



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Medicina

Departament de Cirurgia

**IDENTIFICACION Y VALIDACION DE UNA FIRMA DE
EXPRESION DE 21 PROTEINAS PREDICTIVA EN EL
CANCER GASTRICO MEDIANTE TECNICAS
ONCOPROTEOMICAS BASADAS EN
MICROMATRICES DE ANTICUERPOS**

Tesis Doctoral presentada por **Manuel Puig Costa** para
optar al grado de Doctor

Directores

Javier Abel Menendez Menendez

Manuel Armengol Carrasco

Antonio Codina Cazador

2013



D. **JAVIER ABEL MENÉNDEZ MENÉNDEZ**, Doctor en Bioquímica y Biología Molecular, Jefe de la Unidad de Investigación Translacional del INSTITUTO CATALAN DE ONCOLOGIA (ICO) de Girona y Coordinador del Grupo de Oncología Molecular del Instituto de Investigación Biomédica de Girona (IDIBGI), D. **ANTONIO CODINA CAZADOR**, Doctor en Medicina y Cirugía, Jefe del Servicio de Cirugía del Hospital Universitario Dr. Josep Trueta de Girona, y D. **MANUEL ARMENGOL CARRASCO**, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático de Cirugía de la Universitat Autònoma de Barcelona

Certifican que,

D. **MANUEL PUIG i COSTA** ha realizado bajo nuestra dirección y supervisión durante los últimos 4 años el proyecto de investigación titulado: "**IDENTIFICACION Y VALIDACIÓN DE UNA FIRMA DE EXPRESIÓN DE 21 PROTEINAS PREDICTIVA EN CÁNCER GÁSTRICO MEDIANTE TÉCNICAS ONCOPROTEÓMICAS BASADAS EN MICROMATRICES DE ANTICUERPOS**". Es su intención presentarlo como Trabajo de Tesis y optar para ello al **Grado de Doctor en Medicina y Cirugía** por la **Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)**. Por la dedicación, rigor y seriedad de dicho trabajo puede ampliamente presentarse para tal fin. Los abajo firmantes quiere informar asimismo que han dirigido y supervisado personalmente todos los experimentos, resultados y conclusiones reflejados en el mismo. Consideramos que este trabajo de investigación reúne los requisitos de originalidad, calidad y excelencia necesarios para ser presentado y defendido como trabajo de tesis doctoral.

Y para que así conste, firmamos el presente documento en Girona, a 5 de Septiembre de 2013:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Manuel Puig i Costa", written over a horizontal line.

AGRADECIMIENTOS

Cuando terminas un trabajo como este, que puede permitirte alcanzar un título por muchos años deseado, lo primero que piensas es a quién debes agradecer el haberlo podido conseguir y cuantas personas han intervenido de forma directa e indirecta, a lo largo de tu vida. Más en este caso, cuando quién pretende alcanzar el grado de Doctor ya ha cumplido sesenta años.

Sería injusto si no recordara al Profesor J.L.Balibrea, quién ya en el año 1980 me ayudó en un proyecto de Tesis Doctoral que se frustró por circunstancias personales, y a quién siempre mantengo en el recuerdo por su cariño, sus consejos y buenas enseñanzas.

Sin embargo, han transcurrido muchos años y en este momento, no me gustaría ser desagradecido con todas aquellas personas de mi entorno, que de una u otra forma, lo han hecho posible.

Algunos de ellos, amigos que me han estimulado a conseguirlo y me han ayudado, y en particular, a Antonio Codina Cazador, con quién he podido compartir amistad y trabajo, y ha colaborado en la Dirección de esta Tesis.

Por regla general, nada suele ser fruto de una sola persona, sino de un conjunto de circunstancias. Sin embargo, debo dejar bien claro que sin una persona en concreto este trabajo no habría sido posible. En primer lugar, por su capacidad intelectual y de trabajo, calidad científica, entrega, generosidad, y muchas más cualidades que me es difícil enumerar, pero que se resumen en la persona de Javier Abel Menendez. Su calidad científica viene avalada por los trabajos que ha publicado y proyectos en que ha participado.

No obstante, muchas veces la sociedad no tiene consciencia del valor de alguno de sus miembros y si en algo puedo contribuir desde estas líneas, a reconocer un trabajo callado, difícil y del más alto valor científico, será una satisfacción para mí.

El entorno profesional, con personas como Josep Roig quién concedor de este proyecto, siempre he encontrado en él la máxima colaboración y estímulo, Jordi Gironés, José Ignacio Rodríguez, Eva Artigau y todos los miembros del Servei de Cirurgia General i Digestiva del Hospital Josep Trueta de Girona, han facilitado esta labor.

Debo asimismo recordar la colaboración anónima de aquellas personas que han ayudado en la obtención de las muestras, personal de quirófano y laboratorio, y secretaria del servicio de cirugía, que merecen mi reconocimiento.

También, fuera de este, no puedo olvidar la colaboración de Jaume Torramadé y otros compañeros de la Clínica Girona, y como no, a mi familia que ha sido el soporte fundamental a lo largo de toda mi vida.

Por último, y sin que ello suponga ningún orden, debo agradecer a Manuel Armengol su predisposición y apoyo en cuanto le plantee mi interés por desarrollar una Tesis Doctoral, y a quién pedí su colaboración para co-dirigirla.

A todos ellos, mi gratitud.

A mi familia, madre, hermana, esposa e hijos, por su apoyo incondicional

ÍNDICE

Agradecimientos

Summary/Resumen

1. Introducción

1.1. El microambiente tumoral

1.2. Fundamentos del Estudio

1.2.1 Análisis genómicos y proteómicos: Necesidad de nuevas herramientas %ómicas+

1.2.2 Microarrays de proteínas basados en anticuerpos.

2. Hipótesis

3. Objetivos

4. Material y Métodos

4.1 Obtención e identificación de las muestras

4.2 Preparación de las muestras

4.2.1 Descongelación de los tejidos

4.2.2 Lisis de los tejidos

4.2.3 Protocolo de Lowry para determinar la concentración de proteína

4.2.4 Protocolo de microarrays de proteínas basados en anticuerpos

4.3 Creación de la firma oncoproteómica

4.4 Validación del test

5. Resultados

5.1 Generación de la firma oncoproteómica del cáncer gástrico

5.1.1 Metaloproteasas

5.1.2 Factores angiogénicos

5.1.3 Factores inflamatorios y citoquinas

5.1.4. Factores de crecimiento

5.1.5 Resumen de los resultados: Generación de la firma

5.2 Validación del test

6. Discusión

7. Conclusiones

8. Índice de figuras

9. Índice de tablas

10. Bibliografía

SUMMARY/RESUMEN

SUMMARY

Purpose: The early detection of gastric cancer (GC) is crucial for successful treatment and patient survival. However, compliance with current screening methods remains poor. This study aimed to identify and validate an accurate a tissue-based protein expression signature for GC detection using low-cost affinity proteomics. **Methods:** The detection of 120 cytokines, 43 angiogenic factors, 41 growth factors, 40 inflammatory factors and 10 metalloproteinases was performed using commercially available Human antibody microarray-based Arrays (RayBiotech, Inc.). There were 33 paired samples divided into a training set (n=11) and a validation set (n=22) for the identification of differentially expressed proteins between GC tissues and normal gastric mucosae. **Results:** Using a discovery cohort of matched pairs of tumor/normal gastric tissues we identified 21 proteins with significant differences in expression between malignant and normal samples. To assess the performance of the 21 predictors in the classification of unknown samples, we carried out a prediction for %GC+ or %non-GC+ phenotype in a blinded test set. Using this expanded independent validation cohort, the 21-protein expression signature classified gastric samples as %GC+ or as %non-GC+ with sensitivity of 82% (95% CI 59-94) and a specificity of 73% (95% CI 49-89). Positive predictive value and negative predictive value in this validation cohort was 75% (95% CI 53-90) and 80% (95% CI 56-94), respectively. The signature was significantly enriched in proteins involved in inflammatory/immune and chemotaxis responses. **Conclusions:** Antibody microarray analyses of complex proteomes in tissue-based studies can be useful tools to define cancer-associated protein signatures. This study identified and validated a 21-protein signature that accurately discriminated GC and noncancerous gastric mucosae. Because most of the biomarkers belonged to the secreted class of proteins, our results prompt the further blood-based development of the GC 21-protein expression signature for the diagnosis and early detection of GC in general population.

RESUMEN

Objetivo: La detección temprana del cáncer gástrico (CG) es crucial para el tratamiento y supervivencia del paciente. Sin embargo, la adherencia a programas de cribado del CG con los actuales métodos de screening es extremadamente baja. Este estudio fue diseñado para identificar y validar una firma de expresión de proteínas específicamente asociada a la malignización de la mucosa gástrica mediante el empleo de técnicas proteómicas de bajo coste. **Métodos:** Se llevó a cabo la detección de 120 citoquinas, 43 factores angiogénicos, 41 factores de crecimiento, 40 factores inflamatorios y 10 metaloproteasas mediante el empleo de micromatrices de proteínas basadas en anticuerpos disponibles comercialmente (RayBiotech, Inc.). Se analizaron 33 muestras pareadas divididas en un set de entrenamiento (n=11 pacientes) y un set de validación (n=22 pacientes) para la identificación de proteínas expresadas diferencialmente en la mucosa normal y tumoral de los pacientes. **Resultados:** El empleo de la cohorte de descubrimiento permitió la identificación de 21 proteínas con niveles de expresión significativamente alterados en las muestras tumorales respecto al tejido normal. Para analizar el funcionamiento de los 21 predictores en la clasificación de muestras desconocidas, llevamos a cabo un test de predicción ciega del fenotipo %CG+o %mucosa normal+ en un set blindado de muestras. El empleo de esta cohorte independiente de validación demostró que la firma de 21 proteínas fue capaz de clasificar las muestras de mucosa gástrica como %CG+o %mucosa normal+ con una sensibilidad del 82% (IC95% 59-94) y una especificidad del 73% (IC95% 49-89). Los valores predictivos positivos (CG) o negativos (mucosa normal) de la firma de 21 proteínas en la cohorte de validación fueron del 75% (IC95% 53-90) y del 80% (IC95% 56-94), respectivamente. La firma de 21 proteínas estuvo enriquecida con factores implicados en la respuesta inflamatoria/inmune y quimiotaxis. **Conclusiones:** El análisis de proteomas complejos en tejidos tumorales como el CG mediante el empleo de micromatrices de proteínas basadas en anticuerpos es una nueva herramienta de utilidad para definir firmas oncoproteómica específicamente asociadas con el proceso de malignización. Nuestro estudio fue capaz de identificar y validar una firma de 21 proteínas capaz de discriminar de manera sensible y específica la presencia de CG en la mucosa gástrica. Dado que la mayoría de los biomarcadores incluidos en la firma pertenecen a familias de proteínas secretadas al medio extracelular, los resultados obtenidos en este estudio justifican el desarrollo de nuevos estudios de validación de la firma oncoproteómica de 21 proteínas en la sangre para el diagnóstico y detección precoz del CG en una población asintomática.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El Cáncer Gástrico (CG) es una de las principales causas de muerte por cáncer a nivel mundial y una de las más comunes enfermedades neoplásicas. Ocupa el cuarto lugar en cuanto a frecuencia de las mismas. El crecimiento metastásico del tumor primario es el responsable de la mayoría de muertes, y debido a ello, es la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial y cuarta en la Unión Europea.

El CG es una enfermedad heterogénea, en la que podemos distinguir dos tipos fundamentales a partir de la Clasificación de Lauren en 1964, difuso e intestinal, los cuales presentan diferencias en su epidemiología, patogénesis y evolución. La incidencia del adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal ha disminuido en las últimas décadas en los países occidentales, lo cual podría relacionarse con el tratamiento de *Helicobacter pylori*, un agente infeccioso etiológicamente importante para el desarrollo del cáncer gástrico causalmente vinculado a la secuencia de Correa y Yasui metaplasia → displasia → adenocarcinoma.(1)

El diagnóstico del cáncer gástrico suele tener lugar en pacientes sintomáticos, los cuales habitualmente presentan formas avanzadas de la enfermedad (60% en Estadios III y IV); en este escenario la supervivencia se sitúa, de forma global, entre el 10 y el 30% a los cinco años de la cirugía. La cirugía es el tratamiento del CG hasta el momento actual. Iniciada en 1897 por Karl Schlatter en Zúrich, durante muchos años difirió poco en la técnica aplicada hasta que en la década de los 60 los cirujanos japoneses inician, después de definir los distintos grupos ganglionares gástricos, una cirugía más radical con linfadenectomías más extensas, es decir, gastrectomía total y linfadenectomía D2, mejorando de forma notable los resultados obtenidos. Para este tipo de tumores, la afectación de los ganglios linfáticos se encuentra asociada a la supervivencia a corto plazo y habitualmente, es uno de los factores de peor pronóstico (2).

Durante el crecimiento y desarrollo del tumor, las células neoplásicas se escapan de su lugar de origen y colonizan los órganos distantes a través de la invasión de

los sistemas vascular y/o linfático. En realidad, una de las claves para este proceso de diseminación celular es el sistema linfático asociado a los tumores, el cual debe ser considerado una de las claves en la evolución metastática del CG.(3)

La diseminación tumoral puede ocurrir mediante varias vías, incluyendo la invasión local de tejidos, la siembra directa de cavidades o superficies, la diseminación hematológica, y la diseminación linfática. Los procesos metastáticos incluyen complejos procesos de las células tumorales que incluyen el desprendimiento del tumor primario, la micro-invasión del tejido estromal, la intravasación en los vasos linfáticos o sanguíneos y, finalmente, la extravasación y crecimiento en las localizaciones secundarias. Las observaciones clínicas y anatomopatológicas sugieren que en la mayoría de las ocasiones, la vía de diseminación linfática es la más común en la diseminación inicial tumoral, lo que implica la invasión de los vasos linfáticos aferentes siguiendo la ruta de drenaje natural (4-5)

Los denominados ganglios centinelas, que se corresponden con aquellos que reciben en primer lugar el drenaje linfático, están afectados de forma preferente por los carcinomas (6). Las células tumorales intralinfáticas pueden pasar directamente al sistema vascular a través de las comunicaciones venolinfáticas y viceversa.

Como se ha comentado más arriba, la diseminación metastática de las células tumorales continúa siendo la principal causa de muerte en los pacientes con CG. Aunque desconocemos con exactitud los mecanismos moleculares responsables del proceso metastático, sabemos que este proceso no es aleatorio y que ocurre principalmente bien a través de los vasos sanguíneos (*diseminación hematológica*) bien a través de los vasos linfáticos (*diseminación linfática*). Aunque pueden distinguirse distintos patrones de metástasis entre los distintos tipos tumorales, un fenómeno común a todos ellos es que los ganglios linfáticos regionales son las primeras localizaciones en las que tiene lugar el proceso de metástasis, debido al drenaje a través de vasos linfáticos aferentes pre-existentes y/o a través de la formación de nuevos capilares linfáticos(7). Este patrón inicial común explicaría, por ejemplo, la utilidad de la linfadenectomía del ganglio centinela como técnica

quirúrgica capaz de predecir la presencia de metástasis ganglionares, el factor pronóstico más importante en la predicción de la supervivencia en carcinomas como el cáncer de mama(8). Sin embargo, no todos los carcinomas metastatizan inicialmente en los ganglios linfáticos regionales y las rutas de señalización que inicialmente determinan la ausencia o aparición regional y/o distal del proceso metastático aún deben ser establecidas. En realidad, la mayoría de las células tumorales diseminadas presentan una capacidad de supervivencia limitada y solamente un número muy reducido es capaz de desarrollar *micrometástasis* detectables.

En cualquier caso, la disponibilidad de herramientas diagnósticas capaces de identificar rápida y específicamente la presencia de células tumorales ocultas es de una importancia clínica incuestionable en el correcto estadiaje de la enfermedad oncológica, incluyendo el CG.

El ganglio centinela en el cáncer gástrico y otros carcinomas: El problema de las micrometástasis.

Miwa y Cols (9) fueron los primeros investigadores que introdujeron el concepto de la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) en el CG. Como en otros carcinomas (10), el uso clínico de la BSGC para determinar la aproximación quirúrgica a seguir en pacientes con CG requiere la verificación de la enfermedad a nivel de las *micrometástasis* en los ganglios linfáticos (11). La presencia de micrometástasis ganglionares no detectables a través del examen histológico rutinario ha sido observada en carcinomas de mama,(12,13,14,15) pulmón, esófago, estómago, colon y vejiga (16,17). Aunque la aparición de micrometástasis es un indicador de mal pronóstico en cáncer de mama, pulmón y colon, su relevancia clínica en el CG no ha sido establecida definitivamente. Algunos estudios han sugerido que la incidencia de micrometástasis en los ganglios linfáticos detectada por métodos inmunohistoquímicos clásicos es muy elevada y su presencia se asocia con el pronóstico de pacientes con CG sin afectación metastásica ganglionar. En realidad, no solo el número de ganglios positivos aislados sino también el porcentaje de *células tumorales aisladas* (células tumorales

individuales o pequeñas agrupaciones de células tumorales que no exceden los 0.2 mm en la dimensión mayor, habitualmente detectadas por inmunohistoquímica -hematoxilina/eosina- o métodos moleculares, sin evidencia de actividad metastásica .proliferación o reacción estromal- y sin penetración de paredes vasculares o linfáticas) y *micrometástasis* (formación agrupada de células tumorales con reacción estromal y microinteracción de las células tumorales) en los ganglios linfáticos, son factores de riesgo independientes para la aparición de enfermedad recurrente tanto a nivel locoregional como distal. A pesar de estas evidencias clínicas, el diagnóstico de metástasis en los ganglios linfáticos incluyendo micrometástasis sigue constituyendo un grave problema en el CG.(18,19)

Aunque los ganglios linfáticos son estructuras tridimensionales, las investigaciones histológicas e inmunohistoquímicas se realizan habitualmente en secciones planas. Un foco metastásico localizado en el centro del ganglio linfático resulta en una correcta identificación positiva mientras que una localización en el *hilus* del ganglio proporcionará una errónea identificación negativa. Aunque el análisis de secciones seriadas de los ganglios linfáticos para tinción con hematoxilina/eosina incrementa el grado de acierto durante la determinación de la extensión metastásica ganglionar, este procedimiento es clínicamente laborioso y caro. Se requiere, por tanto, un método diagnóstico sistemático y comprensivo para el correcto diagnóstico de metástasis en los ganglios linfáticos, especialmente para la detección de micrometástasis. En este sentido, gracias al progreso de la detección genética, se ha podido evaluar la presencia de micrometástasis ganglionares en pacientes cuyos exámenes histológicos inicialmente indicaron la ausencia de afectación ganglionar.(20,21) Estudios recientes han evaluado la presencia de micrometástasis en ganglios linfáticos mediante la detección de marcadores tales como CEA (antígeno carcinoembrionario), CK-18/-19/-20 (Citoqueratinas), MUC-1/-2 (mucinas) empleando la técnica de *real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*(22,23). En estos estudios, los tumores primarios fueron inmunoteñidos con el anticuerpo monoclonal dirigido contra el marcador específico de vasos linfáticos *D2-40* y la presencia o ausencia

de metástasis linfática fue comparada con la obtenida por tinción con hematoxilina/eosina. Esta evaluación de la relación entre la presencia de micrometástasis y el grado de invasión linfática en pacientes con CG inicialmente diagnosticados como negativos para afectación metastásica ganglionar demostró que:

- 1.) La incidencia de micrometástasis determinada por RT-PCR es significativamente superior a la observada mediante inmunohistoquímica;
- 2.) La tinción específica de vasos linfáticos con el marcador D2-40 es capaz de revelar nuevas invasiones no detectadas por tinción con hematoxilina/eosina;
- 3.) En el diagnóstico de hematoxilina/eosina y tinción con D2-40, la incidencia de micrometástasis en ganglios linfáticos es significativamente superior en pacientes con invasión linfática;
- 4.) La presencia de micrometástasis ganglionares se correlaciona más estrechamente con la tinción positiva para D2-40 que con la tinción por hematoxilina/eosina.

Aunque el procedimiento de detección de marcadores de micrometástasis por RT-PCR es un método relativamente rápido (de 30 minutos empleando el recientemente desarrollado *GeneSearch BLN Assay* a 2-3 horas empleando una RT-PCR convencional) -lo que permitiría un diagnóstico intra-operatorio de micrometástasis ganglionares y, por tanto, una linfadenectomía individualizada en estadios tempranos del CG y otros carcinomas- debe tenerse en cuenta que la totalidad de los marcadores empleados no son exclusivamente específicos de células tumorales y se requiere una comparación de ganglios metastásicos y ganglios benignos sin células tumorales para establecer valores de corte adecuados para cada uno de los marcadores.^(23,24)

Además, y como sucede también con el empleo de métodos inmunohistoquímicos, los problemas metodológicos asociados con el empleo de la RT-PCR como herramienta diagnóstica son múltiples, incluyendo la selección de marcadores y/o

la utilización de varios marcadores simultáneamente, la contaminación con células epiteliales normales, la presencia de pseudogenes y la imposibilidad de amplificación específica de las secuencias disponibles.(25)

Conociendo los mecanismos a través de los cuales las células neoplásicas emigran a los vasos linfáticos o conociendo efectivamente como los nuevos vasos linfáticos se generan a partir de células progenitoras o linfangiogénesis, conoceremos los mecanismos potenciales de crecimiento de las metástasis. El sistema linfático complementa las funciones del sistema vascular sanguíneo, regulando el balance de fluidos tisulares, facilitando el transporte intersticial de las proteínas y cumpliendo unas funciones inmunológicas.

Los vasos linfáticos grandes son los responsables del transporte de la linfa de la circulación sanguínea y los microvasos linfáticos son los que absorben los componentes desde el intersticio, de tal manera que las células linfáticas endoteliales (CLEs) juegan un papel importante en la regulación de la presión intersticial y tráfico celular. Las CLE presentan funciones similares al endotelio vascular, pero con características ultraestructurales y funcionales diferentes a las células del endotelio vascular (CEBs) .(19,26)

El sistema linfático formado por capilares, conductos y ganglios linfáticos está involucrado en el transporte de fluidos tisulares, las proteínas plasmáticas extravasadas y las células que vuelven a la circulación sanguínea; es además una vía para la diseminación de las células malignas, debido en parte a que los vasos linfáticos tiene mayor calibre que los capilares sanguíneos y por la falta de una membrana basal completa. También el hecho de que el flujo linfático sea más lento que no el flujo hemático y tenga una consistencia similar al fluido intersticial, facilita la viabilidad de las cells metastásicas. Es muy difícil definir el papel de cada una de las vías de diseminación aceptadas, a través de vasos linfáticos, ganglios regionales o diseminación hematológica, en el crecimiento sistémico tumoral. Aún cuando no es posible cuantificar la relativa contribución a la diseminación de la enfermedad por parte de cada una de ellas, es evidente que la asociación con la

afectación de los ganglios linfáticos y su relación con la evolución de la enfermedad es un proceso clave para el estadiaje de los tumores malignos.(27)

En determinados tipos de carcinomas como el cáncer de mama, las metástasis linfáticas son la vía principal de diseminación de las células tumorales. La extensión por afectación tumoral de los ganglios linfáticos constituye un indicador importante de la agresividad del tumor y constituye la base para la linfadenectomía no solo en el caso citado anteriormente, sino en el tratamiento quirúrgico de otros tumores y entre ellos, del CG. En estos casos, a pesar de las resecciones gástricas con linfadenectomía para controlar la evolución de la enfermedad, muchos pacientes fallecen con metástasis ganglionares. Actualmente, más del 80% de pacientes con CG avanzado tiene metástasis ganglionares y los ganglios remotos, como los para-aórticos, están afectados en un 20% de los casos. Por todo ello, el control de las metástasis ganglionares es la estrategia más importante para el tratamiento del CG.(3,28)

De forma habitual, no se ha considerado que el sistema linfático juegue un papel activo en el desarrollo de las metástasis. Sin embargo, en numerosos estudios se ha observado que aparecen vasos linfáticos aumentados de tamaño y linfangiogénesis en áreas peritumorales de varios tipos de cáncer en humanos , lo que permite pensar en una mayor participación por parte del mismo. Se desconoce, por otra parte, si los vasos linfáticos preexistentes son suficientes para esta diseminación celular o bien si requiere la formación *de novo* de vasos linfáticos (linfangiogénesis) o un incremento en los vasos linfáticos preexistentes.(29,30)

La importancia de los vasos neo-formados y preexistentes en relación con la diseminación linfática no es del todo conocida. Aunque es probable que los vasos linfáticos preexistentes sean suficientes para el crecimiento tumoral, la presencia de nuevos vasos peritumorales facilitaría la diseminación a través de los mismos. Por ello, la presencia de linfáticos intratumorales junto al aumento en la densidad de estos, podría considerarse como una capacidad tumoral para la diseminación efectiva de las células malignas (31,32). Debe considerarse también el papel activo

de los vasos linfáticos en la formación de metástasis así como el de las células linfática endoteliales en la migración de las células tumorales mediante la liberación de las quimiocinas CCL19 y CCL21 y su acción sobre los receptores CCR7 y CXCR4, procesos moleculares que favorecerían la entrada de las células tumorales en los vasos linfáticos. La liberación de factores solubles expresados en las células endoteliales linfáticas facilitaría la entrada en los vasos linfáticos de las células tumorales (33,34)

La importancia de los receptores de quimiocinas en la formación de metástasis linfáticas ha sido establecida en algunos de tipos de cánceres humanos en los que se ha demostrado expresión aumentada de CCR7 (melanoma maligno y cáncer gástrico) y de CXCR4 (cáncer de mama). En este caso, el empleo de un anticuerpo neutralizador sobre este receptor permite el control de las metástasis ganglionares. También, en un modelo experimental, la neutralización del CCL21 permite una acción similar. Todo ello refleja, considerado en conjunto, el papel activo de las células linfáticas endoteliales en el control de la migración celular no solo en situaciones fisiológicas sino también en el cáncer, así como el papel activo que desempeñan algunas quimiocinas y sus receptores lo que, por otra parte, abre las puertas a una nueva forma de tratamiento linfático del cáncer (35,36,37).

La formación de metástasis linfáticas es, como se ha comentado con anterioridad, la consecuencia de un complejo proceso que implica, en primer lugar, la diseminación de las células malignas desde el tumor primario a los vasos linfáticos. El transporte de las células tumorales a través de los mismos a los ganglios linfáticos locales, el asentamiento de estas en los ganglios linfáticos y su posterior crecimiento metastásico en los mismos, son los siguientes pasos del proceso. Los capilares linfáticos son los que facilitan la entrada de las células tumorales en el sistema vascular linfático cuando aquellas emigran a los ganglios, siendo en parte responsables de la diseminación metastásica del tumor; la presencia de vasos linfáticos y su aumento, tanto en tamaño como en número (linfangiogénesis), son factores importantes en la predicción no solo de la

evolución posterior del paciente sino también en la correcta planificación del tratamiento (38,39).

Más allá de estos principios bien establecidos, hay una serie de cuestiones sobre los mecanismos de invasión linfática que aún permanecen sin respuesta:

1. ¿Cuáles son los mecanismos de linfangiogénesis y dilatación linfática?
2. ¿Es el proceso de intravasación de las células tumorales en los vasos linfáticos análogo al que se produce en el sistema vascular sanguíneo?
3. ¿Es la inhibición de la linfangiogénesis una estrategia adecuada para inhibir la diseminación celular tumoral y la consecuente formación de metástasis?
4. ¿Aumenta la posibilidad de diseminación linfática con la formación *de novo* de vasos linfáticos (linfangiogénesis) o con el aumento de la dilatación de los mismos más allá del que puede producirse a través de los vasos linfáticos preexistentes exclusivamente?

Los mecanismos a través de los cuales las células tumorales emigran a través del endotelio linfático a los vasos linfáticos quedan por definir de manera definitiva. Una de las posibilidades que se ha barajado ha sido la entrada pasiva a través de las uniones intercelulares, lo que sería posible gracias a la estructura de los mismos que facilitan dicho proceso, en contra de la mayor dificultad que significaría la entrada a los vasos sanguíneos. Otras hipótesis sugieren la necesidad de una interacción de las células tumorales con las células endoteliales linfáticas (40).

Se han identificado varios receptores a nivel de las uniones del endotelio linfático, como por ejemplo el MR (*macrophage mannose receptor*), CLÉvER-1 (*common lymphatic endothelial and vascular endothelial receptor-1*), moléculas implicadas en la migración de los leucocitos, o la adhesión de los linfocitos a los vasos linfáticos en los ganglios. Algunos estudios en humanos y animales han sugerido que los tumores carecen de un sistema linfático vascular intrínseco. La observación de

dilatación de vasos linfáticos en el estroma peritumoral, de manera que de forma ocasional penetran en la periferia del tumor, así como la dilatación de vasos linfáticos intratumorales son fenómenos observados prácticamente con igual frecuencia. Asimismo, otros estudios han demostrado aumento de tamaño de los vasos linfáticos y linfangiogénesis en el área peritumoral en varios tumores en humanos, utilizando marcadores endoteliales linfáticos específicos (41,42).

El interés por caracterizar los procesos moleculares relacionados con la formación y diseminación del CG así como su posible relación con la formación de metástasis ganglionares, junto la posibilidad de utilizar métodos proteómicos de bajo coste que permitan establecer un correcto estadiaje de CG en la rutina hospitalaria, constituyen los planteamientos básicos sobre los que se sustentan el desarrollo de este proyecto de investigación. Concretamente, el descubrimiento y validación de un perfil o firma proteómica capaz de ser empleada de manera sensible y específica en la detección precoz del CG en el screening de una población asintomática constituyen los objetivos principales de esta Tesis Doctoral.

1.1. El microambiente tumoral

Las neoplasias son procesos escalonados que implican alteraciones a diversos niveles, como la desregulación de las señales de crecimiento, la muerte celular programada (apoptosis), la formación de nuevos vasos (angiogénesis), el potencial de replicación, la respuesta inmune, la capacidad de migración y metástasis, que finalmente permiten la transformación de las células normales en células neoplásicas.(43)

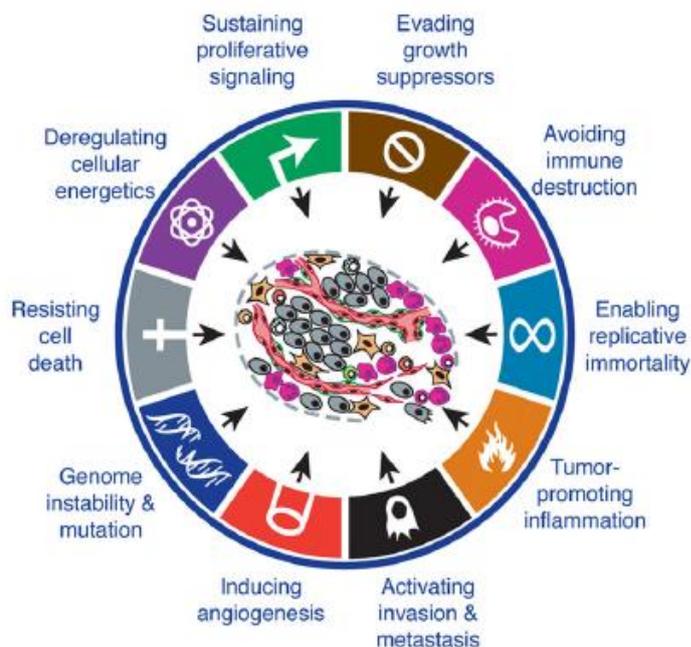


Figura 1. Los atributos del cáncer. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4; 144(5):646-74.

Los tumores no sólo constituyen masas de células tumorales proliferativas, sino que son tejidos con mayor complejidad, formados por diferentes tipos celulares que interactúan entre ellos (44). De dichas interacciones entre las células tumorales y el estroma dependerán la evolución y progresión de las células neoplásicas. El microambiente tumoral está formado no solo por células tumorales sino que incluyen células precancerosas, células estromales (fibroblastos,

mioblastos y células endoteliales), células epiteliales adyacentes, células inflamatorias, canales vasculares y matriz extracelular.

Las células tumorales producen una gran variedad de factores hemato-angiogénicos y linfo-angiogénicos capaces de estimular el crecimiento de las células endoteliales de los vasos sanguíneos y de las células endoteliales linfáticas (45). Las células endoteliales de los vasos sanguíneos también produce factores de crecimiento que promueven el crecimiento de las células tumorales. Además, las células endoteliales de los vasos sanguíneos que infiltran el tumor también producen factores linfo-angiogénicos que estimulan el crecimiento de las células endoteliales linfáticas. Las células endoteliales linfáticas, por su parte, también podrían producir factores de crecimiento que estimulan el crecimiento de las células tumorales y de las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Por tanto, es posible que todos los compartimentos se beneficien, en términos de crecimiento, de la existencia de numerosas interacciones bilaterales en el interior del microambiente tumoral (46,47,48).

Estas interacciones moleculares dentro del microambiente tumoral pueden ser fuente de identificación de biomarcadores que faciliten la obtención de perfiles proteómicos que permitan conocer situaciones clínicas concretas (49,50). Dichos procesos están acompañados por cambios en los niveles de expresión de citoquinas (quimiotaxis), factores inflamatorios, factores de crecimiento, etc. de una manera tal que los perfiles de expresión de estas proteínas están alterados específicamente en el microambiente tumoral, y en consecuencia, en el *secretoma* que se libera al torrente circulatorio. Al mismo tiempo, los fibroblastos activados y las células inflamatorias producen enzimas proteolíticos, citoquinas, y otros factores que tiene un efecto mitogénico sobre las células endoteliales y las células neoplásicas, y que se relacionan activamente con los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis.

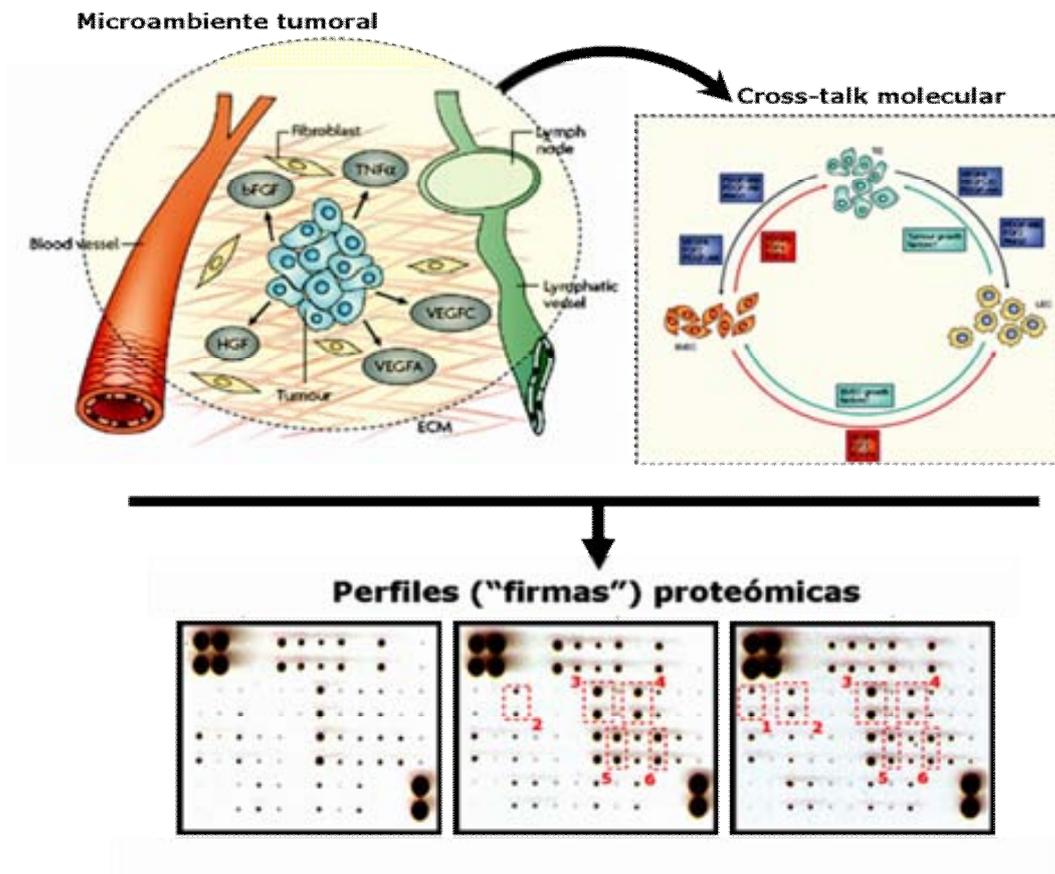


Figura 2. El microambiente tumoral puede ser fotografiado a través de perfiles (firmas) proteómicas. Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008 Aug; 8 (8):604-17.

Cuando nos referimos al secretoma o secretómica, hacemos referencia al estudio global de las proteínas que son secretadas por una célula, un tejido o un organismo en un determinado momento y en unas determinadas condiciones fisiológicas. El secretoma constituye una clase importante de proteínas que controla y regula una gran variedad de procesos biológicos y fisiológicos. En este sentido, lo más relevante es poder detectar y cuantificar las proteínas realmente secretadas en un tejido (51). Debe tenerse en cuenta que la enfermedad oncológica es el producto del microambiente tisular, donde tienen lugar un enorme número de interacciones entre células pre-cancerosas, las células estromales y

epiteliales adyacentes, los canales vasculares, la matriz extracelular y el sistema inmune. Todas estas interacciones están medidas por enzimas, citoquinas, moléculas de la matriz extracelular y distintos componentes del sistema inmunológico y de la respuesta inflamatoria (52,53).

Aunque los procesos celulares normales (y el perfil de proteínas que se genera en estos procesos) son también una manifestación del microambiente tisular, el microambiente tumoral, a través de procesos tales como el crecimiento celular aberrante, la invasión celular y las alteraciones de las funciones del sistema inmune y de la respuesta inflamatoria, genera activamente una estequiometría alterada o desbalanceada de numerosas moléculas en el secretoma tumoral en comparación al microambiente normal. Además, cuando las células mueren en el interior de este microambiente liberan toda una serie de productos de degradación. El modo de muerte celular, apoptosis, necrosis o autofagia, genera clases diferentes de constituyentes celulares degradados. En este escenario, la microecología tumoral genera una cascada de eventos únicos que puede contener una información codificada de las cascadas de comunicación moleculares que tienen lugar en el microambiente tisular, aumentando la especificidad y sensibilidad de los biomarcadores detectados en el secretoma, como los factores de crecimiento que potencian la señal proliferativa, factores de supervivencia que limitan la muerte celular, factores pro-angiogénicos, enzimas modificadores de la matriz extracelular que facilitan la angiogénesis, y factores inflamatorios que facilitan la transformación de las células tumorales hasta convertirse en malignas.

1.2. Fundamentos del Estudio

1.2.1 Análisis genómicos y proteómicos: Necesidad de nuevas herramientas ómicas.

El cáncer, una enfermedad genética altamente compleja que afecta a una gran proporción de la población mundial, y que presenta gran heterogeneidad molecular

entre pacientes, ha sido una diana obvia para diseñar nuevas tecnologías que colaboren en la inequívoca identificación de subgrupos de pacientes con cáncer a través de la asociación entre las características moleculares y clínicas de sus tumores (54).

Desafortunadamente los biomarcadores actuales (Tabla 1) en el CG y en otros tumores, carecen de la suficiente sensibilidad (capacidad de detectar de forma correcta el tejido sano) ni especificidad (capacidad de detectar de forma correcta la enfermedad) que permita el diagnóstico precoz de la enfermedad.

Los factores predictivos conocidos hasta la fecha (invasión linfática determinado por examen con hematoxilina/eosina y/o por inmunotinción con el marcador específico de vasos sanguíneos D2-40, valoración de marcadores específicos de micrometástasis mediante RT-PCR, análisis cuantitativo de factores de crecimiento linfangiogénicos tales como VEGF-C/D y PDGF-BB, etc) son incapaces, individualmente, de proporcionar una información exacta sobre la presencia de afectación metastásica ganglionar pre-operatoria en el CG y otros carcinomas.

Esta importante limitación hace necesario recurrir a técnicas diagnósticas quirúrgicas. En este escenario, la disponibilidad, validación y uso de nuevas estrategias más eficaces y menos invasivas capaces de aumentar la capacidad predictiva del GC y linfadenectomías (selectivas o extensas) no solo proporcionaría un mejor manejo clínico de numerosos carcinomas humanos sino que aumentaría la calidad de vida del paciente y reduciría significativamente un gasto sanitario sobreañadido e innecesario en numerosas ocasiones.

MARCADORES	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	CÁNCER
NMP22	31%	95%	VEJIGA
CA15.3	63%	80%-88%	MAMA
CEA	43%	*****	COLORECTAL
CEA	49%	*****	GÁSTRICO
AFP	50%	90%	HEPÁTICO
Cifra 21-1	63%	94%	PULMÓN
CA 125	57%	*****	OVARIO
CA 19.9	72%	*****	PÁNCREAS
PSA	86%	20%-34%	PRÓSTATA

Tabla 1: Marcadores tumorales más habituales.

Todas las funciones celulares, incluyendo los procesos de proliferación, muerte y diferenciación, están controladas por numerosos genes y cascadas de señalización que tienen lugar a través de las proteínas (55). En este sentido, la obtención de perfiles de expresión génica ha generado una cantidad de información sin precedentes en relación a los numerosos cambios genéticos que simultáneamente ocurren durante la aparición y evolución invasiva/metastásica del cáncer. La predicción de metástasis en los ganglios linfáticos mediante la evaluación de la expresión de genes con una implicación reconocida en el proceso de tumorigénesis y/o metástasis es una estrategia potencialmente prometedora dada la disponibilidad de tejido procedente del tumor primario después de la resección o biopsia. El desarrollo de nuevas tecnologías como los microarrays de

ADNc ha permitido a los investigadores analizar, de manera global, los cambios en la expresión génica subyacentes a numerosas patologías incluyendo el cáncer. Sin embargo, la complejidad de esta aproximación metodológica y su elevado coste imposibilitan que el perfil genómico de los tumores primarios sea una herramienta diagnóstica/pronóstica en la rutina hospitalaria del CG. Dado que las funciones celulares son ejecutadas por proteínas y estas funciones no pueden ser analizadas únicamente a través de la evaluación de ADN o ARN, no es de extrañar que numerosos análisis experimentales hayan demostrado una clara disparidad entre los niveles relativos de expresión de ARNm con aquellos de las proteínas codificadas. Por otro lado, la modificación post-translacional, las interacciones proteína-proteína, y las interacciones proteína-ADN, todas ellas vitales para la actividad celular, tampoco pueden ser analizadas a través de la mera evaluación del ADN o ARN.⁽⁵⁶⁾

En la actualidad está ampliamente aceptado que la consecuencia funcional de una enfermedad, incluyendo el cáncer, se manifiesta en una desregulación de los productos proteicos y redes de señalización que se activan/desactivan en respuesta a estímulos internos y externos. Estas redes dinámicas, por su parte, propagan las señales desde la superficie celular hasta el núcleo, lo que finalmente define el destino de la célula tumoral. Este flujo de información no puede ser analizado en su totalidad mediante el empleo de análisis de expresión génica dado que las proteínas no son productos invariables sino que dependen en gran medida de procesos altamente regulados a nivel genético, transcripcional, translacional y post-translacional. A diferencia de la evaluación del número de copias de ARNm en el análisis genómico, el análisis proteómico proporciona una visión real y funcional de la enfermedad oncológica. El análisis global de la expresión de proteínas (proteómica) es una aproximación investigacional clave no solo en el entendimiento de las funciones celulares básicas sino también para conocer los detalles moleculares que subyacen al desarrollo de las enfermedades humanas, particularmente el cáncer. La práctica estándar para la separación y análisis sistemático de los perfiles de expresión proteica es el SDS-PAGE en dos dimensiones. La tecnología analítica SELDI-TOF-MS (*Surface-Enhanced Laser*

Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) puede ser empleada en una búsqueda rápida para la identificación de múltiples proteínas expresadas diferencialmente en un elevado número de muestras.⁽²³⁾ Esta técnica es extremadamente laboriosa, requiere grandes cantidades del material biológico de partida, y no es práctica para el análisis de un elevado número de muestras procedentes de pacientes en la práctica clínica diaria. Más aún, la necesidad de equipamientos extremadamente sofisticados, la falta de medidas cuantitativas, así como su elevado coste, limitan, en gran medida, una aplicación generalizada en los laboratorios asociados a los Servicios de Cirugía, Patología y Oncología de nuestro Sistema Nacional de Salud. Por tanto se hace prioritario desarrollar y validar nuevas técnicas de análisis proteómico simples, flexibles, efectivas, y altamente sensibles, que permitan el análisis simultáneo de numerosas muestras tumorales en un único ensayo y en un formato de bajo coste.

La necesidad de un mejor conocimiento y descripción del microambiente tumoral y de su secretoma se hace evidente cuando se considera, específicamente, el proceso de la metástasis linfática ⁽⁵⁶⁾ Una lesión metastásica clínicamente detectable en un ganglio linfático es la consecuencia de un proceso complejo y en etapas, que incluye la diseminación de las células tumorales desde la localización primaria a los vasos linfáticos, el transporte de células tumorales a través del sistema linfáticos a los ganglios, el establecimiento de las células tumorales en los nódulos y el crecimiento de la lesión metastásica hasta alcanzar una masa detectable. La diseminación de las células tumorales a través del sistema linfático requiere de la existencia de contactos físicos entre las células tumorales y los vasos linfáticos. El tamaño de los vasos linfáticos peritumorales constituye el factor más importante que contribuye a la aparición de metástasis ganglionares en algunos casos, como en el melanoma. En este sentido, estudios retrospectivos en muestras de tumores humanos han demostrado la existencia de una relación positiva entre el número de vasos linfáticos tumorales y metástasis linfáticas. Las células tumorales, estromales e inflamatorias que están presentes en el microambiente tumoral producen multitud de factores linfo-angiogénicos (por ejemplo, VEGFA, VEGFC, VEGFD y PDGFBB y sus receptores) que podrían

estimular la linfangiogénesis intratumoral y promover la formación de metástasis linfáticas (57).

La hipótesis del secretoma establece que numerosas proteínas y péptidos son liberados a la circulación local desde el microambiente tumoral. Aquí se incluyen proteínas funcionales completas (factores de crecimiento, moléculas pro-inflamatorias, citoquinas, metaloproteinasas, factores angiogénicos/linfangiogénicos, etc.) y un elevado número de fragmentos de estas mismas proteínas. Es importante señalar que una proteína celular completa que presente un tamaño excesivo para penetrar en los vasos sanguíneos y/o linfáticos puede estar representada pasivamente en el sistema circulatorio como un fragmento cortado que entra libremente en la circulación por difusión o convención. Un beneficio asociado del secretoma como fuente de biomarcadores es la propia naturaleza permeable de los vasos de nueva formación y el incremento de presión hidrostática en el interior de los tumores. Esta característica biofísica de la patofisiología tumoral tiende a empujar y liberar numerosas moléculas desde el *interstitium* tumoral a la circulación sanguínea. Si se tiene en cuenta que esta batería de moléculas bio-informativas derivan de una población de células tumorales con un mayor volumen que las pequeñas lesiones precancerosas, la descripción de perfiles proteómicos/secretómicos específicamente representativos de las interacciones moleculares que tienen lugar en el microambiente del tejido tumoral debería proporcionar una mayor especificidad y sensibilidad que la proporcionada por biomarcadores individuales en relación al riesgo de diseminación tumoral linfática en los estadios tempranos de la enfermedad.

1.2.2 Microarrays de proteínas basados en anticuerpos.

Una relativamente reciente aproximación metodológica capaz de cumplir los requisitos de simplicidad, flexibilidad, efectividad, sensibilidad, alta densidad y bajo coste para el análisis proteómico/secretómico del microambiente tumoral es el empleo de sistemas array para proteínas basados en anticuerpos (*antibody-based protein array systems*). Los micro-arrays de proteínas constituyen una nueva

herramienta de laboratorio capaz de producir perfiles semi- y cuantitativos de expresión proteica específicamente asociados con el status de la enfermedad cancerosa. Algunas de las principales ventajas de estos arrays son su flexibilidad, adaptabilidad y fácil manejo. La propia naturaleza de los arrays permite los análisis simultáneos de cientos e incluso miles de muestras, empleando métodos analíticos, de imagen o robóticos. Los microarrays de proteínas basados en anticuerpos son herramientas metodológicas que pueden ser empleadas en numerosas áreas de investigación, desde la básica a la translacional. Publicaciones recientes han demostrado que este tipo de microarrays pueden ser utilizados para fenotipar células tumorales, identificar nuevas interacciones proteína-proteína, escrutar proteomas completos de nuevas proteínas o analizar simultáneamente cientos de muestras biológicas procedentes de pacientes. Sin embargo, en la literatura biomédica pueden encontrarse muy pocos ejemplos acerca del empleo de esta metodología.

Las limitaciones tecnológicas existentes hasta fechas recientes han provocado que la mayoría de estudios dirigidos a obtener nuevos marcadores específicamente asociados con la presencia de diseminación tumoral (y, en general, otros procesos tumorales) hayan evaluado una o muy pocas proteínas candidato+implicadas *a priori* en el proceso (58). Los arrays de proteína basados en anticuerpos desarrollados por RayBiotech (Norcross, GA, EEUU) son capaces de detectar rápida y específicamente los niveles de expresión de numerosas citoquinas, factores de crecimiento, receptores solubles de factores de crecimiento, factores angiogénicos, proteasas y otras proteínas empleando pequeñas cantidades de muestras experimental y en un único experimento. Esta tecnología está diseñada en torno al principio del ~~la~~ ensayo de tipo sándwich+. Un panel de anticuerpos (anticuerpos de captura) es inmovilizado en localizaciones puntuadas específicas en la superficie de una membrana sólida. La incubación de las membranas arrays con muestras biológicas (lisados celulares/tisulares, sobrenadantes celulares, sueros, etc.) resulta en la captura de las proteínas solubles por sus correspondientes anticuerpos. Las proteínas unidas son detectadas mediante la incubación con un cocktail de anticuerpos biotinilados.

Las señales correspondientes son visualizadas finalmente mediante el empleo de técnicas quimioluminiscentes (ECL), colorimetría o fluorescencia infrarroja. La intensidad de la señal de cada *spot* del array es proporcional a la concentración de cada proteína de interés.(59,60)

La definición adecuada de perfiles proteómicos/secretómicos (61,62,63,64) ~~pro~~ metastásicos+en tumores primarios no solo aumentaría la capacidad predictiva de la linfadenectomía en el majo quirúrgico del CG sino que permitiría la identificación de un subgrupo de pacientes de ~~alto~~ riesgo+ de diseminación tumoral linfática. El tipo de indicación, monitorización y respuesta al tratamiento neoadyuvante en función de la firma proteómica del CG permitiría mejorar el pronóstico de este grupo de pacientes.

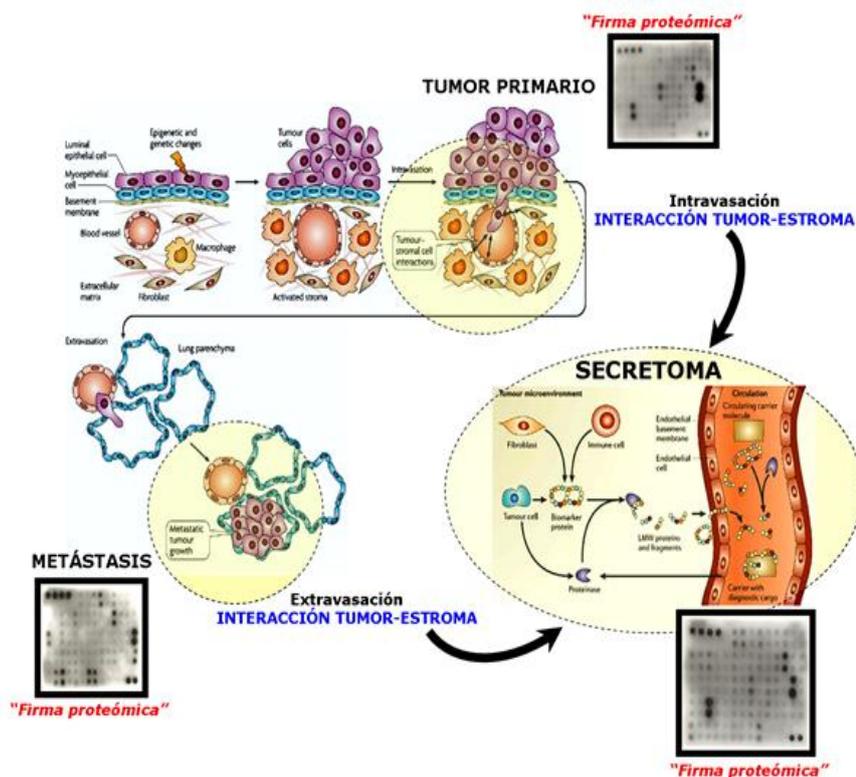


Figura 3. Las interacciones moleculares en el microambiente tumoral generan perfiles proteómicos específicos detectables mediante microarrays basados en anticuerpos. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer*. 2007 Nov; 7(11):834-46 y Petricoin EF, Belluco C, Araujo RP, Liotta LA. The blood peptidome: a higher dimension of information content for cancer biomarker discovery. *Nat Rev Cancer*. 2006 Dec;6(12):961-7.

Por ejemplo, tanto el crecimiento local con afectación de órganos vecinos como la formación de metástasis a distancia, son características de los tumores malignos. Para que ello suceda, los enzimas proteolíticos juegan un papel fundamental para permitir el acceso de las células malignas a los vasos sanguíneos y linfáticos (65). El sistema proteolítico tisular es extremadamente complejo y dentro de este, el papel de las metaloproteasas (MMPs) tienen una importancia especial por su actuación en la degradación de la matriz extracelular y membranas basales que por otra parte, permiten el acceso de las células tumorales a penetrar e infiltrar la matriz estromal. Sin embargo, el papel de las MMPs en la progresión tumoral es mucho más complejo, más allá del que simplemente podría suponerse derivado de la degradación de los componentes de la matriz extracelular (66,67,68). En la figura 4 podemos ver la intervención de todas las células que participan en la producción de MMPs en la acción invasiva del tumor. Células del sistema inmunitario como linfocitos, macrófagos y neutrófilos, del estroma como fibroblastos y miofibroblastos, de los vasos sanguíneos como células endoteliales, interaccionan con las células tumorales, de manera que se origina una foto molecular del proceso de degradación propio del microambiente tumoral. Es decir, detectamos las MMPs de todas las células implicadas, no solamente de las tumorales, sino también del estroma, del sistema inmunitario y de los vasos sanguíneos (69).

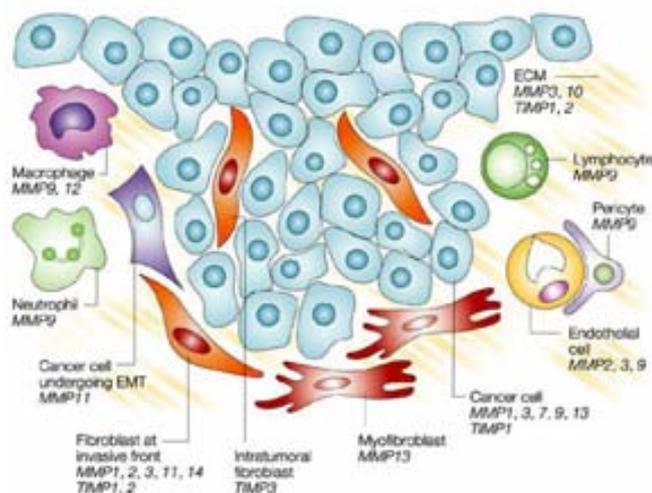


Figura 4. Los diferentes tipos de MMPs y TIMPs son sintetizados por las células estromales, las células tumorales y las células tumorales que realizarán la EMT. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer. 2002 Mar; 2(3):161-74.

Dado que el uso de microarrays de proteínas basados en anticuerpos permitiría la determinación simultánea de un número muy elevado de factores de crecimiento, moléculas pro-inflamatorias, citoquinas, metaloproteasas, TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*), factores angiogénicos y linfangiogénicos, nuestro proyecto ha hipotetizado que la utilización de esta nueva herramienta μ mica+, de fácil implementación y de bajo coste, podría permitir la obtención de un mapeado sensible y específico de los perfiles proteómicos/secretómicos del microambiente tumoral asociado al cáncer gástrico.

HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

Nuestro estudio ha evaluado las siguientes hipótesis:

I.- Las interacciones moleculares que se producen en el microambiente del CG generan firmas ~~oncoproteómicas~~ ~~específicamente~~ asociadas con la presencia de enfermedad tumoral, las cuales se pueden caracterizar mediante ensayos proteómicos de afinidad.

II.- La caracterización de una firma ~~proteómica~~ ~~característica~~ del microambiente del CG y su detección mediante micromatrices de anticuerpos permite detectar de forma específica y sensible la presencia de cáncer en la mucosa gástrica.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Los objetivos generales diseñados en para aceptar o rechazar las hipótesis del estudio han sido los siguientes:

- I. Caracterizar los perfiles proteómicos en el tejido tumoral y en el tejido sano adyacente de tumores primarios de pacientes con CG mediante la utilización de micromatrices de proteínas basados en anticuerpos.
- II. Generar de manera prospectiva una %firma oncoproteómica+ asociada específicamente con la presencia de enfermedad neoplásica en una población de pacientes con CG.
- III. Determinar la especificidad y la sensibilidad del poder predictivo de la %firma oncoproteómica+ en una población independiente de pacientes con CG.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Obtención e identificación de las muestras

Las muestras de tejidos tumorales y los respectivos tejidos sanos adyacentes de pacientes con CG, un total de 66 muestras (33 corresponden a tejidos tumorales y 33 correspondientes a tejido sano adyacente) se obtuvieron prospectivamente de pacientes intervenidos en el Servei de Cirurgia General i Digestiva del Hospital Universitari Josep Trueta de Girona. Todos los pacientes habían firmado el correspondiente consentimiento informado preceptivo previamente aprobado por la Comisión Ética de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitari Josep Trueta de Girona. La cohorte prospectiva analizada en este estudio estuvo formada por pacientes con CG que cumplieron los siguientes requisitos:

- I.- El diagnóstico histológico corresponde al de CG.
- II.- Puede hallarse en cualquier estadio tumoral (I-IV según clasificación TNM)
- III.-La intervención quirúrgica debe tener intención curativa o radical.
- IV.-No puede haber tratamiento previo a la cirugía con quimioterapia o radioterapia.
- V.- Debe haber un consentimiento informado firmado por cada paciente.

La clasificación TNM hace referencia al sistema de clasificación, el cual describe el tamaño (T) del tumor, si hay invasión tejidos próximos, si afectación ganglionar regional (N), o bien, si hay metástasis (M), respectivamente.

Sexo	Edad	Localización del tumor	Tamaño (mm)	Grado histológico	pT	pN	Lymph node ratio	Invasión linfática	Invasión vascular	Invasión perineural	pM	pTNM Estadio	Cirugía	numero	estadio AJCC
m	49	u	41x26	indiferenciado	2b	0/23	0	no	no	no	0	pT2b N0	R0	2	I B
h	83	l	52x49	diferenciado	2b	8/37	<30	si	si	si	0	pT2b N2	R0	3	III A
m	73	u	520x490	indiferenciado	2b	0/24	0	si	si	si	0	pT2b N0	R0	6	I B
m	82	l	83x80	diferenciado	1	0/60	0	no	no	no	0	pT1 N0	R0	9	I A
h	64	u	53x41	diferenciado	2b	12/44	<30	si	no	no	0	pT2b N2	R0	15	III A
h	73	l	95x ?	indiferenciado	3	14/56	<30	si	si	si	0	p T3 N3	R0	16	IV
m	70	u	25x15	indiferenciado	2	9/31	<30	si	si	si	0	p T2 N2	R0	18	III A
h	85	l	36x34	indiferenciado	2b	3/34	<30	si	si	si	0	p T2b N1	R0	19	II
m	80	l	76x61	diferenciado	2b	6/15	<30	si	?	?	0	p T2b N1	R0	22	II
m	53	l	10x5	indiferenciado	3	1/35	<30	si	no	no	0	p T3 N1	R0	23	III A
h	56	l	18x10	indiferenciado	2b	4/34	<30	si	no	si	0	p T2 N2	R0	24	III A
h	0	l	171 x 129	indiferenciado	3	40/57	>30	si	si	si	1	pT3 N3	R0	25	IV
m	54	u	48x34	indiferenciado	3	2/68	<30	no	no	si	0	p T3 N1	R0	28	III A
h	73	u	25x ?	diferenciado	2b	0/42	0	no	no	no	0	p T2b N0	R0	29	I B
h	60	u	38x ?	diferenciado	2	7/35	<30	si	si	no	0	pT1 N2	R0	32	II
h	64	l	40x25	indiferenciado	3	18/49	>30	si	si	si	0	p T3 N3	R0	34	IV
h	61	u	100x ?	indiferenciado	4	?	?	?	?	?	1	p T4 N3	?	36	IV
m	77	l	40 x 35	diferenciado	2b	abr-27	<30	si	si	no	0	pT2b N1	R0	39	II A
h	79	l	77x70	mixto	3	3/17	<30	si	si	si	0	p T3 N2	R0	40	III B
m	63	u	166x154	indiferenciado	3	15/22	>30	si	si	si	0	p T3 N2	R0	41	III B
m	25	l	80x70	diferenciado	2	1/38	<30	no	no	no	0	p T2 N1	R0	43	II
h	61	l	25x14	indiferenciado	1	0/63	0	si	no	no	0	p T1 N0	R0	44	I A
h	51	l	27x20	indiferenciado	3	19/43	>30	si	no	no	0	pT3 N3b	R0	46	IV
m	60	l	30x28	diferenciado	3	5/83	<30	si	?	?	0	p T3 N2	R0	47	III B
h	61	l	50x24	diferenciado	3	1/35	<30	si	no	si	0	pT3 N1	R0	60	IIIA
m	71	l	55 x 50	diferenciado	1	0/27	0	si	no	no	0	pT1 N0	R0	54	I A
m	54	l	40 x 20	indiferenciado	4a	0/41	0	no	no	si		p T4a N0	R0	49	IIIA
h	82	l	38 x 24	indiferenciado	2	0/9	0	si	no	no	0	p T2 N0	R0	52	I B
h	70	l	38 x 25	diferenciado	1b	0/24	0	no	no	no	0	pT1b N0	R0	53	I A
h	55	l	45x 35	indiferenciado	4a	0/10	0	no	no	si	0	p T4a N0	R0	58	III A
m	82	u	47 x 35	diferenciado	3	0/26	0	no	no	no	0	p T3 N0	R0	59	II

Tabla 2. Datos pacientes.

Una vez programada la intervención quirúrgica y con el consentimiento informado preceptivo, se comunicó a los responsables clínicos y a la enfermera de investigación clínica del proyecto sobre la fecha y hora programadas para la obtención de las siguientes muestras:

Biopsias. Tejido fresco de la pieza quirúrgica obtenida durante la cirugía en recipientes separados.

- Muestra de tejido tumoral (durante la cirugía): Las piezas quirúrgicas fueron trasladadas en fresco al Servicio de Anatomía Patológica para su procesamiento diagnóstico de rutina (inclusión en parafina, tinción de

hematoxilina-eosina, técnicas de inmunohistoquímica en los casos necesarios y almacenaje del bloque restante en el banco de tumores de acuerdo al protocolo habitual del centro) y para la obtención adicional de 1 espécimen ($\approx 1 \times 0.5 \text{ cm}^2$) para su congelación inmediata en nitrógeno líquido y almacenamiento a -80°C para su posterior procesamiento y análisis proteómico.

- Muestra de tejido sano (durante la cirugía): Se obtuvo una pieza adicional ($\approx 1 \times 0.5 \text{ cm}^2$) de tejido sano adyacente al tumor ($>3 \text{ cm}$ del borde del tumor) para su congelación inmediata en nitrógeno líquido y almacenamiento a -80°C para su posterior procesamiento y análisis proteómico.

Recogida de datos clínicos. Los responsables clínicos y la enfermera de investigación clínica garantizaron la creación de una base de datos que pasó a disposición del investigador principal del proyecto. Esta base incluyó los siguientes datos correspondientes a cada paciente seleccionado para el estudio:

- Código, edad y sexo del paciente
- Diagnóstico anatomopatológico y otros datos de interés clínico
- Clasificación del tumor según sistema TNM
- Tipo, fecha de inicio y final, y valoración de la respuesta al tratamiento antineoplásico (si existiese), incluyendo: Cirugía, Radioterapia, Quimioterapia, moduladores de la respuesta biológica, etc.
- Otras intervenciones médicas de interés posteriores al diagnóstico
- Fecha de defunción (si procede)

El laboratorio de investigación creó una base de datos que permitió correlacionar los datos clínicos con los resultados del estudio sin comprometer la confidencialidad de los datos del paciente, así como de ponerla a disposición de

los responsables clínicos, quienes pudieron informar a cada paciente sobre los resultados de las evaluaciones realizadas si así hubiera sido oportuno.

- El código de la historia clínica del paciente fue sustituido por un código de laboratorio o código interno reasignado a cada muestra en el momento del registro de entrada de la muestra.
- Cada muestra registrada mantuvo ambos códigos en el cuaderno de registro de muestras que estuvo debidamente custodiado a lo largo de todo el estudio. La información contenida en el cuaderno de registro de muestras se trasladó a un archivo electrónico cuya confidencialidad estuvo garantizada por el investigador principal del proyecto.
- El investigador principal del proyecto fue el encargado de crear, actualizar y gestionar la base de datos de todos los resultados del estudio, incluyendo únicamente el código de laboratorio de cada muestra/paciente.
- Para el análisis de los resultados se utilizó el archivo de correlación entre códigos. En respuesta a la solicitud específica por parte de los responsables clínicos se crearon archivos/informes confidenciales en los que se incluyó la historia clínica del paciente y los resultados de interés.

La confidencialidad de los datos recogidos, por tanto, fue garantizada mediante la recodificación en el momento de registrar la entrada de cada muestra en el laboratorio y la posterior destrucción del etiquetado de partida. El personal responsable de la recogida de las muestras se aseguró que todos los tubos/recipientes recogidos incluyeran los siguientes datos: Código o identificación del paciente, edad del paciente, sexo del paciente, fecha de recogida.

El análisis de los perfiles de expresión proteómicos y secretómicos fue realizado por personal investigador independiente que no tuvo acceso a la información clínica del paciente correspondiente. El tratamiento de los datos de carácter personal se realizó de acuerdo a la normativa vigente, el RD 223/2004 de 6 de

Febrero y la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de Diciembre sobre protección de datos de carácter personal.

4.2 Preparación de las muestras

4.2.1 Descongelación de los tejidos.

Las muestras fueron guardadas en el congelador a -80°C en tubos *ependorf* con una sustancia crioprotectora. Para el procesamiento de las muestras, éstas fueron retiradas del congelador y mantenidas en nieve carbónica (hielo seco) para evitar su descongelación.

Para procesar la muestra de tejido tumoral y la correspondiente muestra de tejido sano estrictamente en paralelo, ambas se dejaron durante unos minutos en el tubo *ependorf* para su descongelación. En ese periodo de tiempo, se colocó una placa de Petri en la báscula para pesar las muestras de tejido una vez descongeladas, un dato necesario para calcular la cantidad de tampón de lisis necesaria para llevar a cabo la disgregación enzimática del tejido. A continuación, y mediante el empleo de pinzas esterilizadas con lejía al 10% y agua destilada, se extrajeron las muestras contenidas dentro de la sustancia crioprotectora y se colocaron en otra placa de Petri, lavándose con agua destilada hasta asegurarse una total desaparición de la sustancia crioprotectora. Seguidamente, se pesaron los fragmentos de tejido y con un bisturí esterilizado con lejía al 10% y agua destilada, se disgregaron los tejidos. Se extremaron las precauciones de uso de material de disgregación entre muestra y muestra para evitar posibles contaminaciones cruzadas de tejidos.

4.2.2 Lisis de los tejidos.

Una vez los fragmentos de tejido estuvieron disgregados, estos fueron transferidos a un tubo con tampón de lisis RIPA (Sigma-Aldrich, ref. RO278-50ml), en una relación de 500 μl de RIPA por cada 100 mg de tejido. El tampón RIPA se utiliza para lisar células y solubilizar proteínas, y puede ser utilizado tanto en muestras en solución (muestras solubles) como muestras adheridas (muestras de tejido). Su

acción se basa en minimizar las uniones proteicas específicas que pueden hacer aparecer un *background* pero, en cambio, permite que puedan darse las interacciones específicas . Para que el tampón sea efectivo, debe añadirse un inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, ref. P8340-1 ml) en una proporción de 100µl de *proteasa inhibidor cocktail* por 1000µl de solución de tampón RIPA. También, es preciso añadir el PMSF (Fluka BioChemika, ref.93482) que es un inhibidor de fosfatasa, en una proporción de 10µl de PMSF por cada 1000µl de tampón.

Una vez dispuestos los fragmentos de tejido dentro del tubo con el tampón de lisis RIPA, los tubos fueron depositados en hielo seco. Para lisar y disgregar el tejido, se empleó un homogeneizador de tejidos *Ultra-turrax T25 Basic (IKA)*. Antes de su utilización se realizaron procesos de limpieza antes de la primera muestra y también entre muestras, para evitar contaminaciones cruzadas. Dicho proceso requirió los pasos siguientes:

- I. Poner un papel de filtro bajo la cuchilla.
- II. Desmontar la cuchilla del homogeneizador, para evitar que queden restos de tejido. En caso de que quedaran, retirarlos con agua destilada y pinzas estériles con lejía al 10%.
- III. Montar la cuchilla.
- IV. Llevar a cabo un proceso secuencial de limpieza:
 - a. Tubo Falcon con agua destilada
 - b. Tubo Falcon de lejía al 10%
 - c. Tubo Falcon con agua destilada
- V. Secar la cuchilla con papel de filtro.
- VI. Triturar las muestras.

Una vez el tejido estuvo bien disgregado, los tubos fueron cubiertos con *parafilm* y depositados en hielo seco para evitar la degradación de las proteínas de la muestra. El tampón de lisis estuvo presente durante 30 minutos, y cada 5 minutos se les dio la vuelta a cada uno de los tubos con objeto de favorecer

mecánicamente el proceso de lisis. Transcurridos los 30 minutos, las muestras fueron transferidas a tubos *ependorf* y centrifugadas a 15000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Una vez centrifugadas, se recuperó el sobrenadante (la fase donde se encuentran las proteínas que se pretende detectar) de cada una de ellas para poder llevar a cabo el protocolo de *Lowry* de cuantificación de proteínas. El sobrenadante fue congelado a -80°C.

4.2.3 Protocolo de LOWRY para la determinación de la concentración de proteínas.

El método de Lowry (1951) (70) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se le añade un reactivo que al unirse a las proteínas forman un complejo que genera color. La intensidad del color es proporcional a la concentración de proteínas en la muestra.

En primer lugar es preciso diseñar una curva patrón, que se prepara en tubos *ependorf* y por duplicado a partir de un cantidad almacenada de BSA (albúmina sérica bovina) de 1,44mg/ml en alícuotas de 240µl. Los estándares a preparar son los siguientes:

Estándar	Concentración	Tubo anterior	Agua destil-lada
1	1.20 mg/ml	240 µl	48 µl
2	1.00 mg/ml	166.6 µl	33.3 µl
3	0.75 mg/ml	112.5 µl	37.5 µl
4	0.50 mg/ml	66.6 µl	33.4 µl
5	0.25 mg/ml	37.5 µl	37.5 µl
6 (blanco)	0.00 mg/ml		5 µl

Una vez diseñada la curva patrón, se preparan los reactivos según el protocolo del fabricante (Bio-Rad DC *protein assay kit*, ref. 500-0112). La relación del reactivo A (Bio-Rad DC) es de 25µl de reactivo A por muestra. La relación del reactivo A que es de 20 µl de reactivo A por ml de reactivo A (Bio-Rad DC). Los dos reactivos se preparan en un mismo tubo. Finalmente, la proporción del reactivo B (Bio-Rad DC) es de 200µl de reactivo B por muestra.

Por último, las muestras son preparadas por duplicado. Se realiza en cada caso una dilución 1/10, es decir, 0.5 µl de muestra más 4.5 µl de agua destilada (volumen final 5 µl de muestra) y se añade la preparación de los reactivos A y Aq (25 µl de la preparación) y los 200 µl del reactivo B, prosiguiendo la incubación sin luz durante 15 minutos.

Transcurrido este tiempo, los resultados colorimétricos son leídos en un lector de placas a una longitud de onda de 750-650 nm y la concentración de proteína en la muestra se calcula por extrapolación de la curva patrón.

4.2.4 Protocolo microarrays de proteínas basados en anticuerpos.

El ensayo con microarrays de proteínas basados en anticuerpos fue llevado a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

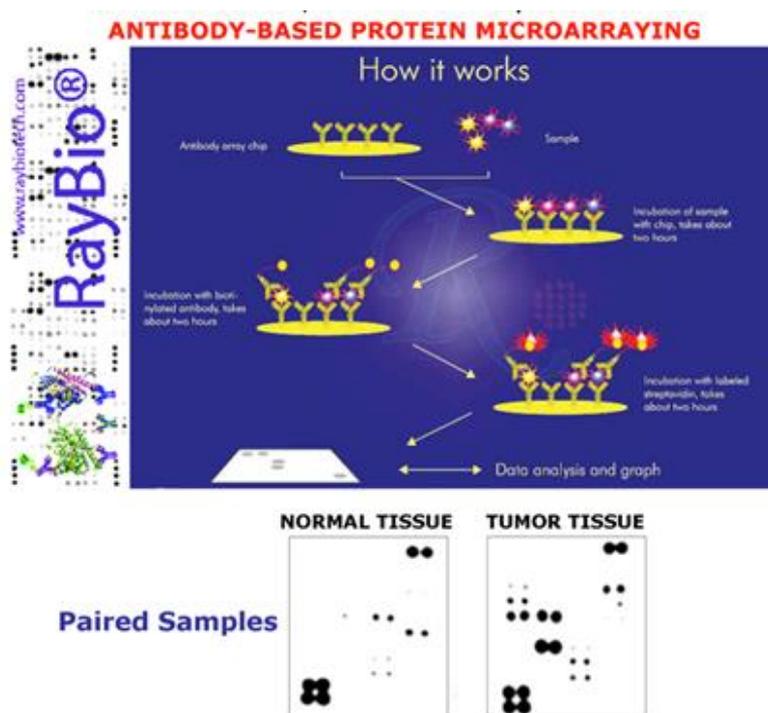


Figura 5. Esquema de los *microarrays* basados en anticuerpos.

<http://www.insightbio.com/services/raybiotech/CA2.asp>.
RayBiotech, Inc.

Podemos ver el proceso esquematizado según el fabricante RayBiotech, Inc. en la figura siguiente:

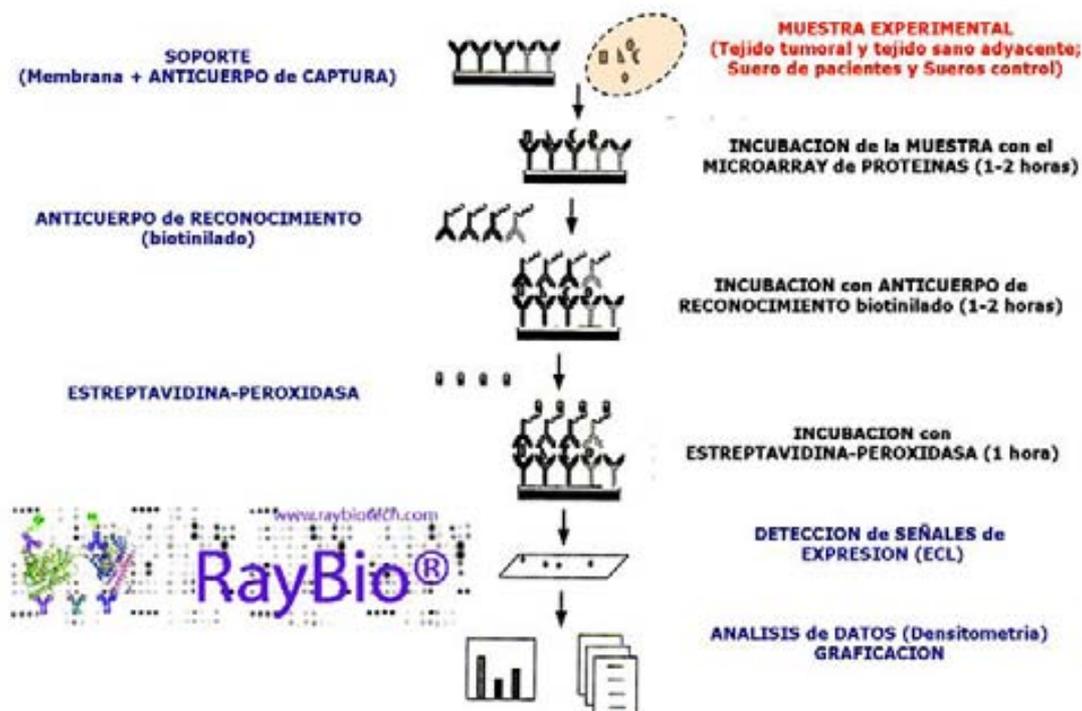


Figura 6. Proceso esquemático del protocolo de los *microarrays* de proteínas basados en anticuerpos. <https://www.raybiotech.com/products/antibody-arrays/c-series/>. RayBiotech, Inc.

Previamente al comienzo del análisis, las membranas fueron bloqueadas con BSA/TBS al 5% (0.01 M Tris HCl pH 7.6/0.15 M NaCl) durante 1 h. Tras el bloqueo para disminuir el número de uniones inespecíficas, las membranas fueron incubadas con 500 μ g proteína total/muestra de tejido durante 2 horas. Tras un lavado extensivo de las membranas con TBS/0.1% (v/v) Tween 20 (3 veces x 5 minutos) y TBS (2 veces x 5 minutos) para eliminar el material no-unido específicamente, las membranas fueron incubadas con un cocktail de anticuerpos marcados con biotina dirigidos contra las proteínas inmovilizadas por los anticuerpos de captura. Tras la incubación con los anticuerpos, las membranas fueron lavadas como se ha indicado anteriormente e incubadas con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano .HRP- (2.5 pg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de HRP-estreptavidina fue eliminado mediante

lavados con TBS/0.1% Tween 20 y TBS. Finalmente, las señales específicas de expresión fueron detectadas mediante el sistema ECL. Los valores densitométricos de los spots fueron cuantificados mediante el uso del software Scion Imaging (Scion Corp., Frederick, MD, EEUU).

4.3 Creación de la firma oncoproteómica

Para la creación de la firma oncoproteómica se utilizó un primer grupo de 22 muestras (11 muestras pareadas de tejido tumoral y de mucosa gástrica sana). En este primer grupo de pacientes, se conocía la naturaleza tumoral o no-tumoral de las muestras. En primer lugar se generaron sub-firmas de las proteínas más relevantes que se encuentran en el microambiente tumoral: metaloproteasas, factores angiogénicos, citoquinas, factores de crecimiento y factores inflamatorios. Siguiendo de manera estricta el protocolo de la casa comercial RayBiotech, Inc., se emplearon los siguientes microarrays basados en anticuerpos para todas y cada una de las muestras.

Microarrays basados en anticuerpos: CANCER GÁSTRICO							
ANGIOGENIC FACTORS							
RayBio® Human ANGIOGENESIS Antibody Array C Series 1000 Array 1							
POS	POS	NEG	NEG	Angiogenin	EGF	ENA-78	b-FGF
POS	POS	NEG	NEG	Angiogenin	EGF	ENA-78	b-FGF
GRO	IFN- γ	IGF-1	IL-6	IL-8	LEPTIN	MCP-1	PDGF-BB
GRO	IFN- γ	IGF-1	IL-6	IL-8	LEPTIN	MCP-1	PDGF-BB
PIGF	RANTES	TGF- β 1	TIMP-1	TIMP-2	Thrombopoietin	VEGF	VEGF-D
PIGF	RANTES	TGF- β 1	TIMP-1	TIMP-2	Thrombopoietin	VEGF	VEGF-D
BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	NEG	POS
BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	NEG	POS
RayBio® Human ANGIOGENESIS Antibody Array C Series 1000 Array 2							
POS	POS	NEG	NEG	Angiopoietin-1	Angiopoietin-2	Angiostatin	Endostatin
POS	POS	NEG	NEG	Angiopoietin-1	Angiopoietin-2	Angiostatin	Endostatin
G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-4
G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-4
I-TAC	MCP-3	MCP-4	MMP-1	MMP-9	PECAM-1	Tie-2	TNF- α
I-TAC	MCP-3	MCP-4	MMP-1	MMP-9	PECAM-1	Tie-2	TNF- α
u PAR	VEGF R2	VEGF R3	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS
u PAR	VEGF R2	VEGF R3	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS
Detección simultánea de 43 FACTORES ANGIOGÉNICOS							

Figura 7. RayBio® Human ANGIOGENESIS Antibody Array C Series 1000 (Array 1 + Array 2, el cual detecta la expresión de 43 factores angiogénicos en dos membranas)

Microarrays basados en anticuerpos: CANCER GÁSTRICO

GROWTH FACTORS

RayBio® Human GROWTH FACTOR Antibody Array 1

POS	POS	NEG	NEG	AR	bFGF	b-NGF	EGF	EGF R	FGF-4	FGF-6	FGF-7
POS	POS	NEG	NEG	AR	bFGF	b-NGF	EGF	EGF R	FGF-4	FGF-6	FGF-7
GCSF	GDNF	GM-CSF	HB-EGF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-6	IGF-I	IGF-I SR
GCSF	GDNF	GM-CSF	HB-EGF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-6	IGF-I	IGF-I SR
IGF-II	M-CSF	M-CSF R	NT-3	NT-4	PDGF R α	PDGF R β	PDGF-AA	PDGF-AB	PDGF-BB	PIGF	SCF
IGF-II	M-CSF	M-CSF R	NT-3	NT-4	PDGF R α	PDGF R β	PDGF-AA	PDGF-AB	PDGF-BB	PIGF	SCF
SCF R	TGF- α	TGF- β	TGF- β 2	TGF- β 3	VEGF	VEGF R2	VEGF R3	VEGF-D	BLANK	BLANK	POS
SCF R	TGF- α	TGF- β	TGF- β 2	TGF- β 3	VEGF	VEGF R2	VEGF R3	VEGF-D	BLANK	BLANK	POS

Detección simultánea de 41 FACTORES DE CRECIMIENTO

Figura 11. RayBio® Human GROWTH FACTOR Antibody Array 1 (el cual detecta la expresión de 41 factores de crecimiento en una membrana)

Una vez llevado a cabo el protocolo de los distintos arrays, la %sub-firmas+ fueron generadas de la siguiente manera:

- Cuando una de las proteínas no fue detectada en una muestra de tejido normal, se decidió de forma arbitraria, que un resultado %positivo+ requeriría un mínimo de 5 veces el aumento de la expresión en la muestra pareada de tejido tumoral.
- Cuando una de las proteínas sí que fue detectada en la muestra de tejido normal, se decidió de forma aleatoria, que un resultado %positivo+ requeriría un mínimo de 10 veces el aumento en la expresión.

Las proteínas que conformaron las distintas %sub-firmas+ y la %firma final+ fueron aquellas que cumplían algunos de los dos requisitos anteriores (>5 o >10) en al menos, uno de los pacientes analizados en la cohorte de descubrimiento.

Una vez generada la firma oncoproteómica del microambiente tumoral del CG, la casa comercial *RayBiotech*, Inc. diseñó arrays personalizados incluyendo exclusivamente las proteínas incluidas en la firma final (**Figura 12**). Por motivos

técnicos de la casa comercial, la citoquina Acrp30 (adiponectina) no pudo ser incluida en el array personalizado de la firma final.

POS	POS	NEG	NEG	GRO	MMP-9	IL-8	MMP-8
POS	POS	NEG	NEG	GRO	MMP-9	IL-8	MMP-8
TIMP-1	HGF	ICAM-1	Angiogenin	HAP-2	bFGF	RANTES	EAN-78
TIMP1	HGF	ICAM-1	Angiogenin	HAP-2	bFGF	RANTES	EAN-78
uPAR	S TNF RII	TIMP-2	EGF R	MCP-1	IL-1 Beta	MIP-1 delta	IGFBP-2
uPAR	S TNF RII	TIMP-2	EGF R	MCP-1	IL-1 Beta	MIP-1 delta	IGFBP-3
Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	NEG	POS
Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	NEG	POS

Figura 12. RayBio[®] Custom Human Antibody Array: Firma oncoproteómica del microambiente tumoral del CG

Para validar la capacidad diagnóstica de la firma oncoproteómica se analizaron 44 muestras de una población independiente (22 muestras pareadas de tejido tumoral y de tejido sano). Este análisis se realizó de forma ciega, es decir, desconociendo la naturaleza tumoral o normal de las muestras y con una numeración de las mismas asignada al azar.

4.4 Validación de poder de diagnóstico, cálculo de la sensibilidad y especificidad del test.

Dado que el valor de un test diagnóstico en cáncer depende de su capacidad en discriminar correctamente la presencia o ausencia de cáncer en una determinada muestra de tejido, se validó el poder de diagnóstico de la firma oncoproteómica del microambiente tumoral del CG mediante la construcción de una tabla de especificidad y sensibilidad. Las características de este test fueron las siguientes:

- *Sensibilidad.* Capacidad del test para detectar de forma correcta la enfermedad
- *Especificidad.* Capacidad del test para detectar de forma correcta el tejido sano

- *Valor predictivo de positivos (PPV, verdaderos positivos)*. Capacidad del test para detectar un positivo cuando el paciente tiene realmente la enfermedad
- *Valor predictivo de negativos (NPV, verdaderos negativos)*. Capacidad del test para detectar un negativo cuando el paciente realmente no tiene la enfermedad

La tabla de especificidad y sensibilidad se construyó de la siguiente manera:

ENFERMEDAD				
		PRESENCIA	AUSENCIA	
TEST POSITIVO	Verdadero positivo (a)		Falso positivo (b)	PPV
				$a/(a+b)$
TEST NEGATIVO	Falso negativo (c)		Verdadero negativo(d)	NPV
				$d/(c+d)$
		SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	
		$a/(a+c)$	$d/(b+d)$	

Con el objetivo de valorar la calidad del test, se realizó asimismo el cálculo del *likelihood ratio positive test* y el *likelihood negative test*, dos cocientes que comparan, utilizando la sensibilidad y la especificidad, la probabilidad que el resultado esperado para un paciente con enfermedad con la probabilidad que el mismo resultado saliera en un paciente sin enfermedad.

El cálculo del *likelihood ratio positive test* fue calculado de la siguiente manera:

$$LR (+) = \text{Sensibilidad}/(1-\text{Especificidad})$$

El cálculo del *likelihood ratio negative test* fue calculado de la siguiente manera:

$LR (-) = (1 - \text{Sensibilidad}) / \text{Especificidad}$

Cuando los resultados son mayores que 1, significa que el resultado se asocia a enfermedad. En el caso de resultados menores que 1, significa que el resultado se asocia a la ausencia de enfermedad.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Generación de la **Í firma oncoproteómica** del CG

Para la generación de **sub-firmas** se utilizaron las micromatrices basadas en anticuerpos dirigidas contra las familias de proteínas más relevantes que se localizan en el microambiente tumoral, tal y como se presentó en la sección de **Materiales y métodos**. A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada tipo de familia de proteínas analizadas.

5.1.1 Metaloproteasas

Una vez realizado el protocolo de los arrays de las muestras de tejido correspondiente, lo que podemos ver son membranas con unos puntos o *spots* de mayor o menor intensidad, tal y como podemos apreciar en la Figura 13.

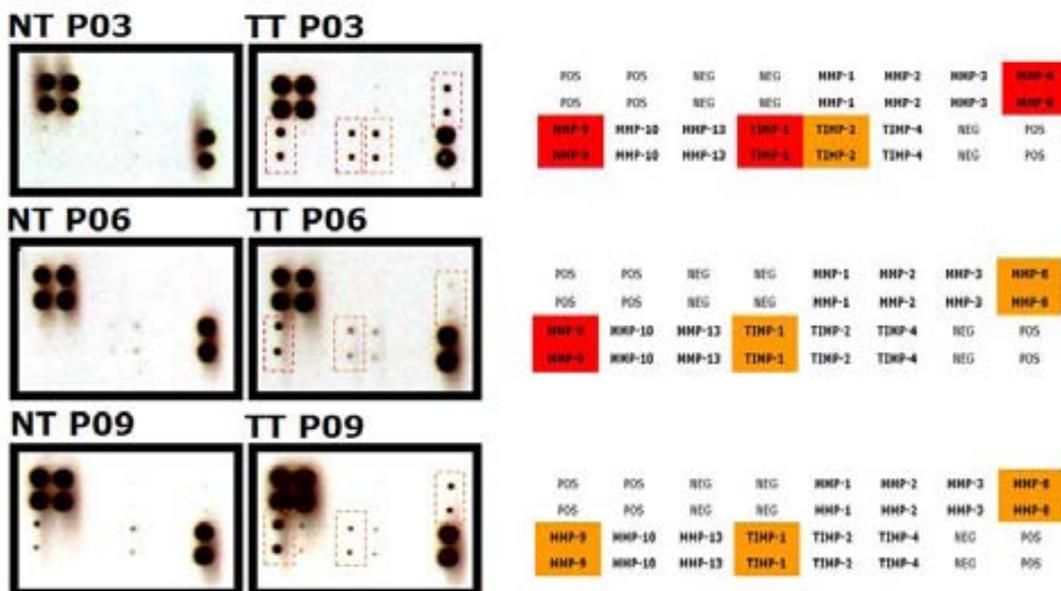


Figura 13. Representación de *arrays* de MMPs y TIMPs obtenidos en tres muestras de tejido sano y tumoral de tres pacientes diferentes. Puig-Costa, M, Oliveras-Ferraros, C; Flaquer S; Llopis-Puigmartí F; Pujol-Amado E; Martín Castillo B; Vázquez-Martín A; Cufí S; Ortiz R; Roig J; Codina-Cazador A; Menéndez JA. Antibody microarray-based technology to rapidly define matrix metalloproteinase (MMP) signatures in patients undergoing resection for primary gastric carcinoma. J Surg Oncol. 2011 Jul 1; 104(1):106-109.

En la Figura 13, tomada como muestra representativa, podemos observar los resultados de tres muestras de tejido tumoral (TT) y mucosa gástrica sana adyacente (NT) procedentes de tres pacientes diferentes. Los rectángulos rojos indican que hay una elevada sobre-expresión de dos MMPs, la MMP-8 y la MMP-9, y de los inhibidores TIMP-1 y TIMP-2. Podemos ver que la proteína que se encuentra más diferencialmente sobre-expresada en el tejido tumoral gástrico es la MMP-9, ya que en las tres muestras el *spot* correspondiente es más intenso en comparación al observado en la muestra pareada de tejido normal. Una vez analizados todos los pacientes, se construyó una tabla mostrada de forma conjunta todos los cambios significativos de expresión de las MMPs y sus inhibidores (TIMPs) obtenidos de las muestras analizadas en 11 pacientes de la cohorte de descubrimiento.

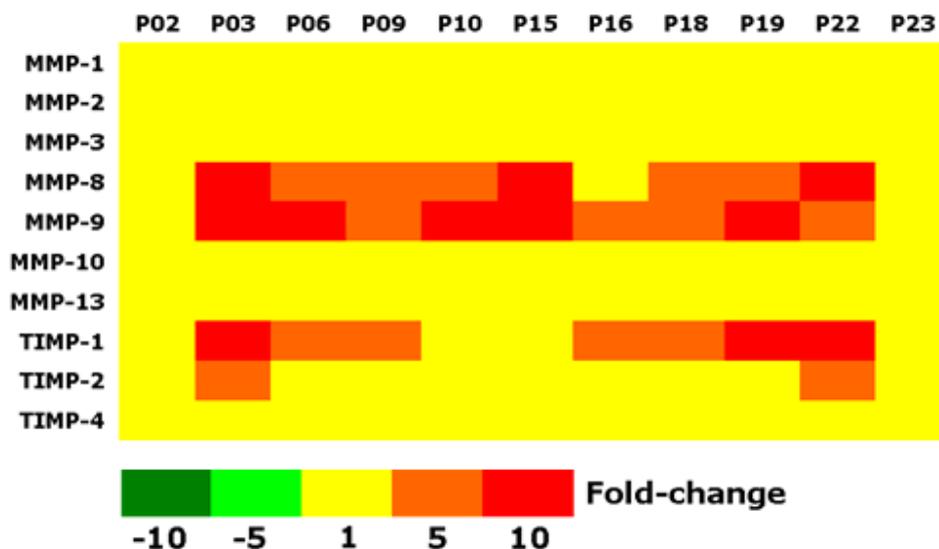


Figura 14. Cambios en la expresión de las MMPs y los TIMPs en CG.

Lo que podemos observar es que en un 70% de las muestras tumorales hay sobreexpresión (>5 aumentada la expresión) de las MMP-8 y MMP-9 y que en un 60% de las muestras los inhibidores TIMP-1 y TIMP-2 también se encuentran sobre-expresados en comparación a la mucosa normal.

Una sub-firma de las MMPs fue entonces construida incluyendo todas aquellas MMPs y TIMPs sobreexpresados en al menos 1 paciente. La Figura 15 muestra las dos MMPs (8 y 9) y TIMPs (1 y 2) que formarán parte de la firma oncoproteómica final.

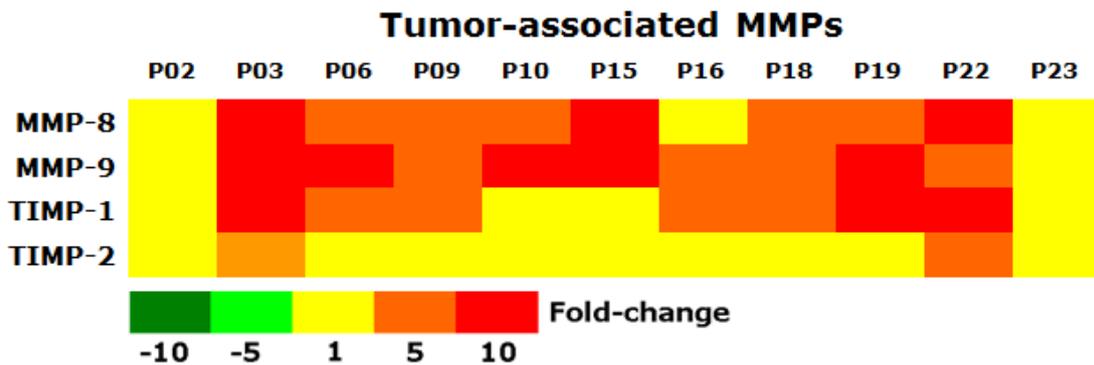


Figura 15. Sub-firma de MMPs en el GC.

5.1.2 Factores angiogénicos

La Figura 16 muestra la tabla que analiza los cambios de expresión de los 43 factores angiogénicos analizados.

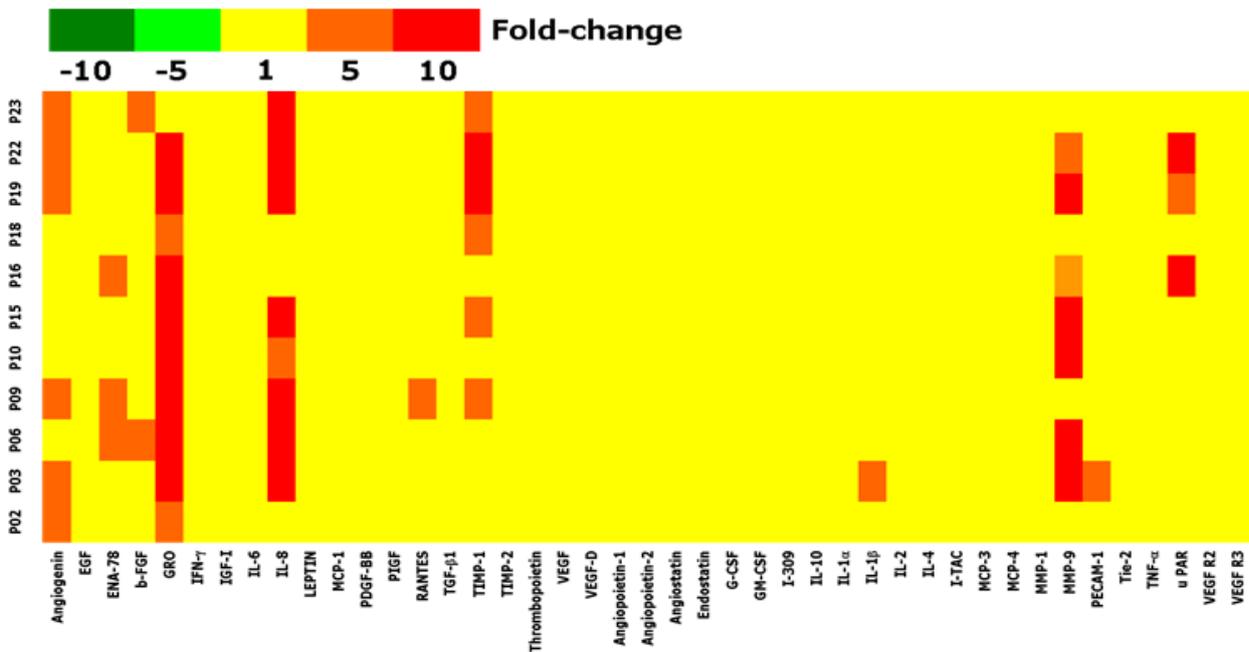


Figura 16. Cambios en la expresión de los factores angiogénicos en CG.

Nuestro estudio no observó cambios significativos en la expresión de VEGF. La familia GRO (la cual incluye las citoquinas quimiotácticas CXCL1, CXCL2 y CXCL3), Sin embargo, estuvo sobre-expresada en un 90% de las muestras analizadas; la IL-8 también fue encontrada sobre-expresada en un 80% de las muestras analizadas. Los otros factores identificados, pese a estar sobreexpresados, lo estuvieron en un porcentaje de pacientes muy inferior. La utilización de las membranas para factores angiogénicos permitió confirmar la sobre-expresión de MMP-9 y TIMP-1 inicialmente detectada mediante el uso de membranas específicas para metaloproteasas y TIMPs. Los otros factores, aun estando sobreexpresados en un porcentaje inferior en las muestras analizadas, también formarán parte de la **%sub-firma+** de los factores angiogénicos, ya que se encuentran alterados en al menos un paciente. La **%sub-firma+** de los factores angiogénicos (Figura 17) estuvo finalmente formada por 10 factores angiogénicos (angiogenina, ENA-78, b-FGF, GRO, IL-8, RANTES, TIMP-1, IL-1 β , MMP-9 y uPAR), aunque debe indicarse que dos de ellos corresponden a la metaloproteasa MMP-9 y al inhibidor de metaloproteasas TIMP-1.

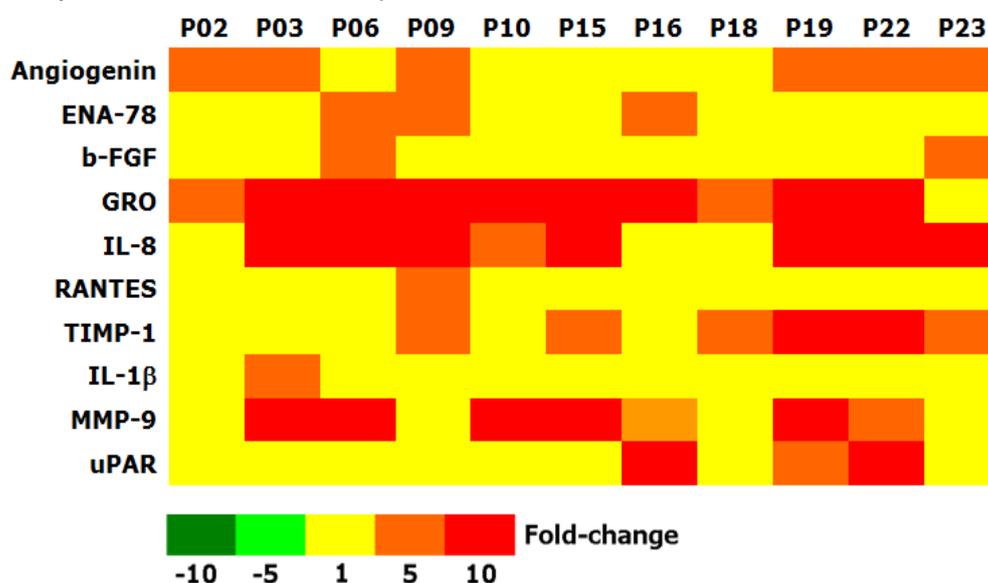


Figura 17. **%sub-firma+** de factores angiogénicos en el CG.

5.1.3 Factores inflamatorios y citoquinas

Los resultados obtenidos en los cambios de expresión de los factores inflamatorios es el que se muestra en la Figura 18.

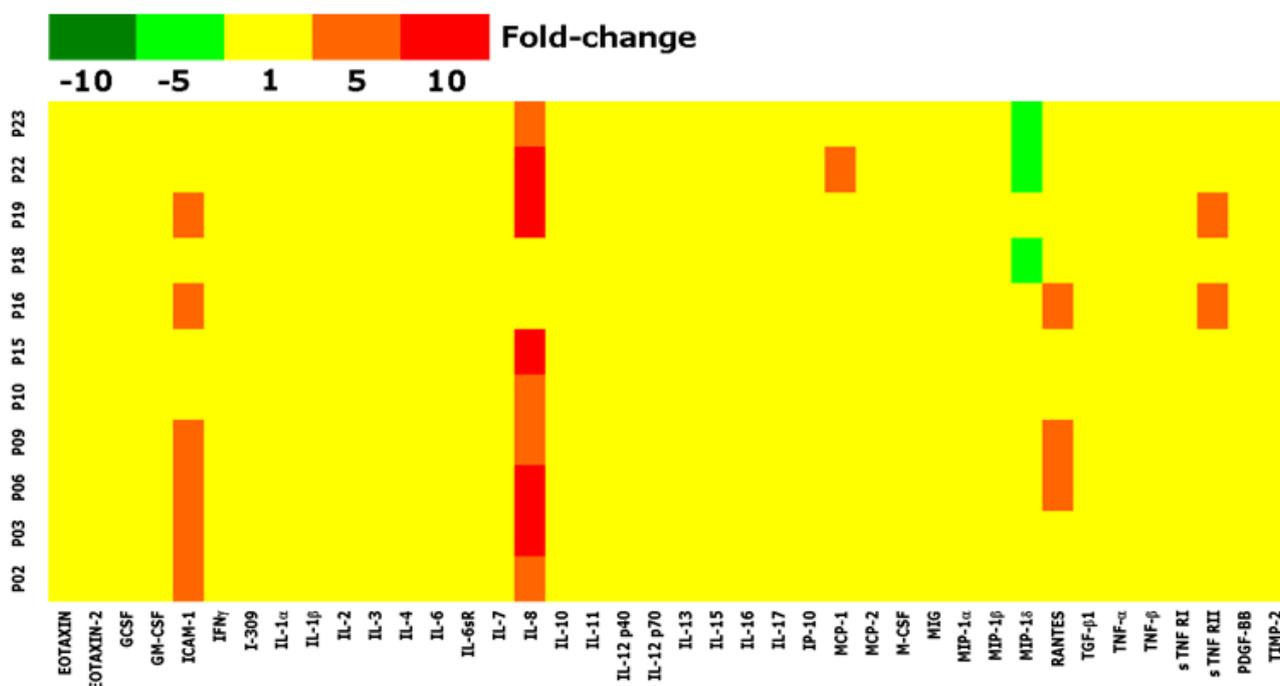


Figura 18. Cambios en la expresión de los factores inflamatorios en el CG.

El factor más relevante fue la IL-8, la cual estuvo sobre-expresada en un 80% de las muestras analizadas, confirmando así los resultados obtenidos con la misma citoquina con el array de factores angiogénico. Cabe destacar que también se observó una disminución significativa en la expresión (>5 veces) de la citoquina MIP-1 en muestras tumorales en comparación a los tejidos normales pareados.

La sub-firma de los factores inflamatorios (Figura 19) estuvo finalmente formada por 6 proteínas (ICAM, IL-8, MCP-1, MIP-1 α , RANTES y sTNF RII), las cuales se encuentran sobre-expresadas o disminuidas en al menos un paciente de la serie.

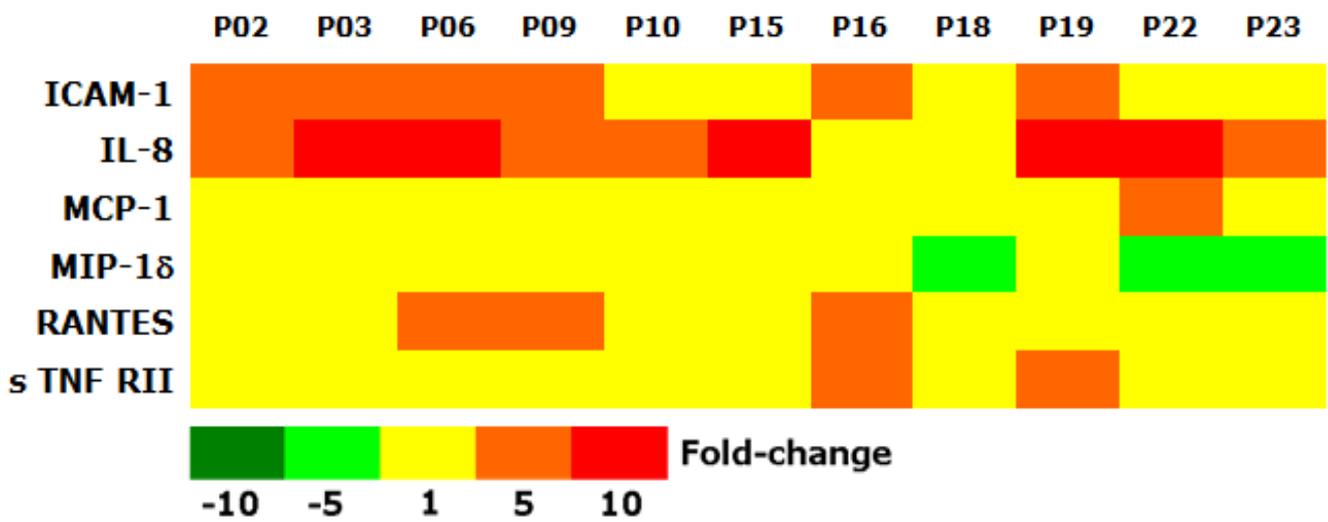


Figura 19. Sub-firma de factores inflamatorios.

Las citoquinas, aunque también considerados factores inflamatorios, fueron analizadas en diferentes micromatrices capaces de detectar un total de 120 de manera simultánea.

La Figura 20 muestra los cambios en la expresión de las citoquinas analizadas.

Los resultados confirmaron que la citoquina quimiotáctica GRO está sobre-expresada hasta en un 90 % de las muestras tumorales analizadas; también se confirmó la sobreexpresión de la IL-8 en aproximadamente un 80% del total de muestras tumorales.

La %sub-firma+ de las citoquinas analizadas (Figura 21) estuvo formada por 10 citoquinas (angiogenina, NAP-2, RANTES, Acrp30, GRO, ICAM-1, IL-8, TIMP-1, TIMP-2, uPAR), aunque una amplia mayoría de las mismas fueron previamente detectadas en el análisis de metaloproteasas, factores angiogénicos y factores inflamatorios.

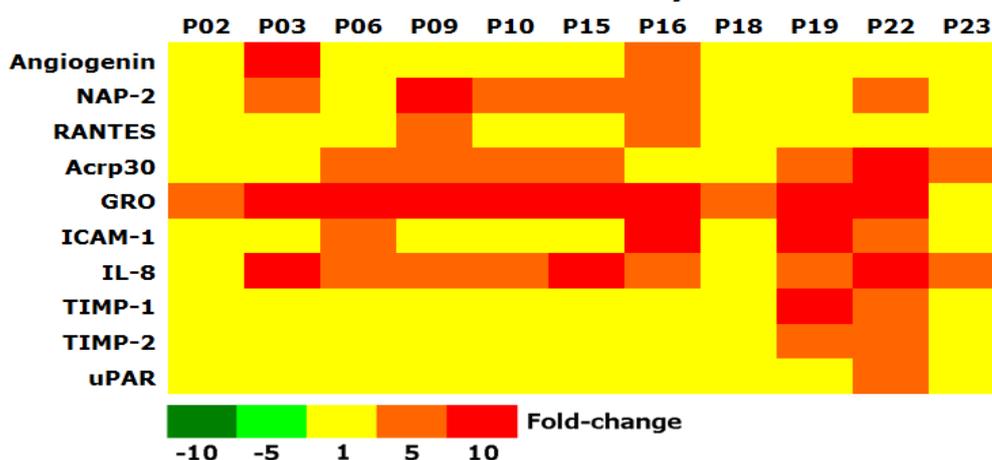


Figura 21. %Sub-firma+ de citoquinas en CG.

5.1.4 Factores de crecimiento

En la Figura 22 se pueden observar los cambios de expresión de los 41 factores de crecimiento analizados. Se detectó la sobreexpresión de tres factores de crecimiento, b-FGF, EGFR y HGF en las muestras tumorales en comparación a la mucosa normal. Se observó asimismo un descenso significativo (>5 veces) en la expresión de IGFBP-2 (*Insulin like growth factor-binding protein 2*) de las muestras tumorales en comparación al tejido normal.

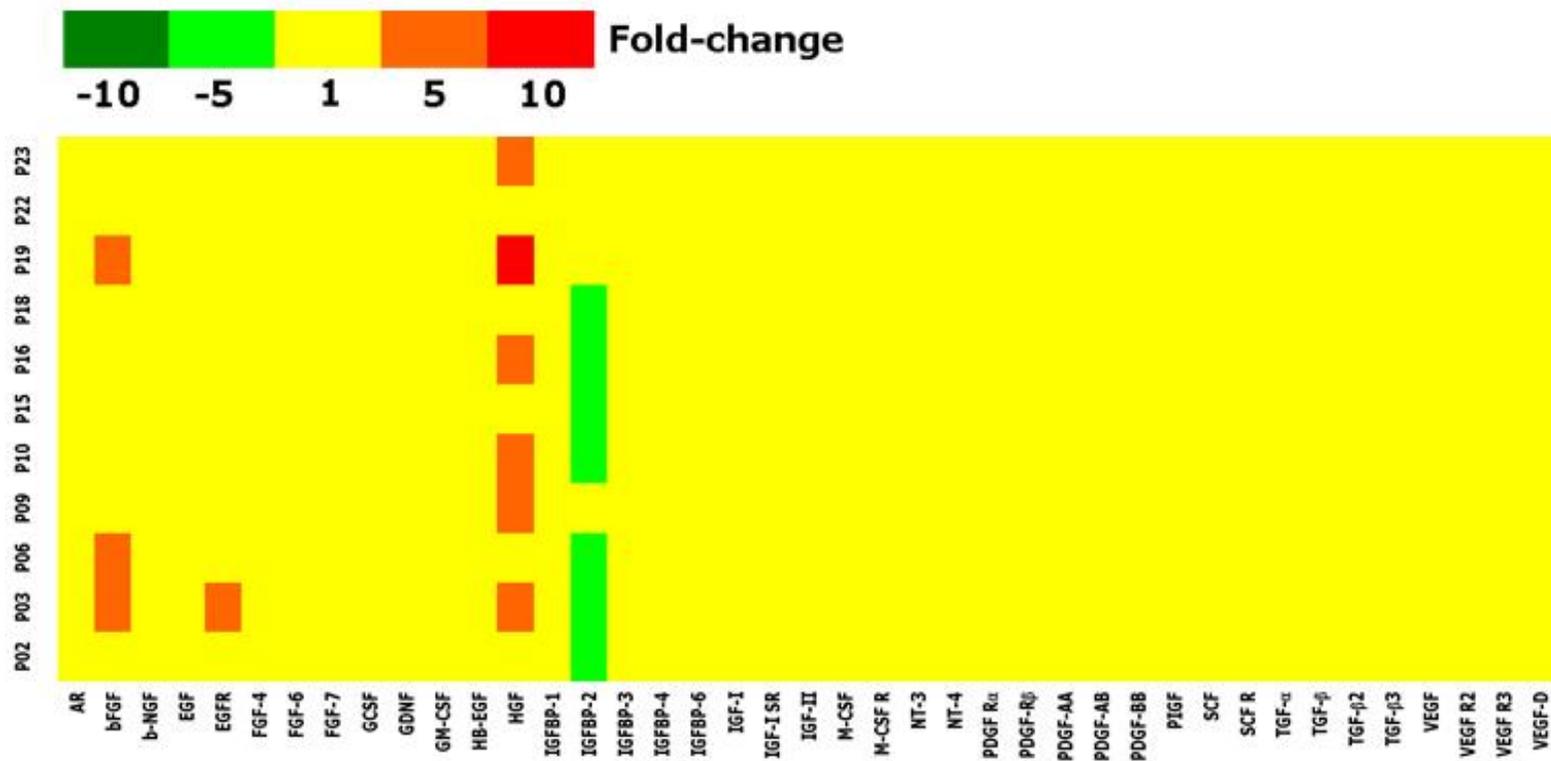


Figura 22. Cambios en la expresión de los factores de crecimiento en el CG.

La sub-firma de los factores de crecimiento estuvo formada por cuatro proteínas (b-FGF, EGFR, HGF e IGFBP-2), tal y como se resume en la Figura 23.

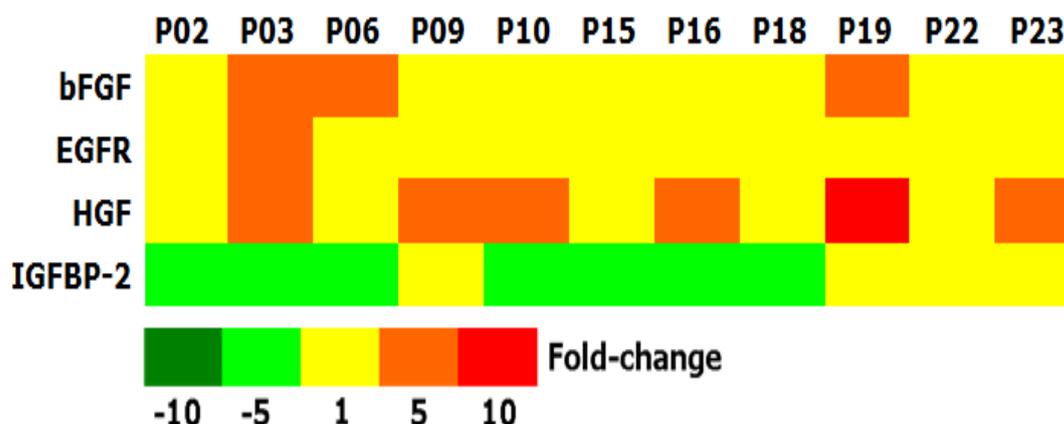


Figura 23. Sub-firma de factores de crecimiento en el CG.

5.1.5 Resumen de los resultados: Generación de la firma

En la cohorte de descubrimiento se identificaron finalmente un total de 19 proteínas sobre-expresada (GRO, MMP-9, IL-8, MMP-8, TIMP-1, TIMP-2, Acrp30, ICAM-1, NAP-2, Angiogenina, HGF, b-FGF, RANTES, ENA-78, uPAR, sTNF RII, EGFR, MCP-1 y IL-1) y dos proteínas (MIP-1 y IGFBP-2) cuya expresión estuvo disminuida en los tejidos tumorales en comparación al tejidos normal adyacente. Una vez analizadas las proteínas a través del programa bio-informático GO (*Gene Ontology*), se concluyó que el 35% de las proteínas de la firma están involucradas en procesos inflamatorios, procesos de respuesta inmunitaria y procesos de quimiotaxis, todos ellos procesos imprescindibles en la carcinogénesis. Cabe destacar que las citoquinas quimiotácticas agrupadas en la familia GRO, la IL-8, así como las MMP-8 y MMP-9 se encontraron sobre-expresadas en más del 80% de las muestras, mientras que la expresión de la IGFBP-2 está disminuida en un 70% de las muestras analizadas. En la siguiente figura (Figura 24) se puede

observar la firma oncoproteómica final del microambiente tumoral del CG constituida por 21 proteínas.

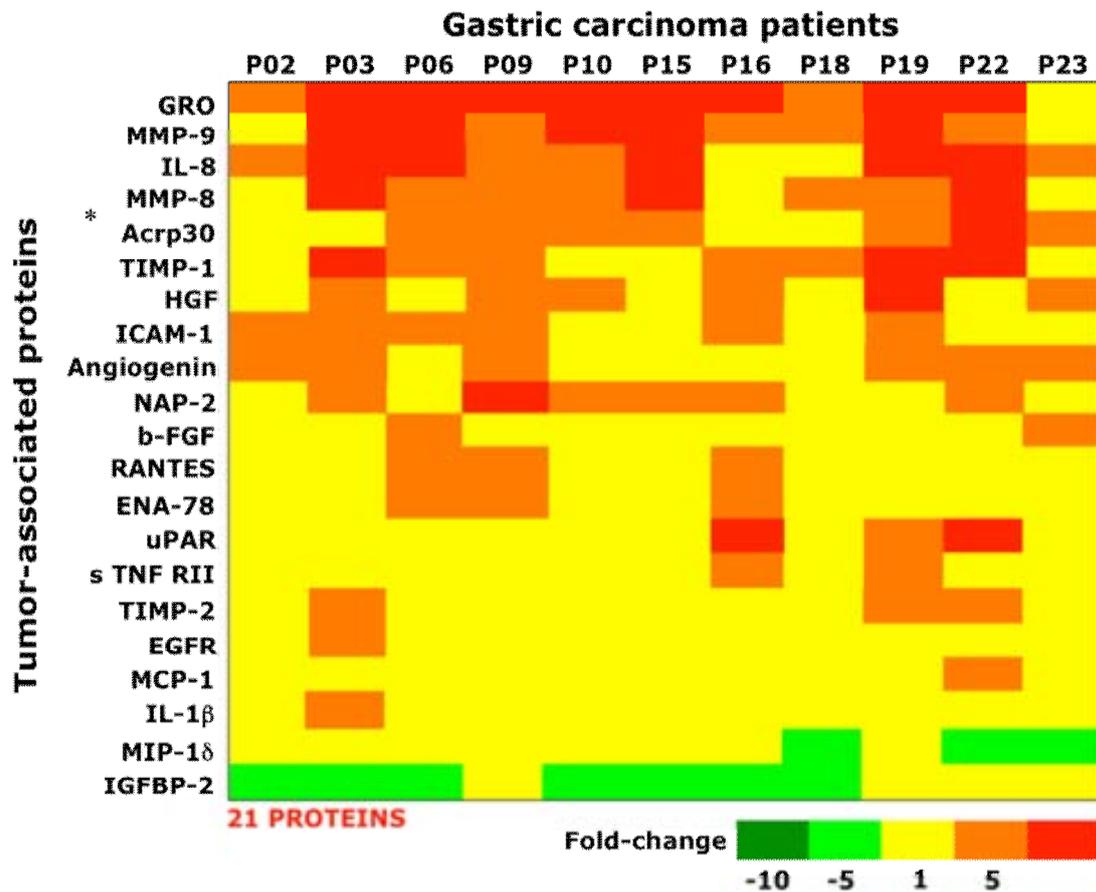


Figura 24. Firma oncoproteómica del microambiente tumoral del CG.

5.2 Validación del test

Con el fin de validar esta firma, se genera un dispositivo para analizar en una única membrana las 21 proteínas de la firma oncoproteómica (Figura 25). Por motivos técnicos de la casa comercial, el array solo pudo contener finalmente 20 proteínas al tener que descartarse la proteína Acrp30.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	POS	POS	NEG	NEG	GRO	MMP-9	IL-8	MMP-8
2	POS	POS	NEG	NEG	GRO	MMP-9	IL-8	MMP-8
3	TIMP-1	HGF	ICAM-1	Angiogenin	HAP-2	bFGF	RANTES	EAN-78
4	TIMP1	HGF	ICAM-1	Angiogenin	HAP-2	bFGF	RANTES	EAN-78
5	uPAR	S TNF RII	TIMP-2	EGF R	MCP-1	IL-1 Beta	MIP-1 delta	IGFBP-2
6	uPAR	S TNF RII	TIMP-2	EGF R	MCP-1	IL-1 Beta	MIP-1 delta	IGFBP-2
7	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	NEG	POS
8	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	NEG	POS

*Acrp30: Not included in the array design due to technical problems

Figura 25. Distribución de las citoquinas en el array que se ha utilizado para validar el valor predictivo de la firma oncoproteómica del microambiente tumoral del CG.

La validación de la firma, tal y como se explica detalladamente en el apartado de **Materiales y Métodos** fue llevada a cabo en una población independiente formada por 44 muestras. Una vez llevado a cabo el protocolo de los arrays en cada una de las muestras se procedió a calcular la sensibilidad y especificidad del test.

Los resultados fueron los siguientes (**Tabla 3**):

- Total de muestras: 44
- Número de muestras patológicas (CG): 22
- Número de muestras sin patología (mucosa gástrica sana): 22

ENFERMEDAD

	PRESENCIA	AUSENCIA	TOTALES	
TEST POSITIVO	18	6	24	PPV = 75% (53-90)
TEST NEGATIVO	4	16	20	NPV = 80% (56-94)
TOTALES	22	22	44	

Tabla 3. Sensibilidad y Especificidad de la firma oncoproteómica

$$\text{PPV} = [a/(a+b)] = [18 / (18+6)] * 100 = 75\% (53-90)$$

$$\text{NPV} = [d/(c+d)] = [16 / (4+16)] * 100 = 80\% (56-94)$$

$$\text{Sensibilidad} = [a/(a+c)] = [18/(18+4)] * 100 = 81,81\% (59-94)$$

$$\text{Especificidad} = [d/(b+d)] = [16/(6+16)] * 100 = 72,72\% (49-89)$$

$$\text{LR (+) test} = [\text{sensibilidad}/(1-\text{Especificidad})] = [0,8181/(1-0,7272)] = 3 (1,47-6,1)$$

$$\text{LR (-) test} = [(1-\text{Sensibilidad})/\text{Especificidad}] = [(1-0,8181) / 0,7272] = 0,249 (0,099-0,62)$$

Nota: () = 95% del intervalo de confianza (calculado con el test de expansión binomial)

La Figura 26 proporciona un ejemplo representativo de los resultados obtenidos con el array diseñado con la firma oncoproteómica de 21 proteínas del microambiente tumoral del CG. Pueden observarse ejemplos de verdaderos positivos (en rojo) y verdadero negativos (en azul), así como también de falsos positivos y falsos negativos (en negro)

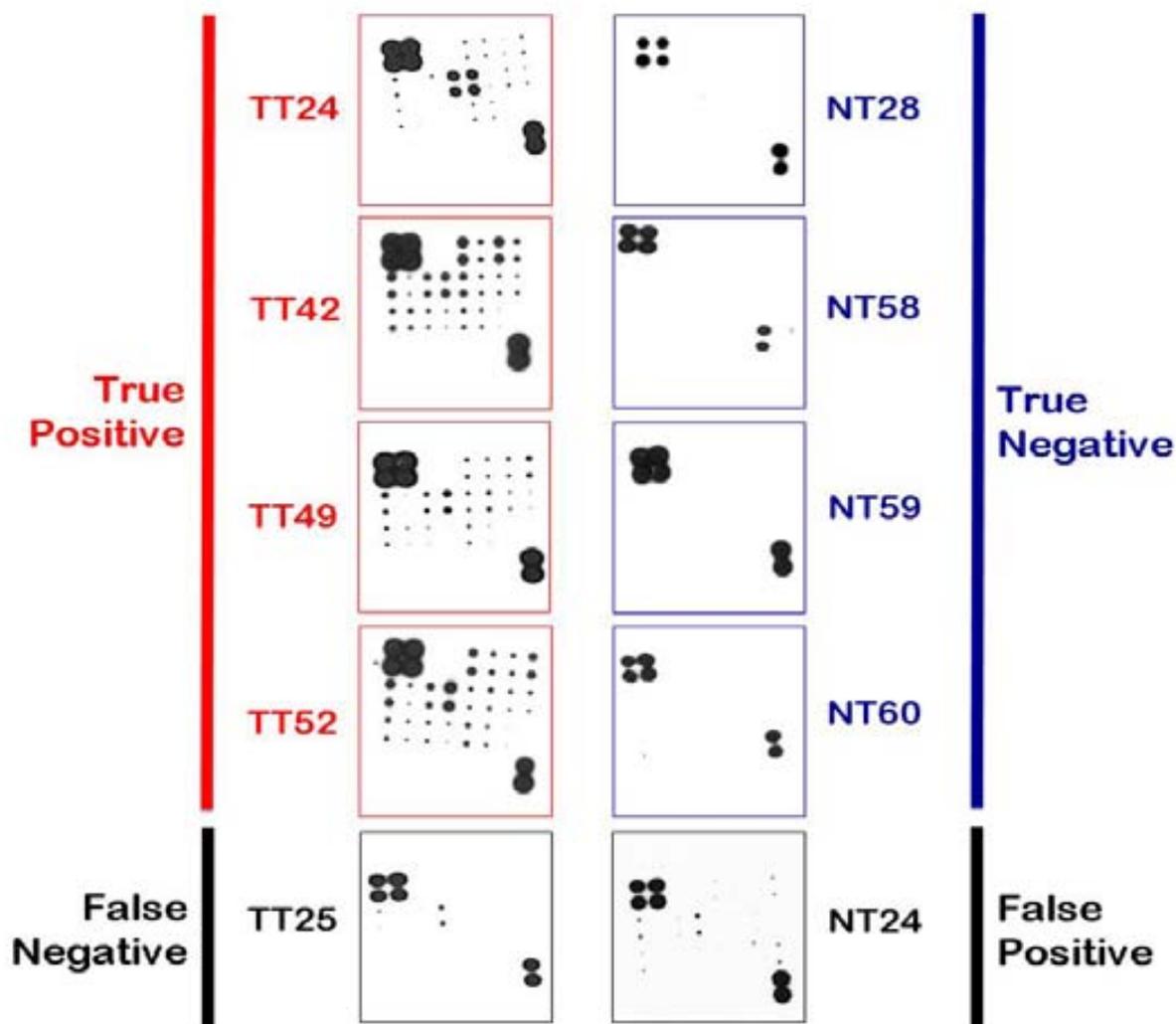


Figura 26. Resultados representativos de los arrays personalizados con la firma de 21 proteínas del microambiente tumoral del CG. En rojo, los verdaderos positivos, en azul los verdaderos negativos y en negro, los falsos positivos y negativos.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Inflamación y CG

La relación causal entre la inflamación y el cáncer ha sido sugerida durante muchos años. En la actualidad, la conexión entre los procesos inflamatorios y el cáncer está respaldada por diversos estudios epidemiológicos, celulares y moleculares. En realidad, la inflamación se incluye ya en la lista de *hallmarks* del cáncer y su inhibición se considera ya una estrategia válida para prevenir y/o tratar el cáncer (55,69,71). Es cierto que una inflamación a corto plazo puede tener efectos anti-infecciosos y anti-tumorales, pero cuando aquella se transforma en crónica, puede promover la aparición de cáncer. Es sabido que muchos tumores malignos tienen su origen en zonas donde preexiste una infección, una inflamación o una inflamación/irritación crónica; un buen ejemplo que relaciona de forma directa la inflamación crónica con la formación de tumores puede observarse en el colon, donde los procesos carcinogénicos se dan en individuos que sufren inflamaciones crónicas como son el caso de la Enfermedad de Crohn y la Colitis Ulcerosa. Ya en el siglo XIX, Virchow fue pionero al proponer la inflamación como origen del cáncer, basándose en la hipótesis de que algunas sustancias irritantes y la consecuente inflamación del tejido, facilitarían la proliferación celular aberrante propia de los carcinomas. Aunque está claro que la sola proliferación celular no es causa de cáncer, en un determinado microambiente enriquecido con células inflamatorias, factores de crecimiento, etc., potenciaría y promovería el riesgo neoplásico de manera sinérgica (72)

En diferentes estudios, ha podido confirmarse que las células inflamatorias juegan un importante papel en la linfangiogénesis patológica (73,74). Las células neoplásicas producen citoquinas (moléculas señalizadoras importantes en procesos inflamatorios) y quimioquinas (tipos de citoquinas encargadas de llevar a cabo la quimiotaxis), mediadores citotóxicos que incluyen ROS (*reactive oxygen species*), MMPs, moléculas perforadoras de la membrana celular, TNF α , interleuquinas e interferones (75), las cuales tienen una función mitogénica y de

atracción de granulocitos, monocitos/macrófagos, fibroblastos y células endoteliales hacia el microambiente tumoral, provocando su infiltración. Concomitantemente, los fibroblastos (76) activados y las células inflamatorias infiltradas producen y secretan enzimas proteolíticos (metaloproteasas), citoquinas y quimioquinas (77), las cuales tiene efectos mitogénicos sobre las células neoplásicas y las células endoteliales relacionadas con los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis. En este microambiente inflamatorio, se generan desequilibrios entre muchas de las moléculas que intervienen en los procesos como el crecimiento celular aberrante, y alteraciones en la respuesta inflamatoria, que promueven o potencian aquel, dando lugar a una evolución acelerada del proceso de malignización (78).

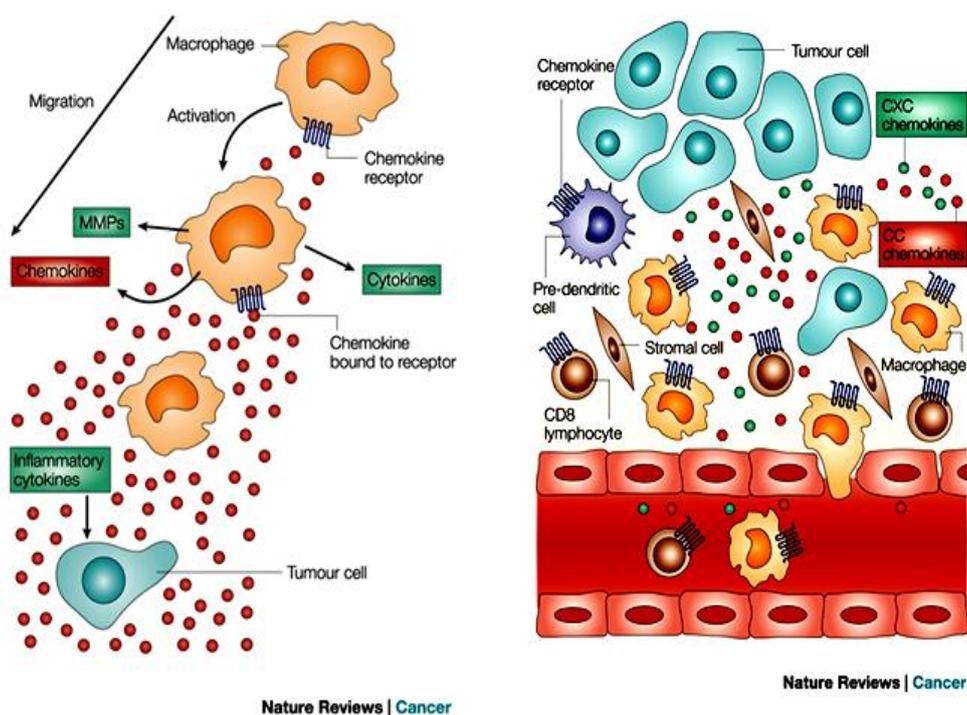


Figura 27. La producción de citoquinas y quimioquinas por parte de las células tumorales provocan una infiltración de las células inflamatorias hacia el microambiente tumoral. Balkwill, F, Coussens LM. Cancer: an inflammatory link. Nature. 2004 Sep 23; 431 (2007):405-6.

Es decir, una vez originado el microambiente inflamatorio alrededor del estroma tumoral, las citoquinas de dicho ambiente activan de nuevo los mismos factores de transcripción responsables de estimular la presencia de los mediadores pro-inflamatorios, provocando de nuevo un aumento de su producción, generándose una retroalimentación positiva del microambiente inflamatorio relacionado con el estroma tumoral y favorecido por la activación de la inflamación de las células peritumorales (79).

El papel de la inflamación en la angiogénesis tumoral es evidente, de manera que el número de macrófagos en los tejidos tumorales es significativamente superior que en tejidos normales. En algunos tipos de tumor como el cáncer de mama, el cáncer de ovario o el cáncer de próstata se ha observado que la densidad de TAMs (*Tumor Associated Macrophages*) tiene valor pronóstico. La TAMs promueven la neovascularización mediante la secreción de potentes citoquinas pro-angiogénicas y factores de crecimiento, como el VEGF, el TNFalfa (*tumor necrosis factor alfa*), interleucina 8 y bFGF (*basic fibroblastic growth factor*) y gran variedad de metaloproteasas (MMP2, MMP7, MMP9 y MMP12) que, asimismo, participan en el proceso de la angiogénesis a través de la degradación y remodelación activa de la matriz celular (80,81).

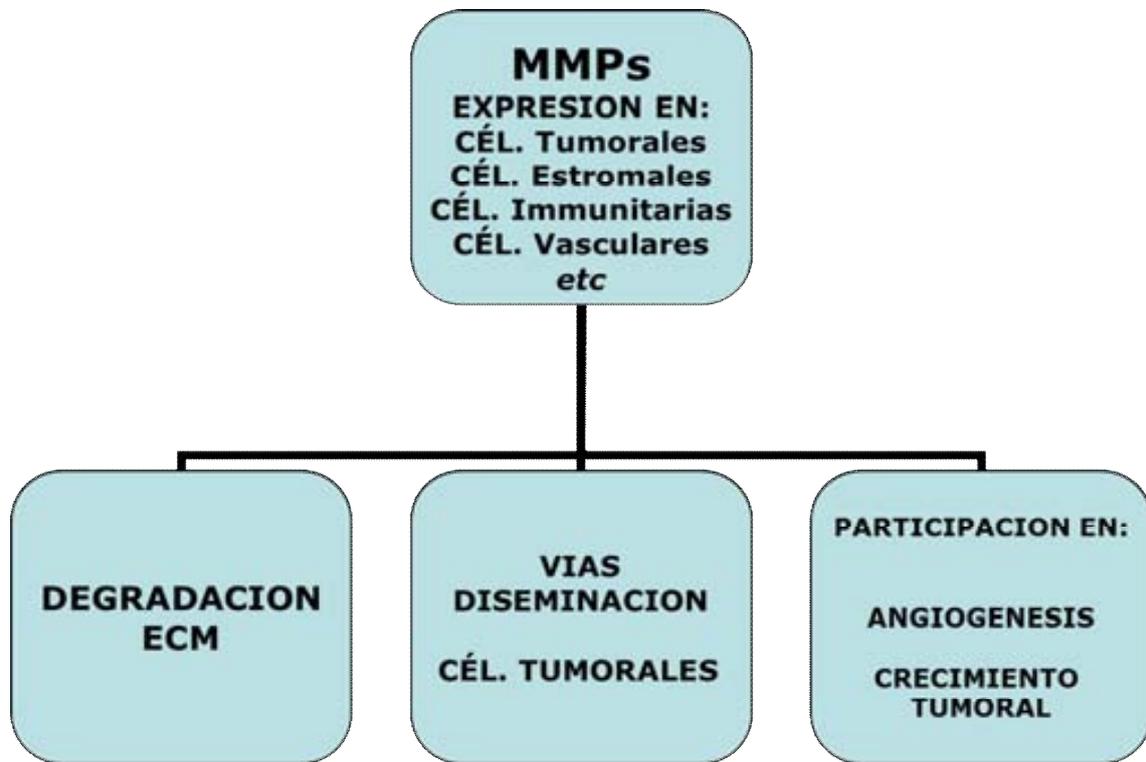
Estudios más recientes han puesto de manifiesto que la estimulación de la angiogénesis y linfangiogénesis, las citoquinas inflamatorias o sus reguladores, promueven la amplificación de la población minoritaria de cancer stem cells (CSC) o células iniciadoras de tumores (*tumor initiating cells*, TICs), que son las únicas capaces de auto-renovarse dentro de la población celular tumoral y, por tanto, las verdaderas responsables del crecimiento, resistencia a las terapias y recaídas de los carcinomas humanos (82,83,84,85,86).

Metaloproteasas y CG

Tanto el crecimiento local con afectación de órganos vecinos como la formación de metástasis a distancia en localizaciones distales, son características de los tumores malignos incluyendo el CG. Para que estos procesos tengan lugar, los enzimas proteolíticos juegan un papel fundamental para permitir el acceso de las células malignas a los vasos sanguíneos y linfáticos. El sistema proteolítico tisular es extremadamente complejo y, dentro de este, el papel de las MMPs tienen una importancia especial por su actuación en la degradación de la matriz extracelular y membranas basales que, por otra parte, posibilitan a las células tumorales penetrar e infiltrar la matriz estromal (87,88,66).

En los últimos años, el estudio de estos enzimas y la implicación de los mismos en fase tempranas de la evolución tumoral, ha permitido conocer otras actividades también fundamentales en la citada evolución tumoral, como la estimulación de la proliferación celular y la modulación de la angiogénesis. Así, el papel de las MMPs, inicialmente limitado a la degradación de la matriz extracelular creando vías de acceso para las células cancerígenas a vasos linfáticos y vasculares, ha sido ampliado por su implicación directa en la angiogénesis y crecimiento tumoral durante la progresión metastática de la enfermedad tumorales (89,90).

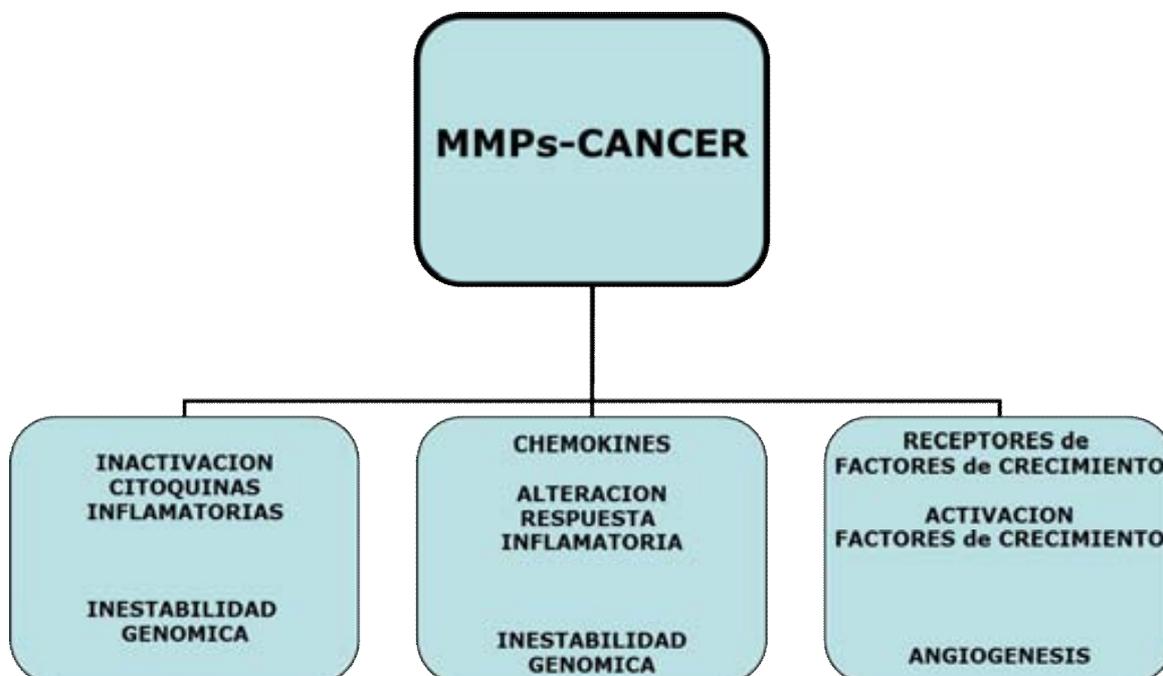
Dentro de las funciones fisiológicas de las MMPs, por su actividad degradadora de los componentes de la ECM y la membrana basal, figura el crecimiento embrionario y la morfogénesis tisular, la adipogénesis y la participación en los procesos de cicatrización, entre otros. También, la participación de las MMPs en la angiogénesis es complejo y extenso. Varias MMPs producidas por las células endoteliales han sido descritas como factores importantes en la neo-formación vascular tanto en procesos fisiológicos como patológicos, describiéndose múltiples MMPs que actúan tanto movilizando o activando factores pro-angiogénicos como estimulando la liberación de sustancias inhibitoras de la angiogénesis.



La identificación de nuevas funciones biológicas por parte de las MMPs (la activación de factores de crecimiento, la supresión de la apoptosis en las células tumorales, la destrucción de los gradientes de chemokines desarrollado por la respuesta inmune de acogida, o la liberación de factores angiogénicos)⁽⁹¹⁾ ha propiciado la reevaluación del papel de estas en el cáncer más allá de su papel como regulador de la matriz extracelular en estadios avanzados de la enfermedad. Por ejemplo, los procesos proteolíticos de moléculas bioactivas por parte de las MMPs favoreciendo la liberación de factores de proliferación celular que están vinculados a determinadas proteínas de unión (por ejemplo, IGF-BP) contribuyen a la transformación de un microambiente complejo que promueve la malignización en las primeras etapas de formación de los carcinomas humanos incluyendo el CG. De una manera similar las MMPs también puede orientar y activar los factores de crecimiento cuyos precursores están anclados en la superficie celular o secuestrados en la matriz extracelular peritumoral. No es de extrañar que estas y

otras actividades no-clásica de las MMPs (p. ej. remodelación de sustratos implicados en la muerte celular programada . apoptosis-) sean capaces de dirigir de manera directa el crecimiento de las células tumorales.

Las MMPs pueden asimismo modular las reacciones inmunes antitumorales a través de su capacidad de adherirse de manera eficiente a varias quimioquinas, regulando directamente su movilización (92). En este mismo sentido, las MMPs también pueden ser beneficiosas para el huésped mediante la estimulación de respuestas inmunes de protección y de adaptación. En un estudio llevado a cabo por Balbín y cols. (2003), el déficit de MMPs se asoció con un incremento significativo de la susceptibilidad tumoral. La falta de esta MMP puede obstaculizar las primeras etapas de la inflamación, pero una vez establecida, es anormalmente sostenida conducente a un ambiente más favorable para el desarrollo de tumores (93). La acumulación prolongada de las células inflamatorias y el establecimiento de una inflamación crónica, facilitarían finalmente la inestabilidad genómica y la promoción del crecimiento del tumor.



No es de extrañar que, en nuestro estudio, hayamos observado una sobreexpresión de las MMPs-8 y -9 en un 70% de las muestras tumorales analizadas. Diferentes publicaciones habían observado la sobreexpresión de la MMPs-2 y -9 en CG, correlacionando la misma con la presencia de metástasis ganglionares o recurrencia del tumor (94,95,96). Sin embargo, si frente a la expresión de la primera y la correlación citada no hay consenso en la actualidad, no es así en el caso de la MMP-9, la cual cuyo efecto pro-metastásico ha sido confirmado en varios estudios (97,98). Otros estudios han observado la sobreexpresión de otras MMPs, como las MMP-7 y MMP-14 en el CG, un escenario que no ha podido ser replicado en nuestra aproximación experimental (99,100,101).

La determinación de la expresión de determinadas proteínas que participan en la señalización celular y que se han convertido en objetivos diana (102,103,104) para el tratamiento de algunos tipos de tumores y que, además, contribuyen a diferenciar subtipos de tumores molecularmente diferentes, conlleva modificaciones en los planteamientos terapéuticos; la identificación del *protease degradomics+* (105) permitiría actuaciones concretas sobre algunas proteasas y contribuiría a establecer criterios pronósticos diferentes a los criterios clínicos más generales empleados en la actualidad.

Factores angiogénicos y CG

Tanto la angiogénesis como la linfangiogénesis son procesos que participan activamente en el crecimiento de los tumores y en la formación de metástasis de los mismos. Los tumores malignos estimulan tanto el crecimiento de los vasos sanguíneos como de los linfáticos mediante la producción de factores angiogénico y linfangiogénicos. La capacidad de las células tumorales para promover los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis determina por tanto la probabilidad de las metástasis por vía hematológica y linfática, respectivamente (106,107,108,109,110,111).

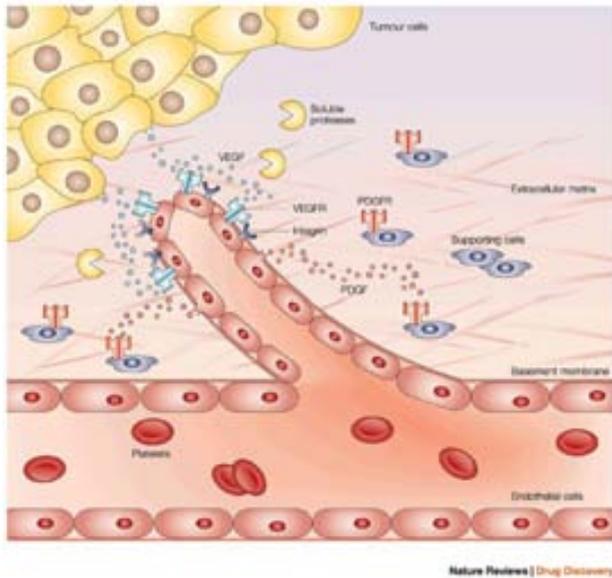


Figura 28. Las células tumorales secretan factores angiogénicos que difunden a través del microambiente temporal y permiten el alargamiento de los capilares preexistentes. Cristofanilli M; Charnsangavej,C; Hortobagyi GN. Angiogenesis modulation in cancer reserach: novel clinical approaches. Nat Rev Drug Disco. 2002 Jun; 1 (6): 415-26.

Dentro de los mecanismos biológicos implicados en el proceso angiogénico, la familia VEGF (*vascular endothelial growth factor*) y los factores de crecimiento endotelial han sido identificados como los actores moleculares más influyentes en la angiogénesis tumoral. Junto a estos inductores clásicos de la angiogénesis, debemos considerar también el factor de crecimiento fibroblástico, las angiopoyetinas 1 y 2 , el TNFalfa, así como las moléculas inhibitoras del proceso como la angiostatina, vasostatina, e interferón alfa. En realidad, es el equilibrio entre ambos grupos de mediadores lo que determina finalmente la evolución en el proceso angiogénico.

La familia de los VEGF está integrada por diferentes tipos del mismo (A,B,C,D,E,F y PlGF -*placental growth factor*-) (112,113). Cada uno de ellos presenta diferentes subtipos de moléculas. En el caso del VEGF-A se pueden reconocer hasta 9 subtipos por la escisión repetida de un simple gen (VEGF121,145,148,162,165,165b,183,189 y 206.) Sin embargo, cuatro son las isoformas principales (121,165, 189 y 206), siendo la 165-aminoacid la forma predominante de VEGF. Las varias isoformas del VEGF-A juegan distintos

papeles en la formación vascular y desarrollo arterial, aunque el VEGF-165 isoforma juega un papel central en el desarrollo vascular.

El VEGF-A también referido como VPF (vascular permeability factor) es un importante regulador de la fisiología de las células endoteliales que fue identificado en 1989; se trata de una glicoproteína esencial en múltiples procesos angiogénicos, tanto en situaciones normales como patológicas, a través de sus dos receptores: el VEGFR-1, también conocido como Flt-1 (*Fms-like tyrosine kinase*) y VEGFR-2, también conocido como Flk-1 (*fetal liver kinase*). El VEGF-A presenta dos actividades biológicas preferentes, como son la capacidad de estimular la proliferación del endotelio vascular y promover la supervivencia y migración de las células endoteliales. La expresión del VEGF-A está regulada por una variedad de estímulos como la hipoxia, los factores de crecimiento PDGF (114), FGF, EGF -*epidermal growth factor*-TNF, TGFbeta -*transforming growth factor-beta* y interleucina-1 -IL-1-), mutaciones en p53, estrógenos, TSH, y otras proteínas. Aunque todos los estímulos citados son importantes, es la hipoxia la que tiene un interés especial por el tipo de respuesta, un proceso de inducción que se sabe esta mediado por el factor de transcripción HIF-1 (112).

Las isoformas largas VEGF-165, VEGF-189 y VEGF- 206 se encuentran en la superficie celular y matrices extracelulares. Corresponden a las formas heparino-proteoglicanas de VEGF y pueden ser liberadas de la superficie celular y las matrices extracelulares mediante la acción de heparinasas, plasmina y MMPs. El VEGF por sí mismo activa las principales cascadas proteolíticas con vistas a la generación de plasmina y MMPs, creando una retroalimentación positiva en la actividad del VEGF.

Aunque tradicionalmente se ha enfatizado más la importancia de la angiogénesis sobre la linfangiogénesis, esto ha sido debido en gran parte a la ausencia de identificación de factores para esta última, así como de marcadores que pudieran utilizarse para diferenciar el endotelio linfático del vascular (115,116). La evidencia reciente de la importancia de los factores de crecimiento linfangiogénicos en el desarrollo de los vasos linfáticos tumorales, y en la diseminación tumoral y

formación de metástasis (117), hace suponer que los factores que influyen sobre los vasos linfáticos y su crecimiento y desarrollo también deben ser considerados como objetivos para la terapia antitumoral (118,85,119). En la actualidad parece claro que los mecanismos básicos aplicables a la angiogénesis pueden también aplicarse a la linfangiogénesis, con la intervención de los VEGF-C y su homólogo D. Tanto el uno como el otro ejercen sus efectos mediante la interacción con los receptores VEGFR- 2 y VEGFR-3, también denominado este último Flt4.

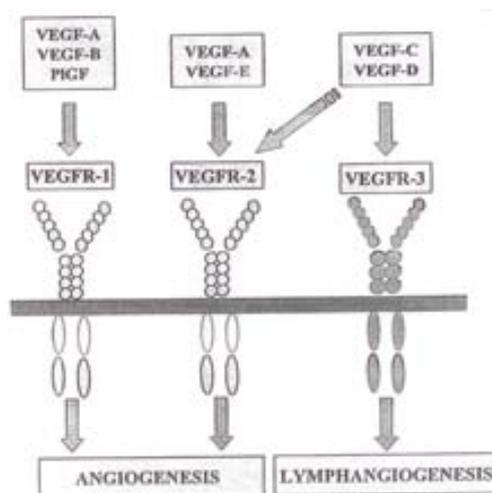


Figura 29. Los VEGFs y sus receptores. Al-Rawi, MAA, Mansell RE, Jiang WG . Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis. EJSO (2005) 31,177-121.

El VEGF-C, el primer factor linfangiogénico descrito induce la proliferación de las células endoteliales linfáticas y vasos linfáticos a través de la activación del VEGFR-3 (Flt4) o VEGFR-2(KDR) presentes en la membrana de las células endoteliales, así como promoviendo la migración de dichas células y la permeabilidad vascular. La caracterización de VEGF-C y D como potentes factores que estimulan la linfangiogénesis a través de su receptor VEGFR-3, han permitido profundizar en el conocimiento de la misma. Así, algunos trabajos han demostrado que la sobreexpresión de VEGF-C o VEGF-D induce la linfangiogénesis y promueve la aparición de metástasis linfáticas (120) en modelos

experimentales. En estudios clínicos, el incremento de la expresión de VEGF-C en tumores primarios se ha correlacionado con un aumento en la diseminación de células tumorales en múltiples tumores (121,122,123,124,125). Algunos autores han concluido que la expresión de VEGF-C en el CG puede considerarse un marcador predictivo en la evolución del mismo (126,5,127,128,129,130). Varios estudios han confirmado que la expresión de VEGF-C es un indicador pronóstico independiente en la supervivencia global por CG (131,132).

Se ha reportado también una relación significativa entre la expresión elevada de VEGF-D y un mal pronóstico en cáncer colorrectal, carcinoma de mama y CG. En un estudio en el que se analizó la expresión de VEGF-D (133,134,135) y su relación con el estadio clínico-patológico y su significado pronóstico en el CG (136), se demostró que la recurrencia en los ganglios linfáticos era más elevada en los pacientes con expresión VEGF-D positiva que en los casos en que era negativa(137) Una correlación similar fue observada entre los niveles elevados de VEGF-D en CG y la recurrencia peritoneal.

Tanto VEGF-C como el VEGF-D tienen una gran afinidad por el VEGFR-3, mientras que para el VEGFR-2 se obtiene una respuesta progresiva bajo el efecto de algunas proteasas tisulares. No queda claro todavía que forma molecular de VEGF-C y VEGF-D están presente mayoritariamente en el tejido tumoral y la influencia de cada una de las isoformas en el pronóstico y desarrollo de la enfermedad. La caracterización de las isoformas del VEGF-C y D y las proteasas que influyan en las mismas, podría ser una aproximación útil en el diagnóstico y pronóstico del CG (138,139,140).

Estudios de laboratorio han demostrado que los niveles de FGF-2 (*fibroblastic growth factor-2*) modulan la capacidad de los cultivos celulares para desarrollar linfangiogénesis *versus* angiogénesis en función de la presencia en mayor o menor medida de VEGF-C o VEGF-A. Así, dentro de los factores necesarios para la regulación molecular de la formación y diferenciación de los vasos linfáticos, incluiríamos varios factores, entre los que cabe citar VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-3, VEGFR-2, NRP2 (*non-kinase neuropilin-2*, expresado en células endoteliales

linfáticas), Ang2 (también expresado en células endoteliales linfáticas), Prox-1 (necesario para el desarrollo de los vasos linfáticos a partir de las células endoteliales), y la *adaptor protein SLP76*, necesaria para la separación anatómica entre vasos linfáticos y sanguíneos.

Una nueva firma oncoproteómica del microambiente tumoral del CG: Importancia tecnológica, molecular y relevancia clínica.

Nuestro estudio ha demostrado la utilidad de la tecnología de los arrays de proteínas basados en anticuerpos es útil para el estudio del proteoma del microambiente tumoral (141, 142, 143, 144,145) en el CG y permite sugerir las posibles interacciones moleculares en el mismo. Así, la generación de esta firma (146,147,148) ha confirmado que las moléculas relacionadas con la inflamación y la quimiotaxis, como por ejemplo las metaloproteasas (MMPs) y las citoquinas pro-inflamatorias (IL-8, GRO), se encuentran sobre-expresadas en la mayoría de los tejidos tumorales analizados y que es lógico sugerir la existencia una interacción entre ellas y entre las células que las producen, como por ejemplo, las células tumorales y las células del estroma. Estos resultados reafirman que el microambiente tumoral es un sistema dinámico formado por varios tipos celulares que segregan moléculas que interaccionan entre ellas, y que son indispensables para el proceso de la carcinogénesis, en este caso en la mucosa gástrica (149,150,151).

Como hemos visto en el apartado de Resultados, nuestro proyecto de investigación ha desarrollado un dispositivo proteómico de bajo coste capaz de diagnosticar de forma sensible (82%) y específica (73%) el CG en muestras de mucosa gástrica. Se trata por tanto de un dispositivo que podría aplicarse en la rutina hospitalaria para llevar a cabo programas de *screening* y diagnóstico precoz de posibles pacientes con CG en una población asintomática. Estudios futuros deberán validar los resultados obtenidos en tejido con los obtenidos en suero; es decir, dada la naturaleza secretómica de la mayoría de proteínas incluidas en las 21 de la firma final, se hace necesario la puesta en marcha de un nuevo estudio secretómico de las mismas moléculas que hemos analizado en este estudio en el

suero de los mismos pacientes, con la intención de establecer relaciones causales entre la presencia de una proteína predictora en el tejido tumoral y su presencia/ausencia en el torrente circulatorio del mismo paciente.

Si consideramos el CG desde un punto de vista funcional podemos decir que de todas las 21 moléculas presentes en el microambiente tumoral del CG definidas en nuestro proyecto de investigación, un 70% de las mismas participan en procesos inflamatorios y angiogénicos. El resto representan moléculas que participan en procesos de crecimiento celular, remodelación de la matriz extracelular e invasión. Por tanto, podríamos concluir que tanto los procesos inflamatorios como los angiogénicos son muy importantes en el proceso de malignización de la mucosa gástrica.

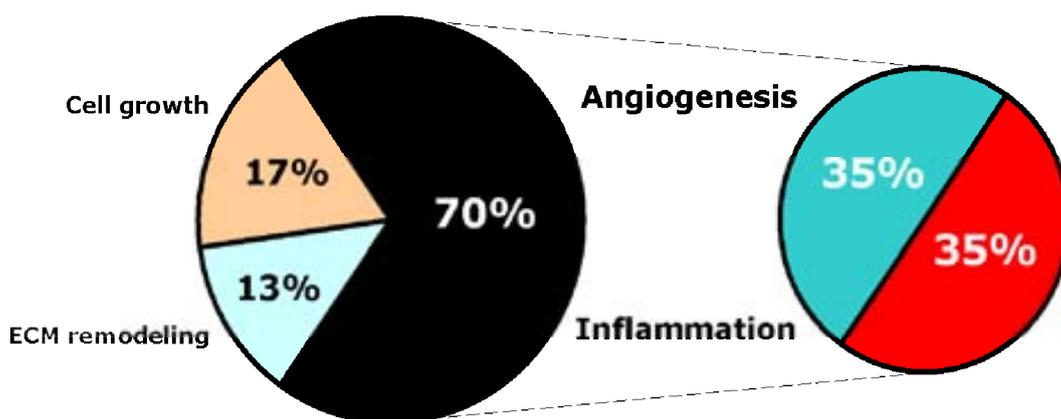


Figura 30. Visión funcional del CG según la firma oncoproteómica de 21 proteínas obtenida en nuestro proyecto de investigación

Si atendemos a los datos clínico-patológicos que durante muchos años han sugerido el papel clave que para la diseminación tumoral podrían jugar los vasos linfáticos, y la afectación ganglionar regional como primer paso en la evolución de la diseminación metastásica, podremos entender por qué se ha modificado la extensión inicial de las linfadenectomías hasta protocolizar las mismas dentro del tratamiento del CG en la actualidad. Nuestros resultados sugieren que la

valoración *a priori* de ciertos factores moleculares implicados en el desarrollo del proceso de malignización podría impactar significativamente la implementación de estrategias quirúrgicas tempranas, tales como resecciones endoscópicas locales (EMR), en individuos con un riesgo elevado de CG. En los tumores submucosos gástricos invasivos con mínimo riesgo de afectación linfática y por ello, tributarios de EMR, seleccionados combinando el tamaño del tumor, el tipo histológico, la afectación vascular-linfática y la profundidad de la afectación submucosa, la implementación de nuestra firma oncoproteómica de 21 proteínas podría orientar la indicación o no de EMR e incluso ampliar las opciones de dicha técnica, si la firma tuviera valor predictivo para las metástasis ganglionares.

Iniciábamos nuestra introducción indicando que el CG es una de las principales causas de muerte por cáncer a nivel mundial. También en la misma línea, la aparición de metástasis tumorales es la responsable de la mayoría de muertes por cáncer, y también lo es en el caso de CG. En Occidente los pacientes con CG son diagnosticados en estadios más avanzados en comparación a los diagnosticados en Japón, mostrando en la mayoría de los casos invasión linfática y un mal pronóstico con supervivencias a 5 años inferiores a un 30%. Los estudios clínicos demuestran que la extensión de la diseminación tumoral determinan el futuro de estos pacientes. Es por ello que se hace indispensable conocer con la máxima precisión el grado de afectación ganglionar metastásica con vistas a optimizar las estrategias terapéuticas y establecer un pronóstico correcto de manera muy temprana. Los procedimientos habituales para valorar la extensión ganglionar en el CG incluyen TAC, ultrasonidos endoluminales y laparoscopia. Aun cuando todos ellos están bien establecidos desde el punto de vista clínico, todos ellos tienen una utilidad limitada que podría mejorarse significativamente mediante la implementación simultánea de tests predictivos como el desarrollado en nuestro estudio.

La aplicación clínica de la firma oncoproteómica de 21 proteínas podría permitir el establecimiento de un mejor estadiaje del CG y, por tanto, la implementación de factores pronóstico capaces de identificar grupos determinados de pacientes que

podrían beneficiarse de tratamientos diferentes desde etapas más tempranas (152). Por ejemplo, el empleo de fármacos anti-angiogénicos y/o anti-linfangiogénicos (bevacizumab, valatanib, ZD6475 . vandetanib-, SU6668) (153,85,154) podría evitar la diseminación temprana de células tumorales en subgrupos de pacientes con un alto riesgo de diseminación, permitiendo de esta manera el diseño personalizado de tratamientos adyuvantes con el doble objetivo de evitar no solo la proliferación tumoral sino también su recurrencia y sus metastatización loco-regional y distal.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. La utilización de micromatrices de proteínas basadas en anticuerpos, una nueva técnica oncoproteómica, es capaz de caracterizar adecuadamente los perfiles proteómicos específicamente asociados con la presencia de tejido tumoral en la mucosa gástrica.

2. La generación prospectiva de una firma oncoproteómica compuesta por 21 biomarcadores permite predecir de manera específica (73%) y sensible (82%), la presencia de enfermedad neoplásica en muestras procedentes de la mucosa gástrica.

Los resultados de esta tesis doctoral han sido presentados en parte en:

- Manuel Puig-Costa, Cristina Oliveras-Ferraros; Silvia Flaquer, Josep Roig, Antonio Codina-Cazador, Javier A. Menéndez. **A novel microproteomic signature of the gastric cancer microenvironment defined by antibody microarrays-based Technology: A pilot study for biomarker discovery** **ESMO Conference: 11th World Congress on Gastrointestinal Cancer at CCIB. Abstract #169**. Barcelona, Spain. June 24-27, 2009.
- Manuel Puig-Costa, Cristina Oliveras-Ferraros; Josep Roig García; Eva.Artigau Nieto; J.Ignacio Rodríguez; Silvia Flaquer, Rosa Ortiz Duran; Antonio Codina-Cazador, Javier A. Menéndez. Comunicación oral: **Empleo de micromatrices de anticuerpos para la detección de metaloproteinasas en cáncer gástrico** **28 Congreso Nacional de Cirugía**, Madrid, 9-11 Noviembre 2010.

Los resultados de esta tesis doctoral han sido publicados en parte en:

- Puig-Costa M, Oliveras-Ferraros C, Flaquer S, Llopis-Puigmarti F, Pujol-Amado E, Martin-Castillo B, Vazquez-Martin A, Cufí S, Ortiz R, Roig J, Codina-Cazador A, Menendez JA. Antibody microarray-based technology to rapidly define matrix metalloproteinase (MMP) signatures in patients undergoing resection for primary gastric carcinoma. *J Surg Oncol*. 2011 Jul 1;104(1):106-9.

Los resultados de esta tesis doctoral han sido enviados para consideración de publicación:

- Manuel Puig-Costa, Antonio Codina-Cazador, Elisabet Cortés-Pastoret, Cristina Oliveras-Ferraro, Sílvia Cufí, Sílvia Flaquer, Francesca Llopis-Puigmartí, Eulalia Pujol-Amado, Bruna Corominas-Faja, Elisabet Cuyàs, Rosa Ortiz, Eugeni Lopez-Bonet, Begoña Martín-Castillo, Josep Roig, Jorge Joven, Javier A. Menéndez Discovery and validation of an INflammatory PROtein-driven GASTric cancer Signature (INPROGAS) using antibody microarray-based oncoproteomics. **Modern Pathology** 2013 (en consideración)

ÍNDICE DE FIGURAS

8. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Los *atributos del cáncer* Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4; 144(5):646-74.

24

Figura 2. El microambiente tumoral puede ser *fotografiado* a través de perfiles (*firmas*) proteómicos. Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. Nat Rev Cancer. 2008 Aug; 8 (8):604-17

26

Figura 3. Las interacciones moleculares en el microambiente tumoral generan perfiles proteómicos específicos detectables mediante microarrays basados en anticuerpos. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. Nat Rev Cancer. 2007 Nov; 7(11):834-46 y Petricoin EF, Belluco C, Araujo RP, Liotta LA. The blood peptidome: a higher dimension of information content for cancer biomarker discovery. Nat Rev Cancer. 2006 Dec;6(12):961-7.

34

Figura 4. Los diferentes tipos de MMPs y TIMPs son sintetizados por las células estromales, las células tumorales y las células tumorales que realizarán la EMT. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer. 2002 Mar; 2(3):161-74

35

Figura 5. Esquema de los *microarrays* basados en anticuerpos. *RayBiotech, Inc.*

49

Figura 6. Proceso esquemático del protocolo de los *microarrays de proteínas basados en anticuerpos*. *RayBiotech, Inc.*

50

Figura 7. RayBio® Human ANGIOGENESIS Antibody Array C Series 1000 (Array 1 + Array 2, el cual detecta la expresión de 43 factores angiogénicos en dos membranas).

51

Figura 8. RayBio [®] Human MATRIX METALLOPROTEINASES (MMPs) Antibody Array 1 (el cual detecta la expresión de 10 MMPs en una membrana).	52
Figura 9. RayBio [®] Human INFLAMMATION Antibody Array 3 (el cual detecta la expresión de 40 factores inflamatorios en una membrana).	52
Figura 10. RayBio [®] Human CYTOKINE Antibody Array C Series 1000 (Array VI + Array VII, el cual detecta la expresión de 120 citoquinas en dos membranas).	52
Figura 11. RayBio [®] Human GROWTH FACTOR Antibody Array 1 (el cual detecta la expresión de 41 factores de crecimiento en una membrana).	53
Figura 12. RayBio [®] Custom Human Antibody Array: Firma oncoproteómica del microambiente tumoral del CG.	54
Figura 13. Representación de <i>arrays</i> de MMPs y TIMPs obtenidos en tres muestras de tejido sano y tumoral de tres pacientes diferentes. Puig-Costa, M, Oliveras-Ferraro, C; Flaquer S; Llopis-Puigmartí F; Pujol-Amado E; Martín Castillo B; Vázquez-Martín A; Cufí S; Ortiz R; Roig J; Codina-Cazador A; Menéndez JA. Antibody microarray-based technology to rapidly define matrix metalloproteinase (MMP) signatures in patients undergoing resection for primary gastric carcinoma. J Surg Oncol. 2011 Jul 1; 104(1):106-109.	58
Figura 14. Cambios en la expresión de las MMPs y los TIMPs en CG.	59
Figura 15. Sub-firma de MMPs en el GC.	60
Figura 16. Cambios en la expresión de los factores angiogénicos en CG.	60

Figura 17. %Sub-firma+de factores angiogénicos en el CG.	61
Figura 18. Cambios en la expresión de los factores inflamatorios en el CG.	62
Figura 19. %Sub-firma+de factores inflamatorios.	63
Figura 20. Cambios en la expresión de citoquinas en CG.	64
Figura 21. %Sub-firma+de citoquinas en CG.	65
Figura 22. Cambios en la expresión de los factores de crecimiento en el CG.	66
Figura 23. %Sub-firma+de factores de crecimiento en el CG.	67
Figura 24. Firma oncoproteómica del microambiente tumoral del CG.	68
Figura 25. Distribución de las citoquinas en el array que se ha utilizado para validar el valor predictivo de la firma oncoproteómica del microambiente tumoral del CG.	69
Figura 26. Resultados representativos de los arrays personalizados con la firma de 21 proteínas del microambiente tumoral del CG. En rojo, los verdaderos positivos, en azul los verdaderos negativos y en negro, los falsos positivos y negativos.	71
Figura 27 La producción de citoquinas y quimioquinas por parte de las células tumorales provocan una infiltración de las células inflamatorias hacia el microambiente tumor. Balkwill, F, Coussens LM. Cancer: an inflammatory link. Nature. 2004 Sep 23;431 (2007):405-6.	74

Figura 28. Las células tumorales secretan factores angiogénicos que difunden a través del microambiente tumoral y permiten el alargamiento de los capilares preexistentes. Cristofanilli M; Charnsangavej,C; Hortobagyi GN. Angiogenesis modulation in cancer reserach: novel clinical approaches. Nat Rev Drug Disco. 2002 Jun; 1 (6): 415-26.

80

Figura 29. Los VEGFs y sus receptores. Al-Rawi,MAA, Mansell RE, Jiang WG . Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis. EJSO (2005) 31,177-121.

82

Figura 30. Visión funcional del CG según la firma oncoproteómica de 21 proteínas obtenida en nuestro proyecto de investigación.

85

ÍNDICE DE TABLAS

9. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Marcadores tumorales más habituales. **29**

Tabla 2.- Datos pacientes. **43**

Tabla 3.- Sensibilidad y Especificidad de la firma oncoproteómica. **70**

BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Correa P, Piazuolo MB, Camargo MC. Etiopathogenesis of gastric cancer. *Scandinavian Journal of Surgery* (2006) 95: 218-224.
2. Sasako M, Saka M, Fukagawa T, Katai H, Sano T. Modern Surgery for gastric cancer. Japanese Perspective. *Scandinavian Journal of Surgery* (2006) 95:232-235.
3. Den Dulk M, Verheij M, Cats A, Jansen E.P.M. Hartgrink H.H. van de Velde C.J.H. The essentials of locoregional control in the treatment of gastric cancer. *Scandiavian Journal of Surgery* (2006) 95: 236-242.
4. Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, Kajiya K, Brown L.F, Detmar M. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *JEM* (2005) 201,7,1089-1099.
5. Aoki Y, Tosato G. Lymphatic Regeneration: New Insights from VEGF-3 Blockade. *J Natl Cancer Inst* (2005) 97, 2-4.
6. Aikou T, Kitagawa Y, Kitajima M, Uenosono Y, Bilchik AJ, Martinez SR, Saha S. Sentinel lymph node mapping with GI cancer. *Cancer Metastasis Reviews* (2006) 25, 269-277.
7. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Kurozomi K, Nakahara M, Nakao K, Kakudo K. Importance of lymph vessels in gastric cancer: a prognostic indicator in general and a predictor for lymph node metastasis in early stage cancer. *J Clin Pathol* (2006) 59, 77-82.

8. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *New England Journal of Medicine* (2003) 349, 546-553.
9. Miwa K, Kinami S, Taniguchi K, Fushida S, Fujimura T, Nonomura A. Mapping sentinel nodes in patients with early-stage gastric carcinoma. *British Journal of Surgery* (2003) 90, 178-182.
10. Giuliano AE, Dale PS, Turner RR, et al. Improved staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy. *Annals of Surgery* (1995) 3, 394-401.
11. Ishii K, Kinami S, Funaki K, Fujita H, Ninomiya I, Fushida S, Fujimura T, Nishimura G, Kayahara M. Detection of sentinel and non-sentinel lymph node micrometastases by complete serial sectioning and immunohistochemical analysis for gastric cancer. *Journal of Experimental Clinical Cancer Research* (2008) 27, 7.
12. Kim T, Giuliano AE, Lyman GH. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in early-stage breast carcinoma. *Cancer* (2006) 106, 4-16.
13. Kohrt HE, Olshen RA, Bermas HR. New models and online calculator for predicting non-sentinel lymph node status in sentinel lymph node positive breast cancer patients. *Br J Cancer* (2008) 8, 66.
14. Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* (2005) 23, 7703-7720.

15. Mansel RE, Fallowfield L, Kissin M, et al. Randomized multicenter trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: the ALMANAC Trial. *Journal of the National Cancer Institute.* (2006) 98, 599-609.
16. Chen SL, Iddings DM, Scheri RP, Bilchik AJ. Lymphatic mapping and sentinel node analysis: current concepts and applications. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* (2006) 56, 292-309.
17. Bembenek A, Gretschel S, Schlag PM. Sentinel lymph node biopsy for gastrointestinal cancers. *Journal of Surgical Oncology* (2007) 96, 342-352.
18. Nathanson D. Insights into the Mechanisms of Lymph node metastasis. *American Cancer Society* (2003)413-423.
19. Pepper MS, Skobe M. Lymphatic endothelium: morphological, molecular and functional properties. *The Journal of Cell Biology.* (2003) Vol. 163, No 2, 209-213.
20. Tobler NE, Detmar M. Tumor and lymph node lymphangiogenesis-impact on cancer metastasis. *Journal of Leucocyte Biology* (2006) 80, 691-696.
21. Amioka T, Kitadai Y, Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Yasui W, Chayama K. Vascular endothelial growth factor-C expression predicts lymph node metastasis of human gastric carcinomas invading the submucosa. *European Journal of Cancer* (2002) 38, 1413-1419.
22. Liang Z, Brooks J, Williard M, Liang K, Yoon Y, Kang S, Shim H. CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.*(2007) 359, 716-722.

23. Liang Y, Fang M, Li J, Liu Ch B, Rudd J, Kung HF, Yew D.T.W. Serum proteomic for gastric lesions as revealed by SELDI mass spectrometry. *Experimental and Molecular Pathology* (2006) 81: 176-180.
24. Shida A, Fujioka S, Kobayashi K, Ishibashi Y, Kobayashi K, Nimura H, Mitsumori N, Suzuki Y, Kawakami M, Urashima M, Yanaga K. Prognostic Significance of Vascular Endothelial Growth Factor D in Gastric Carcinoma. *World J Surg* (2005) 29: 1600-1607.
25. Takeuchi H, Kitajima M, Kitagawa Y. Sentinel lymph node as a target of molecular diagnosis of lymphatic micrometastasis and local immunoresponse to malignant cells. *Cancer Science* (2008) 99, 441-450.
26. Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of Lymphatic invasion in primary tumors. *Laboratory Investigation* (2002) Vol. 82, No.9, 1255-1257.
27. Shida A, Fujioka S, Kobayashi K, Ishibashi Y, Nimura H, Mitsumori N, Yanaga K. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and -D in gastric carcinoma. *Int J Clin Oncol* (2006) 11:38-43.
28. Jain R.K, Padera T.P. Prevention and treatment of lymphatic metastasis by antilymphangiogenic therapy. *Journal of the National Cancer Institute* (2002) Vol. 94, No 11, 785-787.
29. Mohammed RAA, Green A, El-Shik S, Paish EC, Ellis IO, Martin SG. Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors -A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis. *British Journal of Cancer* (2007) 96, 1092-1100.

30. Van der Auwera I, Cao Y, Tilla JC, Pepper MS, Jackson DG, Fox SB, Harris AL, Dirx LY, Vermeulen PB. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumors. *Br J Cancer* (2006) 95, 1611-1625.
31. Gao P, Zhou GY, Zhang QH, Su ZX, Zhang TG, Xiang L, Wang Y, Zhang SL, Mu K. Lymphangiogenesis in gastric carcinoma correlates with prognosis. *J Pathol.* (2009) 218, 192-200.
32. Pepper MS. Lymphangiogenesis and Tumor Metastasis. Myth or Reality? *Clin Cancer Res* (2001) 7, 462-468.
33. Murphy PM. Chemokines and the Molecular Basis of Cancer Metastasis. *N Engl J Med* (2001) 345, 833-835.
34. Spring H, Schüler T, Arnold B, Hämmerling GJ, Ganss R. Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels. *PNAS* (2005) 102, 18111-18116.
35. Acosta, J.C., O'Loghlen, A., Banito, A., Guijarro, M.V., Augert, A., et al. Chemokine signaling via CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* (2008) 133, 1006-1018.
36. Moore MAS. The role of chemoattraction in cancer metastases. *BioEssays* (2001) 23, 674-676.
37. Warner KA, Miyazawa M, Cordeiro MMR, Love WJ, Pinsky MS, Neiva KG, Spalding AC, Nor JE. Endothelial cells enhance tumor cell invasion through a crosstalk mediated by CXC Chemokine signaling. *Neoplasia* (2008) 10, 131-139.

38. Schoppmann SF, Birner P, Stöckl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K, Kerjaschki D. Tumor-Associated Macrophages express Lymphatic Endothelial Growth Factors and are related to Peritumoral Lymphangiogenesis. *Am J Pathol.* (2002) 161, 947-956.
39. Schoppmann SF. Lymphangiogenesis, inflammation and metastasis. *Anticancer Research* (2005) 25, 4503-4511.
40. Wirzenius M, Tammela T, Uutela M, He Y, Odorisio T, Zambruno G, Nagy JA, Dvorak HF, Ylä-Herttuala S, Shibuya M, Alitalo K. Distinct vascular endothelial growth factor signals for lymphatic vessel enlargement and sprouting. *JEM* (2007) 204, 1431-1440.
41. Eccles, SA, Welch DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* (2007) 369, 1742-1757.
42. Ji RC. Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. *Cancer Metastasis Rev.* (2006) 25, 677-694.
43. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* (2011) Mar 4; 144(5):646-74.
44. Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer.* (2008) Aug; 8 (8): 604-17.
45. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2007) 8, 464-478.

46. Roy H, Bhardawaj S, Yla-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Letters* (2006) 580, 2879-2887.
47. Scavelli C, Weber E, Agliano M, Cirulli T, Nico B, Vacca A, Ribatti D. Lymphatics at the crossroads of angiogenesis and lymphangiogenesis. *J. Anat.* (2004) 433-449.
48. Tammela T, Heckman C, Alitalo K. Lymphangiogenesis and Metastasis. AACR 96th Annual Meeting. April 16-20 (2005).
49. Celis JE, Gromov P, Cabezón T, Moreira JM, Ambartsumian N, Sandelin K, Rank F, Gromova I. Proteomic characterization of the interstitial fluid perfusing the breast tumor microenvironment: a novel resource for biomarker and therapeutic target discovery. *Molecular Cell Proteomics* (2004) 3, 327-344.
50. Celis, J.E., Gromov, P. Proteomics in translational cancer research: Toward an integrated approach. *CANCER CELL* (2003) 3.
51. Petricoin EF, Belluco C, Araujo RP, Liotta LA. The blood peptidome: a higher dimension of information content for cancer biomarker discovery. *Nature Reviews Cancer* (2006) 6, 961-967.
52. Gulmann C, Sheehan KM, Kay EW, Liotta LA, Petricoin EF. Array-based proteomics: mapping of protein circuitries for diagnostics, prognostics, and therapy guidance in cancer. *J Pathol* (2006) 208, 595-606.
53. Hathout Y. Approaches to the study of the cell secretome. *Expert Review of Proteomics* (2007) 4, 239-248.

54. Kelloff GJ, Sigman CC. New science-based endpoints to accelerate oncology drug development. *European Journal of Cancer* (2005) 41, 491-501.
55. Kopf E, Zharhary D. Antibody arrays - An emerging tool in cancer proteomics. *The International Journal of Biochemistry & Cell biology* (2007) 39:1305-1317.
56. Cristofanilli M; Charnsangavej,C; Hortobagyi GN. Angiogenesis modulation in cancer reserach: novel clinical approaches. *Nat Rev Drug Disco.* (2002) Jun; 1 (6): 415-26.
57. Karpanen T, Alitalo K. Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annual Reviews in Pathology* (2008) 3, 367-397.
58. Charboneau L, Tory H, Chen T, Winters M, Petricoin EF 3rd, Liotta LA, Paweletz CP. Utility of reverse phase protein arrays: applications to signalling pathways and human body arrays. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* (2002) 1, 305-315.
59. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer.* (2007) Nov; 7(11):834-46.
60. Puig-Costa, M, Oliveras-Ferraros, C; Flaquer S; Llopis-Puigmartí F; Pujol-Amado E; Martín Castillo B; Vázquez-Martín A; Cufí S; Ortiz R; Roig J; Codina-Cazador A; Menéndez JA. Antibody microarray-based technology to rapidly define matrix metalloproteinase (MMP) signatures in patients undergoing resection for primary gastric carcinoma. *J Surg Oncol.* (2011) Jul 1; 104(1):106-109.

61. Petricoin EF, Belluco C, Araujo RP, Liotta LA. The blood peptidome: a higher dimension of information content for cancer biomarker discovery. *Nat Rev Cancer*. (2006) Dec: 6(12):961-7.
62. Azad, N.S., Rasool, N., Annunziata, C.M., Minasian, L., Whiteley, G., Kohn, E.C. Proteomics in clinical trials and practice. *Molecular & Cellular Proteomics* (2006) 5, 1819-1829.
63. Cho, WC. A future of cancer prevention and cures: highlights of the Centennial Meeting of the American Association for Cancer Research. *Annals Oncol* (2008) 19, 205-211.
64. Cho, WCS. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Molecular Cancer* (2007) 6, 25-38.
65. Chen ST, Pan TL, Juan HF, Chen TY, Lin YS, Huang CM. Breast tumor microenvironment: proteomics highlights the treatments targeting secretome. *Journal of Proteome Research* (2008) 7, 1379-1387.
66. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Rev. Cancer* (2002) 2, 161-168.
67. Egeblad, M., Werb, Z. Expression of MMPs and TIMPs in breast tumors. *Nature Reviews Cancer* (2002) 2, 161-174.
68. Hojilla CV, Mohammed FF, Khokha R. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *Br J Cancer* (2003) 89, 1817-1821.

69. Coussens, L.M., Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* (2002) 420 , 860-867.
70. Lowry, O.H., Nira, J., Rosebrough, A. Farr, L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol. Chem.* (1951) 193, 265-275.
71. Sumantran, V.N., Tillu, G. Cancer, inflammation, and insights from Ayurveda. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine; Vol.* (2012): 306346; 11.
72. Mose SF, Blaser MJ. Mechanisms of disease : Inflammation and the origins of cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* (2005) 2, 90-97.
73. Da MX, Wu Z, Tian HW. Tumor lymphangiogenic growth factors. *Arh Med Res.* (2008) 39, 365-372.
74. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* (2003) 200, 429-447.
75. Poon TCW, Sung JJY, Chow SM, Enders KWNG, Yu ACW, Chu ESH, Hui AMY, Leung WK. Diagnosis Gastric Cancer by Serum Proteomic Fingerprinting. *Gastroenterology* (2006) 130, 1858-1864.
76. Kalluri, R., Zeisberg, M.. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer* (2006) 6, 392-401.
77. Balkwill, F. Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer* (2004) 4: 540-550.

78. Sampieri, CL, De la Peña, S, Ochoa-Lara M, Zenteno-Cuevas R, León-Cordoba. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human gastric cancer and superficial gastritis. *World J Gastroenterol* (2010) 16, 1500-1505
79. Avraamides, CJ, Garmy-Susini B, Varnier JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Reviews Cancer* (2008). Advance online publication 1-13.
80. Sounni, NE, Noel A. Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. *Biochimie* (2005) 87, 329-342.
81. Stuart, H, Ysupa. Overview of carcinogenesis: past, present and future. *Carcinogenesis* (2002) 21 ,341-344.
82. Kaminishi M. Diversity of gastric carcinogenesis. *Oncology* (2005) 69, 1-8.
83. Wissmann C, Detmar M. Pathways Targeting Tumor Lymphangiogenesis. *Clin Cancer Res* (2006) 12, 6865-6868.
84. Wong SY, Hynes RO. Tumor-lymphatic interactions in an activated stromal microenvironment. *Journal of Cell Biochemistry* (2007) 101: 840-850.
85. Tabernero J, Macarulla FJ, Ramos FJ, Baselga J. Novel targeted therapies in the treatment of gastric and esophageal cancer. *Annals Oncol* (2005) 16,1740-1748.

86. Wagner AD, Moehler, M. Development of targeted therapies in advanced gastric cancer:promising exploratory steps in a new era.Current Opinions in Oncology (2009) 21, 381-385.
87. Jiang Y, Goldberg ID, Shi E. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer .Oncogene (2002) 21, 2245-2252.
88. Kaplan RN, Rafiii S, Lyden D. Preparing the %Soil#: The Premetastatic Niche. Cancer Res (2006) 66, 11089-11093.
89. Yana IE , Fujita C, Irifune A, Takeda M, Madachi A, Mori S, Hamada Y, Kawaguchi N, Matsuura N. The role of MT2-MMP in cancer progression. Biochem Biophys Res Commun. (2010) 393, 222-227.
90. Yonemura, Y,Endou E, Fujita H,Fushida S, Bandou E, Taniguchi K, Miwa K, Sugiyama K, Sasaki T. Role of MMP-7 in the formation of peritoneal dissemination in gastric cancer. Gastric Cancer (2000) 3,63-70
91. Pozzi A, Le Vine WF, Gardner HA. Low plasma levels of matrix metalloproteinase 9 permit increased tumor angiogenesis. Oncogene (2002) 21, 272-281.
92. Galvez BG, Matias-Román S, Albar JP, Sanchez-Madrid F. Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinasa Is activated during migration of human endotelial cells modulates endotelial motility and matrix remodeling.J.Biol.Chem. (2001) 276, 37491-37500.
93. Peng B, Cao L, Ma X, Wang W, Wnag D, Yu L. Meta-analysis of association between matrix metalloproteinases 2, 7 and 9 promoter polymorphisms and cancer risk. Mutagenesis (2010) abstract.

94. Alakus H, Grass G, Hennecken JK, Bollschweiler E, Schulte C, Drebber U, Baldus SE, Metzger R, Hölscher AH, Mönig SP. Clinicopathological significance of MMP-2 and its specific inhibitor TIMP-2 in gastric cancer. *Histol Histopathol.* (2008) 23, 917-923.
95. Kubben FJGM, Sier CFM, Van Duijn W, Griffioen G, Hanemaaijer R, Van de Velde CJH, Krieken JHJM, Lamers CBHW, Verspaget HW. Matrix metalloproteinase-2 is a consistent prognostic factor in gastric cancer. *Br J Cancer* (2006) 94, 1035-1040.
96. Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. Structure, function and biochemistry. *Circ Res* (2003); 92: 827-839.
97. De Mingo M, Morán A, Sanchez-Pernaute A. Expression of MMP-9 and TIMP-1 as prognostic markers in gastric carcinoma. *Hepatogastroenterol.* (2007) 54, 315-319.
98. Dragutinovic V, Izrael-Zivkovic L, Radovanovic N. Relation of Matrix Metalloproteinases-9 to Different Stages of Tumors in Serum of Gastric Cancer. *Dig Dis Sci* (2009) 54, 1203-1207.
99. Koyama, S. Enhanced cell surface expression of Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors, and Tumor-induced Host response in Progression of Human Gastric Carcinoma. *Dig. Dis. Scie.* (2004) 49, 1621-1630.
100. Shim KN, Jung SA, Joo YH, Yoo K. Clinical significance of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gastric cancer. *J Gastroenterol.* (2007) 42, 120-128.

101. Zheng H, Takahashi H, Murai Y, Cui Z, Nomoto K, Niwa H, Tsuneyama K, Takano Y. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. *Anticancer Res.* (2006) 26, 3579-3583.
102. Bramhall SR, Hallissey MT, Whiting J, Scholefield J, Tierney G, Stuart RC, Hawkins RE, McCulloch P, Maughan T, Brown PD, Baillet M, Fielding JW. Marimastat as a maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomised trial. *Br J Cancer* (2002) 86, 1864-1870.
103. Li X, Wu JF. Recent Developments in Patent Anti-Cancer Agents Targeting the Matrix Metalloproteinases (MMPs) . *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* (2009) abstract, dec.2.
104. Zucker S, Cao J, Chen WT. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene* (2000) 19, 6642-6650.
105. Lopez-Otin, C, Overall CM. Protease Degradomics: A new challenge for proteomics. *Nature Rev. Molecular Cell Biology* (2002) 3, 509-519.
106. Achen MG, Mann GB, Stacker SA. Targeting lymphangiogenesis to prevent tumor metastasis. *Br J Cancer* (2006) 94, 1355-1360.
107. Achen MG, Stacker SA. Molecular control of lymphatic metastasis. *Ann N Y Acad Sci.* (2008) 1131, 225-234.
108. Achen MG, Stacker SA. Tumor lymphangiogenesis and metastatic spread-new players begin to emerge. *Int J Cancer* (2006) 119, 1755-1760.

109. Alitalo K, Mohla S, Ruoslahti E. Lymphangiogenesis and Cancer: Meeting Report. *Cancer Res* (2004) 64, 9225-9229.
110. Jussila L, Alitalo K. Vascular Growth factors and Lymphangiogenesis. *Physiol Rev* (2002) 82, 673-700.
111. Cao Y. Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nature Reviews Cancer* (2005) 5, 735-743.
112. Ferrara, N. VEGF as a Therapeutic Target in Cancer. *Oncology* (2005) 69, 11-16.
113. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* (2006) 312, 549-560.
114. Cao Y. Direct role of PDGF-BB in lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cell Cycle* (2005) 4, 228-230.
115. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* (2005) 438, 946-953.
116. Al-Rawi MA, Mansell RE, Jaing WG. Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis. *Eur J Surg Oncol.* (2005) 31, 117-121.
117. Onogawa S, Kitadai Y, Amioka T, Kodama M, Cho S, Kuroda T, Ochiuni T, Kimura S, Kuwai T, Tanaka S, Chayama K. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in early gastric carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters. *Cancer Lett.* (2005) 226, 85-90.

118. Roberts N, Kloos B, Cassella M, Podgrabinska S, Persaud K, Wu Y, Pytowski B, Skobe M. Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2. *Cancer Res* (2006) 66, 2650-2657.
119. Thiele W, Sleeman JP. Tumor-induced lymphangiogenesis: a target for cancer therapy? *J Biotechnol.* (2006) 124, 224-241.
120. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF) / VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science* (2005)109: 227-241.
121. Kwee RM, Kwee TC. Predicting lymph node status in early gastric cancer. *Gastric Cancer* (2008) 11, 131-133.
122. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and Cancer Metastasis. *Nature Review Cancer* (2002) 2, 573-583.
123. Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB Journal* (2002) 16, 922-934.
124. Su JL, Yen CJ, Chen PS, Chuang SE, Hong CC, Kuo IH, Chen HY, Hung MC, Kuo ML. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. *Br J Cancer* (2007) 96, 541-545.
125. Sundar SS, Ganesan TS. Role of lymphangiogenesis in cancer. *Journal of Clinical Oncology* (2007) 25, 4298-4307.

126. Fondevila C, Metges JP, Fuster J, Grau JJ, Palacin A, Castells A, Volant A, Pera M. p53 and VEGF expression are independent predictors of tumor recurrence and survival following curative resection of gastric cancer. *Br J Cancer* (2004) 90, 206-215.
127. Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in preoperative biopsy specimens and metastatic foci of regional lymph nodes in submucosal gastric carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology* (2005) 3, 2-10.
128. Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor C and D (VEGF-C and D) is an important Risk Factor for Lymphatic Metastasis in Undifferentiated Early Gastric Carcinoma. *Jap J Clin Oncol* (2003) 33, 21-27.
129. Jüttner S, Wibmann C, Jöns T, Vieth M, Hertel J, Gretschel S, Schlag P, Kemmer W, Höcker M. Vascular Endothelial Growth Factor D and Its Receptor VEGFR-3: Two Novel Independent Prognostic Markers in Gastric Adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* (2006) 24, 228-240.
130. Kabashima A, Maehara Y, Kakeji Y, Sugimachi K. Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor C is Related to Lymphogenous Metastasis in Early Gastric Carcinoma. *Oncology* (2001) 60, 146-150.
131. Vidal O, Soriano-Izquierdo A, Pera M, Elizalde JL, Palacin A, Castells A, Piqué JM, Volant A, Metges JP. Positive VEGF immunostaining independently predicts poor prognosis in curatively resected gastric cancers patients: results of a study assessing a panel of angiogenic markers. *J Gastrointest Surg* (2008) 12, 1005- 1014.

132. Jackson DG. Lymphatic markers, tumour lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Cancer Treatment Research* (2007) 135, 39-53.
133. Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, Fushida S, Ninomiya I, Bandou E, Taniguchi K, Miva K, Ohoyama S, Sugiyama K, Sasaki T. Role of Vascular Endothelial Growth Factor C Expression in the Development of Lymph Node Metastasis in Gastric Cancer. *Clin Cancer Res* (1999) 5, 1823-1829.
134. Yonemura Y, Endo Y, Tabata K, Kawamura T, Yun HY, Bandou E, Sasaki T, Miura M. Role of VEGF-C and VEGF-D in lymphangiogenesis in gastric cancer. *Int J Clin Oncol* (2005) 10, 318-327.
135. Yonemura Y, Fushida S, Bando E, Kinoshita K, Miwa K, Endo Y, Sugiyama K, Partanen T, Yamamoto H, Sasaki T. Lymphangiogenesis and the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 in gastric cancer. *European J Cancer* (2001) 37, 918-923.
136. Kitadai Y, Kodama M, Cho S, Kuroda T, Ochiuni T, Kimura S, Tanaka S, Matsumura S, Yasui WW, Chayama K. Quantitative analysis of lymphangiogenic markers for predicting metastasis of human gastric carcinoma to lymph nodes. *Int.J.Cancer* (2005) 115, 388-392.
137. Yu JW, Wu JG , Tajima Y, Liu XQ, Du GY, Zheng LH, Zhang B, Ni XC, Jiang BJ. Study on lymph Node metastasis correlated to Lymphangiogenesis, Lymphatic vessel invasion, and lymph node micrometastasis in gastric cancer. *J Surg Res* (2009) abstract.
138. He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala, Takahashi T, Alitalo K. Suppression Tumor Lymphangiogenesis an Lymph Node

Metastasis by Blocking Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 Signaling. *J Natl Cancer Inst* (2002) 94, 819-825.

139. He Y, Rajantie I, Pajusola K, Jeltsch M, Holopainen T, Yla-Herttuala S, Harding T, Joos K, Takahashi T, Alitalo K. Vascular-Endothelial Cell Growth Factor Receptor-3 Mediated Activation of Lymphatic endothelium is crucial for Tumor Cell entry and Spread via Lymphatic Vessels. *Cancer Res* (2005) 65, 4379-4746.
140. Zhao ZS, Chu YQ, Ye ZY, Wang YY, Tao HQ. Overexpression of matrix metalloproteinase 11 in human gastric carcinoma and its clinicopathologic significance. *Human Pathology* (2010) 41, 686-696.
141. Maurya P, Meleady P, Dowling P, Clynes M. Proteomic approaches for serum biomarker discovery in cancer. *Anticancer Research* (2007) 27, 1247-55.
142. Posadas, EM, Simpkins F, Liotta AL, MacDonald C, Kohn EC. Proteomic analysis for the early detection and rational treatment of cancer-realistic hope? *Annals Oncol* (2005) 16,16-22.
143. Sanchez-Carbayo, M. Antibody arrays: technical considerations and clinical applications in cancer. *Clin Chem* (2006) 52, 1651-1659.
144. Wulfkuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF. Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nature Reviews Cancer* (2003) 3: 267-75.
145. Yoshihara T, Kadota Y, Yoshimura Y, Tatano Y, Takeuchi N, Okitsu H, Umemoto A, Yamauchi T, Itoh K. Proteomic alteration in gastric adenocarcinomas from Japanese patients. *Molecular Cancer* (2006) 5, 75-87.

146. Menendez JA, Vazquez-Martin A, Colomer R. Development of a high-sensitive antibody-based protein array system that quantitatively detects serum Fatty Acid Synthase (sFASN) in breast cancer: Correlation with Her-2/neu (erbB-2) expression and trastuzumab efficacy. *European Journal of Cancer Supplements* (2006) 4, 44 (135).
147. Vazquez-Martin A, Colomer R, Menendez JA. HER-2/new-induced "cytokine signature" in breast cancer. *Advances in Experimental Medical Biology* (2008) 617, 311-319.
148. Vazquez-Martin, A., Colomer, R., Menendez, J.A. Protein array technology to detect HER2 (erb-2)-induced cytokine signature in breast cancer. *Eur J Cancer* 2007) 43, 1117-1124.
149. Kountouras J, Zavos CH, Chaztopoulos D. New Concepts of Molecular Biology on Gastric Carcinogenesis. *Hepato-Gastroenterology* (2005) 52, 1305-1312.
150. Zhao ZS, Wang YY, Ye ZY, Tao HQ. Prognostic value of tumor-related molecular expression in gastric carcinoma. *Pathol Oncol Res* (2009) 15, 586-596.
151. Zhang YJ, Fang JY. Molecular staging of gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* (2008) 23, 856-860.
152. Herrmann, K., Walch, A., Balluff, B., et al. Proteomic and metabolic prediction of response to therapy in gastrointestinal cancers. *Nat Clin Gastroenterol Hepatol* (2006) 6, 170-183.

153. Reinacher-Schick A, Pohl M, Schmiegel W. Drug Insight: Antiangiogenic Therapies for Gastrointestinal Cancers. Focus on Monoclonal Antibodies. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* (2008) 5, 250-267.

154. Yang AD, Bauer TW, Camp ER , Somcio R, Liu W, Fan F, Ellis LM. Improving delivery of antineoplastic agents with antivascular-endothelial growth factor therapy. *Cancer* (2005) 103, 1561-1570.