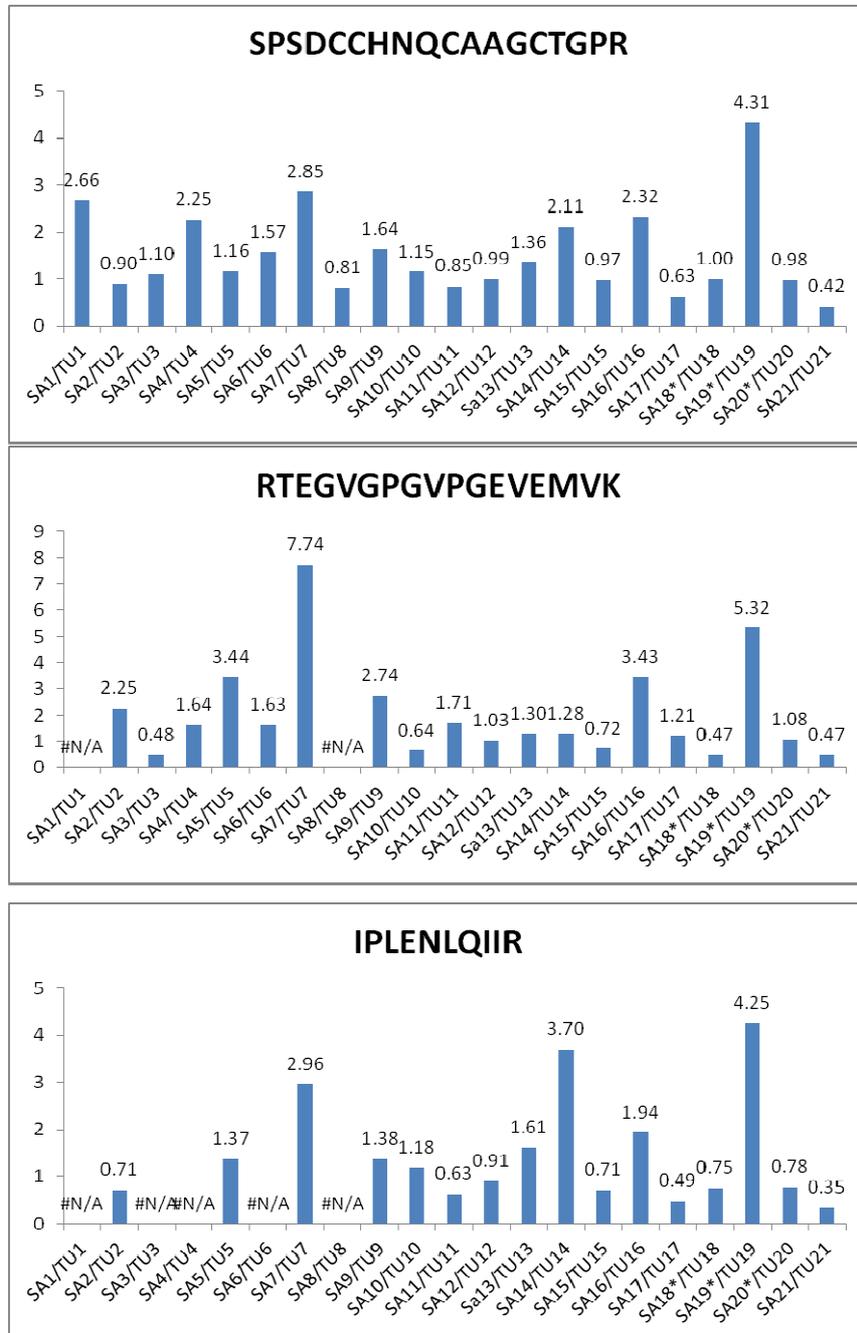
Con los valores de cuantificación de los péptidos nativos se procedió a calcular los cocientes sano/tumor (SA/TU) para cada paciente al igual que se hizo para las muestras de la Fase 1. TABLA XXXVI.

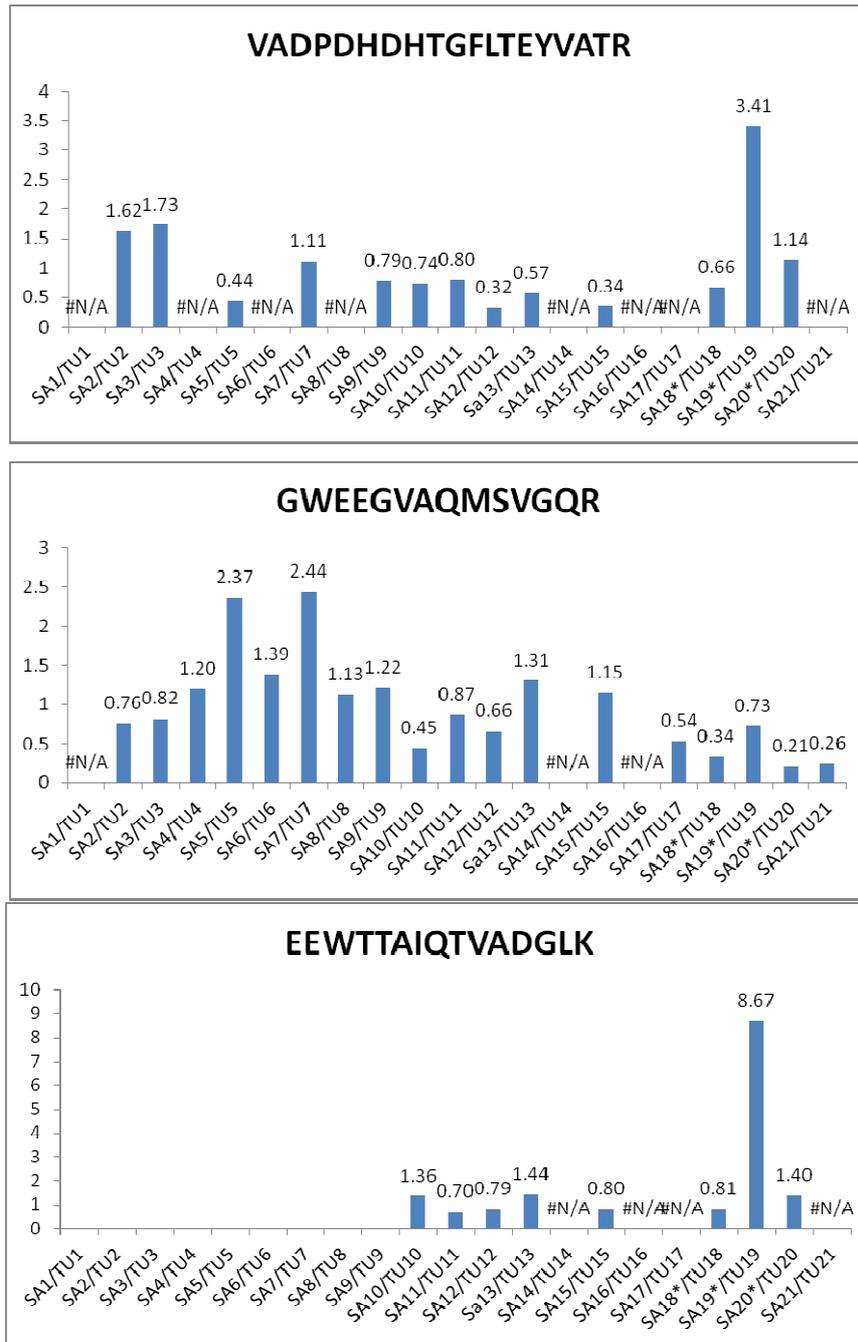
MUESTRAS	SPSDCCHNQAAGCTGPR	IPLNLQHIR	RTEGVGPGVPGEVEMVK	VADPDHDHTGFLTEYVATR	GWEEGVAQMSVGQR	EEWTTAIQTVADGLK
SA1/TU1	2.658848673	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	(-)
SA2/TU2	0.896364931	0.710643515	2.249114664	1.622810609	0.76450935	(-)
SA3/TU3	1.099325576	#N/A	0.480901561	1.728322118	0.81963412	(-)
SA4/TU4	2.24574605	#N/A	1.63688081	#N/A	1.202195758	(-)
SA5/TU5	1.162799709	1.372780796	3.442285925	0.436559715	2.368251091	(-)
SA6/TU6	1.565681146	#N/A	1.631583631	#N/A	1.389920381	(-)
SA7/TU7	2.85114989	2.956222859	7.741959376	1.114043941	2.437643798	(-)
SA8/TU8	0.813227594	#N/A	#N/A	#N/A	1.127867017	(-)
SA9/TU9	1.63677789	1.37640351	2.737146746	0.785301042	1.219958187	(-)
SA10/TU10	1.152199898	1.17669118	0.642634914	0.736114822	0.452983281	1.361988452
SA11/TU11	0.847370852	0.632800205	1.708227484	0.800676192	0.871101362	0.696171571
SA12/TU12	0.993117186	0.908398175	1.029283335	0.316862824	0.662924949	0.789927218
SA13/TU13	1.357282166	1.614925672	1.299316886	0.573078909	1.308098466	1.435585564
SA14/TU14	2.110455608	3.704542233	1.282350394	#N/A	#N/A	#N/A
SA15/TU15	0.973070422	0.70518598	0.715485941	0.343943054	1.151564917	0.802478881
SA16/TU16	2.32117829	1.937424695	3.430620778	#N/A	#N/A	#N/A
SA17/TU17	0.629190348	0.491802128	1.21270438	#N/A	0.535151382	#N/A
SA18*/TU18	1.003905597	0.74608446	0.473763889	0.664341586	0.340914598	0.811358821
SA19*/TU19	4.314515588	4.250831931	5.316594753	3.406852438	0.72702848	8.673749038
SA20*/TU20	0.976671107	0.775523398	1.076041179	1.136662249	0.212703448	1.396776319
SA21/TU21	0.419117307	0.348232408	0.465182622	#N/A	0.25540336	#N/A

#N/A CUANTIFICACIÓN NO DETECTABLE. (-) CUANTIFICACIÓN NO REALIZADA. LAS MUESTRAS SA1/TU1 CORRESPONDEN AL PACIENTE1 Y ASÍ SUCESIVAMENTE. LAS MUESTRAS SA18*, SA19* Y SA20* SON UNA ÚNICA MUESTRA SANA DE UN ÚNICO PACIENTE CORRELACIONADAS CON CADA UNA DE LAS MUESTRAS TUMORALES DE LOS 3 TUMORES DE DICHO PACIENTE (TU18*-TU19*-TU20*).

TABLA XXXVI. Valores de los cocientes sano/tumor de los péptidos nativos para cada paciente.

Los mismos datos de la TABLA XXXVI se presentan en forma de gráfico en la FIGURA 41. En los casos en los que el cociente SA/TU>1 indica una cantidad de péptido aumentada en el tejido sano respecto al tumoral. Por el contrario, un cociente SA/TU<1 indica un aumento del péptido en el tejido tumoral mientras que un cociente SA/TU≈1 indica que no hay cambio en la cantidad del péptido entre el tejido sano y el tejido tumoral.





#N/A CUANTIFICACIÓN NO DETECTABLE. SIN VALOR NI #N/A: CUANTIFICACIÓN NO REALIZADA. LAS MUESTRAS SA1/TU1 CORRESPONDEN AL PACIENTE1 Y ASÍ SUCESIVAMENTE. LAS MUESTRAS SA18*, SA19* Y SA20* SON UNA ÚNICA MUESTRA SANA DE UN ÚNICO PACIENTE CORRELACIONADAS CON CADA UNA DE LAS MUESTRAS TUMORALES DE LOS 3 TUMORES DE DICHO PACIENTE (TU18*-TU19*-TU20*).

FIGURA 41. Representación gráfica de los cocientes sano/tumor de los valores de cuantificación de los péptidos monitorizados. Se muestran los valores de los cocientes sano/tumor de los péptidos nativos para cada paciente.

I. DATOS DE CUANTIFICACIÓN DE LOS DIFERENTES PÉPTIDOS DE LAS PROTEÍNAS ANALIZADAS EN EL TEJIDO SANO Y TUMORAL DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Relación de proteínas y péptidos seleccionados para su cuantificación

- EGFR “SPSDCCHQCAAGCTGPR” (pep1) y “IPLNLQIIR” (pep2)
- MK01, secuencia peptídica “VADPDHDHTGFLTEYVATR”
- MK03, secuencia peptídica “RTEGVGPGVPGEVEMVK”
- FKBP1A, secuencia peptídica “GWEEGVAQMSVGQR”
- AKT1, secuencia peptídica “EEWTTAIQTVADGLK”

Los resultados de los cocientes de cuantificación (Ccs)* de los péptidos seleccionados son mostrados en las tablas XXXVII-XXXVIII-XXXIX-XL descritas a continuación:

(Ccs)*: el concepto de cociente de cuantificación es desarrollado en el apartado de análisis de datos.

PACIENTE	EGFR		
	Ratio SA/TU (SPSDCCHNQAAGCTGPR)	Ratio SA/TU (IPLNLQIIR)	Ratio SA/TU (SPSDCCHNQAAGCTGPR) +(IPLNLQIIR)/2
1	2.658848673	#N/A	2.658848673
2	0.896364836	0.710643515	0.8035041755
3	1.099325576	#N/A	1.099325576
4	2.24574605	#N/A	2.24574605
5	1.162799709	1.372780796	1.2677902525
6	1.565680973	#N/A	1.565680973
7	2.85114989	2.956223341	2.9036866155
8	0.813227674	#N/A	0.813227674
9	1.636778035	1.37640351	1.5065907725
10	1.152199999	1.17669118	1.1644455895
11	0.847370921	0.632800276	0.7400855985
12	0.993117186	0.908398175	0.9507576805
13	1.357282287	1.614925672	1.4861039795
14	2.110456025	3.704542233	2.907499129
15	0.973070319	0.70518598	0.8391281495
16	2.321177823	1.937424695	2.129301259
17	0.629190235	0.491802128	0.5604961815
18(*)	1.003905516	0.74608446	0.874994988
19(*)	4.314515965	4.250831931	4.282673948
20(*)	0.976671107	0.775523319	0.876097213
21	0.419117308	0.348232408	0.383674858

#N/A: NO DETECTABLE. (*) CATALOGADA COMO N°18, 19 Y 20, SE REFIERE A UNA PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS.

TABLA XXXVII. Cocientes de cuantificación de los péptidos (pep1: SPSCCHNQAAGCTGPR y pep2: IPLNLQIIR) de la proteína P00533 EGFR en el tejido sano y tumoral, en pacientes con cáncer gástrico humano.

	MK01	MK03
PACIENTE	Ratio SA/TU (VADPDHDHTGFLTEYVATR)	Ratio SA/TU (RTEGVGPGVPGEVEMVK)
1	#N/A	#N/A
2	1.622811	2.249114664
3	1.728322	0.480901561
4	#N/A	1.63688081
5	0.43656	3.442286238
6	#N/A	1.631583766
7	1.114044	7.74196085
8	#N/A	#N/A
9	0.785301	2.737146746
10	0.7361152	0.64263485
11	0.80067619	1.70822673
12	0.3168628	1.02928301
13	0.57307891	1.29931689
14	#N/A	1.28235039
15	0.34394305	0.71548591
16	#N/A	3.43062107
17	#N/A	1.2127045
18(*)	0.66434143	0.47376392
19(*)	3.40685094	5.31659514
20(*)	1.13666179	1.07604135
21	#N/A	0.46518247

#N/A: NO DETECTABLE. (*) CATALOGADA COMO N°18, 19 Y 20, SE REFIERE A UNA PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS.

TABLA XXXVIII. Cocientes de cuantificación de la proteína MK01 (secuencia peptídica VADPDHDHTGFLTEYVATR) y MK03 (secuencia peptídica RTEGVGPGVPGEVEMVK) en el tejido sano y tumoral, en pacientes con cáncer gástrico humano.

	FKBP1A
PACIENTE	Ratio SA/TU (GWEEGVAQMSVGQR)
1	#N/A
2	0.764509419
3	0.81963417
4	1.202195858
5	2.368250377
6	1.389920381
7	2.43764415
8	1.127867017
9	1.21995803
10	0.45298324
11	0.87110136
12	0.66292484
13	1.30809847
14	#N/A
15	1.15156472
16	#N/A
17	0.53515148
18(*)	0.3409146
19(*)	0.72702843
20(*)	0.21270345
21	0.25540336

#N/A: NO DETECTABLE. (*) CATALOGADA COMO N°18, 19 Y 20, SE REFIERE A UNA PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS.

TABLA XXXIX. Cocientes de cuantificación del péptido GWEEGVAQMSVGQR de la proteína P62942 FKBP1A_HUMAN (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1a), entre el tejido sano y tumoral, en el cáncer gástrico.

PACIENTE	AKT1
	Ratio SA/TU (EEWTTAIQTVADGLK)
1	(-)
2	(-)
3	(-)
4	(-)
5	(-)
6	(-)
7	(-)
8	(-)
9	(-)
10	1.36198845
11	0.69617151
12	0.78992722
13	1.43558556
14	#N/A
15	0.80247888
16	#N/A
17	#N/A
18(*)	0.81135882
19(*)	8.67375077
20(*)	1.39677632
21	#N/A

(-) CUANTIFICACIÓN NO REALIZADA. #N/A: NO DETECTABLE. (*) CATALOGADA COMO N°18, 19 Y 20, SE REFIERE A UNA PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS.

TABLA XL. Cocientes de cuantificación del péptido EEWTTAIQTVADGLK de la proteína AKT1, en el tejido sano y tumoral en pacientes con cáncer gástrico humano.

J. ANÁLISIS DE DATOS Y RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ANALIZADAS

RESUMEN

En este capítulo se analizan los datos de la cuantificación de las proteínas, obtenidos a partir del proceso experimental, descrito previamente (Metodología de cuantificación de los péptidos seleccionados mediante técnicas de cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem).

Los objetivos principales de este análisis son: (1) describir patrones de comportamiento de las diferentes proteínas; (2) establecer las relaciones funcionales, si las hubiere; (3) relacionar las correspondientes cuantificaciones y su variabilidad, como indicadores para la evolución del paciente.

Este proceso se ha basado en unas consideraciones previas como son, la clasificación molecular del cáncer gástrico y sus vías de señalización, los datos clínicos de los pacientes y la muestra de los datos y su tratamiento estadístico.

El capítulo se ha ordenado de la siguiente forma: en primer lugar, se resumen los datos disponibles y se describen las consideraciones e hipótesis en los que se fundamenta el análisis estadístico y funcional de los valores de la muestra. Después, se presentan las relaciones funcionales entre las cuantificaciones de los diferentes péptidos. Seguidamente se asocian las cuantificaciones de los péptidos, con la clasificación TNM y estadíos UICC, de los pacientes incluidos en el estudio^{70,71,72}.

CONSIDERACIONES PREVIAS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

La muestra de datos disponible está formada por los cocientes de cuantificación (Cc), para una cantidad equivalente* de péptido de las proteínas EGFR1, MK03, MK01, FKBP1A, AKT1, en el tejido gástrico sano, dividido por la cantidad equivalente de péptido en el tejido gástrico tumoral de 19 pacientes, con 21 tumores.

La cantidad equivalente, Cc, se refiere a las cuantificaciones proporcionadas por el método analítico de la cromatografía líquida y el espectrómetro de masas, que es un valor comparativo con una proteína patrón, para cada una de las proteínas analizadas, tal y como se ha descrito previamente. La relación de las proteínas y péptidos seleccionados y sus cocientes de cuantificación se recogen en las tablas mostradas a continuación

Relación de proteínas y péptidos seleccionados para su cuantificación

- EGFR1 “SPSDCCHQCAAGCTGPR” (pep1) y “IPLNQLQIR” (pep2)
- MK03, secuencia peptídica “RTEGVGPGVPGEVEMVK”
- MK01, secuencia peptídica “VADPDHDHTGFLTEYVATR”
- FKBP1A, secuencia peptídica “GWEEGVAQMSVGQR”
- AKT1, secuencia peptídica “EEWTTAIQTVADGLK”

Los resultados de los cocientes de cuantificación (Ccs)* de los péptidos seleccionados son mostrados en las tablas descritas a continuación: TABLAS XLI-XLII

(Ccs)*: el concepto de cociente de cuantificación es desarrollado en el apartado de análisis de datos.

Muestra	SPSDCCHNQCAAGCTGPR	IPLLENLQIIR	SPSDCCHNQCAAGCTGPR+ IPLLENLQIIR/2
SA1/TU1	2.658848673	#N/A	2.658848673
SA2/TU2	0.896364931	0.710643515	0.8035041755
SA3/TU3	1.099325576	#N/A	1.099325576
SA4/TU4	2.24574605	#N/A	2.24574605
SA5/TU5	1.162799709	1.372780796	1.2677902525
SA6/TU6	1.565681146	#N/A	1.565681146
SA7/TU7	2.85114989	2.956222859	2.9036866155
SA8/TU8	0.813227594	#N/A	0.813227594
SA9/TU9	1.63677789	1.37640351	1.5065907725
SA10/TU10	1.152199898	1.17669118	1.1644455895
SA11/TU11	0.847370852	0.632800205	0.7400855985
SA12/TU12	0.993117186	0.908398175	0.9507576805
SA13/TU13	1.357282166	1.614925672	1.4861039795
SA14/TU14	2.110455608	3.704542233	2.907499129
SA15/TU15	0.973070422	0.70518598	0.8391281495
SA16/TU16	2.32117829	1.937424695	2.129301259
SA17/TU17	0.629190348	0.491802128	0.5604961815
SA18*/TU18	1.003905597	0.74608446	0.874994988
SA19*/TU19	4.314515588	4.250831931	4.282673948
SA20*/TU20	0.976671107	0.775523398	0.876097213
SA21/TU21	0.419117307	0.348232408	0.383674858
Proteína	EGFR1	EGFR1	EGFR1 total

#N/A: NO DETECTABLE. (*) CATALOGADA COMO N°18, 19 Y 20, SE REFIERE A UNA PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS. LAS MUESTRAS SA1/TU1 CORRESPONDEN AL PACIENTE1 (TABLA XXXVII) Y ASÍ SUCESIVAMENTE. LAS MUESTRAS SA18*, SA19* Y SA20* SON UNA ÚNICA MUESTRA SANA DE UN ÚNICO PACIENTE CORRELACIONADAS CON CADA UNA DE LAS MUESTRAS TUMORALES DE LOS 3 TUMORES DE DICHO PACIENTE (TU18*-TU19*-TU20*).

TABLA XLI. Valor medio de los cocientes de cuantificación de los péptidos (pep1: SPSDCCHNQCAAGCTGPR y pep2: IPLLENLQIIR) de la proteína P00533 EGFR en el tejido sano y tumoral, en pacientes con cáncer gástrico humano.

Muestra	SPSDCCHNQCAAGCTGPR	IPLNLQIIR	RTEGVGPGVPGEVEMVK	VADPDHDHTGFLTEYVATR	GWEEGVAQMSVGQR	EEWTTAIQTVADGLK
SA1/TU1	2.658848673	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	
SA2/TU2	0.896364931	0.710643515	2.249114664	1.622810609	0.76450935	
SA3/TU3	1.099325576	#N/A	0.480901561	1.728322118	0.81963412	
SA4/TU4	2.24574605	#N/A	1.63688081	#N/A	1.202195758	
SA5/TU5	1.162799709	1.372780796	3.442285925	0.436559715	2.368251091	
SA6/TU6	1.565681146	#N/A	1.631583631	#N/A	1.389920381	
SA7/TU7	2.85114989	2.956222859	7.741959376	1.114043941	2.437643798	
SA8/TU8	0.813227594	#N/A	#N/A	#N/A	1.127867017	
SA9/TU9	1.63677789	1.37640351	2.737146746	0.785301042	1.219958187	
SA10/TU10	1.152199898	1.17669118	0.642634914	0.736114822	0.452983281	1.361988452
SA11/TU11	0.847370852	0.632800205	1.708227484	0.800676192	0.871101362	0.696171571
SA12/TU12	0.993117186	0.908398175	1.029283335	0.316862824	0.662924949	0.789927218
SA13/TU13	1.357282166	1.614925672	1.299316886	0.573078909	1.308098466	1.435585564
SA14/TU14	2.110455608	3.704542233	1.282350394	#N/A	#N/A	#N/A
SA15/TU15	0.973070422	0.70518598	0.715485941	0.343943054	1.151564917	0.802478881
SA16/TU16	2.32117829	1.937424695	3.430620778	#N/A	#N/A	#N/A
SA17/TU17	0.629190348	0.491802128	1.21270438	#N/A	0.535151382	#N/A
SA18*/TU18	1.003905597	0.74608446	0.473763889	0.664341586	0.340914598	0.811358821
SA19*/TU19	4.314515588	4.250831931	5.316594753	3.406852438	0.72702848	8.673749038
SA20*/TU20	0.976671107	0.775523398	1.076041179	1.136662249	0.212703448	1.396776319
SA21/TU21	0.419117307	0.348232408	0.465182622	#N/A	0.25540336	#N/A
Proteína	EGFR1	EGFR1	MK03	MK01	FKBP1A	AKT1

#N/A: NO DETECTABLE. (*) CATALOGADA COMO N°18, 19 Y 20, SE REFIERE A UNA PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS. LAS MUESTRAS SA1/TU1 CORRESPONDEN AL PACIENTE1 (TABLA XXXVII) Y ASÍ SUCESIVAMENTE. LAS MUESTRAS SA18*, SA19* Y SA20* SON UNA ÚNICA MUESTRA SANA DE UN ÚNICO PACIENTE CORRELACIONADAS CON CADA UNA DE LAS MUESTRAS TUMORALES DE LOS 3 TUMORES DE DICHO PACIENTE (TU18*-TU19*-TU20*).

TABLA XLII. Cocientes de cuantificación de la proteína EGFR1 (secuencias peptídicas SPSPDCCHNQCAAGCTGPR, IPLNLQIIR), proteína MK03 (secuencia peptídica RTEGVGPGVPGEVEMVK), proteína MK01 (secuencia peptídica VADPDHDHTGFLTEYVATR), péptido GWEEGVAQMSVGQR de la proteína P62942 FKB1A_HUMAN (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A), péptido EEWTTAIQTVADGLK de la proteína AKT1, en el tejido sano y tumoral, en pacientes con cáncer gástrico humano.

Cuando el (Cc) de los peps. (péptidos) de la proteína EGFR1, MK01 y MK03, FKBP1A, AKT1, es mayor que 1, la cantidad experimental (calculada) del péptido correspondiente, es mayor en el tejido sano, que en el tumoral.

Si el Cc es menor que 1, la cantidad experimental (calculada) del péptido correspondiente es mayor en el tejido tumoral que en el sano. Si el cociente es igual, o aproximadamente, 1, la cantidad experimental de péptido en los tejidos sano y tumoral, son aproximadamente iguales.

En esta tesis, se trabaja con 19 casos de pacientes afectados de un adenocarcinoma gástrico, mostrando uno de ellos un tumor múltiple, con tres carcinomas gástricos en diferente localización.

La muestra de Ccs abarca los estadios tumorales de la enfermedad del IA al IV. Desde un punto de vista estadístico, el cociente de cuantificación Cc, se puede considerar como una variable aleatoria cuyo valor depende, entre otros, del "fenotipo de cáncer gástrico", de la proteína seleccionada, del paciente y sus antecedentes "clínicos y patológicos".

Se considera que la muestra está tomada de una población homogénea, ésto es, pacientes con cáncer gástrico. El método de toma y manejo de las muestras y el cálculo de los valores experimentales de los Cc, ha sido el mismo para todos los péptidos de las proteínas seleccionadas. Por ello, se puede admitir que la muestra, a pesar de su pequeño tamaño, es estadísticamente representativa de los pacientes con cáncer gástrico y que, de ella, se pueden obtener patrones de comportamiento en los diferentes estadios de la clasificación TNM.

Esta hipótesis de trabajo se corrobora por los resultados obtenidos en el estudio, que se identifican con el comportamiento de las proteínas descritas en la bibliografía y que son utilizadas para el tratamiento en la práctica clínica.

Este resultado, en los inicios de una línea de investigación, no está exento de incertidumbre. Las principales fuentes de incertidumbre son (1) del propio fenómeno estudiado, ésto es, la evolución tumoral en pacientes con cáncer gástrico, (2) de los datos obtenidos de un proceso complejo de extracción, manipulación y cuantificación de las proteínas (3) de la estadística, ya que la información de la que se ha dispuesto, es efectivamente pequeña e incompleta y (4) de los modelos de agrupación e interpretación de los cocientes de cuantificación "control/caso", que las diferentes proteínas ejercen sobre la célula y el desarrollo tumoral.

Con respecto a la fuente de incertidumbre (2), los errores que se pudieran producir en la cuantificación, se han acotado mediante la normalización de los valores experimentales, utilizando el péptido pesado de una proteína, con la misma secuencia peptídica, que la proteína objeto de análisis.

Los valores así obtenidos, se pueden considerar como "representativos" del comportamiento de la proteína en pacientes con cáncer gástrico, de localización antral. Esta manera de proceder ofrece garantías de la representatividad estadística de los valores de la muestra y de los resultados obtenidos a partir de ellos.

Sin embargo, el tamaño de la muestra y la falta de algunos datos durante el proceso, no aconseja realizar estudios sobre su varianza.

Apoyados en estas consideraciones, en esta tesis, se analizan en primer lugar, las relaciones entre los valores de los Cc de diferentes proteínas implicadas en la carcinogénesis del cáncer gástrico. En segundo lugar, se agrupan los valores de cuantificación de la muestra por estadíos, se calcula el valor medio de los datos disponibles para cada proteína y se analiza la dependencia funcional de estos valores medios, con el estadío del paciente.

Hemos estudiado la variabilidad de esta muestra agrupada por estadíos, mediante el método de las funciones empíricas ortogonales tal y como se describe en este capítulo.

ESTUDIO DE LAS RELACIONES ENTRE LOS VALORES DE LOS COCIENTES DE CUANTIFICACIÓN DE LAS DIFERENTES PROTEÍNAS

La muestra de datos disponible, está formada por los cocientes de cuantificación (Cc) de las proteínas EGFR1, MK01, MK03, FKBP1A, AKT1, en el tejido gástrico sano, dividido por la cantidad equivalente de péptido en el tejido gástrico tumoral. Los datos se obtuvieron experimentalmente en dos campañas diferentes. En la primera de ellas, se analizaron las muestras de nueve pacientes y se corresponden con la numeración correlativa del 1 al 9. En la segunda campaña, se amplió la muestra de datos con diez pacientes más, numerados del 10 al 21, en total, 19 pacientes con 21 datos tumorales, puesto que uno de los pacientes presentaba un tumor múltiple, con tres carcinomas gástricos en diferente localización (18, 19 y 20); estos datos aparecen en la tabla resultados con un (*).

El prefijo SA indica la cantidad observada y normalizada de tejido sano, mientras que el prefijo TU es indicativo de la cantidad observada y normalizada de tejido tumoral del paciente. El cociente de cuantificación de cada uno de los péptidos correspondiente a cada uno de los pacientes, se obtiene dividiendo ambas cantidades observadas.

Los valores de este cociente, se recogen en las tablas descritas en el apartado previo de datos de cuantificación de los diferentes péptidos de las proteínas analizadas en el tejido sano y tumoral de los pacientes incluidos en el estudio, en la TABLA XXXVII para los péptidos del EGFR1, TABLA XXXVIII para el péptido del MK01-MK03, TABLA XXXIX con los valores del péptido del FKBP1A y finalmente TABLA XL con los valores correspondientes al péptido AKT1. Este péptido sólo fue analizado en la segunda campaña experimental. Así mismo, en este capítulo se describe una tabla resumen con todos los resultados anteriormente descritos, correspondiente a la TABLA XLII.

En la primera campaña se analizó un segundo péptido del FKBP1A, pero, por razones de volumen de información, no pareció conveniente continuar con ese proceso experimental en la segunda campaña.

REVISIÓN Y VALIDACIÓN DE LOS DATOS

En primer lugar se procedió a revisar y validar los datos obtenidos experimentalmente, comprobando el orden de magnitud y chequeando los cocientes a partir de las cantidades SA y TU disponibles. Después se discutió el tratamiento de los datos #N/A proporcionados por el laboratorio. Siguiendo sus indicaciones se decidió quitar ese dato que, si bien significaba reducir aún más la muestra, no había ningún criterio para discriminar, si es que el péptido no se encontraba en la muestra, o si se encontraba en una cantidad inferior a la

de detección por el equipo experimental o si el experimento resultó fallido por causas no conocidas. Las tablas anteriores recogen los datos válidos para los diferentes péptidos de las proteínas seleccionadas y pacientes.

También, siguiendo las indicaciones del laboratorio, se procedió a adjudicar a la proteína EGFR1, el valor medio de los valores observados en las secuencias peptídicas EGFR1 (pep 1) y EGFR1 (pep 2). Si uno de los datos faltaba, se adoptó el único valor disponible, como valor representativo del EGFR1 para ese paciente.

Por otra parte, todos los valores de los Ccs reflejados en las tablas, toman valores menores y mayores que la unidad (umbral de dominio de la cantidad de tejido sano sobre el tumoral), varían en el intervalo [0.25, 7.50], pero la mayor parte de los datos, se encuentran en el intervalo [0.75, 3.50], es decir, tienen el mismo orden de magnitud y su variabilidad alrededor de su valor medio, es del orden de 2-3 veces el valor medio.

Se puede admitir, al menos como hipótesis de trabajo, que esta muestra de los valores de los cocientes de cuantificación de los péptidos, es una muestra representativa de las proteínas encontradas en los pacientes con "cáncer gástrico", independientemente del estadio de la enfermedad, según la clasificación UICC.

Ante el control que ejerce el EGFR1, a través de las vías tirosin kinasa (RTKs) y PI3K/AKT (fosfo inositol 3-kinasa), sobre la evolución de los restantes proteínas, excepto sobre el FKBP1A, la primera pregunta que se necesita abordar es, si los valores muestrales de las diferentes proteínas, tienen una relación funcional (lineal, potencial, etc.) con los valores muestrales correspondientes al péptido EGFR1.

1. RELACIONES FUNCIONALES DE LOS VALORES DE LOS COCIENTES DE CUANTIFICACIÓN DE LAS DIFERENTES PROTEÍNAS CON LOS DEL EGFR1.

En las figuras siguientes (FIGURA 42-43-44-45), se representan los valores de Ccs recogidos en las tablas anteriores; en el eje de abscisas se presenta el valor correspondiente al EGFR1, y en el eje de ordenadas se representan correlativamente los valores de los péptidos MK01 (FIGURA 42), MK03 (FIGURA 43), FKBP1A (FIGURA 44) Y AKT1 (FIGURA 45).

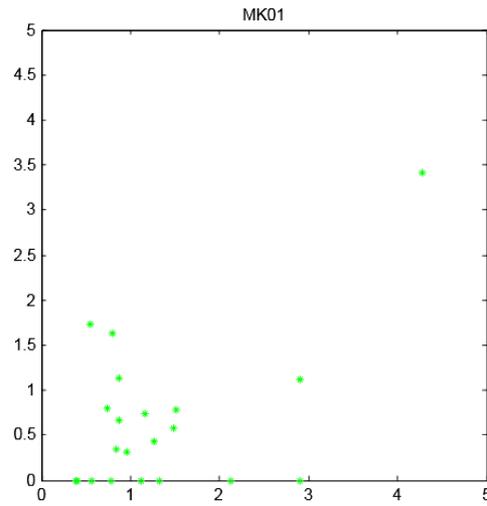


FIGURA 42. Valores de los péptidos MK01/EGFR1

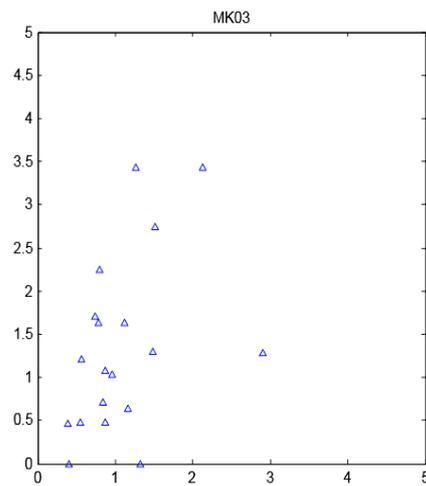


FIGURA 43. Valores de los péptidos MK03/EGFR1

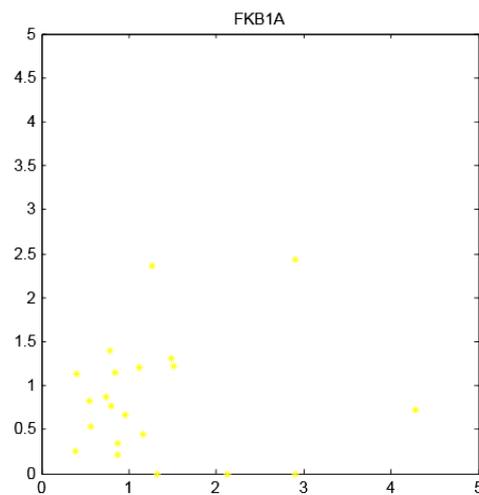


FIGURA 44. Valores de los péptidos FKB1A/EGFR1

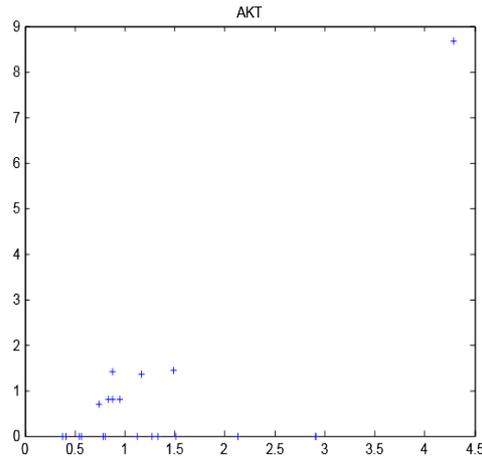


FIGURA 45. Valores de los péptidos AKT1/EGFR1

a) MK01 y EGFR1

Los datos en el eje de abscisas (EGFR1) están en el intervalo de valores [0.70-4.40], mientras que los valores del eje de ordenadas (MK01) están en el intervalo [0.25-3.50]. Excepto dos valores, correspondientes a los pacientes 7 (IIIC) y 19 (paciente con tres tumores, en este caso estadio IA), los datos se agrupan alrededor del punto (1,1), con dispersión vertical (MK01) mayor que la horizontal (EGFR). Tanto el ajuste lineal como el parabólico, pueden utilizarse para analizar la relación entre valores Ccs de ambos péptidos. No obstante, conviene resaltar, que ninguno de los dos ajustes es bueno. Los datos parecen indicar una independencia entre los valores de ambos péptidos, al menos entre los intervalos EGFR1 (0.5-1.5)-MK01 (0.25-1.75).

b) MK03 y EGFR1

De forma análoga al intervalo de MK01, los valores del péptido MK03 se extienden en el intervalo (0.40 -3.50), pero, a diferencia de aquellos, el ajuste lineal entre los valores de los Ccs es una buena representación de la relación entre ellos. Con carácter global cuando el valor del EGFR1 crece también lo hace el de MK03. La dispersión de los datos tanto en horizontal como en vertical es grande (es decir, seleccionando un valor del Cc de EGFR1 por ejemplo 1, los valores de MK03 pueden variar entre 0.5 y 2.3. Análogamente ocurre, si se toma un valor de MK03, por ejemplo 1.5, los valores de EGFR1 varían en el intervalo 0.5-2.3.

c) AKT1 y EGFR1

Si bien el número de datos disponibles es menor que para los otros péptidos, sólo se determinó la Cc del AKT en la segunda campaña, los datos indican que al crecer (decrecer) el valor de Cc del EGFR1 crece (decrece) el correspondiente de AKT.

d) FKBP1A y EGFR1

Cuando los valores de los correspondientes Ccs son más pequeños $EGFR < 1.5$ y $FKBP1A < 1.5$, la relación lineal representa bien el comportamiento experimental. Obsérvese que en ese rango de valores la rama de la curva parabólica es casi una recta, que define mejor la relación entre Ccs que la recta, en azul, mejor ajuste de todos los datos. Al contabilizar en la regresión lineal los cuatro valores más alejados, la pendiente de recta se reduce para

conseguir el error medio cuadrático mínimo. Los dos valores más altos del péptido FKBP1A pertenecen a pacientes (5 y 7) en el estadio IIIC.

En resumen, con carácter general, los valores de los datos experimentales de los cocientes de cuantificación de los péptidos seleccionados, tienen todos ellos el mismo orden de magnitud y siguen la pauta de los valores del EGFR1, crecen al crecer estos. Este comportamiento es más evidente en el AKT, MK03 y en el FKBP1A, en concreto para valores menores que 1.5. Los valores del MK01 no siguen este comportamiento, pero se mantienen acotados alrededor del punto (1.1).

Llegado a este punto, se continuó explorando otras relaciones entre los valores de los Ccs; así, por ejemplo, realizamos análisis de funciones no polinómicas y análisis de regresión múltiple, es decir exploramos, si los valores de un péptido, además del valor del EGFR1, dependen también del valor de otra u otras proteínas.

Una vez analizados los resultados pudimos observar, que no mejoraba sensiblemente los resultados anteriores.

Por ello, se decidió analizar los datos, en función de un parámetro (conducta) de homogeneización, es decir en términos del estadio tumoral de la enfermedad.

REGRESIÓN MÚLTIPLE

A la luz de los resultados anteriores y teniendo en cuenta el control que ejerce el EGFR1 sobre el proceso evolutivo del tumor, parece oportuno realizar un análisis de regresión múltiple de los datos. En este apartado se obtienen relaciones lineales entre los valores de Cc por ternas de péptidos, de tal forma que, conocidos los valores de dos de ellos, se puede determinar el valor del tercero con un error máximo.

El modelo lineal se escribe

$$Cc_0 = a_0 + a_1 * Cc_1 + a_2 * Cc_2$$

donde, Cc_0 es el valor del cociente de cuantificación de uno de los péptidos a determinar, en función de los valores de los cocientes de cuantificación de los otros dos Cc_1 y Cc_2 . Los coeficientes de la regresión son a_0 , a_1 , a_2 que se determina a partir de los datos de la muestra. El error máximo, E_{max} , se determina como el valor absoluto de la máxima diferencia entre los valores calculados por la regresión y el de la muestra.

Se han considerado dos casos: (1) la regresión entre los valores Cc del péptido MK01 con los valores Cc de los péptidos EGFR y MK03 y (2) la regresión de los valores de Cc de FKBP1A y los de los péptidos EGFR y AKT. En cada caso se ha uniformizado el número de datos de cada uno de los péptidos de la terna, descartando aquellos valores que fueran #N/A en alguna de ellas. FIGURA 46-47.

Caso(1): MK01, MK03 y EGFR.

En la FIGURA 46 se presenta el resultado de la regresión lineal por pares de valores [Cc_0 , Cc_1] y [Cc_0 , Cc_2]. En el eje de abscisas se representan los valores del Cc_0 del péptido MK01, obtenido mediante la regresión y los valores observados experimentalmente. En el eje de

ordenadas se presentan los correspondientes valores del Cc_1 en este caso el EGFR y Cc_2 valores del MK03. Los coeficientes del ajuste obtenidos son: $a_1 = -0.0374$; $a_2 = 0.3254$; $a_3 = 0.3761$,

$$[MK01] = -0.0374 + 0.3254*[EGFR] + 0.3761*[MK03]$$

El error máximo del valor calculado del cociente de cuantificación del péptido MK01 es $E_{\max} = 0.49$.

Se puede observar que los valores de los Cc del MK01 calculados y representados frente al EGFR (azul) o MK03 (verde), siguen el mismo patrón de comportamiento que los valores experimentales (rojo). Al decrecer, (crecer), los valores de las Cc s del EGFR y del MK03, también decrecen, (crecen), los valores del Cc del MK01. Conocidos los valores de dos péptidos, se puede obtener el del tercero.

Por otra parte, si se bloquea y quedan fijados los valores de una de las proteínas, mediante tratamiento farmacológico, los valores de los otros dos péptidos están determinados por una recta. Por ejemplo, si se bloquease la acción del EGFR y si, hipotéticamente, se lograra acotar su valor de Cc , por ejemplo en cero, entonces los valores de los dos péptidos MK01 y MK03 estarían vinculados,

$$[MK01] = -0.0374 + 0.3761*[MK03]$$

Si, como consecuencia del tratamiento anterior, se bloquease el MK03, bastaría llevar su valor de bloqueo a $Cc[MK03] = 0.10$ para que el $Cc[MK01] = 0$.

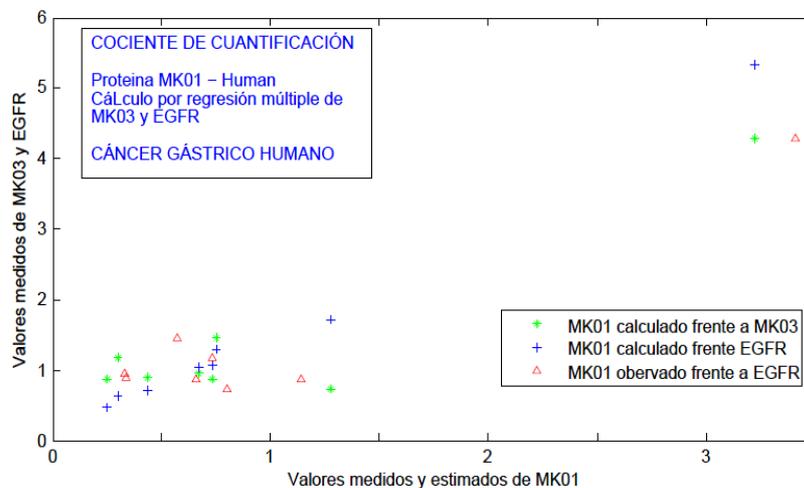


FIGURA 46. Caso(1): Terna MK01, MK03 y EGFR.

Caso (2): FKBP1A, EGFR y AKT

En la FIGURA 47 se presenta el resultado de la regresión lineal por pares de valores $[C_{c0}, Cc_1]$ y $[C_{c0}, Cc_2]$.

En el eje de abscisas se representan los valores del Cc_0 del péptido FKBP1A obtenido mediante la regresión y los valores observados experimentalmente. En el eje de ordenadas

se presentan los correspondientes valores del Cc_1 en este caso el EGFR y Cc_2 del AKT. Los coeficientes del ajuste obtenidos son: $a_1 = -0.1702$; $a_2 = 1.6238$; $a_3 = -0.7004$,

$$[FKBP1A] = -0.1702 + 1.6238 \cdot [EGFR] - 0.7004 \cdot [AKT]$$

El error máximo del valor calculado del cociente de cuantificación del péptido FKBP1A es $E_{\max} = 0.44$.

Los valores experimentales de la Cc del péptido FKBP1A, varían en el intervalo [0.2 1.35]. En el siguiente apartado se muestra que el crecimiento de su valor es lineal con el estadio tumoral del paciente.

Mientras que en la terna MK01, MK03 y EGFR los tres valores crecen, o decrecen, simultáneamente, al determinar un valor del Cc del FKBP1A, por superposición lineal de los Cc del EGFR y del AKT, se puede observar que éstos actúan de forma antagónica, uno (EGFR) suma, mientras que el otro (AKT) resta.

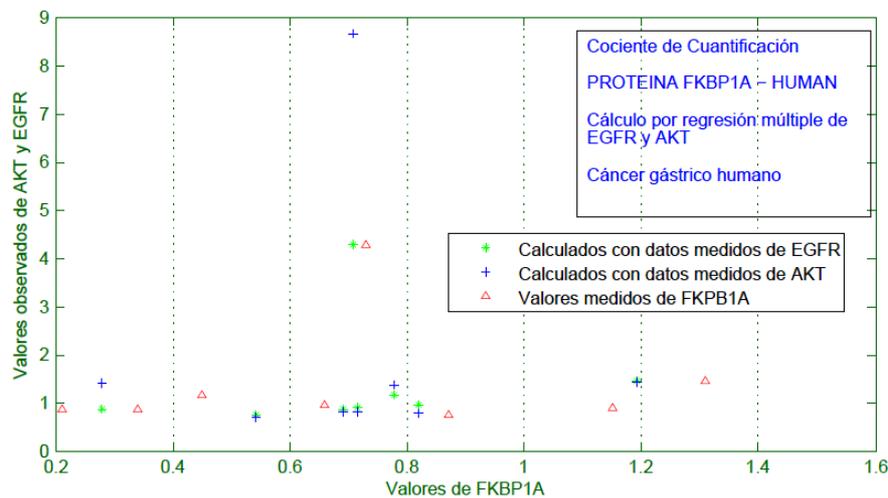


FIGURA 47. Caso(2): Terna FKBP1A, AKT y EGFR.

Este comportamiento, además de confirmar de forma cruzada los valores experimentales, permite también, apoyarse en él, para predecir la acción medicamentosa, sobre los valores de los cocientes de cuantificación de estas proteínas, en relación con el estadio tumoral del paciente.

Si se bloquea la acción del FKBP1A y se consigue mantener constante el valor del Cc , por ejemplo cero, entonces, las Cc s de los péptidos EGFR y AKT mantienen una relación lineal. De esta forma, alcanzado el bloqueo del cociente de cuantificación de la proteína EGFR, entonces el Cc del AKT, queda acotada.

Si el valor de bloqueo del EGFR desciende hasta un $Cc[EGFR] = 0.11$, entonces la Cc de la AKT se hace cero, véase la FIGURA 48.

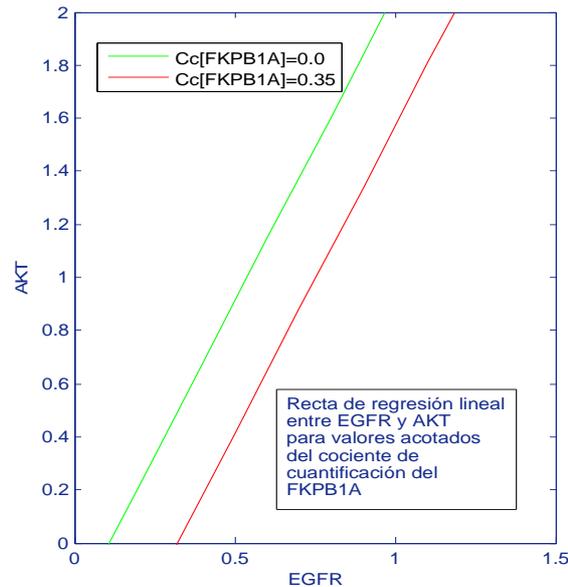


FIGURA 48. Recta regresión lineal EGFR-AKT para valores acotados del Cc del FKPB1A.

2. ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DEL COCIENTE DE CUANTIFICACIÓN EN FUNCIÓN DEL ESTADÍO TUMORAL DEL PACIENTE

Además, se pueden continuar explorando otras relaciones entre los valores de los Ccs, como, por ejemplo, funciones no polinómicas. Este camino es sencillo, pero una vez explorado no parece que vaya a mejorar la aplicación de los resultados anteriores.

El siguiente paso, una vez verificado que los valores de los Ccs de los diferentes péptidos mantienen relaciones lineales, sería unir los datos experimentales con los datos clínicos, relativos a los estadios tumorales del paciente. Es decir, homogeneizar los datos muestrales por subconjuntos, en función de un parámetro (conducta) de homogeneización, es decir en términos del estadio tumoral de cada paciente.

El procedimiento seguido para determinar del estadio tumoral de cada uno de los pacientes se explica en el apartado relativo a los datos epidemiológicos.

La tabla siguiente (TABLA XXX de RESULTADOS Y DISCUSIÓN) , recoge a todos los pacientes de la serie, identificados por su número, del 1 al 21, su clasificación TNM y el estadio anatómico-patológico de los tumores según UICC.

PACIENTE	TNM	ESTADÍO UICC
1	pT3N0M0 LVi- PN-	IIA
2	pT4aN2M0 LVi- PN+	IIIB
3	pT3N2M0 LVi+ PN+	IIIA
4	pT3N2M0 LVi+ PN+	IIIA
5	pT4aN3aM0 LVi+ PN+	IIIC
6	pT1bN0M0 LVi- PN-	IA
7	pT4aN3bM0 LVi+ PN+	IIIC
8	pT2N1M0 LVi+ PN-	IIA
9	pT3N0M0 LVi- PN-	IIA
10	pT3N1M0 LVi- PN+	IIB
11	pT3N0M1 LVi- PN-	IV
12	<u>γT3N0M0 LVi- PN-</u>	IIA
13	<u>γT3N2M0 LVi- PN-</u>	IIIA
14	<u>γT3N3aM0 LVi+ PN-</u>	IIIB
15	<u>γT3N0M0 LVi- PN-</u>	IIA
16	pT2N0M0 LVi- PN-	IB
17	pT2N2M0 LVi+ PN-	IIB
18(*)	pT4aN0M0 LVi+ PN+	IIB
19(*)	pT1N0M0 LVi PN-	IA
20(*)	pT1N0M0 LVi- PN-	IA
21	pT2N1M0 LVi- PN-	IIA

ESTADÍOS ANATOMO-PATOLÓGICOS DE LOS TUMORES DE LOS 19 PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO. (PACIENTES MARCADOS p-TNM) SE CORRESPONDEN CON ESTADÍO ANATOMO-PATOLÓGICO SIN TRATAMIENTO PREVIO. (PACIENTES MARCADOS EN NEGRITA/SUBRAYADO/γ-TNM) HAN RECIBIDO NEOADYUVANCIA. (*) CATALOGADA COMO Nª18, 19 Y 20, SE REFIERE A UNA PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS.

TABLA XXX. Clasificación TNM. Estadío UICC.

COMPORTAMIENTO DE LOS VALORES MEDIOS MUESTRALES DE LOS COCIENTES DE CUANTIFICACIÓN AGRUPADOS POR ESTADÍOS TUMORALES.

En la TABLA XLII, se recogen los valores medios muestrales por estadio tumoral para cada proteína. Se indica expresamente, identificado con el superíndice (1), cuando sólo se dispone de un único valor muestral. Siguiendo las recomendaciones del laboratorio, se trabaja con el valor medio de los Ccs de los péptidos EGFR1 (pep1) y EGFR1 (pep2).

UICC	EGFR	MK01	MK03	FKBP1A	AKT
I-A	2.47	2.77	2.67	0.77	-
I-B ⁽¹⁾	2.13	-	3.43	-	5.03
I-C	-	-	-	-	-
II-A	1.08	0.48	1.28	0.81	0.79
II-B	1.10	0.70	0.77	0.67	1.08
II-C	-	-	-	-	-
III-A	1.59	1.15	1.14	1.10	1.43
III-B	2.60	1.63	1.76	0.76	-
III-C	1.83	0.77	5.59	2.38	-
IV	0.79	0.80 ⁽¹⁾	1.71 ⁽¹⁾	0.87	0.69

TABLA XLIII. Valores medios de los cocientes de cuantificación en función de los estadios del paciente

En la FIGURA 49, se representan los valores de la tabla previa, en el eje de abscisas el estadio tumoral del paciente, en el eje de ordenadas el cociente de cuantificación de cada proteína, y una poligonal de mejor ajuste a los datos de cada uno de ellos. Todas las proteínas, excepto el FKBP1A, tienen el mismo comportamiento frente al estadio tumoral del paciente.

Se pueden identificar cuatro regiones de comportamiento del cociente de cuantificación de cada uno de los péptidos: decaimiento, valor mínimo, crecimiento y dominio tumoral.

(1) Región de decaimiento: estadios I-A/II-A

Los valores de los Ccs de cada proteína decrecen al incrementar el estadio de la enfermedad. Tal y como era esperable dada la relación lineal entre los Ccs de las proteínas, la tasa de decaimiento es similar. En todos ellos, la cantidad de proteínas de tejido sano es superior a la del tejido tumoral.

(2) Región de valores mínimos: estadios II-A/II-B

Los valores de los Ccs de cada proteína son los mínimos de la serie muestral y toman valores alrededor de la unidad. Cuando el valor está por debajo de la unidad, quiere decir que la muestra de esa proteína (en promedio) tiene más cantidad de proteína en el tejido tumoral que en el sano. El péptido AKT alcanza el mínimo en el estadio III-A, si bien, dado el escaso número de datos, este resultado debe tomarse con prudencia.

(3) Región de crecimiento: estadios II-C/III-C

Los valores de los Ccs vuelven a crecer a una tasa similar a los de la Región (1); los valores son mayores que la unidad, indicando que de nuevo, hay mayor cantidad de proteína en el tejido sano que en el tumoral. Aparentemente este crecimiento continúa hasta alcanzar el estadio III-B o C, donde tendría los valores máximos.

(4) Región de "dominio tumoral": estadios III-C/IV

Si bien los datos correspondientes al estadio IV son escasos y en dos proteínas sólo se dispone de un valor, parece que los Ccs decrecen bruscamente, hasta alcanzar valores alrededor de la unidad.

Este patrón de comportamiento de los valores medios de los Ccs, puede ser de aplicación en la práctica clínica; a medida que evoluciona en el tiempo el cáncer gástrico, podemos predecir, según el estadio tumoral en el que se encuentra la enfermedad, el Cc de cada proteína, para cada paciente y viceversa.

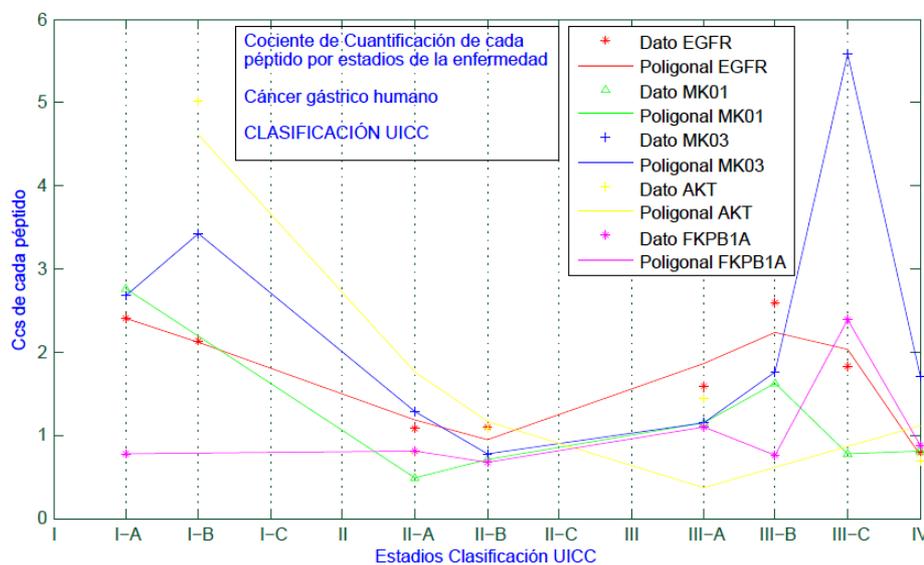


FIGURA 49. Valores medios de los cocientes de cuantificación en función de los estadios del paciente.

COMPORTAMIENTO DEL FKBP1A

Esta proteína tiene un comportamiento diferenciado en relación con las otras proteínas cuantificadas. Desde el estadio I-A hasta el III-C, modifica su valor ligeramente al alza, pero se mantiene por debajo de la unidad. Solamente al alcanzar el estadio III-C, aumenta ligeramente para luego caer bruscamente en el estadio IV.

El FKBP1A es la proteína con menor variación de los valores medios de los Ccs, en los diferentes estadios del paciente. Este comportamiento diferencial puede utilizarse como referencia y contraste frente al comportamiento de las restantes proteínas, bien aplicando la regresión lineal o el potencial que proporciona el análisis por componentes principales y que se analiza en el siguiente apartado.

En efecto, se ha visto que se pueden determinar los valores del péptido FKBP1A, en función de los Ccs del EGFR y AKT, que actúan de forma antagónica. Hasta el estadio II-B, los Ccs del EGFR y AKT decrecen, pero al combinarlos linealmente, se obtiene un Cc de FKBP1A que, entre los estadios II-B y III-B, crece ligeramente, al crecer el EGFR y seguir decreciendo el AKT. La evolución del valor de los Ccs del FKBP1A en los estadios III-C y IV, es similar al valor de los Ccs de las restantes proteínas.

ANÁLISIS MULTIVARIADO DE LOS COCIENTES DE CUANTIFICACIÓN

En el apartado anterior, se ha realizado una regresión múltiple para explicar la variación del valor del Cc de una de las proteínas, en función de los valores de los Ccs de otras dos proteínas de la muestra, sin tener en cuenta el estadio del paciente.

Todas las curvas de los valores de los Cc de las proteínas, transitan por las cuatro regiones descritas en el apartado anterior, excepto para la proteína FKBP1A, cuando se comparan con el estadio tumoral del paciente.

En vista de la similitud de la variación de los valores de los Ccs de las proteínas en función de los estadios tumorales del paciente, parece aconsejable realizar un análisis multivariado, tratando de encontrar las posibles relaciones entre los Ccs de todas las proteínas estudiadas de forma conjunta y agrupada, según el estadio tumoral de la enfermedad.

Se ha decidido realizar este análisis, aplicando el método de las componentes principales, aunque también habría sido posible aplicar otras técnicas de análisis similares. El objetivo de este tipo de análisis es explicar la estructura de la varianza-covarianza en una muestra de datos, utilizando combinaciones lineales de las variables originales. Con ello, se trata de reducir el número de datos con los que se trabaja. En este caso, se ha probado, que se puede trabajar sólo con dos componentes o autofunciones, lo que ayuda a su interpretación.

Dado que la serie de datos del cociente de cuantificación es homogénea, no ha habido que estandarizar el conjunto de datos. Se han descartado los valores (pacientes) que no estaban en las cinco proteínas, en algunos de los estadios de la enfermedad (por ejemplo el estadio IA).

La muestra se ha construido con los datos, que aparecen en las tablas de valores de los cocientes de cuantificación por proteínas y enfermos y éstos se han cruzado con el estadio tumoral del paciente, datos que se han obtenido de los estudios anatómo-patológicos de cada paciente.

VARIACIÓN DE LA MEDIA DE LOS VALORES MUESTRALES Y DE LAS TRES PRIMERAS AUTOFUNCIONES, CON EL ESTADÍO DEL PACIENTE

A continuación, en las FIGURAS 50-51-52-53 se presentan los resultados más relevantes obtenidos en el análisis por componentes principales.

La FIGURA 50, representa la variación media de todos los datos en función del estadio. El mismo resultado se obtiene calculando el valor medio por estadios de los valores representados en la FIGURA 49 (valor medio de cada proteína, en función del estadio del paciente, TABLA XLIII). En la FIGURA 51-52-53, se representan las tres primeras autofunciones 1, 2 y 3, en función del estadio del paciente.

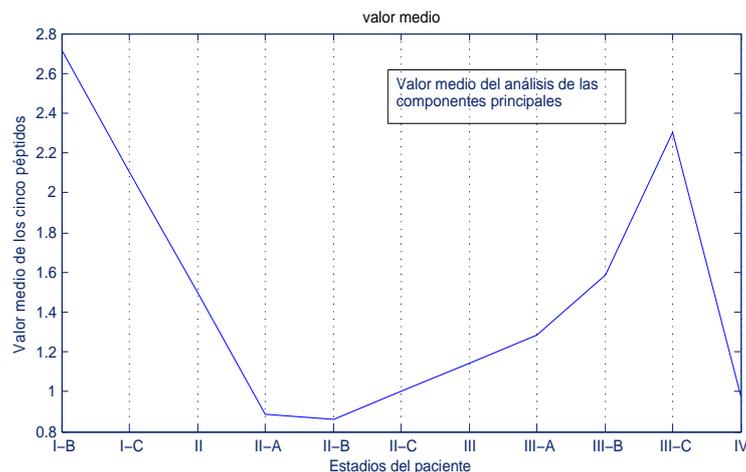


FIGURA 50. Representa los valores de los cocientes de cuantificación de las 5 proteínas analizadas, en relación con el estadio tumoral de cada paciente. Variación media de todos los datos en función del estadio.

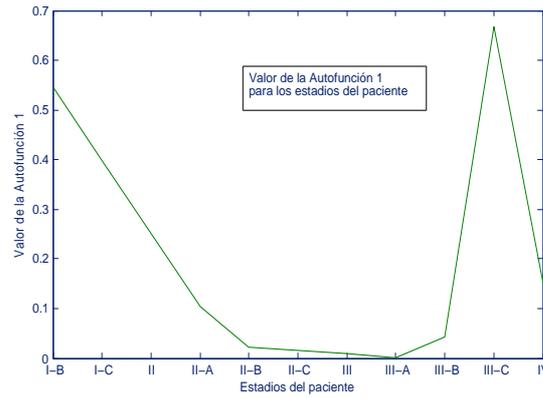


FIGURA 51. Valor de la Autofunción 1 en relación con los estadios.

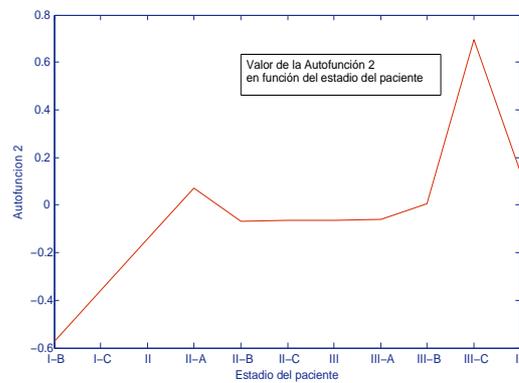


FIGURA 52. Valor de la Autofunción 2 en relación con los estadios.

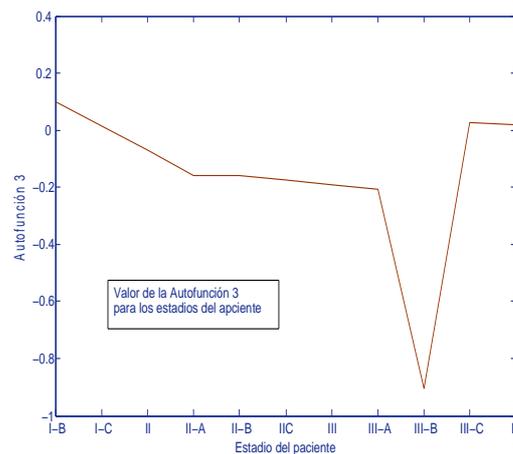


FIGURA 53. Valor de la Autofunción 3 en relación con los estadios.

En la FIGURA 54 se representa el tanto por ciento de variabilidad que se puede explicar con el concurso de las dos primeras autofunciones. Bastan dos autofunciones, para explicar el 98% de la variabilidad de la muestra.

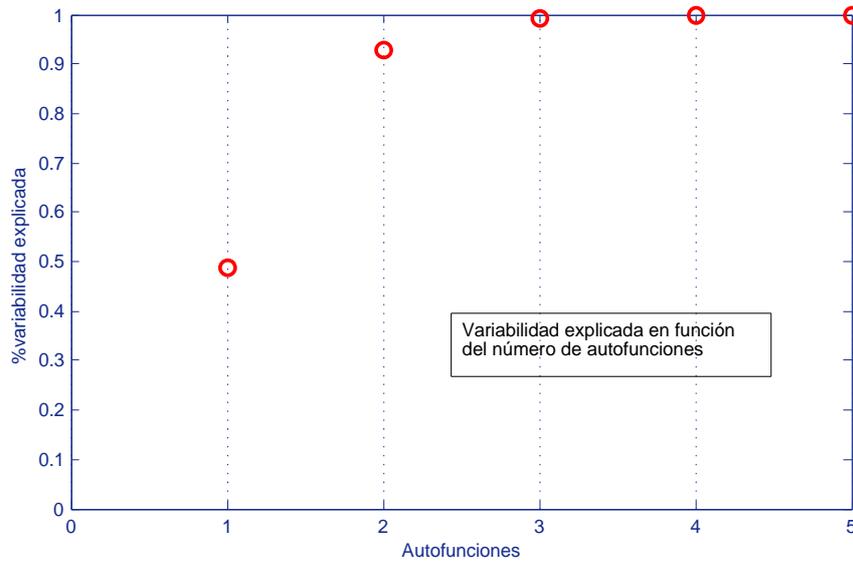


FIGURA 54. Variabilidad explicada en función del número de autofunciones.

3. SIMULACIÓN DE LOS COCIENTES DE CUANTIFICACIÓN DE LOS DIFERENTES PÉPTIDOS SEGÚN EL ESTADÍO DEL PACIENTE CON LAS TRES PRIMERAS AUTOFUNCIONES

El análisis por componentes principales, además de proporcionar las autofunciones, también proporcionan los pesos (scores) por los que se deben multiplicar cada autofunción, para calcular su contribución al cociente de cuantificación de un péptido cualquiera, en un estadio cualquiera de la enfermedad.

En las dos tablas siguientes se presentan los valores de las autofunciones 1, 2, 3 y 4 y los pesos por los que se deben multiplicar para obtener el cociente de cuantificación de cada péptido. TABLA XLIV-XLV.

Estadío	Autof_1	Autof_2	Autof_3	Autof_4
I-B	0.544505	-0.571667	0.100309	-0.177947
I-C	0.397675	-0.357926	0.014564	0.021099
II	0.250845	-0.144185	-0.071182	0.220145
II-A	0.104015	0.069556	-0.156927	0.419190
II-B	0.022259	-0.067787	-0.160528	0.348389
II-C	0.015521	-0.065025	-0.176524	0.344316
III	0.008784	-0.062263	-0.19252	0.340243
III-A	0.002046	-0.059501	-0.208516	0.336170
III-B	0.043824	0.006584	-0.906318	-0.392394
III-C	0.668082	0.696996	0.028787	0.062126
IV	0.150181	0.131802	0.01788	-0.342298

TABLA XLIV. Valor de cada autofunción (Autof) según el estadío del paciente

	Autof_1	Autof_2	Autof_3	Autof_4
EGFR	-0.729074	0.058089	-1.226564	0.170121
MK01	-1.680205	-0.549469	0.058833	-0.443192
MK03	3.108628	1.748229	0.022758	-0.117781
AKT	1.067483	-3.011699	0.408149	0.153860
FKBP1A	-1.766833	1.754849	0.736823	0.236992

TABLA XLV. Pesos de cada autofunción (Autof) para cada péptido

Por último, en la tabla siguiente se dan los valores de la media de la muestra, que se deben de sumar al producto de cada una de las autofunciones, multiplicadas por sus respectivos pesos, para obtener el valor del cociente de cuantificación de un péptido en función del estadío. TABLA XLVI.

Estadío	Valor medio muestral
I-B	2.7135
I-C	2.105
II	1.4965
II-A	0.8880
II-B	0.8640
II-C	1.0033
III	1.1427
III-A	1.2820
III-B	1.5867
III-C	2.3013
IV	0.9720

TABLA XLVI. Valor medio muestral en función del estadío.

El valor del cociente de cuantificación, por ejemplo del péptido EGFR, en el estadío II-A se puede obtener mediante la suma de los siguientes términos, (en este ejemplo se han tomado solo tres autofunciones),

Valor medio muestral II-A: 0.8880

Primera autofunción por el peso de EGFR (estadío II-A): $0.1040 * (-0.7271)$

Segunda autofunción por el peso de EGFR (estadío II-A): $0.0696 * 0.0581$

Tercera autofunción por el peso de EGFR (estadío II-A): $-0.1569 * (-1.2266)$

$Cc[EGFR_{II-A}] = \text{Valor medio} + p_1 * \text{Autof}_1 + p_2 * \text{Autof}_2 + p_3 * \text{Autof}_3$

$Cc[EGFR_{II-A}] = 0.8880 - 0.1040 * 0.7271 + 0.0696 * 0.0581 + 0.1569 * 1.2266$

$Cc[EGFR_{II-A}] = 1.01$

En las FIGURAS 55-56-57-58-59, se presentan los resultados de la simulación de los valores muestrales, considerando sólo las tres primeras autofunciones, conjuntamente con los valores muestrales para los péptidos EGFR1, MK01, MK03, AKT y FKBP1A, en función del estadío del paciente.

El ajuste es muy bueno para todas las proteínas y permite utilizar este resultado para predecir la evolución del paciente.

La reconstrucción gráfica de la proteína MK01, no es tan buena como la de las restantes proteínas. Se necesitan incorporar más autofunciones a la combinación lineal. En la FIGURA 60 se presenta la reconstrucción de la curva y los valores experimentales utilizando esta vez cinco autofunciones. El ajuste mejora apreciablemente.

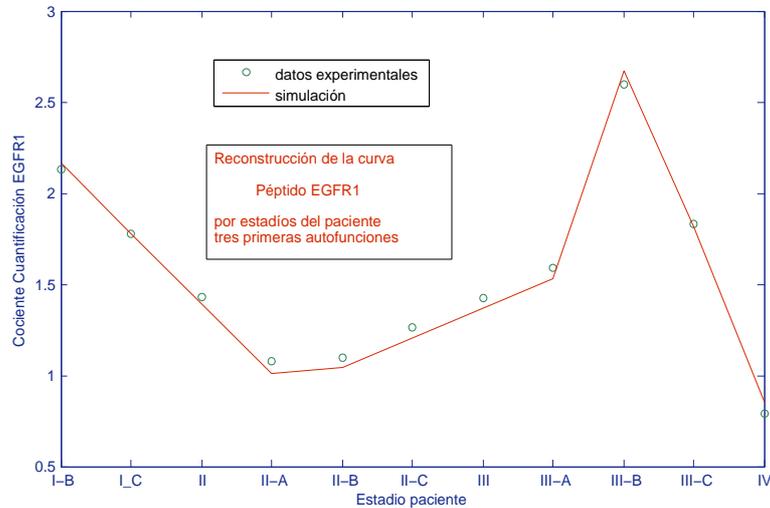


FIGURA 55. Reconstrucción de la curva del péptido EGFR1 por estadios del paciente con las 3 primeras autofunciones.

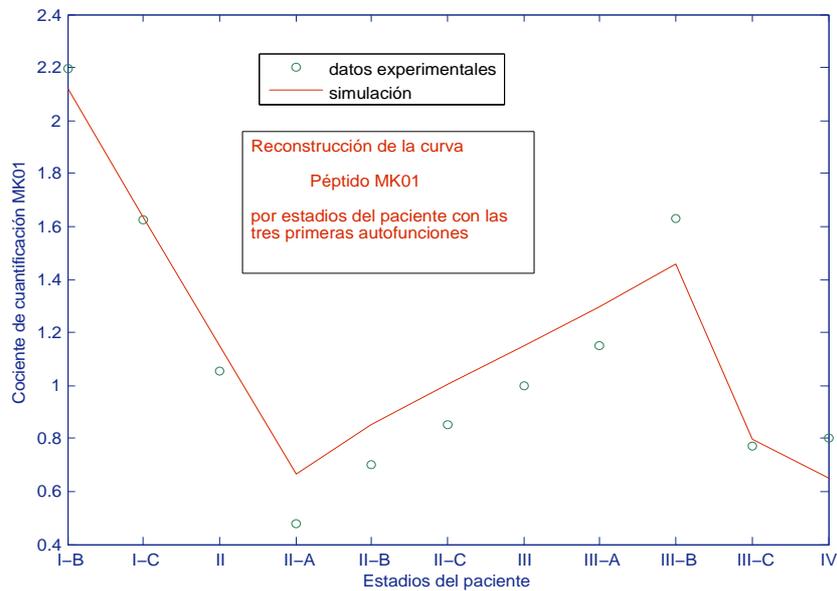


FIGURA 56. Reconstrucción de la curva del péptido MK01 por estadios del paciente con las 3 primeras autofunciones.

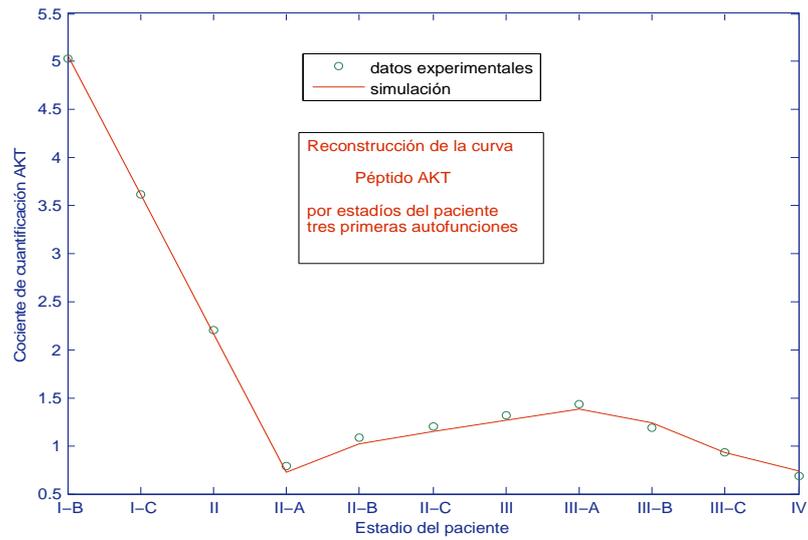


FIGURA 57. Reconstrucción de la curva del péptido AKT por estadios del paciente con las 3 primeras autofunciones.

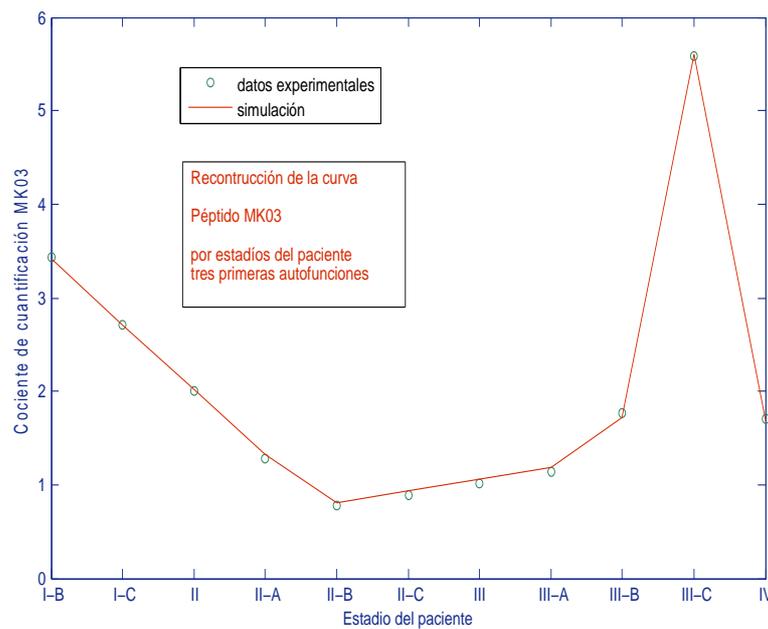


FIGURA 58. Reconstrucción de la curva del péptido MK03 por estadios del paciente con las 3 primeras autofunciones.

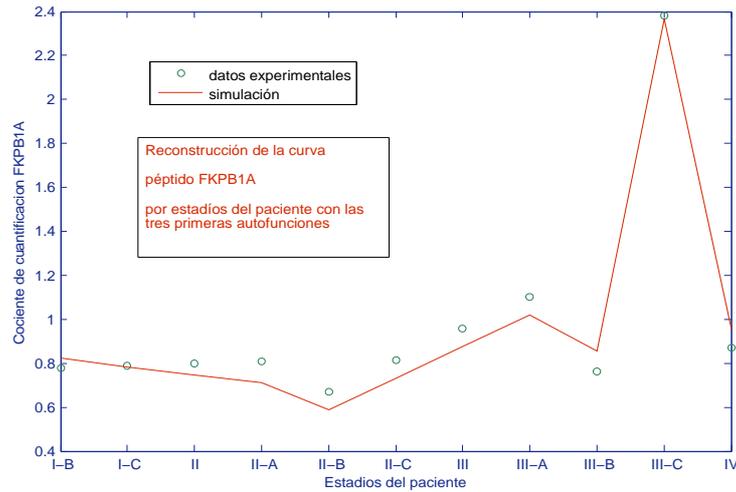


FIGURA 59. Reconstrucción de la curva del péptido FKBP1A por estadios del paciente con las 3 primeras autofunciones.

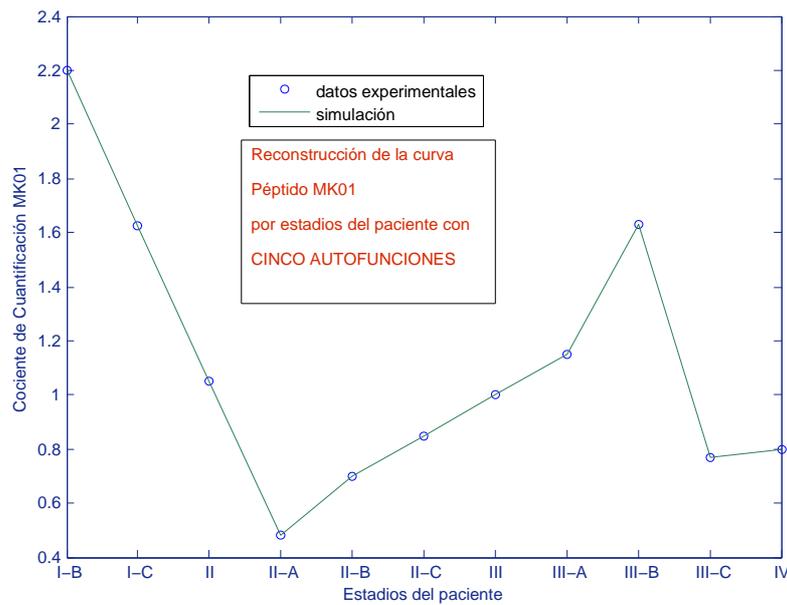


FIGURA 60. Reconstrucción de la curva del péptido MK01 por estadios del paciente con las 5 autofunciones.

APLICACIÓN TERAPEÚTICA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE EL ANÁLISIS DE LAS AUTOFUNCIONES

La simulación de las curvas de los valores del Cc para cada proteína, en cada uno de los estadios tumorales del paciente, tiene una clara aplicación práctica.

Paciente diagnosticado por endoscopia de adenocarcinoma gástrico antral, tipo intestinal de la clasificación de Lauren y previsiblemete con alteraciones moleculares de los receptores tirosin-kinasa. Eco-endoscopia, TAC torácico, abdominal y pélvico, PET-TAC, para la determinación del estadio tumoral.

Conocido el estadio tumoral clínico del paciente, previo a iniciar el tratamiento, podemos conocer los valores simulados de los Ccs de las cinco proteínas estudiadas en esta tesis, utilizando las tablas y calculando el valor o simplemente entrando en la gráfica de cada proteína y midiendo su valor.

Esta primera estimación, es validada con una prueba analítica con metodología proteómica dirigida, en el tejido sano y tumoral con cáncer gástrico, que permite obtener los Ccs de estas proteínas, por cromatografía líquida y espectrometría de masas.

Si ambos resultados son “aproximadamente” coincidentes, las curvas simuladas se pueden utilizar en el seguimiento del paciente, tomando a aquellos como valores de referencia.

Cuando el paciente es intervenido quirúrgicamente y se le ha practicado una resección gástrica con una linfadenectomía, días después, el patólogo informa del estadio tumoral en el que se encuentra el paciente.

Conocido el estadio tumoral se pueden conocer los valores de los Ccs de las cinco proteínas estudiadas en esta tesis, utilizando los valores de las tablas y calculando el valor o simplemente entrando en la gráfica de cada proteína y midiendo su valor.

También, estas curvas se pueden utilizar para verificar la respuesta de un paciente a unos fármacos administrados, ya que con las autofunciones se dispone de la respuesta (evolutiva) estándar del paciente con cáncer gástrico.

Cuando los resultados del seguimiento del paciente se desvían claramente de estas curvas, entonces, se dispone de una información bien referenciada e identificada para determinar de forma cierta el efecto de un determinado tratamiento.

4. POTENCIAL UTILIZACIÓN DE LOS DATOS OBTENIDOS

➤ **CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA DE UNA NEOPLASIA GÁSTRICA MULTIFOCAL EN PACIENTE CON INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE**

INTRODUCCIÓN

La incidencia de cáncer gástrico en la inmunodeficiencia común variable (IDCV) es menor del 1%.

Son factores de riesgo para el desarrollo del cáncer gástrico, la infección por *Helicobacter pylori* y la anemia perniciosa, que lo aumentan en la población en general así como en pacientes con IDCV.

La tasa supervivencia a 5 años, entendida ésta como la comparación entre la supervivencia de los pacientes afectados de cáncer gástrico y la esperada en las personas sin enfermedad, fue de un 29 %¹.

El riesgo de muerte en la IDCV fue once veces mayor para los pacientes con complicaciones no infecciosas, como la enfermedad cancerosa².

Por ello, una estrategia para la detección precoz y vigilancia, puede ayudar a reducir la morbilidad y el riesgo de cáncer gástrico³.

De esta enfermedad no se conoce la herencia. Los niveles séricos de inmunoglobulinas están bajos, tanto para la IgG, IgA y/o IgM.

La nueva clasificación de las inmunodeficiencias primarias de 2014, frente a las de 2011, identifica más de 30 nuevos genes anómalos, que podría ayudar a explicar posibles mecanismos de carcinogénesis⁴.

En el año 2000, se describieron cinco categorías de neoplasia epitelial gastrointestinal, en torno a la llamada clasificación de Viena.

En la categoría de las neoplasias invasivas, fueron incluidos los carcinomas intramucosos.

La clasificación quedó resumida de la siguiente forma:

- 1.-Negativo para neoplasia/displasia.
- 2.-Indefinido para neoplasia/displasia.
- 3.-Neoplasia de bajo grado, no invasiva (adenoma /displasia bajo grado).
- 4.-Neoplasia alto grado, no invasiva,
 - 4.1 Adenoma /displasia alto grado.
 - 4.2 Carcinoma no invasivo (carcinoma in situ).
 - 4.3 Sospecha de carcinoma invasivo.
- 5.-Neoplasia invasiva.
 - 5.1 Carcinoma intramucoso: el carcinoma intramucoso indica invasión dentro de la lámina propia o de la muscularis mucosa
 - 5.2 Carcinoma submucoso o en profundidad⁵.

La Sociedad Japonesa de Endoscopia Gastroenterológica, define el cáncer gástrico precoz como un cáncer en el que la afectación tumoral está limitada a la mucosa o a la submucosa, independientemente de las metástasis en los ganglios linfáticos.

Desde el punto de vista macroscópico el cáncer gástrico fue dividido en avanzado y superficial.

El cáncer gástrico avanzado fue clasificado en tipo 1, protuberancial, tipo 2, ulcerativo, tipo 3, ulcerativo infiltrativo y tipo 4, infiltrativo difuso; mientras que el tumor mucoso superficial fue clasificado en 5 subtipos:

Tipo 0-I (polipoideo)-tumor polipoideo con una altura superior a 3mm

Tipo 0-IIa (superficial elevado)-tumor ligeramente elevado con altura inferior a 3mm

Tipo 0-II b (superficial plano)-tumor deprimido elevado

Tipo 0-IIc (superficial deprimido) -tumor con depresión

Tipo 0-III (excavado)- tumor con gran depresión

Los tipos celulares de la neoplasia epitelial gástrica son el papilar, tubular, pobremente diferenciado, anillo de sello (sig) y mucinoso (muc). El tubular a su vez, ha sido dividido en bien diferenciado y moderadamente diferenciado y el pobremente diferenciado en tipo sólido y no sólido. El carcinoma de células en anillo de sello representa del 3,4 al 29% de todos los cánceres gástricos y es más frecuente en personas jóvenes y en mujeres⁶.

En el capítulo de análisis estadístico de la tesis doctoral, se comprobó que los valores de los cocientes de cuantificación (Ccs) de las diferentes proteínas (excepto para el FKBP1A), tienen un comportamiento similar, para cada uno de los estadios tumorales de la clasificación TNM. FIGURA 1.

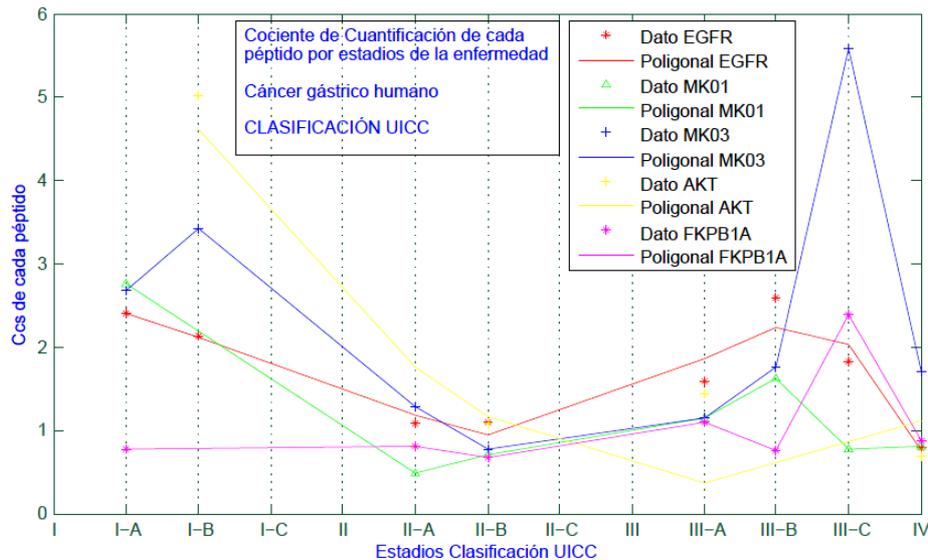


FIGURA 1. Valores medios de los cocientes de cuantificación en función de los estadios del paciente.

Todas las proteínas, excepto el FKBP1A tienen el mismo comportamiento frente al estadio tumoral del paciente.

Se pueden identificar cuatro regiones de comportamiento del cociente de cuantificación de cada uno de las proteínas: decaimiento, valor mínimo, crecimiento y dominio tumoral (ver descripción en el capítulo análisis de datos).

La región de decaimiento se corresponde con los estadios I-A/II-A, la región de valores mínimos, con los estadios II-A/II-B, la región de crecimiento con los estadios II-C/III-C y por último la región de "dominio tumoral" con los estadios III-C/IV.

Este patrón de comportamiento de los valores medios de los Ccs, puede ser de aplicación en la práctica clínica; a medida que evoluciona en el tiempo el cáncer gástrico, podemos predecir, según el estadio tumoral en el que se encuentra la enfermedad, el Cc de cada proteína, para cada paciente y viceversa.

En este capítulo se analiza el comportamiento de los Ccs de tres cánceres gástricos de la misma paciente, con IDCV, que pertenecen a la región 1 (nº19 y20) y a la región 2 (nº 18), de la estructura anterior.

CASO CLÍNICO

Presentamos una mujer de 52 años, con diagnóstico de inmunodeficiencia común variable en 1994, en tratamiento con inmunoglobulinas (Ig intravenosas), a una dosis de 40 gr. cada 2 semanas. Gastritis crónica Helicobacter Pylori-, con anemia perniciosa con déficit de Vitamina B12 y ferropenia. Hiperplasia linfoide intestinal; gastroscopia en 2005 (adenoma con atipia moderada), en 2006 (pólipo adenomatoso gástrico), en 2007

(metaplasia intestinal sin rasgos de displasia). Ecoendoscopia gástrica en 2007 normal. Colonoscopia en 2012 con adenoma tubular en sigma. Cáncer gástrico en 2014, practicándose una gastrectomía total con esofagoyeyunostomía en Y de Roux, linfadenectomía D2.

FIGURA 2-3.

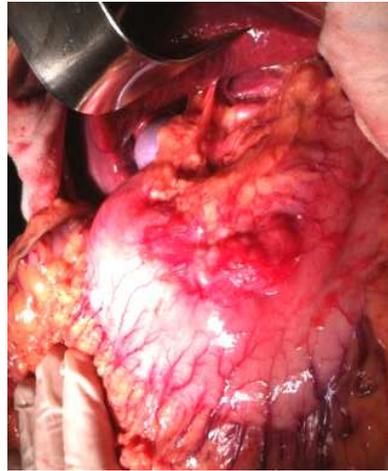


FIGURA 2. Aspecto intraoperatorio macroscópico del tumor.

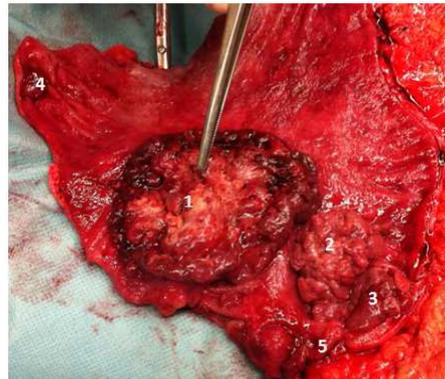


FIGURA 3. Pieza de gastrectomía total y omentectomía, abierta por curvatura mayor. Unión esófago-gástrica marcada con una tijera en el borde superior de la fotografía. Numerados del 1 al 5, corresponde a los tumores encontrados en la pieza.

Las FIGURA 2 Y 3 corresponden a la pieza de gastrectomía total con linfadenectomía D2 y omentectomía de la paciente con (ICV) en la que se describen los siguientes tumores y alteraciones:

1.- Adenocarcinoma gástrico tipo intestinal infiltrante, moderadamente diferenciado de 9 cm. de diámetro, localizado sobre la curvatura menor a nivel de cuerpo-antro gástrico, afectando tanto a la cara anterior y posterior. Invade toda la pared gástrica, contacta con la serosa y alcanza también el tejido adiposo de la curvatura menor, respetando el borde quirúrgico radial. pT4a, pN0. Estadio II B⁷. (Tumor 18)

2.- Carcinoma gástrico, intramucoso, bien diferenciado, de 4,5 cm. localizado en el antro gástrico cara posterior. pT1, pN0. Estadío I A⁷. (Tumor 19)

3.- Carcinoma gástrico intramucoso, bien diferenciado, de 3,5 cm. localizado en el antro-píloro gástrico, con presencia de células en anillo de sello. pT1, pN0 Estadío I A⁷. (Tumor 20)

4.- Dos pólipos adenomatosos gástricos con displasia de alto grado, localizados en el fundus.

5.- Dos pólipos de 1 y 0,5 cm en el píloro.

Además, en la pieza de resección quirúrgica se pudo apreciar, gastritis crónica atrófica, Helicobacter Pylori negativo y en los cortes de la mucosa gástrica realizados al azar, displasia de bajo y alto grado.

En resumen, el caso que presentamos, muestra un estómago con una neoplasia epitelial gástrica, con varias formaciones tumorales en diferentes fases evolutivas.

Hemos seleccionado para el estudio, el adenocarcinoma ulcerativo-infiltrativo intestinal tipo 3 (T n^o18). También, hemos incluido los dos carcinomas intramucosos, el de células papilo-vellositaria (T n^o19) y el de células en anillo de sello (T n^o 20).

El tumor (T n^o18) es un moderadamente diferenciado, mientras que los tumores (T n^o19) y (T n^o 20), los dos son bien diferenciados.

El adenocarcinoma invasivo (T n^o18), alcanza en profundidad todo el espesor de la pared gástrica, sin metástasis en los ganglios linfáticos, pero con invasión capilar, linfática-venosa y perineural.

Mientras que, los otros dos tumores intramucosos (T n^o19) y (T n^o 20), son tipo 0-I, no tienen metástasis ganglionares, ni invasión linfática-venosa ni neural, y son bien diferenciados.

PLANTEAMIENTO

La progresión tumoral del cáncer gástrico se asocia con una reducción de la tasa de supervivencia a 5 años. Si pudiéramos caracterizar biomarcadores proteicos, que nos permitan predecir la progresión tumoral y determinar la capacidad de invasión linfática, elegiríamos mejor el tratamiento médico y quirúrgico en estos pacientes y en consecuencia mejoraríamos la tasa de supervivencia.

OBJETIVOS

1.- Comparar el perfil proteómico del adenocarcinoma tipo intestinal invasivo, con los carcinomas intramucosos papilar-vellositario, de células en anillo de sello y con la mucosa gástrica normal de una paciente con inmunodeficiencia común variable.

2.- Agrupar los valores de cambio experimentados por los Ccs de las proteínas seleccionadas, generados a partir de los cánceres gástricos analizados, mediante técnicas de clustering e identificar el cluster al que pertenecen los diferentes tumores de la paciente.

3.- Establecer un posible factor pronóstico que nos permita identificar la progresión tumoral en el cáncer gástrico precoz, que nos ayude a seleccionar mejor el tratamiento médico y quirúrgico para estos pacientes, utilizando la regresión lineal múltiple, en los grupos identificados en el análisis clustering.

MATERIAL Y MÉTODO

Consultar en capítulo “tesis doctoral” material, métodos y análisis de datos.

El material corresponde al estómago de la paciente con IDCV, intervenida quirúrgicamente por una neoplasia epitelial multifocal, en la que se han recogido muestras de la zona tumoral (TU) tres tumores numerados en la FIGURA 3 como 1 (nº18), 2 (nº19), 3 (nº20) y como control, una zona sana del mismo estómago, alejada de los tumores (SA).

Técnicas de Clustering para el análisis de datos de cuantificación proteica

El principal objetivo al aplicar clustering, sobre las proteínas analizadas por cromatografía líquida y espectrometría de masas, es agrupar aquellas proteínas cuyos valores de los cocientes de cuantificación se comportan de manera similar, a lo largo de los diferentes estadios de cáncer gástrico.

La actividad celular en el cáncer gástrico, está organizada por activación de vías de señalización celular, en las que están implicadas, entre otras, las proteínas seleccionadas.

Un software comercial fue utilizado para agrupar los valores de cambio experimentados por los Ccs de las proteínas seleccionadas, generados a partir de los cánceres gástricos analizados.

En el diagrama, FIGURA 4, se muestran los dos grupos jerárquicos de los cocientes de cuantificación (SA/TU) de las proteínas EGFR1, MK03 y FKBP1, en tejidos de 19 pacientes con cáncer gástrico. Incluidos en esta serie se encuentra la paciente con con IDCV y numerado sus tumores como SA/TU, 18,19,20, según los Ccs.

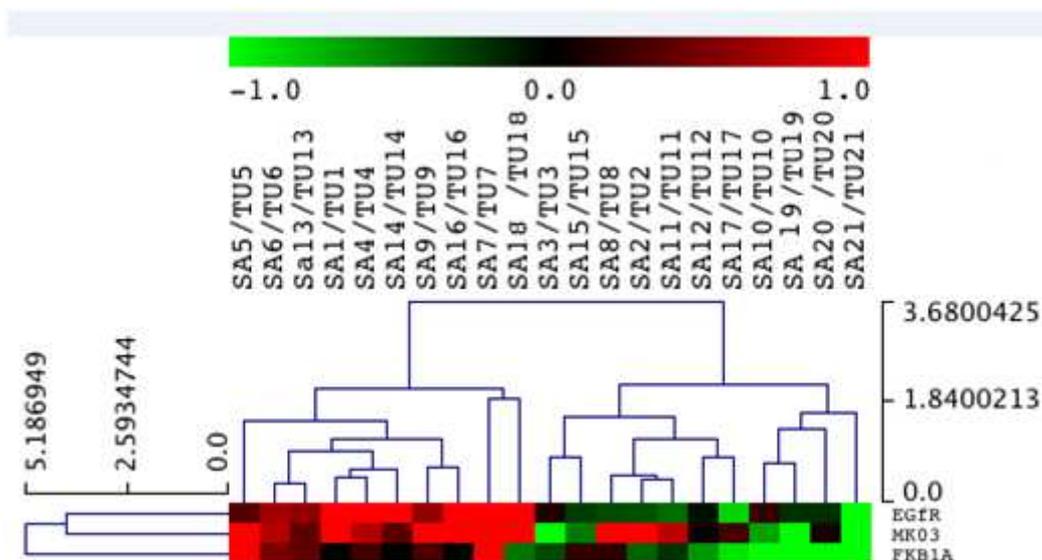


FIGURA 4. Técnicas de Clustering para el análisis de datos de cuantificación proteica

RESULTADOS

Se describen dos agrupamientos para los Ccs de las proteínas. El grupo 1 correspondiente a los pacientes 21, **20, 19**, 10, 17, 12, 11, 2, 8, 15, 3 en los que las proteínas EGFR1, MK03 y FKBP1A son más abundantes en el tejido sano, que en el tumoral (verde). El grupo 2, corresponde a los pacientes **18**, 7, 16, 9, 14, 4, 1, 13, 6, 5, en los que las proteínas EGFR1, MK03 y FKBP1A, son más abundantes en el tejido tumoral que en el sano (rojo). En negro se representa la mediana de los valores de los Ccs.

Los casos 19 y 20 del grupo 1, se corresponden con tipo histopatológico de carcinoma intramucoso, mientras que en el grupo 2, se encuentra el adenocarcinoma invasivo (18). Los dos grupos de Ccs proteica, definen el pronóstico de la enfermedad, correlacionándose con el estadio tumoral, estadios IA (19-20) y IIB (18).

Esta separación por grupos (1 y 2) la hemos utilizado para calcular la regresión lineal múltiple de los cocientes de cuantificación de las proteínas de la terna, EGFR MK03 y FKBP1 y, así obtener una relación cuantitativa entre ellas que nos sirva para predecir el valor de una de las proteínas en relación con los otros dos y estudiar su posible comportamiento como objetivos terapéuticos.

En nuestro caso, los tres carcinomas gástricos de la paciente con (IDCV) correspondían a los estadios I y II⁷ En la TABLA I, mostrada a continuación, se pueden observar los Ccs de los péptidos en los tres tumores, según el estadio AJCC⁷ en el que se encuentran.

DATOS DE LOS COEFICIENTES DE CUANTIFICACIÓN DE LOS DIFERENTES PÉPTIDOS EN LOS TRES TUMORES AGRUPADOS POR ESTADÍOS AJCC.

PACIENTE	TNM	ESTADÍO AJCC	EGFR		MK01	MK03	FKBP1A		AKT
			Ratio SA/TU (SPSDCCHNQCAAGCTGPR)	Ratio SA/TU (IPLNLQIIR)	Ratio SA/TU (VADPDHDHTGFLTEYVATR)	Ratio SA/TU (RTEGVGPGVPGEVEMVK)	Ratio SA/TU (GWEEGVAQMSVGQR)	Ratio SA/TU (RGQTCVVHYTGMLDGGK)	Ratio SA/TU (EEWTTAIQTVADGLK)
18(*)	pT4aN0M0 LVi+PN+	IIB	1.003905516	0.74608446	0.66434143	0.47376392	0.3409146	(-)	0.81135882
19(*)	pT1N0M0 LVi-PN-	IA	4.314515965	4.250831931	3.40685094	5.31659514	0.72702843	(-)	8.67375077
20(*)	pT1N0M0 LVi-PN-	IA	0.976671107	0.775523319	1.13666179	1.07604135	0.21270345	(-)	1.39677632

(*) CATALOGADA COMO N°18, 19 Y 20, SE REFIERE A UNA PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS. (-) CUANTIFICACIÓN NO REALIZADA.

TABLA I. Datos de los coeficientes de cuantificación de los diferentes péptidos en los tres tumores agrupados por estadios AJCC.

A continuación, hemos tomado como base las clasificaciones de la neoplasia epitelial gástrica de Viena y Japón, en relación al fenotipo celular (carcinoma intramucoso de células papilo-vellositaria, carcinoma intramucoso de células en anillo de sello y de adenocarcinoma ulcerativo infiltrante). Estos fenotipos celulares los hemos relacionado con los Ccs. de las proteínas seleccionadas, agrupando estos Ccs según la descripción de los estadios tumorales realizada por el patólogo, en el estudio histopatológico de la pieza de resección quirúrgica. TABLA II.

Cocientes de cuantificación de las proteínas analizadas

	Nº 18	Nº 20	Nº19
	ADENOCARCINOMA TIPO INTESTINAL ULCERATIVO INFILTRANTE, MODERADAMENTE DIFERENCIADO LVi + , Ni+ , SIN METASTASIS GANGLIONARES T4aN0M0 IIB	CARCINOMA INTRAMUCOSO CÉLULAS EN ANILLO DE SELLO, BIEN DIFERENCIADO, LVi - , Ni- , SIN METASTASIS GANGLIONARES T1N0M0 IA	CARCINOMA INTRAMUCOSO PAPILO- VELLOSITARIO, BIEN DIFERENCIADO, LVi - , Ni- , SIN METASTASIS GANGLIONARES T1N0M0 IA
EGFR1	0,87	0,87	4,28
MK01	0,66	1,13	3,4
MK03	0,47	1,07	5,31
FKBP1A	0,34	0,21	0,72
AKT1	0,81	1,39	8,67



Peor pronóstico **Mejor pronóstico**

TABLA II. (Ccs) de las proteínas del EGFR1, MK01, MK03, FKBP1A y AKT1, analizados en las tres neoplasias epiteliales, según el estadio tumoral y su fenotipo celular.

En el primer caso el adenocarcinoma intestinal invasivo, moderadamente diferenciado y con permeación capilar y neural (T nº 18), presenta unos (Ccs) para todas las proteínas, menores de 1, lo que nos indica mayor presencia de proteínas en el tejido tumoral, que en el tejido sano.

En el segundo caso, se muestra un carcinoma intramucoso de células en anillo de sello, bien diferenciado (T nº 20). Éste, presenta unos (Ccs) mayores de 1 para el MK01, MK03 y

AKT1 (mayor contenido de proteína en el tejido sano), mientras que las proteínas EGFR1 y FKBP1A, son mayores en el tejido tumoral.

Y, por último, el carcinoma intramucoso papilar-vellositario, bien diferenciado (T n° 19), muestra unos (Ccs) para todos las proteínas mayores de 1, con mayor cantidad de proteínas en el tejido sano, que en el tumoral, excepto para el FKBP1A, que es mayor en el tejido tumoral, que en el sano.

Siguiendo el patrón de comportamiento del EGFR1, los cocientes de cuantificación del resto de la proteínas decrecen al progresar en el estadio.

REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE GRUPO I Y II EN RELACIÓN CON LA PACIENTE

En el análisis se ha representado el EGFR1 frente al MK03 y el FKBP1A, ya que producía el menor valor absoluto del error y, también, porque su resultado tiene mejores posibilidades de aplicación terapéutica.

En el grupo 1, donde existe mayor variabilidad de los datos experimentales, el resultado es muy demostrativo y en particular evidencia que todos los pacientes tienen un EGFR mayor que 1. En el grupo 2, la mayoría de los valores de Ccs del EGFR 1 se agrupan entorno al valor 1, es decir, pertenecen a la región 2 en función del estadio, o sea, la zona de valores mínimos correspondientes a valores del estadio tumoral IIA, IIB.

En la siguiente figura se han representado los valores de los Ccs del EGFR1 obtenidos experimentalmente (eje x) frente a los valores predichos por el modelo de regresión lineal. Además se identifican los valores de los Ccs del paciente n°18,19,20, apreciándose que el tumor 18 pertenece al grupo 2 en el estadio IA, mientras que los tumores 19 y 20 el cluster los incluyó en el grupo 1, y su estadio son IIB y IA respectivamente. Este resultado aparentemente dispar del tumor n° 18 se discute posteriormente. FIGURA 5.

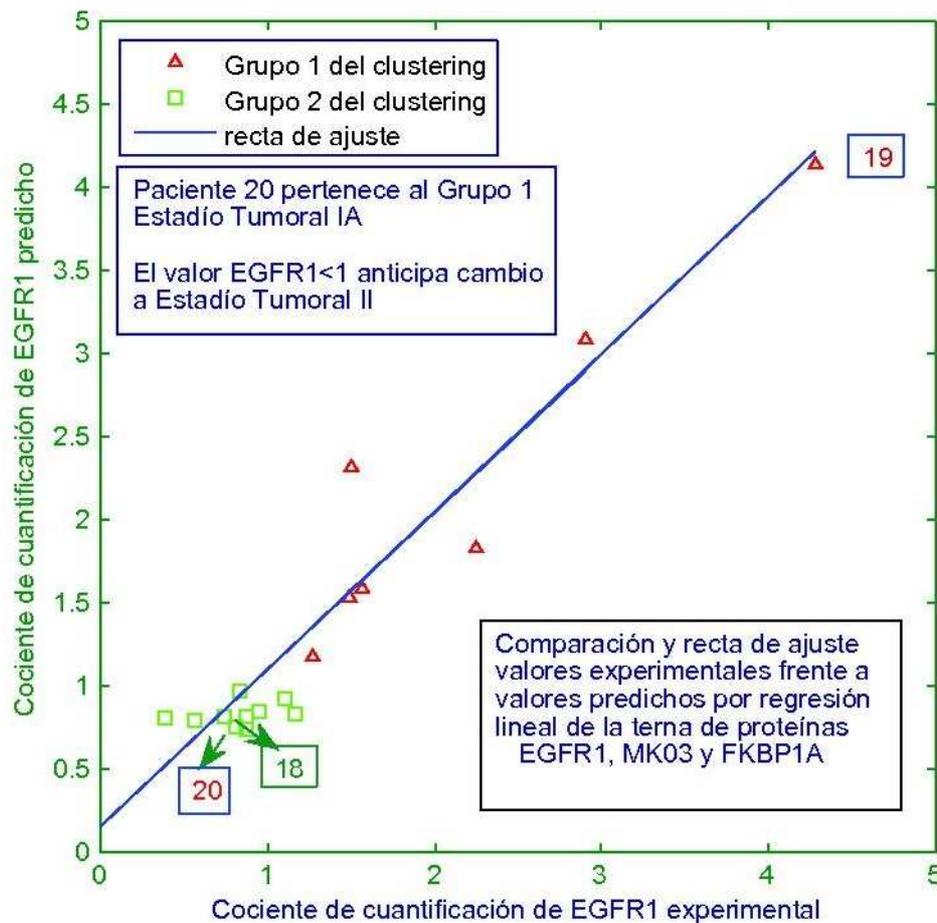


FIGURA 5. Valores de los CCs del EGFR1 obtenidos experimentalmente (eje x) frente a los valores predichos por el modelo de regresión lineal.

APLICACIÓN TERAPEÚTICA

La capacidad de bloquear la proteína EGFR1 con Trastuzumab o Cetuximab, permite analizar la aplicación terapéutica de los resultados anteriores. Al bloquear el EGFR1 a un valor dado, los valores de los Ccs de las proteínas MK03 y FKBP1 tienen una relación lineal. Así por ejemplo, para el grupo 2 se ha obtenido una regresión lineal múltiple dada por la ecuación:

$$Cc(EGFR1) = a_0 + a_1 \cdot Cc(MK03) + a_2 \cdot Cc(FKBP1A)$$

Donde $a_0 = 2.6064$, $a_1 = 0.4468$, $a_2 = -1.2782$

A continuación, se representa la recta que relaciona los valores de MK03 y FKBP1A cuando el EGFR1 se ha bloqueado al valor 1.25 (línea azul, que representa el comportamiento de los pacientes pertenecientes al grupo 2). Así mismo, también se ha representado una recta, prolongación de la anterior, para un valor del EGFR1 igual a cero (línea verde). FIGURA 6.

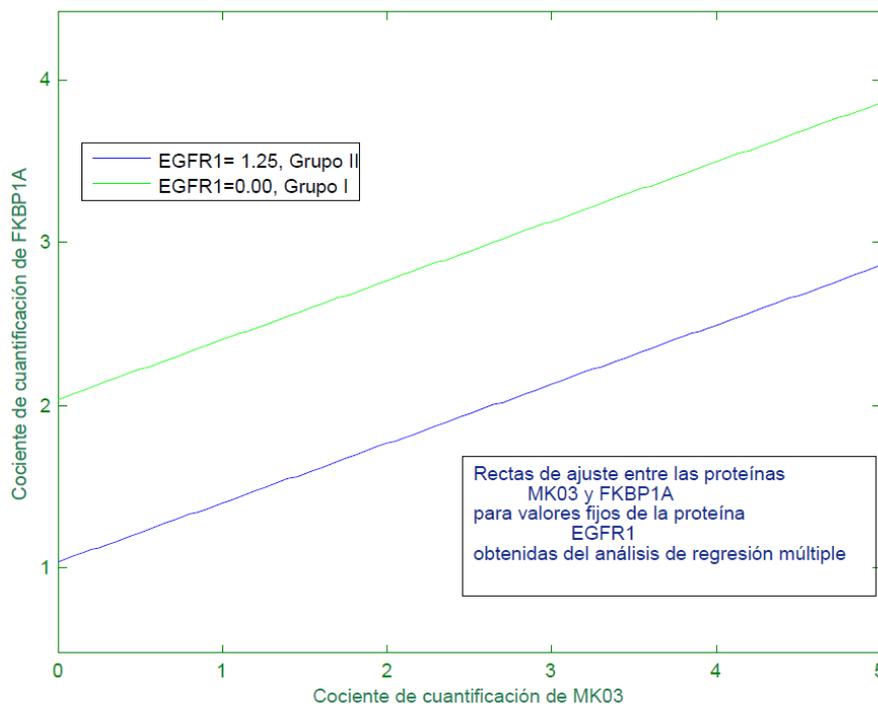


FIGURA 6. Relación entre los valores de MK03 y FKBP1A con el EGFR 1 bloqueado al valor 1.25 (línea azul) y para un valor del EGFR1 igual a cero (línea verde).

Si además a estos pacientes se les administra un bloqueante del FKBP1A que mantenga los valores inferiores a 1 (que lo hace de forma natural), el MK03 prácticamente se haría nulo.

Cualquier valor del EGFR1 en el intervalo 0-1,25 tendría rectas paralelas a las anteriores. El bloqueo total del EGFR se traduciría también en un bloqueo del MK03 y un valor acotado del valor del FKBP1A.

DISCUSIÓN

La compleja interacción de factores externos del entorno como, *Helicobacter Pylori*, bacterias anaerobias, compuestos muy salados o el tabaco y factores relacionados con el huésped, como los anticuerpos contra las células parietales gástricas, que generan baja secreción de ácido clorhídrico en el estómago y un pH gástrico alcalino, pueden actuar sobre el micro-entorno de la mucosa gástrica.

También actúan los polimorfismos en los genes del huésped (IL 1b, TNF α , Interleucina 10, MUC 1, HLA) o la respuesta inmune y los cambios moleculares.

Estos factores y otros, actúan durante un periodo prolongado y generan una inflamación crónica, con incremento de la expresión de factores pro-inflamatorios, como la IL1 b, IL6, IL10, TNF α y el óxido nítrico sintasa, que contribuyen al desarrollo del carcinoma gástrico¹⁰.

En nuestro caso, los factores determinantes, para el desarrollo del adenocarcinoma gástrico, relacionados con el huésped son, el síndrome de inmunodeficiencia común variable y sus antecedentes relacionados con patología benigna gástrica.

En su historia clínica, están reflejados factores de riesgo, que han actuado sobre la mucosa gástrica normal, hasta llegar al desarrollo del carcinoma gástrico multifocal.

Así, la paciente había padecido, gastritis crónica atrófica con anemia perniciosa, dos pólipos adenomatosos localizados en el fundus, en los años 2005 y 2006, metaplasia intestinal en 2007, displasia de bajo y alto grado, visualizada en los cortes realizados al azar de la mucosa gástrica, en el estudio anatómo-patológico del estómago tras su gastrectomía por adenocarcinoma gástrico; y por último en la pieza de resección, también aparecían pólipos adenomatosos en fundus y en el antro-píloro.

El análisis directo de las muestras tumorales con formación de imágenes por espectrometría de masas, representa un método que mantiene la información morfológica contenida en los tejidos. Esta metodología previsiblemente podría evitar los problemas planteados con los métodos basados en la homogeneización de la muestra, como ocurre en la espectrometría de masas convencional realizada por nosotros ¹⁵.

Si bien esto es así, no es menos cierto que las redes de señales oncogénicas y sus interacciones proteína-proteína a lo largo de las diferentes vías de señalización llevan a la adquisición y desarrollo de señas de identidad de las células cancerosas, por lo que el método empleado por nosotros, hace posible correlacionar el fenotipo tumoral y los cocientes de cuantificación de las proteínas.

Con metodología proteómica diferencial, utilizando electroforesis bidimensional y espectrometría de masas, se ha demostrado que hay cambios en la expresión de proteínas, entre la gastritis crónica antral y la mucosa normal¹¹.

De esta forma podemos decir, que los cambios proteicos están presentes a nivel de la mucosa gástrica con la gastritis crónica antral o con pólipos adenomatosos, desarrollados a partir de una mucosa gástrica atrófica con metaplasia intestinal¹².

El tamaño del pólipo y el grado de displasia son predictores de progresión del carcinoma. Dado que los adenomas gástricos representan una condición premaligna, la escisión es el tratamiento de elección¹³.

Esta paciente tenía resecados en varias ocasiones pólipos adenomatosos, que indicaban una cierta progresión de la enfermedad.

Dado que el tejido tumoral contiene directamente toda la información relativa a los cambios proteómicos y genéticos, representa la mejor muestra de material posible, para cualquier investigación molecular.

La mayoría de los biomarcadores proteicos tumorales en el diagnóstico de cáncer gástrico son glicoproteínas. Las más comunes son la mucina-5AC (MUC5AC), IgG, mucina 1 (MUC1), IGHM, LRG1, haptoglobina (HP), albúmina (ALB), TF, quinínogeno-1 (KNG1), alfa-1-glicoproteína ácida (AGP), ceruloplasmina (CP), A1BG, proteína de unión a vitamina D (GC), alfa-1-antitripsina (SERPINA1), antitrombina (SERPINC1), angiotensina (AGT), CFB, inhibidor peptidasa serpina, Clade A (SERPINA3), alfa-2-HS-glicoproteína (AHSG), Zn-alfa-

2-glicoproteína (AZGP1), CLU, ITIH2, complementan el factor H (CFH), interalpha-tripsina HCRP inhibidor, SERPING1 y variante de la proteína C4A (C4A)¹⁴.

En el carcinoma intramucoso moderadamente diferenciado con rasgos de pobremente diferenciado, se han identificado cinco genes con implicaciones pronósticas y/o terapéuticos en el cáncer gástrico. Éstos son MET, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), HER2, gen del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2) y la fosfatidilinositol 3-quinasa a subunidad catalítica (PIK3CA)¹⁵.

Los criterios establecidos en el trabajo, que han agrupado a estos tres tumores en los grupos 1 y 2, han sido los Ccs de las proteínas EGFR1, MK03 y FKBP1.

Para el grupo 1, los Ccs fueron mayores de 1 (mayor contenido proteico en el tejido sano que en el tejido tumoral), mientras que en el grupo 2, con Ccs menores de 1, la mayor cantidad de proteínas estaría en el tejido tumoral, en relación con el tejido sano. Además, los tres tumores están en estadios tumorales IA y IIB. Hemos utilizado la misma muestra de tejido gástrico control sano (SA) para determinar los Ccs en los tres casos.

Ésto nos hace pensar que, siendo el numerador del cociente de cuantificación (SA/TU) constante (SA) en los tres tumores, las modificaciones producidas en los resultados, han tenido que ser en el tejido tumoral.

En relación a los datos relativos a los Ccs proteicos analizados, clasificación TNM y fenotipo celular de los tres tumores, señalar que el (T nº18), adenocarcinoma tipo intestinal ulcerativo infiltrante, moderadamente diferenciado LVi + , Ni+ , sin metástasis ganglionares, T4aN0M0, IIB, tiene unos datos proteómicos, relativos a los (Ccs) de: EGFR1:(0,87), MK01: (0,66) MK03: (0,47) FKBP1A: (0,34) AKT1: (0,81).

En el caso (T nº 19), el carcinoma intramucoso papilar-vellositario, bien diferenciado muestra unos (Ccs) para todos los péptidos mayores de 1, excepto para el FKBP1, que es de 0,72. Los datos proteómicos encontrados en este tumor son, EGFR1: (4,28), MK01:(3,4), MK03: (5,31) y AKT: (8,67).

Los valores proteómicos de los (Ccs) del tumor nº 20, carcinoma intramucoso de células en anillo de sello, bien diferenciado, LVi - , Ni-, sin metástasis ganglionares T1N0M0, estadio IA son de EGFR:(0,87), MK01: (1,33), MK03:(1,07), FKBP1A: (0,21), AKT1:(1,39).

Los principales datos clínicos de la (IDCV) que padece la paciente son: hipogammaglobulinemia, con incapacidad para producir anticuerpos específicos tras inmunización, susceptibilidad a infecciones bacterianas, trombocitopenia, bronquiectasias, enterocolitis de repetición por campylobacter y anemia perniciosa. La (IDCV) había aparecido en la tercera década de vida, desarrollando su carcinoma gástrico dos décadas después.

En relación a los niveles de inmunoglobulinas: la IgA fue indetectable, IgG < de 500 y la IgM baja (4,8 -17 mg/dl), con valores normales entre 40-230.

Hay una inmunodeficiencia primaria ligada al cromosoma X, llamada enfermedad de Bruton, que cursa con agammaglobulinemia por falta de linfocitos B maduros.

En la base molecular de esta enfermedad, hay mutaciones en el gen BTKes¹⁶.

La tirosin-kinasa Bruton, es una proteína citoplasmática tirosin-kinasa, que contiene varios dominios, entre los que se encuentran los dominios PH (homólogos Pleckstrin)¹⁷.

La vía fosfoinositolkinasa (PI-3kinasa) transduce señales para la función de los linfocitos, que generan el fosfolípido PIP3 en la membrana plasmática, para reclutar proteínas que contienen los dominios PH (homólogos Pleckstrin). La interacción del dominio PH-PIP3 lleva a una rápida propagación de las señales de la vía fosfoinositol 3-kinasa¹⁸.

La kinasa AKT es un efector clave del fosfolípido PIP3, que unido al dominio PH, median procesos celulares vitales como la supervivencia, activación y diferenciación de los linfocitos. Además el AKT está frecuentemente hiperactivado en cánceres humanos.

El dominio AKT-PH se asocia con el dominio kinasa (kd). Las uniones de los dominios PH con los dominios kinasa (Kd) son importantes para mantener un estado inactivo al AKT.

La mutación del dominio PH en el receptor serina threonina-kinasa altera la interacción del dominio PH, produciendo una activación constitutiva del AKT¹⁹.

Al igual que ocurre en el síndrome de Bruton una alteración en el dominio PH podría ocurrir en la (IDCV).

En nuestro trabajo, el (Ccs) AKT1 fue de 8,1 en el caso nº 19 de carcinoma papilar intramucosa, más abundante en el tejido sano, que en el tejido tumoral. Ésto podría reflejar una hiperactivación constitutiva del AKT1, para activar y diferenciar a los linfocitos, para producir inmunoglobulina.

En los otros dos tumores nº18 y 20, los valores de los Ccs están amortiguados, con inhibición progresiva de los valores del AKT1, indicándonos la progresión tumoral y empeoramiento del pronóstico, con un grado de agotamiento de la producción constitutiva del AKT1, en el tejido sano y tumoral.

La incidencia de metástasis en los ganglios linfáticos del carcinoma gástrico intramucoso es del 3,5%. La invasión linfática, la ulceración histológica del tumor y el tamaño mayor (≥ 30 mm), fueron factores de riesgo independientes, que predicen metástasis en los ganglios linfáticos regionales²⁰.

El carcinoma intramucoso de células en anillo de sello, tienen un porcentaje de metástasis linfáticas, similar a los carcinomas tubulares pobremente diferenciados y más frecuentes que los tubulares bien diferenciados o moderadamente diferenciados.

De ahí que, el cáncer intramucoso de células en anillo de sello, tiene un mayor riesgo de metástasis en los ganglios linfáticos que los demás tipos histológicos y no deben ser considerados para la resección endoscópica, lo mismo que los tubulares pobremente diferenciados²¹.

Por ello, de los tres tumores que presentamos, el único con criterio para la resección local sería el carcinoma intramucoso papilo-vellositario.

Es llamativo cómo estando los dos tumores intramucosos en el mismo estadio IA, sus (Ccs) son totalmente diferentes, estando probablemente relacionado con los dos diferentes tipos celulares que los componen. Pero del resultado de nuestro análisis, los valores del EGFR1 menores de 1, a través del análisis de regresión múltiple sitúan más a este tumor próximos al grupo 2.

Los Ccs de estas proteínas en el carcinoma intramucoso de células en anillo de sello, ayudan a predecir la evolución tumoral y la posible presencia de metástasis ganglionares, por lo que la resección gástrica y la linfadenectomía, D1, según los criterios de riesgo, sería el tratamiento a realizar.

El adenocarcinoma intestinal infiltrante, moderadamente diferenciado, con invasión-linfática-venosa y perineural, sin metástasis ganglionares, tiene los Ccs de las diferentes proteínas menores a 1, por lo que la resección quirúrgica amplia con linfadenectomía D2, debería ser el procedimiento de elección.

➤ CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO CON DIFERENTE FENOTIPO CELULAR Y ESTADÍO TUMORAL

La neoplasia epitelial gástrica ha sido clasificada según el tipo celular en papilar, tubular, pobremente diferenciado, anillo de sello (sig) y mucinoso (muc). El tipo tubular a su vez, ha sido dividido en bien y moderadamente diferenciado y el pobremente diferenciado en tipo sólido y no sólido. El carcinoma de células en anillo de sello representa del 3,4 al 29% de todos los cánceres gástricos y es más frecuente en personas jóvenes y en mujeres ¹.

Con el fin de mejorar la clasificación del cáncer gástrico, identificar las claves de sus vías de señalización, dianas terapéuticas y biomarcadores, la “Cancer Genome Atlas Research Network”, ha dividido el cáncer gástrico en cuatro subtipos moleculares distintos².

El primer subtipo lo configuran los pacientes infectados por Epstein Barr +. Éstos muestran una alta frecuencia de mutaciones del gen PIK3CA, que codifica la proteína PI3-kinasa (fosfo inositol 3 kinasa), que es esencial para el crecimiento y la división celular.

Los tumores del segundo subtipo tienen alta inestabilidad de microsatélites (MSI).

El tercer subtipo llamado “genómicamente estable”, relacionados con los carcinomas de tipo infiltrante difuso de la clasificación de Lauren, contiene mutaciones frecuentes en un gen llamado “RHOA”, cuyo producto interactúa con otras proteínas celulares para ayudar a las células a que cambien de forma y migren, lo que puede ser importante en el crecimiento del tumor.

Por último, el cuarto subtipo llamados cromosómicamente inestables y relacionados con el adenocarcinoma de tipo intestinal de la clasificación de Lauren, contienen amplificaciones frecuentes de los genes que codifican proteínas para los receptores tirosin-kinasa (RTK-Ras activación) de la membrana celular, dando lugar a una proliferación celular aberrante².

La relación entre el subtipo molecular y el fenotipo celular muestran las siguientes características en el cáncer gástrico. TABLA I.

WHO Class	Total		Molecular Subtype EBV		MSI		GS		CIN	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Mixed	19	6.4	3	15.8%	3	15.8%	3	15.8%	10	52.6%
Mucinous	18	6.1	0	0.0%	7	38.9%	2	11.1%	9	50.0%
Papillary	22	7.5	1	4.5%	4	18.2%	2	9.1%	15	68.2%
Poor cohesive	69	23.4	5	7.2%	6	8.7%	40	58.0%	18	26.1%
Tubular	140	47.5	9	6.4%	35	25.0%	9	6.4%	87	62.1%
Not specified	27	9.2	8	29.6%	9	33.3%	2	7.4%	8	29.6%

EBV: EPSTEIN BARR, MSI: INESTABILIDAD MICROSATÉLITES, GS: ESTABILIDAD GENÓMICA, CIN: INESTABILIDAD CROMOSOMAL.

TABLA I. Relación entre el subtipo molecular y el fenotipo celular
Fuente: Cristescu R².

El adenocarcinoma de células mucinosas presenta inestabilidad cromosomal en un 50 % de los casos, mientras que en el tipo papilar asciende al 68,2%. El 62,1 % de los tubulares y el 52,6% de los mixtos, también presentan inestabilidad cromosomal³.

El adenocarcinoma gástrico mucinoso puede albergar mutaciones del receptor del crecimiento epidérmico EGFR4. El adenocarcinoma gástrico de células en anillo de sello, no tiene peor pronóstico en cuanto a la mortalidad, que otros tipos celulares⁵.

PLANTEAMIENTO

La cuantificación de las proteínas que participan en las vías de señalización celular (EGFR1, PI3K y mTOR) de la carcinogénesis del cáncer gástrico pueden ayudar, a clasificar mejor, en el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la enfermedad.

OBJETIVOS

1.- Cuantificar proteínas de la vía de señalización tirosin kinasa. Hemos elegido para el análisis de cuantificación, la proteína EGFR1 y dos proteínas MAPKs (MK01 y MK03). Mientras que, de la vía PI3K / Akt, mTOR, hemos elegido para su cuantificación el AKT1.

2.- Dado que la rapamicina inhibe a mTORC1 alostéricamente, por unión al receptor intracelular FKBP-12 (FK-506 de unión a la proteína de 12 kd), con la formación de un alto complejo de afinidad trimolecular, que incluye el dominio FRB (FKBP-12 / rapamicina del mTOR), ha sido objetivo de este trabajo determinar la cantidad del FKBP1A en los pacientes con cáncer gástrico avanzado y conocer su posible influencia en la inhibición del mTOR

3.- Investigar la relación entre los cocientes de cuantificación del EGFR, MK03 Y FKBP1A, con los datos clínico- patológicos, estadio tumoral y supervivencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Por metodología de proteómica dirigida, hemos analizado las proteínas implicadas en las vías de señalización.

a.- De la vía con receptores tirosin kinasa (RTKs) que responden al estímulo del EGF, hemos seleccionado para su cuantificación las siguientes proteínas:

P00533/EGFR_HUMAN (Epidermal growth factor receptor), P28482-MK01_HUMAN, P27361- MK03_HUMAN (Mitogen-activated protein kinase 3).

b.- También, de la vía con receptores serine/threonine-protein kinase, de vía PI3K/AKT fosfo inositol 3 kinasa, hemos seleccionado la proteína P31749-AKT1_HUMAN (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase).

c.- Por último de la vía de señalización con receptores TGFβ1 hemos seleccionado la proteína P62942- FKBP1A_HUMAN (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A) con el que se interrelaciona.

Los métodos empleados para la selección y cuantificación de los péptidos, se describen en el capítulo de material y métodos de la tesis doctoral^{12,13}.

ANÁLISIS DE DATOS

El análisis de datos lo hemos realizado agrupando a los pacientes que se encontraban en estadios tumorales III y IV. Además, hemos considerado que las dos secuencias peptídicas del EGFR1 son la misma proteína, habiendo utilizado para la determinación de los cocientes de cuantificación el valor medio de ambos. Si en alguno de ellos el valor fuera N/A, solo se tomó uno de los valores de cuantificación.

Un objetivo de este capítulo es “investigar la relación entre los cocientes de cuantificación de las proteínas EGFR, MK01, MK03, FKBP1A y AKT, con los datos clínico-patológicos, en base a la clasificación por estadio tumoral y a la supervivencia, expresada en meses.

Se utilizan los valores de la simulación para ver “la distancia o grado de discordancia” entre éstos y los estadios proporcionados por el análisis histológico-patológicos y la supervivencia. .

Para ampliar datos ver capítulo análisis de datos en el proyecto de tesis doctoral.

RESULTADOS

En la tabla se muestran los datos de localización tumoral, de las diferentes clasificaciones histopatológicas empleadas y el grado de diferenciación tumoral.

Una vez realizado el análisis anatómico-patológico (p), se procedió a agrupar los tumores, según el estadio tumoral de la clasificación TNM. Además, aquellos pacientes que tienen una “ γ ”, su estadio tumoral es en pacientes que han sido tratados con quimioterapia preoperatoria y cirugía. TABLA II.

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

PACIENTE	HELICOBACTER PYLORI	EPSTEIN BARR	LOCALIZACIÓN	LAUREN-VIENA	BORMANN	WHO-JAPONESA	G
1	ND	ND	ANTRO	DIFUSO	II	POBREMENTE COHESIVO	3
2	ND	ND	ANTRO	INTESTINAL	II	TÚBULO-PAPILAR	2,3
3	ND	ND	INCISURA ANGULARIS	INTESTINAL	II	ND	2
4	ND	ND	CARDIAS SIEWERT II	INTESTINAL	II	TÚBULO-PAPILAR-MUCINOSO	2
5	(-)	ND	ANTRO	INTESTINAL	III	TÚBULO-PAPILAR	3
6	ND	ND	ANTRO	INTESTINAL	II	TÚBULO-MUCINOSO	2
7	ND	ND	ANTRO	INDETERMINADO	II	MIXTO (TÚBULO-PAPILAR/ANILLO DE SELLO)	3
8	ND	ND	CUERPO ANTRO	INTESTINAL	I	TÚBULO-PAPILAR	2
9	(+)	ND	ANTRO	INTESTINAL	II	PAPILAR	2
10	ND	ND	ANTRO	INDETERMINADO	II	MIXTO (TÚBULO-PAPILAR/POBREMENTE COHESIONADO)	3
11	ND	ND	CUERPO	INDETERMINADO	II	MIXTO ADENONEUROENDOCRINO	1_2_3
12	ND	ND	ANTRO	INTESTINAL	III	MUCINOSO	2
13	ND	ND	ANTRO	DIFUSO	II	POBREMENTE COHESIONADO	3
14	ND	ND	CUERPO	INTESTINAL	II	TUBULAR	2
15	ND	ND	ANTRO	INTESTINAL	II	TUBULAR	2
16	ND	ND	CUERPO	INTESTINAL	II	MUCINOSO	2
17	ND	(-)	ANTRO	INTESTINAL	I	TÚBULO-PAPILAR INFILTRANTE	3
18 (*)	(-)	ND	CUERPO	INTESTINAL	II	PAPILAR ULCERATIVO-INFILTRANTE	2
19 (*)	(-)	ND	ANTRO	INTRAMUCOSO	I	PAPILO-VELLOSITARIO	1
20 (*)	(-)	ND	CUERPO ANTRO	INTRAMUCOSO	I	ANILLO SELLO	1
21	ND	ND	FUNDUS CUERPO	INTESTINAL	II	INFILTRANTE	2

ND : NO DESCRITO. (-) AUSENTE. (+) PRESENTE. (*) CATALOGADO COMO PACIENTE 18-19-20: SE REFIERE A UNA PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS.

TABLA II. Datos histopatológicos de los pacientes incluidos en el estudio.

PACIENTE	TNM	ESTADÍO UICC
1	pT3N0M0 LVi- PN-	IIA
2	pT4aN2M0 LVi- PN+	IIIB
3	pT3N2M0 LVi+ PN+	IIIA
4	pT3N2M0 LVi+ PN+	IIIA
5	pT4aN3aM0 LVi+ PN+	IIIC
6	pT1bN0M0 LVi- PN-	IA
7	pT4aN3bM0 LVi+ PN+	IIIC
8	pT2N1M0 LVi+ PN-	IIA
9	pT3N0M0 LVi- PN-	IIA
10	pT3N1M0 LVi- PN+	IIB
11	pT3N0M1 LVi- PN-	IV
12	<u>γT3N0M0 LVi- PN-</u>	IIA
13	<u>γT3N2M0 LVi- PN-</u>	IIIA
14	<u>γT3N3aM0 LVi+ PN-</u>	IIIB
15	<u>γT3N0M0 LVi- PN-</u>	IIA
16	pT2N0M0 LVi- PN-	IB
17	pT2N2M0 LVi+ PN-	IIB
18(*)	pT4aN0M0 LVi+ PN+	IIB
19(*)	pT1N0M0 LVi PN-	IA
20(*)	pT1N0M0 LVi- PN-	IA
21	pT2N1M0 LVi- PN-	IIA

ESTADÍOS ANATOMO-PATOLÓGICOS DE LOS TUMORES DE LOS 19 PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO. (PACIENTES MARCADOS pTNM) SE CORRESPONDEN CON ESTADÍO ANATOMO-PATOLÓGICO SIN TRATAMIENTO PREVIO. (PACIENTES MARCADOS EN NEGRITA/SUBRAYADO/γ-TNM) HAN RECIBIDO NEOADYUVANCIA. (*) CATALOGADA COMO Nª18, 19 Y 20, SE REFIERE A UNA PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS.

TABLA III. Clasificación TNM. Estadío UICC.

Agrupados según el tipo histopatológico y el estadío tumoral, se muestran a continuación el n° de paciente en estadío III y IV, y los cocientes de cuantificación de las 5 proteínas analizadas. TABLA IV.

PROTEÓMICA DIRIGIDA. COCIENTES DE CUANTIFICACIÓN PROTEICA EN RELACIÓN CON CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS, ESTADÍO TUMORAL III y IV									
2	3	11	10	5	13	4	14	7	
ADENOCARCINOMA INTESTINAL TUBULO-PAPILAR MODERADO- POBREMENTE DIFERENCIADO LVi- PN+ T4aN2M0 IIIB	ADENOCARCINOMA INTESTINAL MODERADAMENTE DIFERENCIADO Lvi+ PN+ T3N2M0 IIIA	ADENOCARCINOMA INDETERMINADO MIXTO ADENONEUROENDOCRINO BIEN, MODERADO Y POBREMENTE DIFERENCIADO LVi- PN- T3N0M1 IV	ADENOCARCINOMA INDETERMINADO TUBULO- PAPILAR POBREMENTE DIFERENCIADO LVi- PN+ METASTASIS GANGLIONARES T3N1M0 IIB	ADENOCARCINOMA INTESTINAL TUBULO PAPILAR POBREMENTE DIFERENCIADO METASTASIS GANGLIONAR E IMPLANTES EN LA GRASA LVi+ PN+ T4aN3aM0 IIIC	ADENOCARCINOMA INFILTRANTE DIFUSO POBREMENTE DIFERENCIADO METÁSTASIS GANGLIONARES LVi- PN- γT3N2M0 IIIA	ADENOCARCINOMA INTESTINAL MIXTO TUBULO PAPILAR MUCINOSO MODERADAMENTE DIFERENCIADO Lvi+ PN+ T3N2M0 IIIA	ADENOCARCINOMA INTESTINAL TUBULAR MODERADAMENTE DIFERENCIADO METÁSTASIS GANGLIONARES LVi+ PN- γT3N3aM0 IIIB	ADENOCARCINOMA INTESTINAL INDETERMINADO TUBULO-PAPILAR /ANILLO DE SELLO MODERADO- POBREMENTE DIFERENCIADO T4aN3bM0 LVi+ PN+ IIIC	
EGFR1	0,8	1,09	0,74	1,16	1,26	1,48	2,24	2,9	2,9
MK01	1,62	1,72	0,8	0,73	0,43	0,57	N/A	N/A	1,11
MK03	2,24	0,48	1,7	0,64	3,44	1,29	1,63	1,28	7,74
FKBP1A	0,76	0,81	0,87	0,45	2,36	1,3	1,2	N/A	2,43
AKT1	No determinado	No determinado	0,69	1,36	No determinado	1,43	No determinado	No determinado	No determinado
SUPERVIVENCIA meses	29	28	19	19	27	18	27	17	25 (fallecido)

#N/A: NO DETECTABLE. (-) CUANTIFICACIÓN NO DETERMINADA.

TABLA IV. Pacientes con cáncer gástrico: relación tipo anatomo-patológico, estadio tumoral III-IV de la clasificación TNM, cocientes de cuantificación de las proteínas analizadas y supervivencia en meses.

Así mismo en la TABLA V se observan los pacientes y sus estadíos en este caso referidos a los estadíos III y IV, con los meses de supervivencia.

PRONÓSTICO			
PACIENTE	ESTADÍO UICC	SUPERVIVENCIA DICIEMBRE 2014	ÉXITUS
1	IIA	30 MESES	NO
2	IIIB	29 MESES	NO
3	IIIA	28 MESES	NO
4	IIIA	27 MESES	NO
5	IIIC	27 MESES	NO
6	IA	26 MESES	NO
7	IIIC	25 MESES	11/06/2013
8	IIA	25 MESES	NO
9	IIA	25 MESES	NO
10	IIB	19 MESES	NO
11	IV	19 MESES	NO
12	IIA	18 MESES	26/09/2014
13	IIIA	18 MESES	NO
14	IIIB	17 MESES	NO
15	IIA	15 MESES	NO
16	IB	13 MESES	NO
17	IIB	7 MESES	NO
18-19-20 (*)	IIB-IA-IA	6 MESES	NO
21	IIA	14 MESES	NO

TABLA V. Pronóstico: Estadío UICC y supervivencia en meses.

En relación con la supervivencia, señalar que el único paciente fallecido al cierre de la serie (diciembre 2014) en estadío III-IV, fue el nº 7, a los 25 meses del diagnóstico.

Los pacientes nº 13 y 14 en estadío IIIA y IIIB, que fueron tratados con EOX en el preoperatorio, son presentados en el análisis de datos conjuntamente con los datos de otros pacientes tratados con quimioterapia.

En el análisis de este grupo hemos incluido al paciente nº10, a pesar de que su estadío tumoral es un IIB, pero sus cocientes de cuantificación en relación con las proteínas

analizadas están entre los Cc de estadio III-IV. La mayoría de estos tumores son túbulo papilares, pobremente diferenciados, con metástasis ganglionares.

En nuestra serie de 19 pacientes con diferentes tipos de cáncer gástrico, no hay correlación entre los cocientes de cuantificación de las proteínas analizadas y los tipos morfológicos de cáncer gástrico de la clasificación de Lauren. Todos los tumores, menos el tumor neuroendocrino, mostraron metástasis ganglionares, si bien este último tenía metástasis a distancia.

En la serie que presentamos, la anatomía patológica del paciente nº 7, fue de adenocarcinoma indeterminado con células en anillo de sello, pT4aN3bM0 LVi+PN+, IIIC. Esta paciente inicialmente no recibió quimioterapia adyuvante postoperatoria. A los 3 meses de la intervención quirúrgica presenta datos de progresión de la enfermedad, siendo tratado con capecitabina y oxaliplatino, pasando a un esquema con Taxol 2 meses después, falleciendo a los 25 meses de la intervención quirúrgica.

APLICACIÓN DEL ANÁLISIS POR COMPONENTES PRINCIPALES DEL COCIENTE DE CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN FUNCIÓN DEL ESTADÍO TUMORAL

Aplicando las autofunciones se obtiene por simulación el cociente de cuantificación de cada uno de las proteínas, en un estadio tumoral dado. Este valor es “representativo y caracteriza” al conjunto de pacientes con cáncer gástrico.

Los valores obtenidos aplicando las autofunciones explican más del 98% de la variabilidad de la muestra. En consecuencia, desde un punto de vista estadístico es la mejor representación que se puede obtener de la muestra de datos utilizada.

Se utilizan los valores de la simulación para ver “la distancia o grado de discordancia” entre éstos y los estadios tumorales proporcionados por el análisis histológico patológico.

Para ello, hemos cogido un subconjunto de la muestra completa que caracteriza a unos pacientes específicos tal y como se ha explicado en los apartados anteriores.

En concreto hemos trabajado con los siguientes pacientes: 2, 3, 4, 5, 7, 10 y 11.

De estos pacientes disponemos de una descripción detallada del tipo histopatológico de cáncer gástrico, del estadio tumoral y de la supervivencia en meses, Además, de los cocientes de cuantificación de las proteínas seleccionadas determinados por cromatografía líquida y espectrometría de masas (ver TABLAS descritas previamente).

Este último dato adicional es relevante, ya que añade un nuevo contraste a la aplicación de las autofunciones, que se han obtenido utilizando todos los datos de todos los pacientes.

Hay que reconocer que el método de trabajo no es el ideal, es decir, obtener las autofunciones con una parte de la muestra y verificar la utilidad de la simulación con los datos restantes. El número de datos válidos disponible es pequeño, por lo que no sería recomendable aplicar esa técnica.

Por ello, en este caso se ha optado por comparar los datos obtenidos por ambas técnicas, para pacientes concretos y analizar la concordancia o discordancia a la luz de la evolución del paciente.

De los siete pacientes verificados, en cinco coinciden los diagnósticos “proteómico e histológico”, y en dos discrepan. Al analizar la evolución de estos tres pacientes, el diagnóstico proteómico parece ser el más acertado.

SIMULACIÓN DE LOS COCIENTES DE CUANTIFICACIÓN.

En las FIGURAS 1-2-3 se representa la variación de los cocientes de cuantificación de las proteínas EGFR1, MK03 y FKBP1A en función del estadio tumoral obtenido mediante la superposición lineal de las cinco primeras autofunciones, que explica más del 98% de la variabilidad de la muestra.

También se incluye en cada una de las figuras los valores de cada uno de los pacientes (cociente de cuantificación proteica, eje de ordenadas, frente a estadio tumoral según el estudio histopatológico, eje de abscisas).

Finalmente se incluye una flecha que indica el sentido del desplazamiento del dato para hacer concordar su valor del cociente de cuantificación, con el de la curva de simulación.

FIGURAS 1-2-3: Variación de los datos relativos a los Ccs. de la proteína EGFR1, MK03 y FKBP1A, en función del estadio tumoral. El punto verde indica el Cc del EGFR1 analizado por metodología proteómica en un paciente determinado. El punto azul es el valor del Cc simulado con 5 autofunciones. La línea roja continua es la poligonal de ajuste y por último la flecha negra, que indica el sentido del desplazamiento del dato, para hacer coincidir el valor del Cc, con el de la curva de simulación.

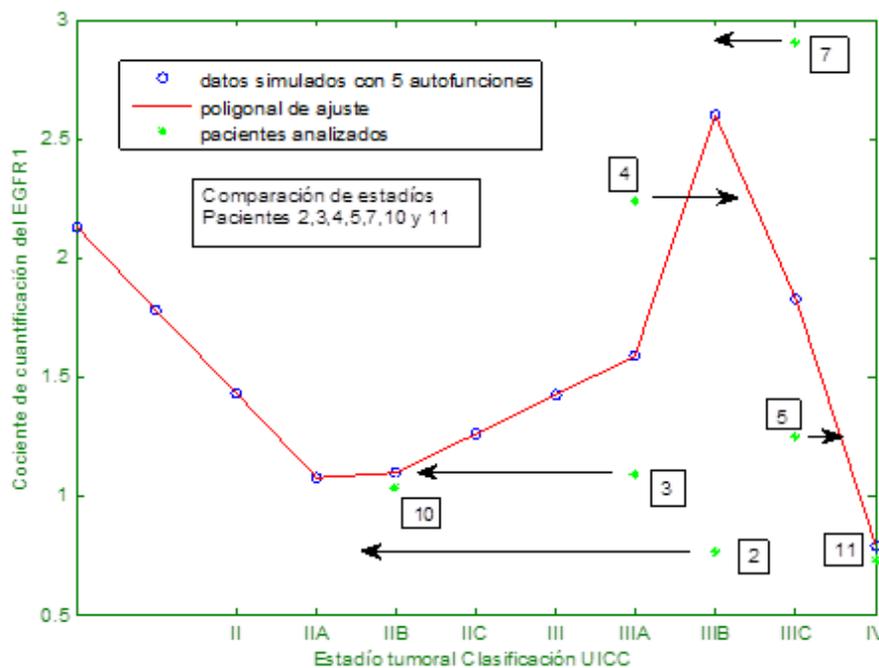


FIGURA 1. Cociente de cuantificación de EGFR1 en relación al estadio tumoral según la clasificación UICC.

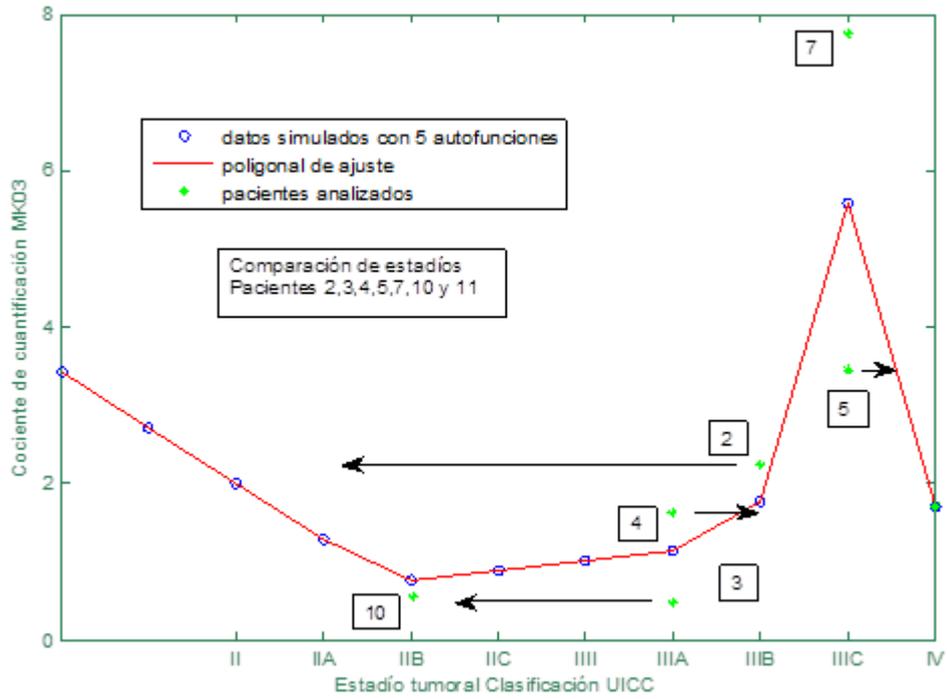


FIGURA 2. Cociente de cuantificación de MK03 en relación al estadio tumoral según la clasificación UICC.

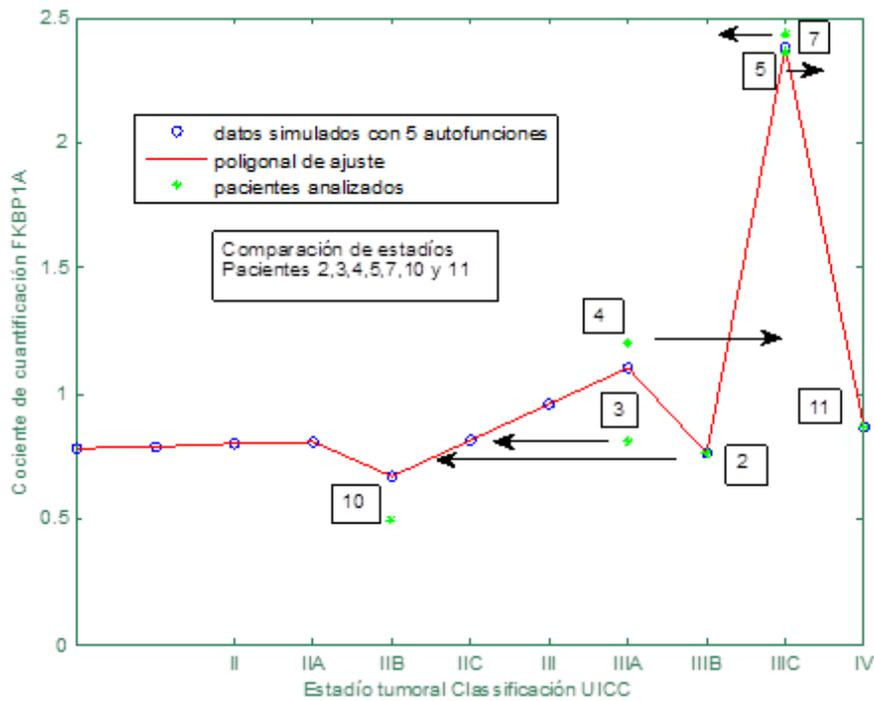


FIGURA 3. Cociente de cuantificación de FKBP1A en relación al estadio tumoral según la clasificación UICC.

Al dato desplazado sobre la curva le corresponde, o no, un estadio tumoral diferente al adjudicado por el estudio histológico. El diagnóstico del nuevo estadio, se hace teniendo en cuenta las tres curvas de simulación para los tres péptidos.

En la TABLA VI descrita a continuación, se refleja el resultado obtenido.

Paciente	Estadio tumoral histopatológico	Estadio tumoral simulado	Evolución paciente
2	IIIB	IIA	favorable
3	IIIA	IIB	favorable
4	IIIA	IIIB/C	fallecido
5	IIC	IIC/IV	desfavorable
7	IIC	IIB	favorable
10	IIB	IIB	similar
11	IV	IV	similar

TABLA VI. Estadio histopatológico, simulado y evolución del paciente.

DISCUSIÓN

Después de la resección curativa del cáncer gástrico, la expresión positiva del EGFR, pero no la positividad del HER2, se asocia con pobres resultados, en pacientes en estadios II/III¹⁵.

La alta expresión del EGFR se correlaciona positivamente con la localización y tamaño tumoral, grado de diferenciación celular, profundidad de invasión, metástasis linfáticas, estadio TNM. Tumores mayores de 5 cm, localizados en la parte distal, pobremente diferenciados, con invasión hasta la serosa y con metástasis linfáticas, en estadio III-IV, tienen una mayor expresión del EGFR.

La tasa de amplificación del HER1 descrito en la literatura es baja (3% a 7%), aunque la tasa de la sobreexpresión de HER1 a nivel de la membrana es del 27% a 44% (2+ y 3+). Tanto la sobreexpresión de la proteína HER1 y la amplificación del HER1 parecen predecir un mal resultado de supervivencia¹⁶.

La sobreexpresión del EGFR o el aumento del número de copias del gen EGFR están asociados con un cáncer gástrico avanzado, con presencia metástasis en ganglios linfáticos y pobremente diferenciados, por lo que su expresión se relaciona con un pronóstico desfavorable. El gen EGFR y el estado de su proteína, deben ser evaluados para poder

interpretar los resultados de los ensayos clínicos que utilizan anticuerpos contra el EGFR¹⁷.

El análisis de la supervivencia en estos pacientes, demostró que el porcentaje de supervivencia de pacientes con cáncer gástrico, con expresión negativa del EGFR, fue mayor que los pacientes con cáncer gástrico con expresión positiva¹⁸.

En un estudio que correlaciona este biomarcador con las características clínico-patológicas y la supervivencia de pacientes con cáncer gástrico, la tasa de positividad general de EGFR fue del 63,4% de los cuales el 46,7% fue citoplasmática y el 16,7% en la membrana celular¹⁹.

El autor aduce, que la razón principal de esta amplia distribución puede ser la falta de un estándar para la evaluación de EGFR, razones técnicas, incluidas las diferencias en los kits que se utilizan, lo que puede afectar a los resultados. La mayoría de los datos publicados se han realizado de acuerdo con la expresión del EGFR en la membrana celular¹⁹.

De los datos que presentamos en el análisis de los pacientes para el estadio III y IV con cáncer gástrico, mediante metodología proteómica dirigida, la determinación de las secuencias peptídicas SPSDCCHNQCAAGCTGPR y IPLENLQIIR del EGFR1, propias de dominios extracelulares de la membrana e intracelulares respectivamente, no permite identificar el nivel de la participación del EGFR1 según el péptido cuantificado en la célula, y si éste es mayor o menor en el tejido sano o tumoral. Con la técnica empleada, los dos péptidos son la misma proteína y sus valores son similares.

En relación con el análisis de componentes, la posición de los pacientes (2), (3) y sus respectivos Ccs (experimentales y simulados) y su evolución clínica en meses, parece confirmar que el estadio tumoral que se les otorgó inicialmente, era más evolucionado de lo que con esta metodología posteriormente se ha demostrado.

Por el contrario en el caso del paciente (4), con el diagnóstico histopatológico se le adjudicó un estadio más bajo que el que luego se ha deducido con esta metodología. Una situación parecida se da con el paciente (5), que está más cerca del estadio IV que del IIIC, otorgado inicialmente.

El paciente (7) fue estadiado en IIIC, sin embargo los cocientes de cuantificación de las tres proteínas analizadas parecen indicar que, su estadio tumoral se ubica mejor como un IIIB.

En el caso del paciente (10) el diagnóstico “proteómico-histológico” coincide razonablemente bien. El paciente (11), es el único caso en estadio IV por lo que no puede ser utilizado en la comparación.

El resultado de la comparación es esperanzador y permite anticipar que los cocientes de cuantificación experimentales pueden ser una información adicional del paciente que ayude a la verificación, el seguimiento y el pronóstico de la evolución más probable de la enfermedad.

➤ **PROTEOMICA DIRIGIDA EN EL CANCER GÁSTRICO. RELACIÓN CON LA CLASIFICACIÓN MOLECULAR. GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO. NIVELES DE EVIDENCIA Y OBJETIVOS DE MEJORA**

INTRODUCCIÓN

La medicina personalizada y de precisión combina datos clínico-patológicos y de tratamiento, con perfiles moleculares, para crear un diagnóstico, pronóstico y estrategias terapéuticas adaptadas a las necesidades exactas de cada paciente¹.

Un pensamiento clave en el modelo que implementa la estrategia práctica de la cirugía “personalizada y de precisión”, es el conocimiento de la complejidad molecular de la iniciación y progresión tumoral².

Forman parte de este proceso molecular las vías de señalización con receptores tirosin kinasa.

De ellas, las vías ErbB-Her contienen varios módulos que están interconectados y solapados. Estos módulos incluyen las vías de señalización RAS-RAF-MEK-ERK1/2, la vía fosfatidilinositol 3- kinasa PIK/AKT (PKB) y la vía fosfolipasa C (PLC gamma).

La vía RAS-RAF-MEK-ERK1/2 y la vía fosfolipasa C (PLC gamma) median la proliferación celular, mientras que la vía de la fosfatidilinositol 3- kinasa PIK/AKT (PKB) media la supervivencia celular. Estas y otras señales ErbB modulan y participan además en la angiogénesis, adhesión celular, motilidad celular, desarrollo y organogénesis³.

Además, en la clasificación molecular basada en los patrones de expresión génica, se han identificado tres subtipos de adenocarcinoma gástrico, denominados mesenquimal, proliferativo, y metabólico⁴.

Con el fin de mejorar la clasificación del cáncer gástrico, identificar las claves de sus vías de señalización, identificar biomarcadores y dianas terapéuticas, el “Cancer Genome Atlas Research Network”, ha dividido el cáncer gástrico en cuatro subtipos moleculares distintos, pacientes Ebstein Barr +, con alta inestabilidad de los microsatélites (MSI), los llamados genómicamente estables y los cromosómicamente inestables⁵.

Por otro lado, recientemente se han publicado las directrices conjuntas para el manejo del cáncer gástrico (CG), analizando la evidencia de las recomendaciones⁶.

En el capítulo de análisis estadístico de la tesis doctoral, se comprobó que los valores de los Ccs (cocientes de cuantificación SA/TU) de las diferentes proteínas (excepto para el FKBP1A), tienen un comportamiento similar, para cada uno de los estadios tumorales de la clasificación TNM. FIGURA 1.

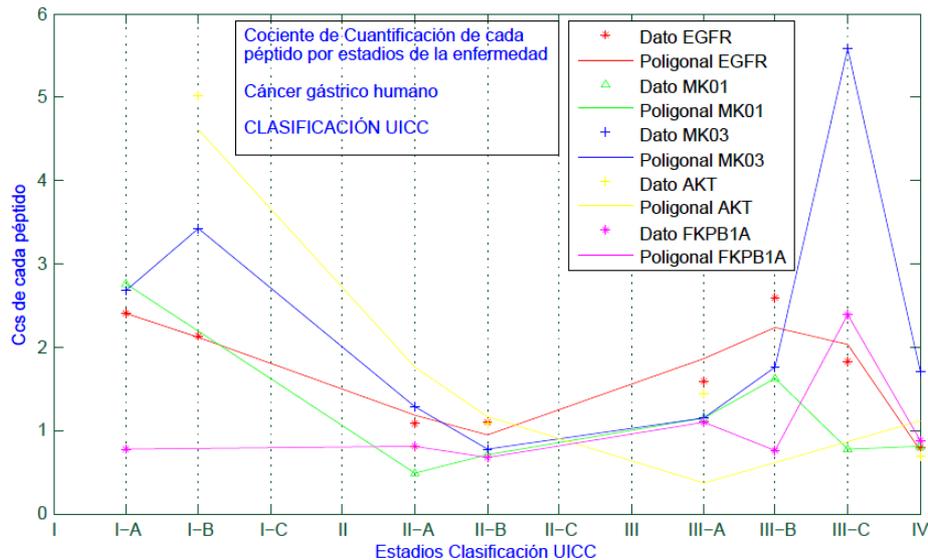


FIGURA 1. Valores medios de los cocientes de cuantificación en función de los estadios del paciente.

Se pueden identificar cuatro regiones de comportamiento del valor de los Ccs de cada una de las proteínas: decaimiento, valor mínimo, crecimiento y dominio tumoral (ver descripción en el capítulo análisis de datos).

La región de decaimiento se corresponde con los estadios I-A/II-A, la región de valores mínimos, con los estadios II-A/II-B, la región de crecimiento con los estadios II-C/III-C y por último la región de "dominio tumoral" con los estadios III-C/IV.

Este patrón de comportamiento de los valores medios de los Ccs, puede ser de aplicación en la práctica clínica.

En este capítulo se analizan los datos clínicos, anatomía patológica, valores de los Cc y el comportamiento de estos datos en pacientes tratados solo con cirugía y los que recibieron tratamiento neoadyuvante con quimioterapia y cirugía.

PLANTEAMIENTO

En el momento actual, las plataformas omics con tecnología genómica de alto rendimiento y/o tecnología proteómica, proporcionan una oportunidad única para identificar y generar hipótesis acerca de las enfermedades y dar respuesta a la eficacia de los tratamientos médicos, frente a nuevos biomarcadores.

Por ello, en este proyecto nos hemos planteado conocer si la proteómica cuantitativa de determinadas proteínas, implicadas en diferentes vías de señalización molecular, puede contribuir a orientar con más precisión el tratamiento médico y quirúrgico de los pacientes con cáncer gástrico.

OBJETIVOS

Son los objetivos de nuestro proyecto.

- 1.- Estratificar y clasificar los cánceres gástricos tratados quirúrgicamente en base a criterios clínicos, anatómo-patológicos y moleculares.
- 2.- Definir la metodología proteómica a emplear en muestras biológicas heterogéneas, como son las del tejido gástrico humano y realizar proteómica cuantitativa de las proteínas implicadas en diferentes vías de señalización molecular.
- 3.- Analizar sus implicaciones en las decisiones terapéuticas médicas y quirúrgicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material corresponde al estómago de 19 pacientes intervenidos quirúrgicamente por una neoplasia gástrica epitelial, en la que se han recogido muestras de la zona tumoral (T) y como control, una zona sana del mismo estómago alejada del/los tumores (SA).

Las vías de señalización seleccionadas para el análisis funcional de las proteínas en los diferentes tumores, fueron la vía RAS-RAF-MEK-ERK1/2 y la vía fosfatidilinositol 3- kinasa PIK/AKT (PKB).

En las muestras, hemos cuantificado los niveles de expresión de las proteínas:

P00533/EGFR_HUMAN, en sus dos secuencias peptídicas: SPSDCCHNQCAAGCTGPR y IPLENLQIIR

P28482/MK01_HUMAN, secuencia peptídica "VADPDHDHTGFLTEYVATR"

P27361/MK03_HUMAN, secuencia peptídica "RTEGVGPGVPGEVEMVK"

P62942- FKB1A_HUMAN secuencia peptídica GWEEGVAQMSVGQR.

P31749/AKT1-human, secuencia peptídica "EEWTTAIQTVADGLK"

MÉTODO

En el capítulo correspondiente al proyecto de tesis doctoral^{7,8,9,10}.

RESULTADOS

CIRUGÍA

Las técnicas quirúrgicas empleadas para el tratamiento del cáncer gástrico en los pacientes de la serie, han sido las siguientes. TABLA I.

PACIENTE	DÍA INTERVENCIÓN	GASTRECTOMÍA	LINFADENECTOMÍA	COMPLICACIÓN POSTOPERATORIA	ESTADÍO UICC
1	27/06/2012	SUBTOTAL + Y ROUX LAPAROSCÓPICA RECONVERTIDA	1	NO	IIA
2	24/07/2012	SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	2	NO	IIIB
3	23/08/2012	SUBTOTAL + Y ROUX LAPAROSCÓPICA RECONVERTIDA	1B	NO	IIIA
4	04/09/2012	TOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	2	NO	IIIA
5	13/09/2012	TOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	1B	NO	IIIC
6	23/10/2012	SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	1B	REINTERVENCIÓN SANGRADO LÍNEA GRAPAS PIE DE ASA	IA
7	13/11/2012	SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	1B	REINTERVENCIÓN ESPLENECTOMÍA	IIIC
8	20/11/2012	SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	1B	NO	IIA
9	29/11/2012	SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	1B	NO	IIA
10	15/05/2013	SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	2	NO	IIIB
11	21/05/2013	TOTAL + Y ROUX LAPAROTÓMICA + ESPLENECTOMÍA	2-RAÍZ MESO YEYUNO	NO	IV
12	<u>18/06/2013</u>	<u>SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA</u>	1	NO	IIA
13	<u>19/06/2013</u>	<u>SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA</u>	2	NO	IIIA
14	<u>02/07/2013</u>	<u>TOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA</u>	1B	NO	IIIB
15	<u>02/08/2013</u>	<u>SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA</u>	2	NO	IIA
16	12/11/2013	SUBTOTAL + Y ROUX VÍDEOASISTIDA	1	NO	IB
17	27/05/2014	SUBTOTAL + Y ROUX LAPAROTÓMICA	1	NO	IIIB
18-19-20 (*)	09/06/2014	TOTAL + Y ROUX LAPAROTÓMICA	2	REINTERVENCIÓN POR FUGA MUÑÓN DUODENAL-DRENAJE PERCUTÁNEO	IIIB-IA-IA
21	29/10/2013	TOTAL + Y ROUX LAPAROTÓMICA + ESPLENECTOMÍA	2	NO	IIA

(PACIENTES 12-13-14-15 MARCADOS EN NEGRITA Y SUBRAYADO) HAN RECIBIDO ESQUEMA DE NEOADYUVANCIA. (*) CATALOGADA COMO N°18, 19 Y 20, SE REFIERE A UNA PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS.

TABLA I. Tratamiento quirúrgicos realizados en los pacientes incluidos en el estudio.

La linfadenectomía D2 fue realizada a 8 pacientes (n° 2,4,10,11,13,15,18-19-20, 21), mientras que una linfadenectomía D1 fue realizada en 11 pacientes (1,3,5,6,7,8,9,12,14,16,17). En el transcurso de la gastrectomía-linfadenectomía fueron realizadas 2 esplenectomías. En los pacientes 10, 17, 18-19-20 y 21, fue asociada al procedimiento una omentectomía completa.

La resección gástrica realizada fue subtotal en 13 pacientes, gastrectomía total en 6, vídeoasistida en 13, laparoscópica reconvertida en 2 y laparotómica en 4.

La reconstrucción del tránsito intestinal fue realizada en todos los casos mediante una Y de Roux, realizando una anastomosis extracorpórea en los casos vídeoasistidos.

En relación a los tipos histopatológicos de la clasificación de Lauren encontrados en la serie, fueron: tipo intestinal 16, infiltrante difuso en 2 y de tipo indeterminado en 3.

El estadio tumoral, una vez realizado el análisis anatómo-patológico (p), es mostrado en la TABLA II. Además, se indican con una “ γ ”, aquellos pacientes que han sido tratados con quimioterapia preoperatoria y cirugía.

PACIENTE	TNM	ESTADÍO UICC
1	pT3N0M0 LVi- PN-	IIA
2	pT4aN2M0 LVi- PN+	IIIB
3	pT3N2M0 LVi+ PN+	IIIA
4	pT3N2M0 LVi+ PN+	IIIA
5	pT4aN3aM0 LVi+ PN+	IIIC
6	pT1bN0M0 LVi- PN-	IA
7	pT4aN3bM0 LVi+ PN+	IIIC
8	pT2N1M0 LVi+ PN-	IIA
9	pT3N0M0 LVi- PN-	IIA
10	pT3N1M0 LVi- PN+	IIB
11	pT3N0M1 LVi- PN-	IV
12	<u>γT3N0M0 LVi- PN-</u>	IIA
13	<u>γT3N2M0 LVi- PN-</u>	IIIA
14	<u>γT3N3aM0 LVi+ PN-</u>	IIIB
15	<u>γT3N0M0 LVi- PN-</u>	IIA
16	pT2N0M0 LVi- PN-	IB
17	pT2N2M0 LVi+ PN-	IIB
18(*)	pT4aN0M0 LVi+ PN+	IIB
19(*)	pT1N0M0 LVi PN-	IA
20(*)	pT1N0M0 LVi- PN-	IA
21	pT2N1M0 LVi- PN-	IIA

ESTADÍOS ANATOMO-PATOLÓGICOS DE LOS TUMORES DE LOS 19 PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO. (PACIENTES MARCADOS p-TNM) SE CORRESPONDEN CON ESTADÍO ANATOMO-PATOLÓGICO SIN TRATAMIENTO PREVIO. (PACIENTES MARCADOS EN NEGRITA/SUBRAYADO/γ-TNM) HAN RECIBIDO NEOADYUVANCIA. (*) CATALOGADA COMO N^o18, 19 Y 20, SE REFIERE A UNA PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS.

TABLA II. Clasificación TNM. Estadío UICC.

La distribución de los pacientes en relación a su estadío tumoral y al tipo de linfadenectomía realizada, fue la siguiente: linfadenectomía D2: (n^o 2-IIIB, 4-IIIA, 10-IIB, 11-IV, 13-IIIA, 15-IIA, 18-19-20-IIA-IA-IA, 21-IIA). Linfadenectomía D1: (n^o1-IIA, 3-IIIA, 5-IIIC, 6- IA, 7-IIIC, 8-IIA, 9-IIA, 12-IIA, 14-IIIB, 16-IB, 17-IIB)

NEOADYUVANCIA Y ADYUVANCIA CON RADIOTERAPIA. SUPERVIVENCIA

No existe todavía ningún régimen de tratamiento universalmente aceptado para el cáncer gástrico y diferentes países y centros ofrecen opciones de tratamiento diferentes. Los pacientes en los EE.UU. con cáncer gástrico suelen ser tratados con quimio-radioterapia adyuvante, mientras que en Europa, son tratados con quimioterapia perioperatoria; en Japón el cáncer gástrico la estandarización de quimioterapia adyuvante, es reciente.

La siguiente tabla muestra los pacientes de nuestra serie tratados con neoadyuvancia (quimioterapia), adyuvancia (radioterapia y quimioterapia) y la supervivencia en meses. TABLA III.

	NEOADYUVANCIA	ADYUVANCIA		PRONÓSTICO
	QUIMIOTERAPIA	QUIMIOTERAPIA	RADIOTERAPIA	SUPERVIVENCIA DIC 2014
1	NO	NO	NO	30 MESES
2	NO	5 FLUOROURACILO + LEUCOVORIN X 6	45Gy	29 MESES
3	NO	5 FLUOROURACILO + LEUCOVORIN X 6	45Gy	28 MESES
4	NO	5 FLUOROURACILO + LEUCOVORIN X 6	45Gy	27 MESES
5	NO	5 FLUOROURACILO + LEUCOVORIN (80%) X 6	45Gy	27 MESES
6	NO	NO	NO	26 MESES
7	NO	NO	NO	25 MESES
8	NO	NO	NO	25 MESES
9	NO	NO	NO	25 MESES
10	NO	5 FLUOROURACILO + LEUCOVORIN X 6	45Gy	19 MESES
11	NO	5 FLUOROURACILO + FOLINATO CÁLCICO X 6	DESESTIMADA	19 MESES
12	EOX X 3	NO	NO	18 MESES
13	EOX X 3	EOX X 3	NO	18 MESES
14	EOX X 3	EOX X 3	NO	17 MESES
15	EOX X 3	EOX X 3	NO	15 MESES
16	NO	NO	NO	13 MESES
17	NO	DESESTIMADA X CIRROSIS	DESESTIMADA	7 MESES
18- 19- 20	NO	NO	NO	6 MESES
21	NO	NO	NO	14 MESES

TABLA III. Pacientes tratados con neoadyuvancia (quimioterapia), adyuvancia (radioterapia y quimioterapia) y supervivencia en meses a cierre del estudio en diciembre 2014.

Los pacientes nº 12, 13, 14 y 15, fueron los tratados con EOX x3 ciclos, en forma de quimioterapia preoperatoria, completando la adyuvancia con el mismo esquema todos ellos, menos el nº 12 por morbilidad asociada. Esquema de tratamiento sugerido por el ensayo holandés CRITICS (NCT00407186)¹¹.

La pauta de EOX empleada en ciclos cada 21 días fue, con Epirrubicina 50 mg/m², intravenoso, día 1, Oxaliplatino 130 mg/m², intravenoso (infusión de 2 horas), día 1, Capecitabina 625 mg/m², vía oral, cada 12 horas, en forma continua.

Los efectos adversos con el tratamiento con EOX incluyen: neutropenia, astenia y alopecia, diarrea, náuseas y vómitos, trombocitopenia, neutropenia, síndrome mano-pie, estomatitis¹².

A continuación son mostrados los pacientes de nuestra serie, que siendo estadios II y III, no recibieron quimioterapia y los que estando en el mismo estadio, sí fueron tratados con quimioterapia. Se representan, el tipo anatómo-patológico, estadio y los datos de cuantificación de las proteínas analizadas. TABLA IV-V.

PROTEOMICA DIRIGIDA. COCIENTES DE CUANTIFICACIÓN PROTEICA EN RELACIÓN CON CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS (TUBULO PAPILAR, MODERADA-POBREMENTE DIFERENCIADO) ESTADIOS II-III					
Nº 17	2	10	5	7	
ADENOCARCINOMA INTESTINAL INFILTRANTE, TUBULO-PAPILAR, POBREMENTE DIFERENCIADO Y EN LA ZONA MAS PROFUNDA PATRÓN INFILTRATIVO, CON METASTASIS GANGLIONARES LVi+, PN-T2N2M0, IIB	ADENOCARCINOMA INTESTINAL TUBULO-PAPILAR MODERADO-POBREMENTE DIFERENCIADO LVi- PN+ T4aN2M0 IIB	ADENOCARCINOMA INDETERMINADO TUBULO- PAPILAR POBREMENTE DIFERENCIADO LVi- PN+ METASTASIS GANGLIONARES T3N1M0 IIB	ADENOCARCINOMA INTESTINAL TUBULO PAPILAR POBREMENTE DIFERENCIADO METASTASIS GANGLIONAR E IMPLANTES EN LA GRASA LVi+ PN+ T4aN3aM0 IIC	ADENOCARCINOMA INTESTINAL INDETERMINADO TUBULO-PAPILAR /ANILLO DE SELLO MODERADO-POBREMENTE DIFERENCIADO T4aN3bM0 LVi+ PN+ IIC	
EGFR1	0,56	0,8	1,16	1,26	2,9
MK01	N/A	1,62	0,73	0,43	1,11
MK03	0,21	2,24	0,64	3,44	7,74
FKBP1A	0,53	0,76	0,45	2,36	2,43
AKT1	N/A	No determinado	1,36	No determinado	No determinado
	Mejor Pronóstico				Peor pronóstico

TABLA IV. Tipo anatómo-patológico, estadio y los datos de cuantificación de las proteínas-péptidos analizados de los pacientes que no recibieron neoadyuvancia.

COCIENTES DE CUANTIFICACIÓN DE LOS PACIENTES SOMETIDOS A TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA PREOPERATORIA " EOX "				
	15	12	13	14
	ADENOCARCINOMA INTESTINAL, TUBULAR MODERADAMENTE DIFERENCIADO, LVi-, PN-, γT3N0M0, IIA	ADENOCARCINOMA INTESTINAL MUCINOSO, MODERADAMENTE DIFERENCIADO, LVi-, PN-, LAGOS DE MOCO EN GANGLIO γT3N0M0 IIA	ADENOCARCINOMA INFILTRANTE DIFUSO POBREMENTE DIFERENCIADO METÁSTASIS GANGLIONARES LVi- PN- γT3N2M0 IIIA	ADENOCARCINOMA INTESTINAL TUBULAR MODERADAMENTE DIFERENCIADO METÁSTASIS GANGLIONARES LVi+ PN- γT3N3aM0 IIIB
EGFR1	0,83	0,95	1,48	2,9
MK01	0,34	0,31	0,57	N/A
MK03	0,71	1,2	1,29	1,28
FKBP1A	1,15	0,66	1,3	N/A
AKT1	0,8	0,78	1,43	No determinado
	Mejor pronóstico			Peor pronóstico

TABLA V. Tipo anátomo-patológico, estadio y los datos de cuantificación de las proteínas-péptidos analizados de los pacientes que recibieron neoadyuvancia.

Los pacientes analizados en este caso son estadíos II (IIA, IIB) y III (IIIA, IIIB, IIIC) y las proteínas analizadas son EGFR1, MK03 y FKBP1A, terna que sirvió para el clustering, ver capítulo (análisis de datos).

En estadio IIB, están los pacientes nº 17 y el nº 10. En estadio IIIB, el paciente nº 2 y en IIIC, los paciente nº 5 y 7. Estos pacientes no recibieron quimioterapia preoperatoria.

Con quimioterapia preoperatoria, se encuentran en estadio IIA, los pacientes nºs 15 y 12, mientras que en el estadio IIIA, está el paciente nº 13 y en el IIIB, el paciente nº 14. FIGURA 2.

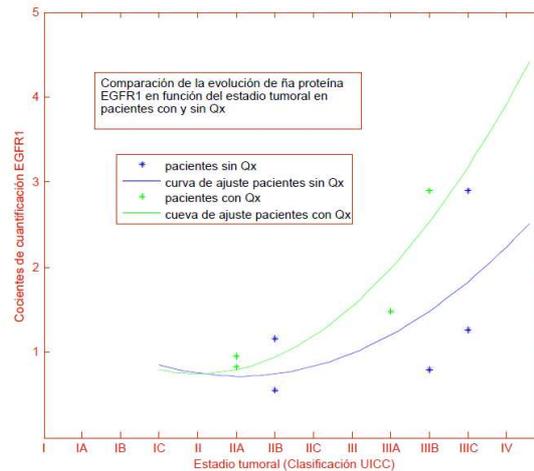


FIGURA 2. Evolución de los Ccs de la proteína EGFR 1 en relación con el estadio tumoral en pacientes no tratados y tratados con quimioterapia preoperatoria (Qx).

Los Ccs de la proteína EGFR1 crecen a partir de los estadios IIA y IIB, tanto para los pacientes tratados, como sin tratar, pero lo hacen más rápidamente en los tratados con quimioterapia, al menos hasta el estadio III C.

Carecemos de datos suficientes de lo que puede ocurrir a partir del estadio IIIC, pero de la información manejada en esta tesis se podría esperar, una caída brusca de los Ccs, hasta alcanzar valores por debajo de la unidad.

Evolución del MK03

Los valores de los Ccs de la proteína MK03 tratados con quimioterapia y reclasificados en estadios IIA, IIB, son mayores que los correspondientes a los valores de los pacientes sin tratar con quimioterapia. Además, su tasa de crecimiento en relación al estadio tumoral, es muy baja, a diferencia de los pacientes que no fueron tratados con quimioterapia, que tienen un crecimiento muy alto del Ccs a partir del estadio III. FIGURA 3.

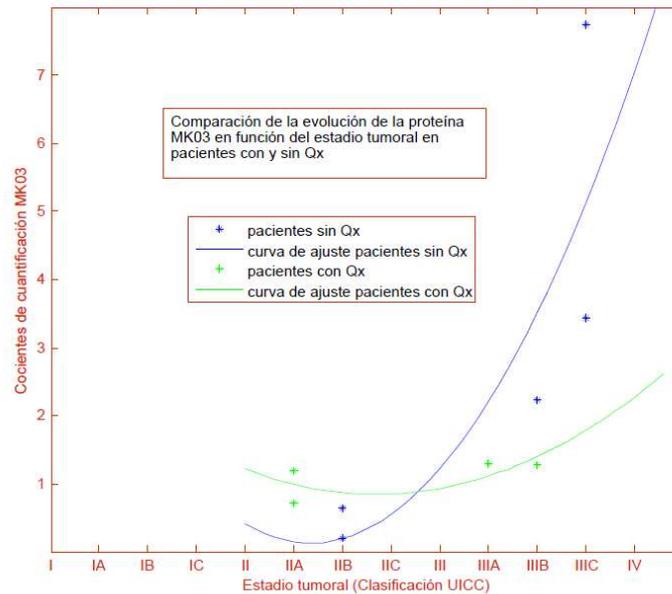


FIGURA 3. Evolución de los Ccs de la proteína MK03 en relación con el estadio tumoral en pacientes no tratados y tratados con quimioterapia preoperatoria (Qx).

Evolución del FKBP1A

Los valores de los Ccs de la proteína FKBP1A, tratados con quimioterapia y reclasificados en estadios II (IIB), son mayores que los correspondientes a los valores de los pacientes sin tratar con quimioterapia, siguiendo el mismo patrón que los Ccs de la proteína MK03. De forma análoga su tasa de crecimiento es muy baja, al menos hasta el estadio IIIB. FIGURA 4.

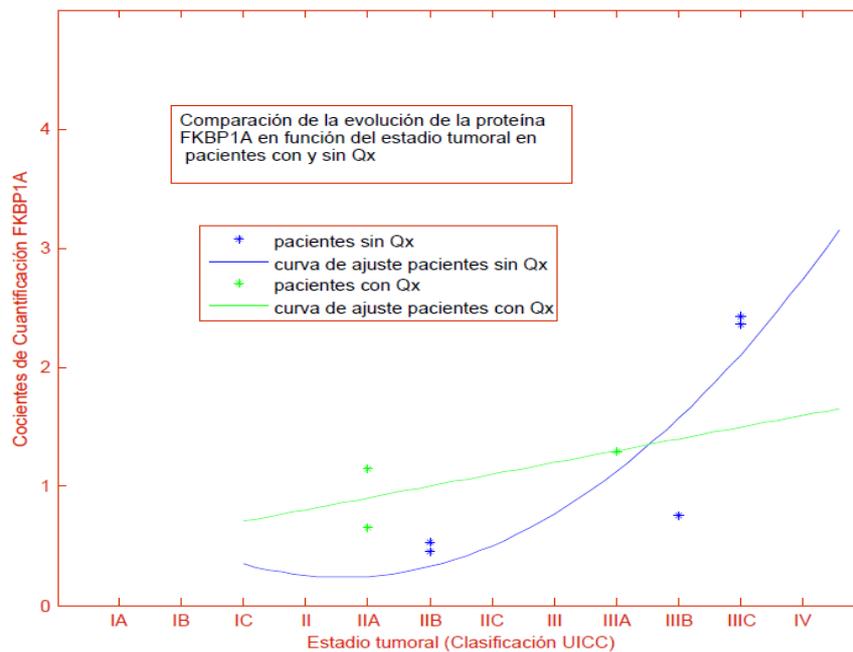


FIGURA 4. Evolución de los Ccs de la proteína FKBP1A en relación con el estadio tumoral en pacientes no tratados y tratados con quimioterapia preoperatoria (Qx).

Hasta el momento del cierre del estudio en diciembre 2014, las supervivencias de los pacientes 12, 13, 14 y 15, fueron de 18, 18, 17 y 15 meses respectivamente.

Otra pauta de tratamiento de quimioterapia adyuvante postoperatoria, fue empleada para los pacientes 2, 3, 4, 5 y 10, que fueron tratados con 5-Fluorouracilo y Leucovorin x 6 ciclos y el paciente 11 con 5-Fluorouracilo y folinato cálcico.

Además, asociado con la quimioterapia, los pacientes 2, 3, 4, 5 y 10 recibieron radioterapia a una dosis total máxima de 45 Gy según el ensayo SWOG/ Intergroup-0116.

El ensayo americano, demostró que la terapia adyuvante con cinco ciclos de 5-FU/leucovorin, además de la radioterapia concomitante (45 Gy en 25 fracciones durante 5 semanas), durante los ciclos 2 y 3, se traduce en una mejoría de la supervivencia global. En este estudio, el grupo tratado con adyuvancia presenta una mediana de supervivencia de 35 meses, frente al grupo tratado únicamente con cirugía, que fue de 27 meses. Tras 10 años de seguimiento, esta diferencia sigue siendo significativa a favor de la quimiorradioterapia adyuvante^{13,14}.

La supervivencia de los pacientes de nuestra serie nº 2, 3, 4, 5, y 10 que siguieron esta pauta de tratamiento hasta el cierre del estudio fue de 29, 28, 27, 27 y 19 meses respectivamente.

RECURRENCIA

La TABLA VI, mostrada a continuación, detalla los pacientes que sufrieron una recurrencia en el transcurso de su enfermedad, así como, el tratamiento de rescate y mortalidad durante el seguimiento.

PACIENTE	RECURRENCIA	TRATAMIENTO RESCATE	ÉXITUS
1	NO	NO	NO
2	JUNIO 2014: METÁSTASIS SUBMUCOSA RECTAL	CAPECITABINA + RADIOTERAPIA NOVIEMBRE 2014	NO
3	JULIO 2014: METÁSTASIS HEPÁTICAS	EOX (-) SEPTIEMBRE 2014	NO
4	AGOSTO 2014: METÁSTASIS SUPRARRENAL	DESESTIMADA ADYUVANCIA POR MORBILIDAD	NO
5	NO	NO	NO
6	NO	NO	NO
7	FEBRERO 2013: CARCINOMATOSIS PERITONEAL.	FEBRERO 2013: XELOX (80%) + EPREX (...) ABRIL 2013: PACLITAXEL	11/06/2013
8	NO	NO	NO
9	NO	NO	NO
10	NO	NO	NO
11	NO	NO	NO
12	SEPTIEMBRE 2014: OBSTRUCCIÓN INTESTINAL POR CARCINOMATOSIS PERITONEAL.	NO	26/09/2014
13	NO	NO	NO
14	JULIO 2014: PROGRESIÓN TUMORAL ADENOPÁTICA	JULIO 2014: XELIRI (80%) X 6 (...)	NO
15	NO	NO	NO
16	NO	NO	NO
17	NO	NO	NO
18-19-20 (*)	NO	NO	NO
21	NO (&)	NO (&)	NO

(-) 5-FU/LV : 5 FLUOROURACILO + LEUCOVORIN DURANTE 6 CICLOS + RADIOTERAPIA: 45 GRAYS. (-) EOX : EPIRRUBICINA + OXALIPLATINO + XELODA (CAPECITABINA) DURANTE 3 CICLOS. (...) XELOX + EPREX: XELODA (CAPECITABINA) + OXALIPLATINO + ERITROPOYETINA. (...) XELIRI: XELODA (CAPECITABINA) + IRINOTECAN DURANTE 6 CICLOS. (&) PACIENTE 21 DESARROLLA UN CARCINOMA BRONQUIOLO-ALVEOLAR NO MUCINOSO ESTADÍO IV: CK7+/CK20-/TTF1+ TRATADO EN 1ª LÍNEA: GEFITINIB + ÁCIDO ZOLEDRÓNICO/2ª LÍNEA: PEMETREXEB + ÁCIDO ZOLEDRÓNICO -> GEN EGFR MUTADO (MUTACIÓN G719X EN EXÓN 18) POR TÉCNICA DE PCR. (PACIENTES 2-3-4-5-10-11 MARCADOS EN NEGRITA) HAN RECIBIDO ESQUEMA DE ADYUVANCIA. (PACIENTES 12-13-14-15 MARCADOS EN NEGRITA Y SUBRAYADO) HAN RECIBIDO ESQUEMA DE NEOADYUVANCIA. (*) CATALOGADA COMO N°18, 19 Y 20, SE REFIERE A UNA PACIENTE CON TRES LESIONES TUMORALES GÁSTRICAS DIFERENTES SINCRÓNICAS. (PACIENTES 7-12 SOMBREADOS) FALLECIERON A LOS 25 Y 18 MESES RESPECTIVAMENTE.

TABLA VI. Recurrencia, tratamiento de rescate y pronóstico de los pacientes incluidos en el estudio a cierre del mismo (Diciembre 2014)

También presentamos los datos del análisis proteómico del cáncer gástrico en los pacientes que en su evolución tuvieron recurrencia de la enfermedad. TABLA VII.

nº Paciente	EGFR1	MK01	MK03	FKBP1A	AKT1
2	0,8	1,62	2,24	0,76	N/D
3	1,09	1,72	0,48	0,81	N/D
4	2,24	#N/A	1,63	1,2	N/D
7	2,9	1,11	7,74	2,43	N/D
12	<u>0,95</u>	<u>0,31</u>	<u>1,02</u>	<u>0,66</u>	<u>0,78</u>
14	<u>2,9</u>	<u>#N/A</u>	<u>1,28</u>	<u>#N/A</u>	<u>#N/A</u>

#N/A: VALORES PEQUEÑOS DIFÍCILES DE CUANTIFICAR CON EL MÉTODO EMPLEADO. N/D: NO DETERMINADO. (PACIENTES 2-3-4 MARCADOS EN NEGRITA) HAN RECIBIDO ESQUEMA DE ADYUVANCIA. (PACIENTES 12-14 MARCADOS EN NEGRITA Y SUBRAYADO) HAN RECIBIDO ESQUEMA DE NEOADYUVANCIA. (PACIENTES 7-12 SOMBREADOS) FALLECIERON A LOS 25 Y 18 MESES RESPECTIVAMENTE.

TABLA VII. Coeficientes de cuantificación de los péptidos del EGFR Y MK01, MK03, FKBP1A Y AKT en los adenocarcinomas gástricos sufrieron recurrencia.

DISCUSIÓN

La aplicación en el cáncer de nuevas tecnologías de diagnóstico, basadas en los perfiles "omics" de los pacientes y sus interacciones, han suministrado los primeros mapas útiles a gran escala del genoma, proteoma y metaboloma para esta enfermedad¹⁵.

Entre estas tecnologías se incluye el análisis proteómico, tanto en su versión de descubrimiento (discovery proteomics), como dirigido (targeted proteomics).

Iniciamos el desarrollo de la proteómica de descubrimiento en el año 2008, por electroforesis bidimensional y es a partir del año 2013, que nos incorporamos a la estrategia 'shotgun', basada en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, en tándem (LC-MS/MS),

La proteómica de descubrimiento identifica proteínas, con niveles de expresión diferencial entre muestras de tejido tumoral y sano, lo que permite relacionarlas con el pronóstico de la enfermedad.

Esta metodología analítica, la utilizamos al principio en la fase de puesta a punto de la técnica, con el paciente nº 4, para conocer el perfil proteico de los tejidos humanos con cáncer gástrico^{16,17}.

Como complemento a la proteómica de descubrimiento, hemos empleado la proteómica dirigida, con objeto de comparar, en un mayor número de muestras, los niveles de expresión de una serie de proteínas de interés, de forma más reproducible y sensible¹⁸.

Con estas técnicas y otras, se ha generado una explosión de información molecular relevante, con potencial para mejorar el cuidado de los pacientes, ya que si observamos la tasa de cambio de los cocientes de cuantificación del tejido sano y tumoral, podemos predecir el estadio evolutivo y seleccionar mejor los tratamientos y su respuesta.

En nuestro estudio, hemos determinado por metodología proteómica dirigida, los cocientes de cuantificación de las proteínas EGFR1, MK01, MK03, FKBP1A y AKT1. En este caso, la muestra para la cuantificación tisular, fueron obtenidas a partir de la resección quirúrgica del estómago de pacientes con cáncer gástrico.

Con un software comercial hemos realizado dos agrupamientos para los Ccs de las proteínas. Al grupo 1 corresponden los pacientes 10, 17, 12, 2, 15, en los que las proteínas EGFR1, MK03 y FKBP1 son más abundantes en el tejido sano, que en el tumoral (verde).

En el grupo 2, se encuentran los pacientes 7, 14, 13, 5, en los que las proteínas EGFR1, MK03 y FKBP1A, son más abundantes en el tejido tumoral, que en el sano (rojo). En negro se representa la mediana de los valores de los Ccs (ver capítulo análisis de datos). Los pacientes analizados en este caso son estadios II (IIA, IIB) y III (IIIA, IIIB, IIIC).

En estadio IIB, están los pacientes nº 17 y el nº 10. En estadio IIIB, el paciente nº 2 y en IIIC, los paciente nº 5 y 7. Estos pacientes no recibieron quimioterapia preoperatoria.

Con quimioterapia preoperatoria, se encuentran en estadio IIA, los pacientes nºs 15 y 12, mientras que en el estadio IIIA, está el paciente nº 13 y en el IIIB, el paciente nº 14.

A continuación, se discuten los resultados, de los dos primeros pacientes tratados con quimioterapia, obtenidos al comparar la evolución del comportamiento de los Ccs y el estadio tumoral.

Después del tratamiento con quimioterapia y la cirugía, estos pacientes previsiblemente fueron reclasificados en su estudio tumoral, como IIA (pacientes nº 15 y 12). Si tomamos como referencia las curvas de los Ccs globales, los valores de los Ccs de FKBP1A Y MK03 que les corresponden, los sitúan más en estadios tumorales IC o IIC.

Esta discrepancia del valor del Ccs y estadio tumoral se puede ratificar observando la evolución y supervivencia de los pacientes.

El paciente nº 15, en su evolución no desarrolló la enfermedad, lo que sugiere que su estadio tumoral podría ser IC, en correspondencia con las curvas de pacientes sin tratamiento quimioterápico. Sin embargo, el paciente nº 12 ha desarrollado recurrencia, lo que hace suponer que el estadio tumoral real en el que le dejó la quimioterapia, era un IIC o IIIA.

Finalizada la quimioterapia neoadyuvante y la cirugía, los otros dos pacientes nºs 13 y 14, fueron situados en un estadio tumoral IIIA y IIIB, respectivamente.

El paciente nº 14, tenía unos los valores de los Ccs de EGFR1, que se corresponden más a un estadio tumoral IIIC, de pacientes no tratados.

Los valores del paciente nº13 en un estadio IIIA, tenía los Ccs de las tres proteínas, aproximadamente en los valores que tienen en ese estadio los pacientes que no han sido tratados con quimioterapia.

Por tanto, su evolución sería la misma que la de los pacientes sin quimioterapia, mientras que en el primer caso, su evolución es la de un IIIC, probado por la recurrencia que desarrollo el paciente.

Conviene llamar la atención, que el caso con menor correspondencia fue el paciente nº 12, un tipo celular mucinoso, con lagos de moco en un ganglio linfático y recurrencia tumoral, que fue infravalorado en su estadio tumoral.

Algo similar ocurre con el paciente 14, reclasificado en un estadio tumoral IIIB y que por su evolución parece indicar que el estadio tumoral era más un III C, de acuerdo con la predicción proteómica.

No hay globalmente aceptado un estándar de tratamiento para el cáncer gástrico resecable y las estrategias de tratamiento varían en todo el mundo.

Mientras que la disección D2, fue durante mucho tiempo un procedimiento estándar en Japón, los países occidentales hemos tardado en adoptar este enfoque, debido a la presión realizada por los ensayos holandeses e ingleses, que argumentaban mayor morbilidad y mortalidad y porque no se obtenía ninguna ventaja en la supervivencia, con la disección D2.

En relación a la linfadenectomía D2, la clasificación por estadio tumoral preoperatoria, no es capaz de definir el tipo de linfadenectomía a realizar.

Hay discrepancia al correlacionar el estadio tumoral y los Ccs de las proteínas analizadas en los enfermos tratados con quimioterapia, cuando se utilizan como referencia las curvas de los valores de los Ccs de pacientes sin tratar con quimioterapia y se observa la evolución y supervivencia de estos pacientes.

La determinación de los Ccs de las proteínas analizadas en este estudio, junto con la determinación del estadio tumoral, una vez hayan sido tratados con quimioterapia, nos ayudaran a seleccionar mejor el tipo de cirugía a realizar, ya que ajustaremos mejor el estadio tumoral.

Desde nuestro punto de vista, la metodología proteómica dirigida junto con el estadio tumoral, permite seleccionar la linfadenectomía D2, en aquellos tumores de la clasificación molecular de Bass, de tipo cromosómicamente inestables, que tengan una localización antral y con previsibles amplificaciones de los genes, que codifican proteínas para la activación de los receptores tirosin kinasa, responsables de proliferación celular aberrante.

A lo largo del tiempo se han propuesto varios esquemas de clasificación de los adenocarcinomas gástricos, en base a su apariencia microscópica. La más comúnmente utilizada ha sido clasificación de Lauren.

También son utilizadas la clasificación de la OMS y otras clasificaciones, como las de Ming y Goseki. La limitación común de todas ellas, es que tienen una significativa variabilidad entre los patólogos.

Los sistemas de clasificación molecular tienen la ventaja, sobre los que clasifican el tumor por su apariencia microscópica, en que están basados en el factor clave que condiciona el fenotipo tumoral.

Una clasificación molecular basada en los análisis de expresión génica del cáncer gástrico, muestra en mayor o menor proporción, alteraciones génicas comparables para ambos tipos de la clasificación de Lauren (intestinal y difuso), en relación a genes como, ERBB2, CDH1, APC, KRAS, P53 y otros, Munding 2013¹⁹.

Subtipos de líneas celulares de cáncer gástrico, con distintos patrones de expresión génica, están asociados al pronóstico (porcentaje de probabilidad de supervivencia) y la respuesta a la quimioterapia de los pacientes.

De las dos líneas celulares con subtipos genómico intestinal y difuso, las de tipo intestinal, fueron significativamente más sensibles a 5-FU y oxaliplatino, pero más resistentes a cisplatino, que las líneas de celulares con genotipo difuso²⁰.

La quimioterapia preoperatoria (quimioterapia neoadyuvante) tiene algunos beneficios para los pacientes con cáncer gástrico como son: reduce el volumen del tumor, mejora la tasa de resección R0 (sin tumor residual después de la cirugía), actúa sobre la micrometástasis, disminuye el riesgo de recurrencia local del tumor y ayuda en la evaluación de la quimiosensibilidad del tumor a los fármacos citotóxicos²¹.

La quimioterapia perioperatoria en pacientes con adenocarcinoma gástrico de células en anillo de sello, no ofrece ningún impacto en los resultados sobre la supervivencia de estos pacientes²².

En relación con el TNM, se encontró una respuesta completa o parcial a la quimioterapia en un 31,3 % de un total de 573 pacientes de tres estudios randomizados. No se ha observado una ventaja en la supervivencia global de los pacientes tratados con quimioterapia preoperatoria. ($p=0,36$), ni en la supervivencia libre de enfermedad ($p=0,20$), ni modifica la tasa de resección R0 ($p=0,36$)²³.

Tampoco se han encontrado diferencias significativas, ni en la supervivencia, ni en la recurrencia tumoral en relación con el subtipo molecular. La inestabilidad de los microsatélites tiene una mayor tendencia a la recurrencia que el resto de los subgrupos, aunque no es significativa²⁴.

La cuantificación por metodología proteómica de las proteínas implicadas en las vías de señalización del la carcinogénesis del cáncer gástrico, podría contribuir a seleccionar mejor las pautas de tratamiento de los pacientes con cáncer gástrico y ayudar a establecer mejor el estadio tumoral.

Biomarcadores, clínicamente útiles, para la optimización del tratamiento como dianas moleculares en el cáncer gástrico, incluyen entre otros, la amplificación genómica o la sobre-expresión del gen Her2 /Neu, que se produce en el 10% de los casos.

En los ensayos clínicos se ha demostrado que los cánceres gástricos HER2 positivos, son tratables con trastuzumab, anticuerpo monoclonal anti-HER2 (Herceptin)²⁵.

Un anticuerpo bifuncional, llamado MaAbNA con capacidad de focalizar su acción sobre el EGFR1 y HER2, que se sobreexpresa ampliamente en una variedad de tipos de tumores, ha sido diseñado recientemente.

MaAbNA exhibe altos efectos inhibidores sobre las células tumorales que sobreexpresan tanto EGFR1 y HER2, con un mínimo de citotoxicidad en células que expresan bajo niveles de EGFR1 y HER2.

Este anticuerpo ha mostrado una mayor eficacia antitumoral que el Cetuximab (EGFR1) y el Herceptin (HER2)²⁶.

La cuantificación por proteómica dirigida del EGFR 1 y HER2 podrían ayudar a conocer mejor la respuesta con estos medicamentos.

VI. CONCLUSIONES

METODOLOGÍA PROTEÓMICA

1. La homogeneización con el sistema Precellys, así como la digestión de las proteínas mediante el método FASP, sirven de manera óptima para su utilización con muestras tisulares de ratón. El número de proteínas identificadas, fue similar al número de proteínas que se obtienen con los flujos de trabajo habituales.
2. Tanto con el tejido conservado en OCT como en PBS, no hay diferencias significativas en el número de proteínas obtenidas con los procedimientos de limpieza utilizados. La funcionalidad de estas proteínas en los tejidos analizados, permanece intacta.
3. La utilización en este trabajo de un péptido común, como el péptido de la levadura ENO1_YEAST, para normalizar la cuantificación peptídica en el tejido humano con cáncer gástrico, no ha sido un procedimiento fiable para obtener resultados homogéneos de cuantificación y con tiempos de elución similares.
4. La presencia de un péptido marcado ayuda a determinar la presencia del péptido natural y permite normalizar la intensidad del péptido natural frente al péptido pesado y en principio obtener una cuantificación más fiable.

ANÁLISIS DE DATOS DE LOS RESULTADOS DE LOS COCIENTES DE CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ANALIZADAS

5. Los resultados de los análisis de regresión lineal y regresión múltiple obtenidos para las ternas (MK01, EGFR1-MK03) y (FKBP1A, EGFR1-AKT), confirman la relación lineal entre valores de los cocientes de cuantificación de las proteínas analizadas y que, conocidos los valores de dos de ellos, se puede obtener el cociente de cuantificación del tercero, con un error máximo acotado.
6. Agrupadas los cánceres gástricos según el estadio tumoral de la clasificación UICC y promediados los valores de los cocientes de cuantificación de las proteínas, cada una de ellas, sigue una curva parabólica en función del estadio tumoral. Los valores mínimos de los cocientes de cuantificación (vértice de la parábola) se localizan en los estadios IIA y IIB.
7. Este comportamiento se rompe en el intervalo del estadio tumoral IIIC al IV. A pesar de los pocos datos disponibles, el cociente de cuantificación de las proteínas, después de alcanzar un valor máximo bastante mayor que uno, disminuye rápidamente a valores cercanos o inferiores a la unidad. Ésto pone en evidencia que, en el estadio tumoral IV, las cantidades de proteínas encontradas en las muestras de tejido tumoral, crecen rápidamente con respecto a las cantidades de proteínas en el tejido sano.

8. Para verificar y ratificar el estadio tumoral del paciente, en un determinado momento de la evolución de la enfermedad y para determinar la magnitud esperable del cociente de cuantificación de cualquiera de las proteínas analizadas en este estudio, se puede aplicar el análisis de la varianza por el método de las autofunciones. Además, mediante este análisis, se dispone de una curva de evolución de los cocientes de cuantificación que, por su propia definición, incluye más del 98% de la variabilidad esperada.

CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA DE UNA NEOPLASIA GÁSTRICA MULTIFOCAL EN PACIENTE CON INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE

9. Los cocientes de cuantificación de la terna de proteínas EGFR1, MK03 y FKBP1 analizados, han sido utilizados para el agrupamiento de los tres cánceres gástricos que padecía la paciente con IDCV. Con ello, hemos diferenciado dos grupos. El grupo 1, en el que se encuentran los dos tumores intramucosos (estadio IA), mientras que en el grupo 2, está el tumor invasivo, estadio IIB.
10. El cociente de cuantificación del AKT1 fue de 8,1 en el tumor nº 19 (carcinoma papilar intramucoso). Ésto podría reflejar una hiperactivación constitutiva del AKT1, para activar y diferenciar a los linfocitos y producir inmunoglobulinas.
11. En el tumor nº20 (carcinoma intramucoso de células en anillo de sello), los cocientes de cuantificación de las proteínas seleccionadas en este análisis, ayudan a predecir la evolución tumoral y la posible presencia de metástasis linfáticas, por lo que la resección gástrica y la linfadenectomía D1, sería la cirugía a realizar en este caso y no la resección submucosa endoscópica.
12. El adenocarcinoma intestinal infiltrante, moderadamente diferenciado, con invasión-linfática-venosa y perineural, sin metástasis ganglionares, tiene los cocientes de cuantificación de las diferentes proteínas menores a 1 (peor pronóstico), por lo que la resección quirúrgica amplia con linfadenectomía D2, debería ser el procedimiento de elección.

CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO CON DIFERENTE FENOTIPO CELULAR Y ESTADÍO TUMORAL

13. La integración de los datos relacionados con el tipo histopatológico, el estadio tumoral y la supervivencia en meses del cáncer gástrico, además de los cocientes de cuantificación de las proteínas seleccionadas, determinados por cromatografía líquida y espectrometría de masas, son componentes de datos relevantes para, mejorar la identificación del estadio tumoral de estos pacientes, seleccionar mejor el tipo de cirugía y terapia médica a utilizar y, previsiblemente, mejorar la significación estadística de las tasas de supervivencia global en estos pacientes.

14. El análisis de los datos de los cocientes de cuantificación obtenidos a partir de las autofunciones, añade un nuevo elemento de contraste con el que podemos simular datos de los cocientes de cuantificación, que ayudan a mejorar la definición del estadio tumoral en el que se encuentran los pacientes y proporcionan una valoración cuantitativa de la evolución y pronóstico del paciente.

PROTEÓMICA DIRIGIDA EN EL CANCER GÁSTRICO. RELACIÓN CON LA CLASIFICACIÓN MOLECULAR. GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO. NIVELES DE EVIDENCIA Y OBJETIVOS DE MEJORA

15. Hay discrepancia al correlacionar el estadio tumoral y los cocientes de cuantificación de las proteínas analizadas en los enfermos tratados con quimioterapia, cuando se utilizan como referencia las curvas de los valores de los cocientes de cuantificación de las proteínas de pacientes sin quimioterapia y se observa su evolución y supervivencia.
16. La determinación de los cocientes de cuantificación de las proteínas analizadas en este estudio, junto con la determinación del estadio tumoral en pacientes tratados con quimioterapia preoperatoria, permite diagnosticar con menor incertidumbre su estadio tumoral y en consecuencia ayuda a decidir con más información y precisión el tipo de cirugía a realizar.

VII. ANEXOS

ANEXO A

Consideraciones éticas: comité de ética de investigación clínica.

Estudio aprobado por el comité de ética y de investigación clínica de Euskadi (CEIC-E).

Adjuntamos aprobación del proyecto EHU11/25 y la aprobación de la ampliación del mismo por CEIC-E.



INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DE EUSKADI (CEIC-E)

D^a **Iciar Alfonso Farnós** como Secretaria del CEIC Comunidad Autónoma de País Vasco (CEIC-E)

CERTIFICA

Que este Comité, de acuerdo a la ley 14/2007 de Investigación Biomédica, Principios éticos de la declaración de Helsinki y resto de principios éticos aplicables, ha evaluado el proyecto de investigación, titulado "**CÁNCER GÁSTRICO. BIOMARCADORES PROTEICOS Y SUS IMPLICACIONES EN EL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO. AUTORIZADO EN EL CEIC DE GALDAKAO, AMPLIACIÓN A CRUCES.**",

Versión Inicial de la HIP: Versión 02 de julio de 2012

Y que este Comité reunido el día **25 de septiembre de 2012** (recogido en acta **8/2012**) ha decidido emitir **Informe Favorable** a que dicho proyecto sea realizado por los siguientes investigadores:

Dra. Bakarne Ugarte (Hospital de Galdakao-Usansolo)
Dr. Joaquín Losada (Hospital Universitario de Cruces)

Lo que firmo en Vitoria, a 4 de octubre de 2012

Fdo:



Dra. Iciar Alfonso Farnós
Secretaria del CEIC Comunidad Autónoma de País Vasco (CEIC-E)



**INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DE
EUSKADI (CEIC-E)**

D^a Iciar Alfonso Farnós como Vicepresidente del CEIC de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CEIC-E)

CERTIFICA

Que este Comité, actuando como comité ético externo del Biobanco Vasco de Bioef, ha evaluado la solicitud de cesión de muestras del biobanco vasco de la Fundación Vasca de Innovación e Investigación Sanitarias (BIOEF) para la realización del proyecto de investigación, titulado "**Cáncer gástrico. Biomarcadores proteicos y sus implicaciones en el tratamiento quirúrgico**", y en el que actuará como investigador principal:

- Joaquín Losada Unidad Docente de la Facultad de Medicina y Odontología en Cruces

Y que este Comité reunido el 26 de marzo de 2014 (recogido en acta 04/2014), ha decidido emitir informe **favorable** a la solicitud de aprobación de cesión de muestras.

Lo que firmo en Vitoria, a 4 de abril de 2014

Fdo:



Dra. Iciar Alfonso Farnós

Vicepresidente del CEIC de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CEIC-E)

ANEXO B

Normas de buena práctica clínica: consentimiento informado.

A continuación adjuntamos el consentimiento informado aprobado por el CEIC-E y recogido para cada paciente otorgando su aceptación tanto para la cesión de muestras biológicas para el proyecto EHU11/25 como para su depósito en cada uno de los nodos del Biobanco Vasco de cada hospital participante en el estudio (Versión 2 de julio de 2012).

MODELO DE HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE PARA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN QUE IMPLIQUEN LA UTILIZACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

(Versión 02 de julio de 2012)

TÍTULO DEL PROYECTO: CÁNCER GÁSTRICO. BIOMARCADORES PROTEICOS Y SUS IMPLICACIONES EN EL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Joaquín Losada Rodríguez

Centro/Hospital: Hospital Universitario Cruces **ENTIDAD FINANCIADORA:** UPV-EHU

DESCRIPCIÓN GENERAL:

Considerando la enfermedad que usted padece, la **Dra. Soledad Ugarte Sierra del Hospital Galdakao-Usansolo**, le solicita su consentimiento para participar en un estudio del que le informamos a continuación. Antes de decidir si quiere participar o no, le rogamos lea detenidamente este documento que incluye la información sobre este proyecto. Puede formular todas las preguntas que le surjan y solicitar cualquier aclaración sobre cualquier aspecto del mismo

PROPÓSITO DEL ESTUDIO: En la enfermedad que padece, se ha visto que las células afectadas por la misma sufren una alteración a nivel genético, que a su vez provoca unas alteraciones en las proteínas expresadas por esas mismas células.

Este estudio tiene como finalidad principal identificar las alteraciones a nivel proteínico que se dan en el tejido enfermo frente al sano y sus implicaciones en el tratamiento quirúrgico llevado a cabo.

EXPLICACIÓN DEL ESTUDIO:

No hay contraprestación económica de ningún tipo.

MUESTRAS A RECOGER: Como parte de este proyecto aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galdakao, se le va a extraer una muestra de BIOPSIA Y de SANGRE para utilizarla con fines de investigación, con objeto de aumentar los conocimientos sobre la patología o proceso objeto de estudio, y desarrollar nuevas estrategias y terapias aplicables a pacientes

SANGRE: La extracción de sangre no conlleva más molestias que un simple pinchazo en la vena en el brazo. A veces, muy raramente, le puede ocasionar un pequeño hematoma o una leve inflamación que remitirán en pocos días.

BIOPSIA La extirpación de tejido se realiza con fines diagnósticos y terapéuticos, pero frecuentemente no se estudia toda la muestra sino que, tras realizar los estudios histopatológicos de las zonas representativas de la lesión, se suele destruir el resto del tejido. Con la firma de este consentimiento se le solicita parte de la muestra excedente para utilizarla en este proyecto

BENEFICIO Y ATENCIÓN MÉDICA: Es probable que no reciba ningún beneficio personal por su participación en este estudio. En cualquier caso, los datos recogidos en el mismo podrán derivar en un mayor conocimiento de su enfermedad o condición objeto de estudio.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria: Si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que pudiera necesitar y su relación con el equipo médico que le atiende no se verá afectada.

- A. **TRATAMIENTO DE LOS DATOS Y CONFIDENCIALIDAD.** *Se solicita su consentimiento para la utilización de sus datos y de su muestra para el desarrollo de este proyecto. Tanto los datos personales (edad, sexo, raza), como los datos de salud, como la muestra para investigación, se recogerán empleando un procedimiento de codificación. Sólo la Dra. Soledad Ugarte Sierra podrá relacionar estos datos con Vd, siendo responsable de custodiar el documento de consentimiento, garantizando el cumplimiento de su voluntad en relación al uso de la muestra biológica que vd. cede para investigación.*

La información será procesada durante el análisis de los resultados obtenidos y aparecerá en los informes finales. En ningún caso será posible identificarle, garantizándole la confidencialidad de la información obtenida, en cumplimiento de la legislación vigente.

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO. Puede revocar en cualquier momento su participación sin necesidad de dar explicaciones. En este caso, no se recogerán nuevos datos después del abandono del estudio. Los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición puede ejercitarlos ante la Dra. Soledad Ugarte Sierra. Hospital Galdakao-Usansolo. Bº Labeaga, s/n. Galdakao. Tel: 94.400 70 00

DESTINO DE LA MUESTRA TRAS SU UTILIZACIÓN EN ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Una vez finalizada la investigación, es posible que existan muestras sobrantes. En relación a las mismas, se le ofrecen las siguientes opciones:

- A. La **destrucción** de la muestra sobrante.
- B. Su **utilización en futuros proyectos** relacionados con esta línea de investigación. A tal fin, se le ofrece la opción de donar la muestra excedente al **Biobanco Vasco para la Investigación** de la Fundación Vasca de Innovación e Investigación Sanitaria (BIOEF) con objeto de que pueda ser conservada y destinada a futuras investigaciones relacionadas con la enfermedad o proceso objeto de estudio. En este caso, firmará el consentimiento específico incluido en este documento, que será custodiado por el coordinador del BIOBANCO de su Hospital. En dicho consentimiento usted podrá escoger si desea que esta donación se haga codificada de forma que usted pueda conocer si lo desea los resultados de las investigaciones que se lleven a cabo, o anonimizada, si usted prefiere que nunca nadie pueda recobrar la relación entre sus muestras y su persona.

ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA EN EL BIOBANCO. Con la firma del consentimiento anexo, Vd. autoriza al Biobanco Vasco para la Investigación, al almacenamiento y utilización de sus datos clínicos relevantes, y su muestra, para la realización de proyectos de investigación en TUMORES.

El clínico responsable de la investigación entregará al Biobanco los datos clínicos y la muestra, conforme a su voluntad, para su almacenamiento en las instalaciones del centro hospitalario adscritas al Biobanco, así como el documento de consentimiento informado por usted firmado. En el Hospital Galdakao-Usansolo se registrarán los datos que pudieran relacionarle con las muestras a conservar, empleando un procedimiento de anonimización o disociación, para garantizar la protección de su identidad. Sólo el Responsable clínico de esta donación y el coordinador del Biobanco de su Hospital podrán relacionar estos datos con Vd.

La donación de muestras para investigación es voluntaria y altruista. Su único beneficio es el que corresponde al avance de la medicina en beneficio de la sociedad. Sus muestras no podrán ser objeto directo de actividades con ánimo de lucro. No obstante, la información generada a partir de los estudios realizados sobre su muestra podría ser fuente de beneficios comerciales. En tal caso, se pretende que estos beneficios reviertan en la salud de la población, aunque no de forma individual ni en el donante ni en sus familiares.

Los resultados de futuros estudios podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones científicas. Siempre se mantendrá una estricta confidencialidad sobre su identidad.

La donación de su muestra no supone ningún gasto extra.

La utilización de la muestra biológica para una finalidad distinta a la expresada habrá de ser expresamente autorizada por Vd. en un nuevo documento de consentimiento.

ACCESO A LAS MUESTRAS Y/O LA INFORMACIÓN. Usted tiene derecho a conocer los datos genéticos clínicamente relevantes que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas, siempre que así lo desee y lo solicite. La información que se obtenga podría ser relevante también para sus familiares. Si fuera este el caso, es decisión personal suya informar a dichos familiares -algo que nosotros le aconsejamos- con el fin de que, si ellos lo desean, puedan ser estudiados y valorar así cuál es su riesgo personal y sus opciones de salud en un futuro.

En todo caso, la muestra estará disponible si usted la requiere por motivos de salud

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO. En cualquier momento podrá Vd. revocar el consentimiento otorgado al Biobanco para su utilización, pudiendo solicitar su destrucción o la anonimización. No obstante, los efectos de la revocación no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que se hayan llevado a cabo previamente a la misma. Para mayor información sobre sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición puede ejercitarlos, si así lo desea, con la Dra. Soledad Ugarte Sierra. Hospital Galdakao-Usansolo. Bº Labeaga, s/n. Galdakao. Tel: 94.400 70 00

CONSENTIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Investigador/Responsable clínico: Dra. Soledad Ugarte Sierra

TÍTULO DEL PROYECTO: CÁNCER GÁSTRICO. BIOMARCADORES PROTEICOS Y SUS IMPLICACIONES EN EL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

Yo.....con DNI..... declaro que he leído la Hoja de Información al paciente, de la que se me ha entregado una copia. Se me han explicado las características del estudio, así como los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar, los derechos que puedo ejercitar, y las previsiones sobre el tratamiento de datos y muestras. He recibido suficiente información sobre el estudio.

Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificarán mis muestras con un sistema de codificación. Soy libre de revocar mi consentimiento en cualquier momento y por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre cualquier tratamiento médico presente o futuro.

Yo doy mi consentimiento para que se utilicen mis muestras y los datos asociados como parte de **este proyecto de investigación**. Consiento en participar voluntariamente.

Por la presente afirmo haber sido advertido sobre la posibilidad de recibir información relativa a mi salud derivada de los análisis genéticos (cuando se realicen) que se realicen sobre mi muestra biológica.

Yo solicito información

Yo no quiero recibir información

una vez finalizada la investigación sobre los resultados del estudio.

Si hubiera excedente de la muestra, afirmo haber sido advertido sobre las opciones de destino al finalizar el proyecto de investigación.

En este sentido: Solicito la destrucción de la muestra excedente

Solicito la incorporación del excedente en el Biobanco Vasco

Fecha Firma del paciente

Fecha :..... Firma representante legal (si procede).....

Nombre representante legal:

Relación con el paciente:

Constato que he explicado las características del proyecto de investigación y las condiciones de conservación que se aplicarán a la muestra y a los datos conservados.

Nombre del Investigador o la persona designada para proporcionar la información:

Fecha Firma

CONSENTIMIENTO PARA LA DONACIÓN DE MUESTRAS AL BIOBANCO VASCO PARA LA INVESTIGACIÓN

Responsable clínico: Dra. Soledad Ugarte Sierra

Yo _____

He sido informado sobre la posibilidad de transferir y almacenar la muestra junto con la información clínica relacionada al Biobanco Vasco para la Investigación.

He sido informado sobre la finalidad de la **conservación**, el lugar de conservación, así como sobre las garantías de cumplimiento de la legalidad vigente y de la posibilidad de ceder las muestras para futuros proyectos de investigación. Se me ha informado que el presente consentimiento será custodiado en las instalaciones del Biobanco en el Hospital Galdakao-Usansolo.

Yo **DOY** mi consentimiento para que el centro sanitario Hospital Galdakao-Usansolo transfiera mis muestras y los datos de salud relevantes (excepto los que me identifiquen) del área TUMORES, al Biobanco Vasco para la Investigación.

Se me ha advertido sobre la posibilidad de consentir en donar la muestra y los datos asociados de forma anonimizada:

DESEO QUE LAS MUESTRAS Y DATOS ESTÉN ANONIMIZADOS**

DESEO QUE LAS MUESTRAS Y DATOS ESTÉN CODIFICADOS*

Se me ha advertido sobre la posibilidad de recibir información relativa a mi salud derivada de futuros análisis genéticos que pudieran realizarse sobre mi muestra biológica (si la muestra se ha donado codificada y se han obtenido datos genéticos).

Yo solicito información

Yo no quiero recibir información

Fecha Firma del paciente

Fecha :..... Firma representante legal (si procede).....

Nombre representante legal:

Relación con el paciente:

Constato que he explicado las características de las condiciones de conservación y seguridad que se aplicarán a la muestra y a los datos clínicos conservados.

Nombre del clínico responsable Fecha Firma

*muestra codificada: la muestra se identifica con un número que sólo su médico o el coordinador del Biobanco Vasco en su hospital podrá relacionarla con usted

**muestra anonimizada es aquella no asociada con los datos identificativos

ANEXO ACLARATORIO

SE GARANTIZA QUE LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO, EL TRATAMIENTO, ALMACENAMIENTO Y UTILIZACIÓN DE LAS MUESTRAS ALMACENADAS EN EL BIOBANCO CUMPLIRÁN CON LA **NORMATIVA APLICABLE**:

Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. En observancia a esta ley los datos de carácter personal recogidos en este estudio pasarán a formar parte de un fichero automatizado que reúne las medidas de seguridad de nivel alto.

Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica

Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.

¿QUÉ ES UN BIOBANCO?

Un **biobanco** es un centro de conservación, en condiciones adecuadas, de muestras, tejidos, ADN y otros derivados, que representan un valioso instrumento con destino a la investigación de enfermedades y que puede permitir la obtención de conocimientos que sirvan para el desarrollo de nuevas estrategias y terapias aplicables a pacientes.

El Biobanco de BIOEF está constituido en nodos, uno de los cuales está ubicado en el Hospital Galdakao-Usansolo, en donde se almacenará y conservará su muestra

Los proyectos de investigación realizados con las muestras almacenadas en el Biobanco serán aprobados por un Comité de Ética de la Investigación, y, si procede, autorizado por la autoridad sanitaria pertinente, previo visto informe favorable de los comités ético y científico externos del biobanco.

Tanto el Biobanco Vasco para la Investigación, como el investigador al que en un futuro se puedan ceder las muestras, son responsables del manejo de los Datos, conforme a la Ley orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, sobre Protección de Datos de Carácter Personal. El Hospital Galdakao-Usansolo garantiza que en ningún caso saldrá del centro dato alguno que le identifique personalmente.

MODELO DE HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE PARA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN QUE IMPLIQUEN LA UTILIZACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

(Versión 02 de julio de 2012)

TÍTULO DEL PROYECTO: CÁNCER GÁSTRICO. BIOMARCADORES PROTEICOS Y SUS IMPLICACIONES EN EL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Joaquín Losada Rodríguez

Centro/Hospital: Hospital Universitario Cruces **ENTIDAD FINANCIADORA:** UPV-EHU

DESCRIPCIÓN GENERAL:

Considerando la enfermedad que usted padece, el Dr. **Joaquín Losada Rodríguez del Hospital Universitario de Cruces**, le solicita su consentimiento para participar en un estudio del que le informamos a continuación. Antes de decidir si quiere participar o no, le rogamos lea detenidamente este documento que incluye la información sobre este proyecto. Puede formular todas las preguntas que le surjan y solicitar cualquier aclaración sobre cualquier aspecto del mismo

PROPÓSITO DEL ESTUDIO: En la enfermedad que padece, se ha visto que las células afectadas por la misma sufren una alteración a nivel genético, que a su vez provoca unas alteraciones en las proteínas expresadas por esas mismas células.

Este estudio tiene como finalidad principal identificar las alteraciones a nivel proteínico que se dan en el tejido enfermo frente al sano y sus implicaciones en el tratamiento quirúrgico llevado a cabo.

EXPLICACIÓN DEL ESTUDIO:

No hay contraprestación económica de ningún tipo.

MUESTRAS A RECOGER: Como parte de este proyecto aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galdakao /CEIC Euskadi, se le va a extraer una muestra de BIOPSIA Y de SANGRE para utilizarla con fines de investigación, con objeto de aumentar los conocimientos sobre la patología o proceso objeto de estudio, y desarrollar nuevas estrategias y terapias aplicables a pacientes

SANGRE: La extracción de sangre no conlleva más molestias que un simple pinchazo en la vena en el brazo. A veces, muy raramente, le puede ocasionar un pequeño hematoma o una leve inflamación que remitirán en pocos días.

BIOPSIA La extirpación de tejido se realiza con fines diagnósticos y terapéuticos, pero frecuentemente no se estudia toda la muestra sino que, tras realizar los estudios histopatológicos de las zonas representativas de la lesión, se suele destruir el resto del tejido. Con la firma de este consentimiento se le solicita parte de la muestra excedente para utilizarla en este proyecto

BENEFICIO Y ATENCIÓN MÉDICA: Es probable que no reciba ningún beneficio personal por su participación en este estudio. En cualquier caso, los datos recogidos en el mismo podrán derivar en un mayor conocimiento de su enfermedad o condición objeto de estudio.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria: Si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que pudiera necesitar y su relación con el equipo médico que le atiende no se verá afectada.

- B. *TRATAMIENTO DE LOS DATOS Y CONFIDENCIALIDAD. Se solicita su consentimiento para la utilización de sus datos y de su muestra para el desarrollo de este proyecto. Tanto los datos personales (edad, sexo, raza), como los datos de salud, como la muestra para investigación, se recogerán empleando un procedimiento de codificación. Sólo el Dr. Joaquín Losada Rodríguez podrá relacionar estos datos con Vd, siendo responsable de custodiar el documento de consentimiento, garantizando el cumplimiento de su voluntad en relación al uso de la muestra biológica que vd. cede para investigación.*

La información será procesada durante el análisis de los resultados obtenidos y aparecerá en los informes finales. En ningún caso será posible identificarle, garantizándole la confidencialidad de la información obtenida, en cumplimiento de la legislación vigente.

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO. Puede revocar en cualquier momento su participación sin necesidad de dar explicaciones. En este caso, no se recogerán nuevos datos después del abandono del estudio. Los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición puede ejercerlos ante el Dr. **Joaquín Losada Rodríguez del Hospital Universitario de Cruces**, Plaza de Cruces s/n, Barakaldo, Teléfono de contacto: 946006341

DESTINO DE LA MUESTRA TRAS SU UTILIZACIÓN EN ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Una vez finalizada la investigación, es posible que existan muestras sobrantes. En relación a las mismas, se le ofrecen las siguientes opciones:

- A. La **destrucción** de la muestra sobrante.
- B. Su **utilización en futuros proyectos** relacionados con esta línea de investigación. A tal fin, se le ofrece la opción de donar la muestra excedente al **Biobanco Vasco para la Investigación** de la Fundación Vasca de Innovación e Investigación Sanitaria (BIOEF) con objeto de que pueda ser conservada y destinada a futuras investigaciones relacionadas con la enfermedad o proceso objeto de estudio. En este caso, firmará el consentimiento específico incluido en este documento, que será custodiado por el coordinador del BIOBANCO de su Hospital. En dicho consentimiento usted podrá escoger si desea que esta donación se haga codificada de forma que usted pueda conocer si lo desea los resultados de las investigaciones que se lleven a cabo, o anonimizada, si usted prefiere que nunca nadie pueda recobrar la relación entre sus muestras y su persona.

ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA EN EL BIOBANCO. Con la firma del consentimiento anexo, Vd. autoriza al Biobanco Vasco para la Investigación, al almacenamiento y utilización de sus datos clínicos relevantes, y su muestra, para la realización de proyectos de investigación en TUMORES.

El clínico responsable de la investigación entregará al Biobanco los datos clínicos y la muestra, conforme a su voluntad, para su almacenamiento en las instalaciones del centro hospitalario adscritas al Biobanco, así como el documento de consentimiento informado por usted firmado. En el Hospital Universitario de Cruces se registrarán los datos que pudieran relacionarle con las muestras a conservar, empleando un procedimiento de anonimización o disociación, para garantizar la protección de su identidad. Sólo el Responsable clínico de esta donación y el coordinador del Biobanco de su Hospital podrán relacionar estos datos con Vd.

La donación de muestras para investigación es voluntaria y altruista. Su único beneficio es el que corresponde al avance de la medicina en beneficio de la sociedad. Sus muestras no podrán ser objeto directo de actividades con ánimo de lucro. No obstante, la información generada a partir de los estudios realizados sobre su muestra podría ser fuente de beneficios comerciales. En tal caso, se pretende que estos beneficios reviertan en la salud de la población, aunque no de forma individual ni en el donante ni en sus familiares.

Los resultados de futuros estudios podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones científicas. Siempre se mantendrá una estricta confidencialidad sobre su identidad.

La donación de su muestra no supone ningún gasto extra.

La utilización de la muestra biológica para una finalidad distinta a la expresada habrá de ser expresamente autorizada por Vd. en un nuevo documento de consentimiento.

ACCESO A LAS MUESTRAS Y/O LA INFORMACIÓN. Usted tiene derecho a conocer los datos genéticos clínicamente relevantes que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas, siempre que así lo desee y lo solicite.-La información que se obtenga podría ser relevante también para sus familiares. Si fuera este el caso, es decisión personal suya informar a dichos familiares -algo que nosotros le aconsejamos- con el fin de que, si ellos lo desean, puedan ser estudiados y valorar así cuál es su riesgo personal y sus opciones de salud en un futuro. En todo caso, la muestra estará disponible si usted la requiere por motivos de salud.

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO. En cualquier momento podrá Vd. revocar el consentimiento otorgado al Biobanco para su utilización, pudiendo solicitar su destrucción o la anonimización. No obstante, los efectos de la revocación no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que se hayan llevado a cabo previamente a la misma. Para mayor información sobre sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición puede ejercitarlos, si así lo desea, con el Dr. **Joaquín Losada Rodríguez del Hospital Universitario de Cruces**, Plaza de Cruces s/n, Barakaldo, Teléfono de contacto: 946006341

CONSENTIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Investigador/Responsable clínico: Dr. Joaquín Losada Rodríguez

TÍTULO DEL PROYECTO: CÁNCER GÁSTRICO. BIOMARCADORES PROTEICOS Y SUS IMPLICACIONES EN EL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

Yo.....con DNI..... declaro que he leído la Hoja de Información al paciente, de la que se me ha entregado una copia. Se me han explicado las características del estudio, así como los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar, los derechos que puedo ejercitar, y las previsiones sobre el tratamiento de datos y muestras. He recibido suficiente información sobre el estudio.

Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificarán mis muestras con un sistema de codificación. Soy libre de revocar mi consentimiento en cualquier momento y por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre cualquier tratamiento médico presente o futuro. Yo doy mi consentimiento para que se utilicen mis muestras y los datos asociados como parte de **este proyecto de investigación**. Consiento en participar voluntariamente.

Por la presente afirmo haber sido advertido sobre la posibilidad de recibir información relativa a mi salud derivada de los análisis genéticos (cuando se realicen) que se realicen sobre mi muestra biológica.

Yo solicito información

Yo no quiero recibir información

una vez finalizada la investigación sobre los resultados del estudio.

Si hubiera excedente de la muestra, afirmo haber sido advertido sobre las opciones de destino al finalizar el proyecto de investigación.

En este sentido: Solicito la destrucción de la muestra excedente

Solicito la incorporación del excedente en el Biobanco Vasco

Fecha Firma del paciente

Fecha :..... Firma representante legal (si procede).....

Nombre representante legal:

Relación con el paciente:

Constato que he explicado las características del proyecto de investigación y las condiciones de conservación que se aplicarán a la muestra y a los datos conservados.

Nombre del Investigador o la persona designada para proporcionar la información:

Fecha

Firma

ANEXO ACLARATORIO

SE GARANTIZA QUE LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO, EL TRATAMIENTO, ALMACENAMIENTO Y UTILIZACIÓN DE LAS MUESTRAS ALMACENADAS EN EL BIOBANCO CUMPLIRÁN CON LA **NORMATIVA APLICABLE:**

Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. En observancia a esta ley los datos de carácter personal recogidos en este estudio pasarán a formar parte de un fichero automatizado que reúne las medidas de seguridad de nivel alto.

Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica

Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.

¿QUÉ ES UN BIOBANCO?

Un **biobanco** es un centro de conservación, en condiciones adecuadas, de muestras, tejidos, ADN y otros derivados, que representan un valioso instrumento con destino a la investigación de enfermedades y que puede permitir la obtención de conocimientos que sirvan para el desarrollo de nuevas estrategias y terapias aplicables a pacientes.

El Biobanco de BIOEF está constituido en nodos, uno de los cuales está ubicado en el Hospital Galdakao-Usansolo, en donde se almacenará y conservará su muestra

Los proyectos de investigación realizados con las muestras almacenadas en el Biobanco serán aprobados por un Comité de Ética de la Investigación, y, si procede, autorizado por la autoridad sanitaria pertinente, previo visto informe favorable de los comités ético y científico externos del biobanco.

Tanto el Biobanco Vasco para la Investigación, como el investigador al que en un futuro se puedan ceder las muestras, son responsables del manejo de los Datos, conforme a la Ley orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, sobre Protección de Datos de Carácter Personal. El Hospital Universitario de Cruces garantiza que en ningún caso saldrá del centro dato alguno que le identifique personalmente.

ANEXO C

Esta tesis doctoral se fundamenta en el desarrollo del proyecto EHU11/25 financiado por la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea en su convocatoria para ayudas a la investigación del año 2011.

**SOLICITUD DE AYUDA A PROYECTOS DE LA CONVOCATORIA
PROYECTOS DE INVESTIGACION UPV/EHU 2011**

INVESTIGADOR PRINCIPAL			
Apellidos:	LOSADA RODRIGUEZ	Nombre:	JOAQUIN
Departamento:	Cirugía, Radiología y Medicina Física		
Centro/Facultad:	Medikuntza eta Odontologia Fakultatearen Gurutzetako Irakasgunea - Unidad Docente de la Facultad de Medicina y Odontología en Cruces		
Teléfono contacto:	4698524	E-mail:	joaquin.losada@ehu.es

PROYECTO	
Año:	2011
Código:	EHU11/25
Disciplina UNESCO:	321300 CIRUGIA
Área de la ciencia:	Ciencias de la Salud
Sector de actividad:	21 Actividades Sanitarias y Servicio Social
Duración (meses):	24
Título:	CÁNCER GÁSTRICO. BIOMARCADORES PROTEICOS Y SUS IMPLICACIONES EN EL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

PARTICIPANTES		
	Cod.Dpto/CIF EMPRESA	NOMBRE DEPARTAMENTO / EMPRESA
DEPARTAMENTO SOLICITANTE	144	Cirugía, Radiología y Medicina Física

PRESUPUESTO	PROYECTOS DE INVESTIGACION UPV/EHU 2011- Universidad	
		TOTAL
INMOVILIZADO	0,00	0,00
PERSONAL UPV / EHU	0,00	0,00
PERSONAL CONTRATADO	0,00	0,00
BECARIOS	0,00	0,00
MATERIAL FUNGIBLE	8.500,00	8.500,00
SUBCONTRATACIÓN	0,00	0,00
VIAJES Y DIETAS	500,00	500,00
OTROS GASTOS	0,00	0,00
TOTAL	9.000,00	9.000,00

FINANCIACIÓN	
	TOTAL
AÑO 1	4.500,00
AÑO 2	4.500,00

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Rahman R, Asombang AW, Ibdah JA. Characteristics of gastric cancer in Asia. *World J Gastroenterol*. 2014;20(16):4483-4490.
2. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49:1374-1403
3. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2014*. Atlanta: American Cancer Society; 2014.
4. Izarzugaza MI, Martínez R, Audicana C, Larrañaga N, Hernández E, Tobalina MC, et al. El cáncer en el País Vasco. Incidencia, mortalidad, supervivencia y evolución temporal [Internet]. 1ª ed. Vitoria-Gasteiz 2010. Eusko Jaurlaritzaren Argitalpen Zerbitzu Nagusia. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco; 2010 [actualizado 1 octubre 2010; citado 15 noviembre 2014]. Disponible en: www.euskadi.net
5. Waddell T, Verheij M, Allum W, Cunningham D, Cervantes A, Arnold D. Gastric cancer: ESMO-ESSO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Radiotherapy and Oncology*. *Ann Oncol* 2014;110(1):189-194.
6. Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York: Springer; 2010.
7. Kouros-Mehr H, Whittington CF. Molecular classification of gastric cancer. *Transl Gastrointest Cancer* 2015;4(2):112-114.
8. Gotoda T, Iwasaki M, Kusano C, et al. Endoscopic resection of early gastric cancer treated by guideline and expanded National Cancer Centre criteria. *Br J Surg* 2010;97:868-871.
9. Cuschieri A, Fayers P, Fielding J, 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;347:995-999.
10. Bonenkamp JJ, Hermans J, Sasako M, et al. Extended lymph-node dissection for gastric cancer. *N Engl J Med* 1999;340:908-914.
11. Songun I, Putter H, Kranenbarg EM, et al. Surgical treatment of gastric cancer: 15-year follow-up results of the randomised nationwide Dutch D1D2 trial. *Lancet Oncol* 2010;11:439-449.
12. Jiang L, Yang KH, Guan QL, et al. Survival and recurrence free benefits with different lymphadenectomy for resectable gastric cancer: a meta-analysis. *J Surg Oncol* 2013;107:807-814.

13. Rodríguez 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):275-281.
14. Sasako M, Sano T, Yamamoto S, Kurokawa Y, Nashimoto A, Kurita A, et al. Japan Clinical Oncology Group. D2 lymphadenectomy alone or with para-aortic nodal dissection for gastric cancer. *N Engl J Med*. 2008;359:453-462.
15. Memon MA, Khan S, Yunus RM, et al. Meta-analysis of laparoscopic and open distal gastrectomy for gastric carcinoma. *Surg Endosc*. 2008;22:1781-1789.
16. Haverkamp L, Weijs TJ, Van der Sluis PC, et al. Laparoscopic total gastrectomy versus open total gastrectomy for cancer: a systematic review and metaanalysis. *Surg Endosc*. 2013;27:1509-1520.
17. Kim HH, Han SU, Kim MC, Hyung WJ, Kim W, Lee HJ, et al. Long-Term Results of Laparoscopic Gastrectomy for Gastric Cancer: A Large-Scale Case-Control and Case-Matched Korean Multicenter Study. *J Clin Oncol*. 2014;32:627-633.
18. Strong VE. Defining the Role of Laparoscopic Gastrectomy for Gastric Cancer. *J Clin Oncol*. 2014;32(7):613-614.
19. Cancer.org [Internet]. Atlanta: American Cancer Society; 2014 [actualizado 19 Mar 2015; citado 25 Mar 2015]. Disponible en:
<http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeestomago/guiadetallada/cancer-de-estomago-early-survival-rates>
20. Smalley SR, Benedetti JK, Haller DG, 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;30:2327-2333.
21. Ashraf N, Hoffe S, Kim R. Adjuvant Treatment for Gastric Cancer: Chemotherapy Versus Radiation. *Oncologist*. 2013;18(9):1013-1021.
22. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med*. 2006;355:11-20.
23. Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, et al. Frailty in Older Adults: Evidence for a Phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001;56(3):146-156.
24. Partridge JSL, Harari D, Dhesi JK. Frailty in the older surgical patient: a review. *Age Ageing*. 2012;41:142-147.

25. Makary MA, Segev DL, Pronovost PJ, Syin D, Bandeen-Roche K, Patel P, et al. Fragility as a Predictor of Surgical Outcomes in Older Patients. *J Am Coll Surg*. 2010;210(6):901-908.
26. Vidal M, Chan DW, Gerstein M, Mann M, Omenn GS, Tagle D, et al. The human proteome – a scientific opportunity for transforming diagnostics, therapeutics, and healthcare. *Clin Proteomics*. 2012;9:6.
27. European Commission . Use of '-omics' technologies in the development of personalised medicine. [Internet]. 1st ed. Brussels. SWD; 2013 [actualizado 25 Oct 2013; citado 1 May 2015]. Disponible en:
http://ec.europa.eu/health/files/latest_news/2013-10_personalised_medicine_en.pdf
28. Personalized Medicine Coalition. The Case for personalized medicine. [Internet]. 4th ed. Washington: PMC; 2014 [actualizado 1 May 2014; citado 1 May 2015]. Disponible en:
http://www.personalizedmedicinecoalition.org/Userfiles/PMC-corporate/file/pmc_the_case_for_personalized_medicine.pdf
29. Brunicardi FCH. Personalized Medicine poised to have a big impact on healthcare. [Internet]. Los Ángeles: UCLA 2013 [actualizado 20 May 2013; citado 1 May 2015]. Disponible en:
<http://surgery.ucla.edu/workfiles/Brunicardi%20May%202013%20DD%20Publication.pdf>
30. Brunicardi FCH, Gibbs RA, Wheeler DA, Nemunaitis J, Fisher W, Chen C. Overview of the Development of Personalized Genomic Medicine and Surgery. *World J Surg*. 35(8):1693–1699.
31. Davis VW, Bathe OF, Schiller DE, Slupsky CM, Sawyer MB. Metabolomics and Surgical Oncology: Potential Role for Small Molecule Biomarkers. *J Surg Oncol*. 2011;103:451-459.
32. Vidal M , Chan DW , Gerstein M , Mann M, Omenn GS, Tagle D, et al. The human proteome – a scientific opportunity for transforming diagnostics, therapeutics, and healthcare. *Clin Proteomics*[Internet]. 2012 [citado 3 Mar 2015];9:6. Disponible en:
<http://www.clinicalproteomicsjournal.com/content/9/1/6>
33. Biofortis.com [Internet]. Columbia; 2002 [actualizado 2 Ene 2015; citado 1 Mar 2015]. Disponible en: <http://biofortis.com/applications/next-generation-biobanking/>
34. McDonald SA, Watson MA, Rossi J, Becker CM, Jaques DP, Pfeifer D. A New Paradigm for Biospecimen Banking in the Personalized Medicine Era. *J Am J Clin Pathol*. 2011;136:679-684.

35. Dillner J. A basis for translational cancer research on aetiology, pathogenesis and prognosis: guideline for standardised and population-based linkages of biobanks to cancer registries. *Eur J Cancer*. 2015;51(9):1018-1027.
36. Malma J, Fehnigerb TE, Danmyrc P, Végvárib Á, Welinderd C, Lindberge H, et al. Developments in biobanking workflow standardization providing sample integrity and stability. *J Proteomics*. 2013;95:38-45.
37. Marko-Varga G, Végvári Á, Welinder C, Lindberg H, Rezeli M, Edula G, et al. Standardization and utilization of biobank resources in clinical protein science with examples of emerging applications. *J Proteome Res*. 2012;11(11):5124-5134.
38. Ericsson C, BO Franzé B, Nistér M. Frozen tissue biobanks. Tissue handling, cryopreservation, extraction, and use for proteomic analysis. *Acta Oncol*. 2006;45:643-661.
39. Diaz Z, Aguilar-Mahecha A, Paquet ER, Basik M, Orain M, Camlioglu E, et al. Next-generation biobanking of metastases to enable multidimensional molecular profiling in personalized medicine. *Mod Pathol*. 2013;26(11):1413-1424.
40. Liebman MN. Personalized medicine: a perspective on the patient, disease and causal diagnostics. *Pers Med*. 2007;4(2):171-174.
41. Werner M, Becker K, Keller G, et al. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2001;127:207-216.
42. Dicken BJ, Bigam DL, Cass C, Mackey JR, Joy AA, Hamilton SM. Gastric Adenocarcinoma Review and Considerations for Future Directions. *Ann Surg*. 2005;241:27-39.
43. Hu B, El Hajj N, Sittler S, Lammert N, Barnes R, Meloni-Ehrig A. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(3):251-261.
44. Berlth F, Bollschweiler E, Drebber U, Hoelscher AH, Moenig S. Pathohistological classification systems in gastric cancer: Diagnostic relevance and prognostic value. *World J Gastroenterol*. 2014;20(19):5679-5684.
45. McLean MH, El-Omar EM. Genetics of gastric cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11:664-674.
46. Shi J, Qu Y-P, Hou P. Pathogenetic mechanisms in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(38):13804-13819.
47. HUPO-The Human Proteome Organization. Gene-centric Human Proteome Project. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9(2):427-429.

48. Legrain P, Aebersold R, Archakov A, Bairoch A, Bala K, Beretta L, et al. The Human Proteome Project: Current State and Future Direction. *Mol Cell Proteomics*[Internet]. 2011 [citado en Feb 2015];10(7):M111.009993. Disponible en: <http://www.mcponline.org/content/10/7/M111.009993.long>
49. UniProt Consortium. The Universal Protein Resource (UniProt) 2009. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:169-174.
50. Gaudet P, Argoud-Puy G, Cusin I, Duek P, Evalet O, Gateau A, et al. NeXtProt: Organizing Protein Knowledge in the Context of Human Proteome Projects. *J Proteome Res.* 2013;12(1):293-298.
51. Paik YK, Omenn GS, Thongboonkerd V, Marko-Varga G, Hancock WS. Genome-wide Proteomics, Chromosome-centric Human Proteome Project (C-HPP), Part II. *J. Proteome Res.* 2014;13:1-4.
52. Zhang L, Hou Y, Wu K, Li D. Comparative proteomics analysis of chronic atrophic gastritis: changes of protein expression in chronic atrophic gastritis without *Helicobacter pylori* infection. *Braz J Med Biol Res.* 2012;45(3):273-283.
53. Ding Y, Li XR, Yang KY, Huang LH, Hu G, Gao K. Proteomics analysis of gastric epithelial AGS cells infected with Epstein-Barr virus. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(1):367-372.
54. Li W, Li JF, Qu Y, Chen XH, Qin JM, Gu QL, et al. Comparative proteomics analysis of human gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2008;14(37):5657-5664.
55. Zhang J, Kang B, Tan X, Bai Z, Liang Y, Xing R, et al. Comparative Analysis of the Protein Profiles from Primary Gastric Tumors and Their Adjacent Regions: MAWBP Could Be a New Protein Candidate Involved in Gastric Cancer. *J Proteome Res.* 2007;6(11):4423-4432.
56. Pinheiro DR, Ferreira WA, Barros MB, Araújo M, Rodrigues-Antunes S, Borges B. Perspectives on new biomarkers in gastric cancer: Diagnostic and prognostic applications. *World J Gastroenterol.* 2014;20(33):11574-11585.
57. Lin LL, Huang HC, Juan HF. Discovery of biomarkers for gastric cancer: a proteomics approach. *J Proteomics.* 2012; 75(11):3081-3097.
58. Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, Gholami AM, Lieberenz M, Kuster B, et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature* [Internet]. 2014 [citado en Mar 2015];509:582-587. Disponible en: <http://www.nature.com/nature/journal/v509/n7502/full/nature13319.html#access>
59. Kim MS, Pinto SM, Getnet D, Nirujogi RS, Manda SS, Pandey A, et al. A draft map of the human proteome. *Nature* 2014;509:575-581.

60. Li WQ, Hu N, Wang Z, Yu K, Su H, Wang L, et al. Genetic Variants in Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Genes and Risk of Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Gastric Cancer in a Chinese Population. *PLoS One* [Internet]. 2013 [citado en Mar 2015];8(7):e68999. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0068999>
61. Galon J, Bindea G, Mlecnik B, Angell H, Lagorce C, Tosi AM, et al. Intratumoral immune microenvironment and survival: the immunoscore. *Med Sci*. 2014;30(4):439-444.
62. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 2009;6:359-362.
63. Silva JC, Denny R, Dorschel CA, Gorenstein M, Kass IJ, Li GZ, et al. Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. *Anal Chem*. 2005;77:2187-2200.
64. Bhatia VN, Perlman DH, Costello CE, McComb ME. Software tool for researching annotations of proteins: open-source protein annotation software with data visualization. *Anal Chem*. 2009;81:9819-9823.
65. MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics*. 2010;26:966-968.
66. Cancer.gov [Internet]. Bethesda: NCI; 2004 [actualizado Nov 2014; citado Ene 2015]. Disponible en: <http://proteomics.cancer.gov/programs/completed/mouseinitiative>
67. Martínez-Bartoloméa S, Deutsch EW, Binz PA, Jones AR, Eisenacher M, Mayere G, et al. Guidelines for reporting quantitative mass spectrometry based experiments in proteomics. *J Proteomics*. 2013;95:84-88.
68. Biobancovasco.org [Internet]. Euskadi: BIOEF; 2012 [actualizado Jul 2015; citado Jul 2015]. Disponible en: <http://www.biobancovasco.org/>
69. Chaerkady R, Pandey A. Quantitative proteomics for identification of cancer biomarkers. *Proteomics Clin Appl*. 2007;1(9):1080-1089.
70. Ming Li. Statistical Analysis Strategies for Shotgun Proteomics Data. Cancer Biostatistics Center. [Internet] Nashville: Vanderbilt University Medical Center; 2008 [actualizado Nov 2008; citado Mar 2015]. Disponible en: <https://medschool.vanderbilt.edu/cqs/files/cqs/media/2008Nov2008Ming.pdf>
71. Nesvizhskii AI, Aebersold R. Interpretation of Shotgun Proteomic Data. The protein Inference problem. *Mol Cell Proteomics*. 2006;4(10):1419-1440.

72. Nesvizhskii AI. Proteogenomics: concepts, applications, and computational strategies. *Nat Methods*. 2014;11(11):1114-1125.

CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA DE UNA NEOPLASIA GÁSTRICA MULTIFOCAL EN PACIENTE CON INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE

1. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2014*. Atlanta: American Cancer Society; 2014.
2. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood*. 2012;119(7):1650-1657.
3. Dhalla F, da Silva SP, Lucas M, Travis S, Chapel H. Review of gastric cancer risk factors in patients with common variable immunodeficiency disorders, resulting in a proposal for a surveillance programme. *Clin Exp Immuno*. 2011;165(1):1-7.
4. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. *Front Immunol*. 2014;5:162.
5. Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, et al. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut*. 2000;47(2):251-255.
6. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd. English Edition. *Gastric Cancer*. 2011;14:101-112.
7. Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York: Springer; 2010.
8. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 2009;6:359-362.
9. Silva JC, Denny R, Dorschel CA, Gorenstein M, Kass IJ, Li GZ, et al. Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. *Anal Chem*. 2005;77:2187-2200.
10. Bhatia VN, Perlman DH, Costello CE, McComb ME. Software tool for researching annotations of proteins: open-source protein annotation software with data visualization. *Anal Chem*. 2009;81:9819-9823.
11. MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics*. 2010;26:966-968.

12. Carl-McGrath S, Ebert M, Röcken C. Gastric adenocarcinoma: epidemiology, pathology and pathogenesis. *J Cancer Ther.* 2007;5:877-894.
13. Schöne C, Höfler H, Walch AK. MALDI imaging mass spectrometry in cancer research: Combining proteomic profiling and histological evaluation. *Clin Biochem.* 2013;46:539-545.
14. Zhang L, Hou Y, Wu K, Li D. Comparative proteomics analysis of chronic atrophic gastritis: changes of protein expression in chronic atrophic gastritis without *Helicobacter pylori* infection. *Braz J Med Biol Res.* 2012;45(3):273-283.
15. Goddard AF, Badreldin R, Pritchard DM, Walker MM, Warren B. The management of gastric polyps. *Gut.* 2010;59:1270-1276.
16. Pinheiro DR, Ferreira WA, Barros MB, Araújo M, Rodrigues-Antunes S, Borges B. Perspectives on new biomarkers in gastric cancer: Diagnostic and prognostic applications. *World J Gastroenterol.* 2014;20(33):11574-11585.
17. Lee D, Kim YC, Lee KM, Yoon JK, Kim JB. MET-Amplified intramucosal gastric cancer widely metastatic after complete endoscopic submucosal dissection. *Treat Cancer Res.* 2015;47(1):120-125.
18. Smith CIE, Bäckesjö CM, Berglöf A, et al. X-linked agammaglobulinemia: Lack of mature B lineage cells caused by mutations in the Btk kinase. *Semin Immunopathol.* 1998;19:369-381.
19. Mohamed AJ, Nore BF, Christensson B, Smith CIE. Signalling of Bruton's Tyrosine Kinase, Btk. *Scand J Immunol.* 1999;49:113-118.
20. Parikha C, Janakiramana V, Wub WI, Foa CK, Kljavina NM, Chaudhuria S, et al. Disruption of PH-kinase domain interactions leads to oncogenic activation of AKT in human cancers. *PNAS.* 2012;109(47):19368-19373.
21. Wang X, Hills LB, Huang YH. Lipid and Protein Co-Regulation of PI3K Effectors Akt and Itk in Lymphocytes. *Front Immunol.* 2015;13(6):117.
22. Yamao T, Shirao K, Ono H, Kondo H, Saito D, Yamaguchi H, et al. Risk factors for lymph node metastasis from intramucosal gastric carcinoma. *Cancer.* 1996;77:602-606.
23. Kim BS, Oh ST, Yook JH, Kim BS. Signet ring cell type and other histologic types: Differing clinical course and prognosis in T1 gastric cancer. *Surgery.* 2014;155(6):103.

CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO CON DIFERENTE FENOTIPO CELULAR Y ESTADÍO TUMORAL

1. Berlth F, Bollschweiler E, Drebber U, Hoelscher AH, Moenig S. Pathohistological classification systems in gastric cancer: Diagnostic relevance and prognostic value. *World J Gastroenterol.* 2014;20(19):5679-5684.
2. 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;21:449-456.
3. Liu Z, Liu L, Li M, Wang Z, Feng L, Zhang Q, et al. Epidermal growth factor receptor mutation in gastric cancer. *Pathol.* 2011;43(3):234-238.
4. Taghavi S, Jayarajan SN, Davey A, Willis AI. Prognostic Significance of Signet Ring Gastric Cancer. *J Clin Oncol.* 2012;30(28):3493-3498.
5. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell.* 2010;141(7):1117-1134.
6. Roskoski R. ErbB/HER protein-tyrosine kinases: Structures and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res.* 2014;87:42-59.
7. Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res.* 2003;284:2-13.
8. Schlessinger J. Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Sci.* 2004;306:1506-1507.
9. Rodrigues GA, Falasca M, Zhang Z, Ong SH, Schlessinger J. A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol.* 2000;20:1448-1459.
10. 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.
11. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods.* 2009;6:359-362.
12. Silva JC, Denny R, Dorschel CA, Gorenstein M, Kass IJ, Li GZ, et al. Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. *Anal Chem.* 2005;77:2187-2200.
13. Bhatia VN, Perlman DH, Costello CE, McComb ME. Software tool for researching annotations of proteins: open-source protein annotation software with data visualization. *Anal Chem.* 2009;81:9819-9823.

14. MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics*. 2010;26:966-968.
15. Terashima M, Kitada K, Ochiai A, Ichikawa W, Kurahashi I, Sakuramoto S, et al. ACTS-GC Group. Impact of expression of human epidermal growth factor receptors EGFR and ERBB2 on survival in stage II/III gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(21):5992-6000.
16. Bohanes P, Loupakis F, Labonte MJ, Wakatsuki T, Lenz HJ. HER Majesty's a Pretty Nice Girl but She Changes From Day to Day. *J Clin Oncol*. 2011;29:1-2.
17. Kim MA, Lee HS, Lee HE. EGFR in gastric carcinomas: Prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number. *Histopathol*. 2008;52:738-746.
18. Gaoa M, Liangb XJ, Zhangc ZS, Maa W, Changa ZW, Zhanga MZ. Relationship between expression of EGFR in gastric cancer tissue and clinicopathological features. *Asian Pac J Trop Med*. 2013;6(4):260-264.
19. Galizia G, Lieto E, Orditura M. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression is associated with a worse prognosis in gastric cancer patients undergoing curative surgery. *World J Surg*. 2007;31:1458-1468.

PROTEÓMICA DIRIGIDA EN EL CANCER GÁSTRICO. RELACIÓN CON LA CLASIFICACIÓN MOLECULAR. GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO. NIVELES DE EVIDENCIA Y OBJETIVOS DE MEJORA

1. Mirnezami R, Nicholson J, Darzi A. Preparing for Precision Medicine. *N Engl J Med*. 2012;366(6):489-491.
2. Dematteo RP, Maki RG, Antonescu C, Brennan MF. Targeted molecular therapy for cancer: the application of STI571 to gastrointestinal stromal tumor. *Curr Probl Surg*. 2003;40(3):144-93.
3. Roskoski R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res*. 2014;79:34-74.
4. Lei Z, Tan IB, Das K, Deng N, Zouridis H, Pattison S, et al. Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to PI3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil. *Gastroenterol*. 2013;145(3):554-565.
5. Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, Reynolds SM, Miller M, Bernard B, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nat*. 2014;513(11):202-209.

6. Waddell T, Verheij M, Allum W, Cunningham D, Cervantes A, Arnold D. Gastric cancer: ESMO-ESSO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Radiotherapy and Oncology. Ann Oncol* 2014;110(1):189-194.
7. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 2009;6:359-362.
8. Silva JC, Denny R, Dorschel CA, Gorenstein M, Kass IJ, Li GZ, et al. Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. *Anal Chem*. 2005;77:2187-2200.
9. Bhatia VN, Perlman DH, Costello CE, McComb ME. Software tool for researching annotations of proteins: open-source protein annotation software with data visualization. *Anal Chem*. 2009;81:9819-9823.
10. MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics*. 2010;26:966-968.
11. Dikken JL, van Sandick JW, Swellengrebel, Lind PA, Putter H, Jansen EPM, et al. Neoadjuvant chemotherapy followed by surgery and chemotherapy or by surgery and chemoradiotherapy for patients with resectable gastric cancer (CRITICS). *BMC Cancer*. 2011;11:329.
12. Cunningham D, Starling N, Rao S. The Upper Gastrointestinal Clinical Studies Group of the National Cancer Research Institute of the United Kingdom, Capecitabine and Oxaliplatin for Advanced Esophagogastric Cancer. *N Engl J Med*. 2008;358:36-46.
13. Smalley SR, Benedetti JK, Haller DG, 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;30:2327-2333.
14. Hanash SM, Baik CS, Kallioniemi O. Emerging molecular biomarkers-blood-based strategies to detect and monitor cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8:142-150.
15. Ashraf N, Hoffe S, Kim R. Adjuvant Treatment for Gastric Cancer: Chemotherapy Versus Radiation. *Oncologist*. 2013;18(9):1013-1021.
16. Celis JE, Gromov P. Proteomics in translational cancer research: toward an integrated approach. *Cancer Cell*. 2003;3:9-15.
17. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003;422:198-207.
18. Picotti P, Aebersold R. Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nat. Methods*. 2012;9(6): 555-566.

19. Munding J, Stüken W, Tannapfel A. Pathologie des ösophagogastralen Adenokarzinoms. Von der Karzinogenese zur molekularen Therapie. *Onkologie*. 2013;19(5):363-370.
20. Tan IB, Ivanova T, Lim KH, Ong CW, Deng N, Lee J, et al. Intrinsic Subtypes of Gastric Cancer, Based on Gene Expression Pattern, Predict Survival and Respond Differently to Chemotherapy. *Gastroenterol*. 2011;141(2):476-485.
21. Li W, Qin J, Sun YH, Liu TS. Neoadjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2010;16(44):5621-5628.
22. Messager M, Lefevre JH, Pichot-Delahaye V, Souadka A, Piessen G, Mariette C. The impact of perioperative chemotherapy on survival in patients with gastric signet ring cell adenocarcinoma: a multicenter comparative study. *Ann Surg*. 2011;254(5):684-693.
23. Liao Y, Yang ZL, Peng JS, Xiang J, Wang JP. Neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer: A meta-analysis of randomized, controlled trials. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(5):777-782.
24. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive Molecular Characterization of Gastric Adenocarcinoma. *Nat*. 2014;513(11):202-209.
25. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova 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;376:687-697.
26. Ding L, Tian C, Feng S, Fida G, Zhang C, Ma Y, et al. Small Sized EGFR1 and HER2 Specific Bifunctional Antibody for Targeted Cancer Therapy. *Theranostics*. 2015;5(4):378-398.