



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS
DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL
CÁNCER GÁSTRICO HER2 POSITIVO;
MECANISMOS DE RESISTENCIA AL
TRATAMIENTO CON ANTICUERPOS
MONOCLONALES DIRIGIDOS

Maria Alsina Maqueda

Director de la Tesis:
Josep Maria Tabernero Caturla.
Doctor en Medicina
Departamento de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

UAB
Universitat Autònoma de Barcelona



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

2016

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER GÁSTRICO HER2 POSITIVO; MECANISMOS DE RESISTENCIA AL TRATAMIENTO CON ANTICUERPOS MONOCLONALES DIRIGIDOS

Tesis Doctoral presentada para optar al grado de Doctor

Maria Alsina Maqueda

Programa de Doctorado en Medicina

Director de la Tesis

Josep Maria Taberner Caturla. Doctor en Medicina

Departamento de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Tutor de la Tesis

Jordi Giralt Lopez de Sagredo. Doctor en Medicina

Departamento de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

*Caminante, son tus huellas
el camino y nada más;
caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.*

Antonio Machado

A mis padres

Agradecimientos

Con esta tesis doctoral alcanzo un gran hito en mi carrera profesional. Desde el principio he intentado seguir el camino más lógico en la práctica de la Oncología Médica. El conocimiento de la biología molecular del cáncer es imprescindible para su correcto enfoque terapéutico, y en cáncer gástrico el descubrimiento del receptor HER2 como diana terapéutica marcó el inicio. Es por ello que, como oncóloga especializada en esta enfermedad, he apostado por profundizar en su análisis molecular.

Mis agradecimientos son para todas aquellas personas que me han acompañado en esta etapa, y sin cuya ayuda y soporte incondicional no hubiera sido posible realizar este trabajo.

A mis padres, por los valores que me han aportado, por su ayuda y tenacidad. A mis hermanas, por su apoyo y cariño constantes. Al resto de mi familia y amigos, por toda la historia compartida. A mi pareja, por comprender y respetar la importancia que para mí tiene esta profesión. Al Dr. Bill Stone, genetista y ex presidente de la Unidad de Genética de la Universidad de Wisconsin-Madison, por el rigor y el entusiasmo que me ha transmitido, y por las muchas horas de *big red pen*.

Agradezco al Dr. Josep M^a Tabernero y al Dr. Josep Baselga por abrirme las puertas al Hospital Universitario Vall d'Hebron.

Mención muy especial al Dr. Josep M^a Tabernero, mentor de mi carrera profesional. Difícilmente podría haber encontrado una persona como él, con su capacidad de confiar y estimularme constantemente, de exigirme y enseñarme, y de transmitirme el valor del rigor en todos los aspectos de nuestra profesión.

Al Dr. Andrés Cervantes, porque ha sido uno de mis referentes desde que me inicié como oncóloga en el cáncer gástrico.

Al Dr. Enric Subirats, por enseñarme cómo compaginar nuestras dos máximas: la Medicina y la pasión por la Montaña.

A los Drs. Josep Àngel Bosch y Albert Selva, porque gracias a médicos y profesores como ellos nos sigue gustando la Medicina. Al Dr. Ramón Salazar, por los conocimientos compartidos. Y al Dr. Jordi Giralt, por facilitarme el camino.

De mis primeros años de formación en el Hospital Universitari Dr. Josep Trueta, recuerdo con gratitud a todos los adjuntos, especialmente al Dr. Bernardo Queralt, a la Dra. Gemma Viñas, al Dr. Xavier Hernández, a la Dra. Raquel Guardado, y a la Dra. Pilar Barretina.

Actualmente tengo la gran suerte de trabajar con un grupo excepcional de personas, médicos especialistas en tumores gastro-intestinales. Agradezco su rigor científico y todas las horas dedicadas, en especial a la Dra. Teresa Macarulla, al Dr. Jaume Capdevila, a la Dra. M^a Elena Élez, y al Dr. Guillem Argilés. Sin olvidar al resto de compañeros, que hacen más fácil el camino cada día: A la Dra. Julieta Grasselli, a la Dra. Tamara Saurí, a la Dra. Cinta Hierro, a la Dra. Helena Verdager, y al Dr. Ignacio Matos. Y también a la Dra. Ana Oaknin, por ser tan docente, por su apoyo constante.

Quiero resaltar la importancia de todo el trabajo conjunto que se realiza con el equipo de coordinación y de enfermería, porque sin su dedicación no sería posible la investigación clínica.

A todos los demás médicos y profesionales que han colaborado en este estudio, facilitándome tanto las biopsias tumorales como toda la información de sus casos, para su inclusión en el estudio.

De forma especial, a los Drs. Paolo Nuciforo, Maurizio Scaltriti, Jeff Sperinde, Joaquín Arribas, y Javier Hernández, y a José Jiménez, por iniciarme y facilitarme en la comprensión de los hallazgos moleculares.

Finalmente a Núria Viladomiu y a Elisabeth Torrelles, profesoras del Departamento de Econometría, Estadística y Economía Aplicada de la Universidad de Barcelona, por su implicación y dedicación sin límite en la realización del análisis estadístico.

Sin olvidar el más sincero agradecimiento a todos los pacientes y familias que confían en nosotros: por ellos luchamos, gracias a ellos nos movemos.

Contenido

1. Preámbulo	11
2. Introducción	12
2.1. Epidemiología y factores de riesgo	12
Factores de Riesgo	13
2.2. Pronóstico	14
2.3. Consideraciones	15
3. Biología Molecular del Cáncer Gástrico y de la Unión Gastro-esofágica	16
3.1. Carcinogénesis.....	16
El componente ambiental	16
La predisposición familiar	18
3.2. Subtipos histológicos.....	21
Clasificación de Lauren.....	21
Clasificación de la OMS	22
3.3. Subtipos moleculares	25
Primeros análisis moleculares.....	25
Clasificación molecular de Lei	27
Clasificación molecular del TCGA	28
Otras clasificaciones moleculares	31
Firmas de expresión inmunológica	32
3.4. Vía de señalización de HER2.....	33
Estructura y función	34
Determinación del HER2 en cáncer gástrico	39
Correlación de HER2 con otras variables clínicas.....	41
Papel pronóstico y predictivo de HER2 en cáncer gástrico.....	41
4. Tratamiento sistémico del cáncer gástrico y de la unión gastro-esofágica	42
4.1. Papel de la quimioterapia	42
4.2. Nuevas terapias dirigidas	43
Inhibición de los receptores del factor de crecimiento EGFR y HER2.....	43
Inhibición de mTOR.....	45
Inhibición de la vía del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).....	45
Inhibición de la vía del receptor de crecimiento de los hepatocitos (MET).....	46
Inhibición del receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos tipo 2 (FGFR 2)	47
Nuevos estudios con terapias dirigidas.....	47

4.3.	Inhibición de las células madre tumorales.....	48
4.4.	Inmunoterapia.....	49
4.5.	Conclusiones.....	51
	Práctica clínica habitual.....	51
5.	Justificación	52
6.	Hipótesis.....	53
6.1.	Hipótesis 1. Ciclinas E y D1	53
6.2.	Hipótesis 2. PIK3CA	54
6.3.	Hipótesis 3. PTEN	54
6.4.	Hipótesis 4. HER3	54
6.5.	Hipótesis 5. p95HER2	55
7.	Objetivos	56
8.	Métodos	57
8.1.	Tipo de estudio.....	57
8.2.	Selección de la muestra	57
	Criterios de inclusión/exclusión de la población a incluir	57
	Procedimientos utilizados para garantizar la confidencialidad de los datos	58
8.3.	Centros participantes.....	58
8.4.	Datos clínicos recogidos.....	58
8.5.	Análisis molecular	59
	Aclaración sobre las muestras biológicas.....	59
	Técnicas Moleculares	60
8.6.	Análisis estadístico	61
	Análisis descriptivo.....	61
	Supervivencia y supervivencia libre de progresión (SLP)	61
	Consideraciones estadísticas.....	62
8.7.	Hoja de Información al Paciente	63
8.8.	Consentimiento Informado	65
9.	Análisis Descriptivo	66
9.1.	Variables Epidemiológicas.....	66
	Análisis de relaciones entre variables clínicas.....	66
9.2.	Localización de las metástasis.....	68
9.3.	Primera línea de tratamiento onco-específico.....	69
9.4.	Toxicidades.....	70

9.5.	Valoración de la respuesta	71
9.6.	Tratamientos onco-específicos posteriores	72
9.7.	Análisis descriptivo de las variables moleculares.....	72
	Análisis de HER2	72
	Análisis de la ciclinas E y D1	72
	Análisis de PIK3CA	79
	Análisis de PTEN	80
	Análisis de HER3	81
	Análisis de p95HER2	81
	Cuantificación de HER2 y p95HER2	84
10.	Supervivencia y supervivencia libre de progresión (SLP)	87
10.1.	Población global y en función del sexo	87
10.2.	Localización del tumor primario.....	89
10.3.	Tipo y grado histológico	90
10.4.	Número de localizaciones metastásicas.....	92
10.5.	Tipo de 1ª línea.....	93
10.6.	Tipo de respuesta al tratamiento	94
10.7.	Tipo de positividad de HER2.....	96
10.8.	Ciclina E	97
10.9.	Ciclina D1.....	100
10.10.	PIK3CA	102
10.11.	PTEN	106
10.12.	HER3	108
10.13.	p95HER2	110
11.	Discusión	113
11.1.	Variables clínicas	113
	Análisis descriptivo.....	113
	Supervivencia y supervivencia libre de progresión (SLP)	114
11.2.	Análisis de las variables moleculares	115
	Ciclina E	115
	Ciclina D1.....	116
	PIK3CA	116
	PTEN	117
	HER3	117

p95HER2	117
Curvas ROC	118
Cuantificación de p95HER2 y HER2	118
Aportaciones y limitaciones del estudio	119
12. Conclusiones.....	120
13. Relación de Tablas y Figuras.....	122
13.2. Figuras	122
13.2. Tablas	124
14. Abreviaciones.....	125
15. Bibliografía	126

1 Preámbulo

1. Preámbulo

El cáncer gástrico (CG) y de la unión gastro-esofágica (CUGE) representa un problema a nivel mundial; si bien es la 5ª causa más frecuente de cáncer, se sitúa la 3ª como causa de muerte por cáncer¹. El pronóstico de los pacientes con CG metastásico es muy adverso, con una supervivencia a los 5 años inferior al 5%, y la quimioterapia consigue un beneficio clínico en alrededor de la mitad de los pacientes pero con una duración limitada². Aproximadamente entre un 15-20% de los pacientes presentan sobreexpresión del receptor de crecimiento epidérmico de tipo 2 (HER2)³. Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado selectivo para HER2, ha sido el primer fármaco dirigido que ha demostrado mejorar el pronóstico de estos pacientes⁴.

El estudio TOGA randomizaba a los pacientes HER2 positivo a recibir una primera línea de quimioterapia con o sin trastuzumab. La mediana en la supervivencia global de los pacientes tratados con trastuzumab mejoraba significativamente, de 11.1 a 13.8 meses (Hazard ratio (HR) = 0.74, $p < 0.01$). De todas formas, cuando se analizan los datos del estudio, se observa que sólo el 50% de los pacientes del grupo experimental se beneficiaba, en términos de respuesta, y que en la mayoría de los pacientes la enfermedad acababa progresando.

La resistencia al tratamiento con trastuzumab se podría explicar por alteraciones moleculares a nivel de las proteínas efectoras de las vías de señalización intracelular que activa HER2: la vía de las MAP-quinasas (MAPK) y la vía de PI3K-AKT-mTOR, responsables mayoritariamente de la proliferación y de la supervivencia celular, respectivamente.

Esta tesis doctoral propone la identificación de las alteraciones moleculares responsables de dicha resistencia, a partir de una muestra de 100 pacientes afectados de CG y de la CUGE con sobreexpresión de HER2, en estadio localmente avanzado irresecable o metastásico, y tratados con una primera línea basada en quimioterapia y trastuzumab.

El análisis molecular se realiza sobre las biopsias tumorales de estos pacientes. Se analiza el estado de las ciclinas E y D1 (amplificación, sobreexpresión), de PIK3CA (amplificación, secuenciación), de PTEN (expresión), de HER3 (sobreexpresión), y de p95HER2 (sobreexpresión, cuantificación). Además, se correlacionan los hallazgos moleculares con los datos clínicos de los pacientes.

La investigación translacional integra la investigación básica de laboratorio con la clínica hospitalaria. El conocimiento de los mecanismos moleculares de desarrollo y progresión del cáncer es indispensable para una práctica clínica oncológica como la que entendemos a día de hoy, abordando la enfermedad desde el conocimiento de su biología molecular. El descubrimiento del papel de HER2 y del potencial terapéutico de trastuzumab marcaron el punto de inflexión en el CG, a partir del cual debemos continuar para poder mejorar el pronóstico de nuestros pacientes.

Esta tesis sigue la misma línea, e intenta incidir en la determinación de potenciales biomarcadores pronóstico y/o predictivos de respuesta de pacientes afectados de CG avanzado que sobreexpresan HER2 tratados con trastuzumab, y que el estudio TOGA no pudo determinar.

2 Introducción

2. Introducción

2.1. Epidemiología y factores de riesgo

El cáncer gástrico (CG) es uno de los tumores más frecuentes a nivel mundial. En el año 2012 se diagnosticaron casi un millón de nuevos casos (952.000 casos en todo el mundo, un 6,8% del total), hecho que lo sitúa como quinto cáncer más común. Todavía más preocupante es su pronóstico, dado que representa la tercera causa principal de muerte por cáncer (723.000 muertes en todo el mundo, 8,8% del total)¹. Datos del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de Programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados (SEER) de Estados Unidos muestran que su incidencia ha disminuido en los últimos 10 años, en un promedio de un 1,5% cada año, así como también su tasa de mortalidad, en promedio un 2,6% cada año durante 2004-2013⁵.

Por su parte, el cáncer de la unión gastro-esofágica (CUGE) es un tumor raro aunque frecuentemente letal, y su incidencia ha aumentado de forma moderada en las últimas décadas. Dado que históricamente su clasificación no ha sido uniforme, los datos referentes a este tumor podrían ser insuficientes. Los datos del programar SEER del Instituto Nacional del Cáncer y los estudios epidemiológicos realizados en diferentes países europeos muestran un incremento de su incidencia desde la década de 1970⁵⁻¹⁰.

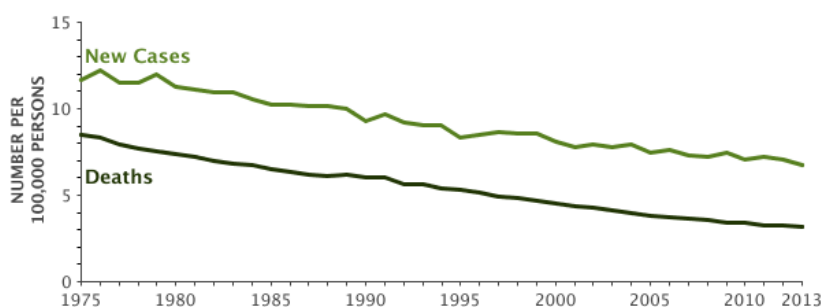


Figura 2.1(1). Curvas de Incidencia y Mortalidad del CG en Estados Unidos 1975-2013, para todas las razas, ambos sexos, tasas ajustadas por edad⁵.

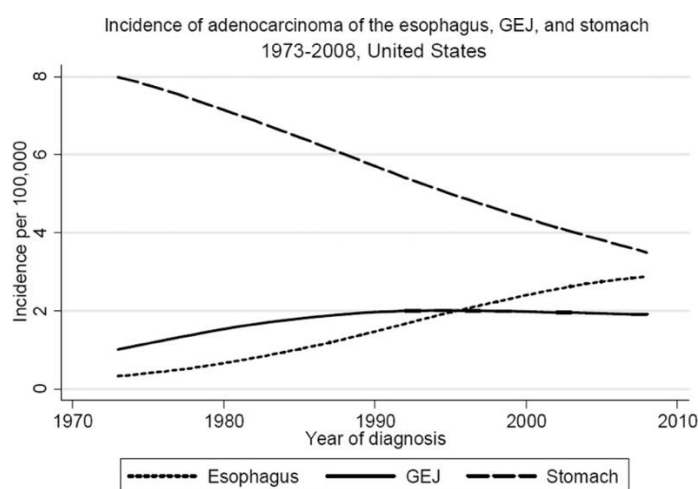


Figura 2.1(2). Tendencia de la incidencia del cáncer de esófago, del CUGE, y del cáncer de estómago no cardias en Estados Unidos de 1973 a 2008 (por cada 100.000, ajustada por edad, raza y sexo de la población estándar de EE.UU. de 2000)¹¹.

Como puede apreciarse, aunque el cáncer de esófago de tipo adenocarcinoma muestra un claro aumento en su incidencia, el aumento presentado por el CUGE es más gradual y se estabiliza a principios de 1990, después de haberlo hecho en casi 2,5 veces desde principios de 1970¹¹ (figura 3).

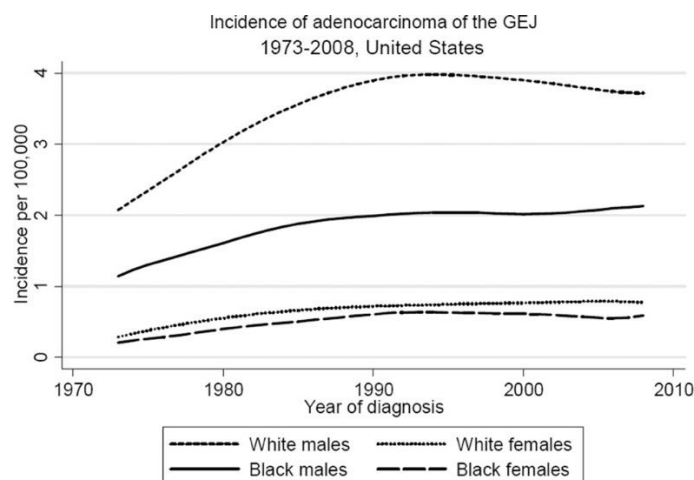


Figura 2.1(3). Tendencia de la incidencia del CUGE en Estados Unidos por raza y sexo, 1973 y 2008 (por cada 100.000 habitantes, ajustadas por edad a la población estándar de los Estados Unidos de 2000¹¹).

Las razones de estas tendencias que presentan tanto el CG como el CUGE no se entienden completamente, aunque se sospecha que puedan estar relacionadas con la mejora del procesamiento y almacenamiento de los alimentos y los cambios en la dieta.

En España, se estima que en el 2014 se diagnosticaron 5.106 nuevos casos de CG en hombres y 3.248 en mujeres. Desde el año 1993, se estima que la incidencia del CG ha disminuido en un 7%, mientras que la del cáncer de esófago ha aumentado en un 22.2%¹².

Factores de Riesgo

Los factores de riesgo para el CG incluyen la presencia de condiciones precursoras (tales como la gastritis crónica atrófica y metaplasia intestinal, anemia perniciosa, pólipos adenomatosos gástricos¹³, y factores genéticos¹⁴⁻¹⁶ y medio-ambientales. Entre estos últimos estarían el bajo consumo de frutas y verduras, el consumo de sal y de ahumados, y de alimentos mal conservados¹⁷. Importante también mencionar el tabaquismo¹⁸⁻²⁰ y la infección por *Helicobacter pylori*^{21,22}. La infección por el *Helicobacter pylori* está reconocida por la OMS (Organización Mundial de la Salud) como factor carcinógeno de clase I desde 1994^{23,24}.

Otros factores ambientales asociados más específicamente al CUGE serían el reflujo gastroesofágico, la obesidad^{20,25}, y la dieta²⁶. Se sugiere que una dieta alta en fibra se asociaría con un menor riesgo de CUGE, mientras que una ingesta alta en grasa lo estaría con mayor riesgo; la fibra dietética podría actuar para limitar hernias de hiato, promover la limpieza de las toxinas del epitelio, o aumentar el aclaramiento de las células epiteliales dañadas²⁷. Por el contrario, la infección por *Helicobacter pylori* tendría un efecto protector en el CUGE²⁸, probablemente secundario a la reducción de la producción de ácido gástrico y la alteración de

la microbiota que causa esta infección²⁹. Finalmente, los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) también se habrían relacionado con un menor riesgo de CUGE³⁰.

2.2. Pronóstico

El pronóstico de los pacientes con CG y CUGE depende principalmente de la extensión del tumor, recogida con la estadificación del tumor (TNM, del inglés *Tumor, Node, Metastasis*)³¹. Otros factores pronóstico serían el grado histológico, la edad, el estado funcional del paciente al debut de la enfermedad, y la pérdida de peso > 10%³².

Las tasas de supervivencia a 5 años del CG resecao varían desde un 71% en el estadio IA, un 57% en el estadio IB, un 46% en el estadio IIA, un 33% en el estadio IIB, un 20% en el estadio IIIA, un 14% en el estadio IIIB, y menos del 10% en el estadio IIIC².

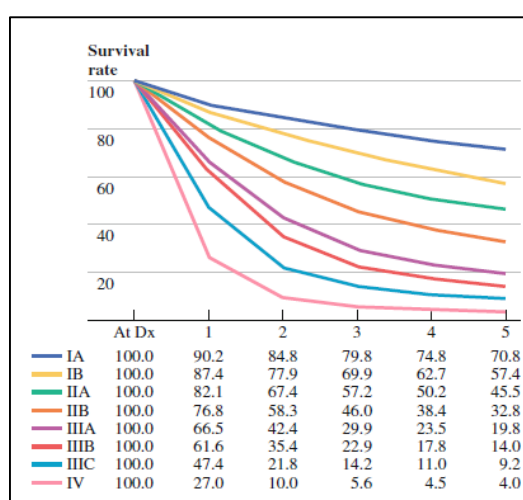


Figura 2.2(1). Tasas de supervivencia observadas de 10.601 pacientes con CG resecao, diagnosticados entre los años 1991 y 2000. Base de datos SEER 1973–2005².

La supervivencia a los 5 años de aquellos pacientes que debutan en estadios IV es inferior al 5%. Teniendo en cuenta que más del 80% de los pacientes diagnosticados de CG o CUGE debutan con metástasis, se confirma el especial mal pronóstico de este tipo de tumores.

La mediana de supervivencia de aquellos pacientes tratados únicamente con paliación es de aproximadamente 3 meses³³. La realización de una primera línea de tratamiento con quimioterapia basada en agentes platinados y fluoropirimidinas consigue mejorar el pronóstico de estos pacientes, aumentando su supervivencia hasta aproximadamente los 10 meses³⁴⁻⁴². La reciente incorporación de segundas líneas de tratamiento onco-específico, así como de nuevas terapias dirigidas, ha mejorado la supervivencia de estos pacientes de forma discreta, en algunos meses más^{4,43-48}.

En el capítulo *Tratamiento sistémico del CG y CUGE* se detallarán los datos de los estudios que soportan estas afirmaciones.

2.3. Consideraciones

En esta tesis se utilizan los términos “cáncer gástrico” o “cáncer de estómago” (CG) y el término “cáncer de la unión gastro-esofágica” (CUGE) para referirse únicamente al subtipo histológico adenocarcinoma, que representa el 95% de los tumores que aparecen en estas localizaciones⁴⁹.

Históricamente el CUGE se ha estudiado como parte del CG, especialmente los subtipos Siewert II y III, que se corresponden con el CG de cardias y subcardial, respectivamente⁵⁰. La proximidad anatómica y su biología molecular indica que se trata de dos tipos de tumores que comparten suficientes similitudes como para justificar su análisis conjunto^{17,51,52}.

En análisis que se ha realizado en esta tesis incluye pacientes afectados de CG y de CUGE.

3
**Biología Molecular del
Cáncer Gástrico y de
la Unión Gastro-esofágica**

3. Biología Molecular del Cáncer Gástrico y de la Unión Gastroesofágica

3.1. Carcinogénesis

La carcinogénesis del CG no está todavía bien establecida. En el 2007 Hanahan y Weinberg sugirieron la existencia de una serie de alteraciones esenciales en la fisiología celular que determinaban su malignización⁵³; proceso responsable de la transformación maligna de la célula del epitelio del estómago hasta la célula cancerosa. Esta evolución sería secundaria a la combinación no sólo de los factores ambientales y las variantes genéticas susceptibles, sino también a la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas¹⁷.

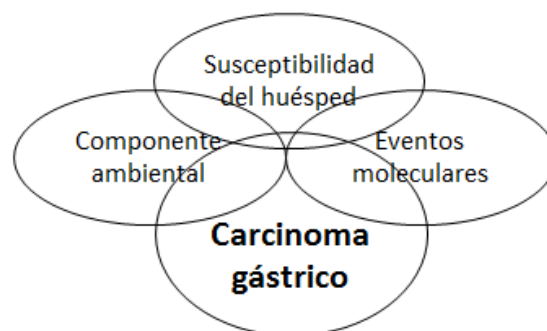


Figura 3.1(1). Factores de riesgo para el desarrollo del CG.

El CG esporádico se suele desarrollar en edades avanzadas (mediana de edad de 65 años), normalmente después de un largo período de gastritis atrófica¹⁷, aunque en un 10% de los casos se produce antes de los 45 años de edad. Este tipo de cáncer que se desarrolla en edades tempranas se reconoce como una entidad llamada EOGC, siglas del inglés que corresponden a *early onset gastric carcinoma*⁵⁴, en el cual el papel de la genética es presumiblemente mayor, y los carcinógenos ambientales tiene menor impacto.

Debe considerarse también el CG hereditario y aquél aparecido en familias con cierta agregación, que se puede presentar tanto como CG convencional y como EOGC.

El componente ambiental

Los factores ambientales más característicos en la carcinogénesis del cáncer gástrico incluirían la infección por *Helicobacter pylori*, el tabaco y la dieta¹⁷.

La causa más común de gastritis es la infección por *H. pylori*^{21,22,55}; su papel causal ha sido ampliamente estudiado en modelos animales⁵⁶ y por ello catalogada por la OMS como factor carcinógeno de clase I desde 1994^{23,24}. El riesgo de infección varía con la edad, la ubicación geográfica y el origen étnico, pero en general del 15 al 20% de los pacientes infectados desarrollan úlceras gástricas, y menos del 1% desarrollan CG⁵⁵. Debe destacarse el reconocimiento que en los últimos años se ha dado al efecto causado por el microbioma

intestinal; el efecto del *Helicobacter pylori* se produce en conjunto con las demás especies bacterianas residentes en el estómago (microbiota)⁵⁷.

Junto con la infección por *Helicobacter pylori*, el hábito tabáquico sería el otro de los factores más importantes en la carcinogénesis del CG¹⁸⁻²⁰.

La dieta es también un factor etiológico conocido, especialmente para el adenocarcinoma tipo intestinal, en el que una ingesta adecuada de frutas y verduras parece disminuir el riesgo (el ácido ascórbico, los carotenoides, los folatos y los tocoferoles actuarían como antioxidantes)^{58,59}. Se ha postulado también que el consumo de cereales puede reducir el riesgo de CG, sobre todo el adenocarcinoma de tipo difuso⁶⁰. La interacción de la dieta sobre la estabilidad genómica está claramente reconocida¹⁷; se ha demostrado que sustancias tales como el té verde pueden afectar el estado de metilación de los genes⁶¹. Algunos autores defienden que la ingesta de sal se asocia fuertemente con el riesgo de CG y sus lesiones precursoras^{62,63}, y este riesgo se incrementa en ciertos individuos predispuestos genéticamente⁶⁴; sin embargo, otros refutan la importancia de la sal como un factor de riesgo⁶⁵. Otros alimentos asociados con alto riesgo en algunas poblaciones incluyen los alimentos ahumados o curados, los vegetales encurtidos y las guindillas⁵⁸. En cuanto al alcohol y a la exposición ocupacional a las nitrosaminas y polvos inorgánicos, aunque se ha estudiado en varias poblaciones, no se ha podido demostrar un claro efecto causal⁵⁸. Finalmente, reconocer el posible papel de la vitamina C como efecto protector, aunque controvertido⁶⁶.

La inflamación crónica altera la homeostasis gástrica, induciendo la patogénesis mediante la creación de radicales libres de oxígeno^{67,68} y nitrógeno⁶⁹, que actuarían dañando directamente el núcleo de las células y el ácido desoxirriboucleico (ADN) mitocondrial⁷⁰ y limitando la barrera que crea la mucosa de forma natural gracias a sus características antioxidantes⁷¹. Así mismo, la inflamación crónica también modularía la respuesta inflamatoria¹⁷.

Así, la infección crónica por *Helicobacter pylori* ejercería daño a distintos niveles. Por un lado tendría un efecto oxidativo directo⁷², predispondría a un mayor riesgo de mutaciones puntuales del gen supresor de tumores *TP53*⁷³ vía inducción del gen *AID* (*activation-induced cytidine deaminase*), también activaría la vía apoptótica de Fas y la caspasa 8⁷⁴, así como estimularía al Toll-like receptor (TLR) 4⁷⁵ del sistema inmunitario innato.

De hecho, en los últimos años el papel de la respuesta inmune en la patogénesis del CG ha adquirido más importancia⁷⁶⁻⁷⁹. La interacción bacteriana estimularía el sistema inmune, que a su vez jugaría un papel crucial desencadenando un proceso inflamatorio que acabaría provocando la transformación maligna. Estudios recientes han demostrado la sobreexpresión de receptores PD-L1 hasta en un 65% de las células de cáncer gástrico, así como la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs, del inglés *tumor infiltrating lymphocytes*)⁸⁰⁻⁸². Se ha relacionado también la densidad de los TILs con un valor predictivo positivo de supervivencia⁸³.

El correcto conocimiento del mecanismo por el que la inflamación puede conducir a la carcinogénesis es crucial en el desarrollo de fármacos dirigidos a los sistemas de transducción de señales implicadas en esta progresión.

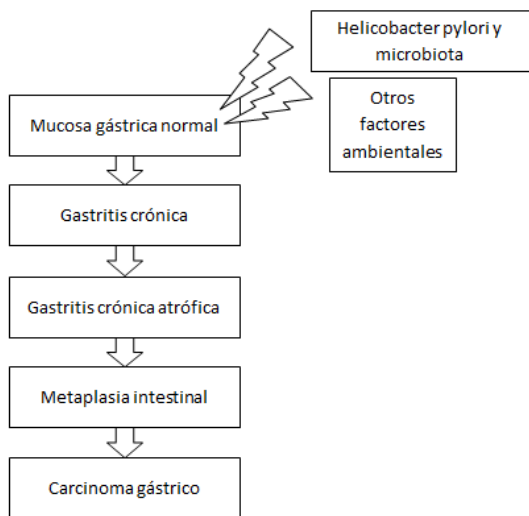


Figura 3.1(2). Carcinogénesis del CG.

La predisposición familiar

Aunque la mayoría del CG aparece de forma esporádica, en un 10% de los casos existe un componente de agregación familiar. En las regiones donde la incidencia del CG es baja, la mayoría de los casos familiares son debidos a mutaciones patógenas hereditarias que aumentan su riesgo desde el nacimiento^{14,15}. Los casos verdaderamente hereditarios representan sólo el 1-3% de los CG a nivel mundial, y comprenden principalmente el CG hereditario difuso (HDGC) y el adenocarcinoma gástrico y poliposis proximal del estómago (GAPPS). La identificación de factores hereditarios entre los individuos con antecedentes familiares de CG es indispensable para el diagnóstico precoz de la enfermedad¹⁶.

Tipos de cáncer gástrico según componente genético		
90%	Esporádico	
10%	Agregación familiar	Cáncer gástrico familiar (FGC)
		Cáncer gástrico familiar tipo intestinal (FIGC)
		Cáncer gástrico familiar tipo difuso (FDGC)
1%	Hereditario	Cáncer gástrico hereditario tipo difuso (HDGC)
		Adenocarcinoma gástrico y poliposis proximal del estómago (GAPPS)

Tabla 3.1(1). Tipos de CG según componente genético.

El CG también puede desarrollarse en un contexto sindrómico, como por ejemplo asociado al síndrome de Lynch, Li Fraumeni, y Peutz-Jeghers, al síndrome hereditario de cáncer de mama-ovario, a la poliposis adenomatosa familiar, o a la poliposis juvenil.

Síndrome	Gen implicado	Riesgo cáncer gástrico	
Síndrome de Lynch ⁸⁴	MMR	1.6%	CG de tipo intestinal
Síndrome de Li-Fraumeni ⁸⁵	TP53	1.8-4.9%	Se presenta como EOGC
Síndrome de Peutz-Jeghers ⁸⁶	STK11	29%	La lesión precursora es el pólipo hamartomatoso
Poliposis adenomatosa familiar ⁸⁷	APC	5%	La lesión precursora es el pólipo adenomatoso
Poliposis juvenil ⁸⁸	SMAD4, BMPR1A	21%	La lesión precursora es el pólipo gástrico
Síndrome hereditario de cáncer de mama-ovario ⁸⁹	BRCA1 y BRCA2	1.69%	

Tabla 3.1(2). El CG en el contexto de un síndrome hereditario.

Cáncer gástrico hereditario tipo difuso (HDGC)

Es el CG hereditario más conocido históricamente. Está causado principalmente por mutaciones hereditarias a nivel del gen de la E-cadherina (CDH1)⁹⁰, aunque también se reconocen mutaciones en el gen de la alfa-E-catenina (CTNNB1)⁹¹. Paralelamente, se han hallado portadores de mutaciones en la línea germinal de CDH1 entre aquellos pacientes diagnosticados de CG difuso de inicio temprano sin antecedentes familiares aparentes, hecho que apoya el papel de la mutación germinal de CDH1 en el inicio de la enfermedad^{92,93}.

En las familias afectas de HDGC, el cáncer de mama lobulillar es el segundo tipo más frecuente⁹⁴. Aunque el cáncer colorrectal también se plantea como parte del espectro de tumores en estas familias, no está claro que exista un mayor riesgo⁹⁴. Por último, destacar otras malformaciones congénitas que pueden aparecer en este contexto, tales como el labio leporino o el paladar hendido⁹⁵. De acuerdo con los datos publicados, la penetrancia del HDGC en portadores de la mutación en CDH1 es superior al 80% en hombres y mujeres de 80 años de edad, y la probabilidad en las mujeres de desarrollar cáncer de mama lobulillar es del 60%⁹⁴. El riesgo combinado de CG y cáncer de mama en mujeres portadoras se ha calculado en el 90% a los 80 años de edad⁹⁶.

La susceptibilidad genética y bases moleculares del HDGC fueron identificadas a partir de un trabajo realizado en familias maoríes en el 1998⁹⁰, corroborado posteriormente por otros estudios^{97,98} que apoyaron la hipótesis de las mutaciones en el gen CDH1. De todas formas, las mutaciones germinales en CDH1 sólo se llegan a hallar en el 40% de los casos de HDGC⁹⁴. Mientras que la correlación genotipo-fenotipo es sencilla para las mutaciones troncales del gen, se hace más difícil en aquellos casos en los que se dan mutaciones puntuales a nivel de aminoácidos. Las evaluaciones clínicas y genéticas de la patogenicidad de las variantes *missense* deben tenerse en cuenta en los controles sanos consagrados dentro de las familias portadoras^{99,100}.

Adenocarcinoma gástrico y poliposis proximal del estómago (GAPPS)

El GAPPS fue identificado en 2012. Se caracteriza por la transmisión autosómica dominante de la poliposis de glándula fúndica, que incluye lesiones displásicas o adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal, o ambos, hallados a nivel del estómago proximal. El GAPPS no se asocia con la poliposis colónica ni duodenal, ni con otros síndromes hereditarios de cáncer gastrointestinal¹⁰¹. Se caracteriza por una penetrancia incompleta; algunos pacientes portadores en edad avanzada tienen endoscopias normales. La causa genética aún no se ha identificado^{101, 102}.

Cáncer gástrico familiar de tipo intestinal (FIGC)

El FIGC se considera que también podría tratarse de una entidad de CG hereditario. Se caracteriza principalmente por ser de tipo intestinal, como su nombre indica, y por un patrón de herencia autosómico dominante, hallándose en muchas familias con CG de tipo intestinal¹⁰³. En términos prácticos, el FIGC debe ser considerado como posible diagnóstico cuando los informes histopatológicos se refieren a adenocarcinoma de tipo intestinal y dentro de las familias sin poliposis gástrica. La causa genética es todavía desconocida¹⁰⁴.

	Clinical criteria	Genetic screening	Alterations described
Hereditary diffuse gastric cancer	Two or more cases of gastric cancer, one confirmed case of diffuse gastric cancer in someone younger than 50 years; Three or more confirmed diffuse gastric cancer cases in first-degree or second-degree relatives, independent of age of onset; Diffuse gastric cancer before age 40 years without a family history; Personal or family history of diffuse gastric cancer and lobular breast cancer, one of which must be diagnosed before age 50 years	Sequencing of <i>CDH1</i> coding sequences; Multiplex ligation-dependent probe amplification (large <i>CDH1</i> rearrangements); Sequencing of <i>CTNNA1</i> coding sequences	Mutations throughout the <i>CDH1</i> gene and deletions mainly implicating flanking untranslated regions; One germline truncating mutation in <i>CTNNA1</i>
Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach	Gastric polyps restricted to the body and fundus with no evidence of colorectal or duodenal polyposis; More than 100 polyps carpeting the proximal stomach in the index case or more than 30 polyps in a first-degree relative of another case; Mainly fundic gastric polyps, some with regions of dysplasia (or a family member with either dysplastic fundic gastric polyps or gastric adenocarcinoma); Autosomal dominant pattern of inheritance; Exclusions include other heritable gastric polyposis syndromes and use of proton-pump inhibitors*	No screening available	No inherited inherited mutations so far
Familial intestinal gastric cancer	Two or more cases of gastric cancer in first-degree or second-degree relatives, with at least one confirmed case of intestinal histology in someone younger than 50 years; Three or more confirmed cases of intestinal gastric cancer in first-degree or second-degree relatives, independent of age	No screening available	No inherited inherited mutations so far

*Proton-pump inhibitors can induce a phenotype similar to that of gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach. Patients taking these drugs should undergo a repeat endoscopy off-therapy to confirm diagnosis of gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach.

Table 1: Clinical criteria, recommended screening, and inherited alterations of familial gastric cancer syndromes

Tabla 3.1(3). Principales síndromes hereditarios de CG, según Oliveira et. al¹⁶.

Los determinantes genéticos y patogénicos de los síndromes hereditarios de CG todavía no están plenamente reconocidos, sobre todo en el caso del GAPPS y del FIGC. La identificación de los factores hereditarios entre los individuos con antecedentes familiares de CG es crucial para su diagnóstico precoz y consecuente tratamiento curativo.

La Dra. Fátima Carneiro, directora del Departamento de Anatomía Patológica del Centro Hospitalario São João en Porto (Portugal), y presidente de la Sociedad Europea de Patología, propone en 2015 el siguiente esquema para entender la carcinogénesis del CG en el contexto de los síndromes hereditarios¹⁰⁵ (Figura 3.1(4)):

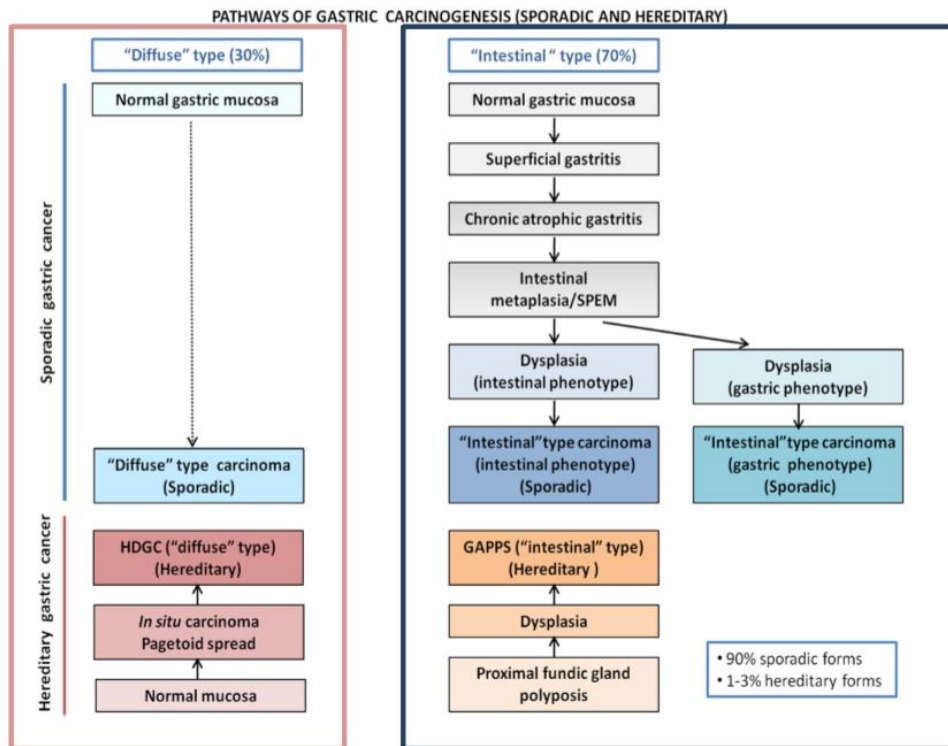


Figura 3.1(4). Principales vías de carcinogénesis del CG, según F. Carneiro, MD PhD.

3.2. Subtipos histológicos

Histológicamente, el CG exhibe una marcada heterogeneidad tanto a nivel arquitectural como a nivel citológico, pudiendo presentarse con diferentes patrones histológicos. Aunque existen múltiples clasificaciones propuestas, como por ejemplo las de Ming (1977), Goseki (1992), y Carneiro (1997), las dos más aceptadas son la clasificación de Lauren (1965) y la de la OMS (2010).

Clasificación de Lauren

Durante el último medio siglo la clasificación histológica del CG se ha regido por los criterios de Lauren, que distinguía dos subtipos principales: el intestinal y el difuso, además del indeterminado como variante infrecuente¹⁰⁶. Éstos estaban representados en el 50%, 32%, y 18% de los casos, respectivamente.

El subtipo intestinal se caracteriza por formar estructuras glandulares de diferente grado de diferenciación, ocasionalmente pobremente diferenciadas en el borde de avance del tumor. Aparecen de manera habitual en el seno de mucosas con metaplasia intestinal. Suelen diseminarse principalmente por vía hematogéna, siendo las metástasis hepáticas las más frecuentes. Son más frecuentes en edades avanzadas y en hombres.

El subtipo difuso está constituido por células neoplásicas pobremente cohesionadas que infiltran la pared gástrica de manera difusa, con escasa o nula formación de glándulas. La apariencia de las células suele ser redonda y pequeña, dispuestas de manera aislada o en pequeños acúmulos que simulan glándulas o retículos; en ellos es habitual encontrar pequeñas cantidades de mucina intersticial. La tasa mitótica de estos tumores es inferior a la que presentan los tumores de tipo intestinal, así como es menos evidente la inflamación asociada. Por el contrario, el grado de desmoplasia es mayor. Al contrario que los tumores de tipo intestinal, suelen extenderse por la superficie peritoneal en forma de carcinomatosis, y son más frecuentes en pacientes jóvenes y en mujeres, y en aquellas familias con agregación de CG o con CG hereditario.

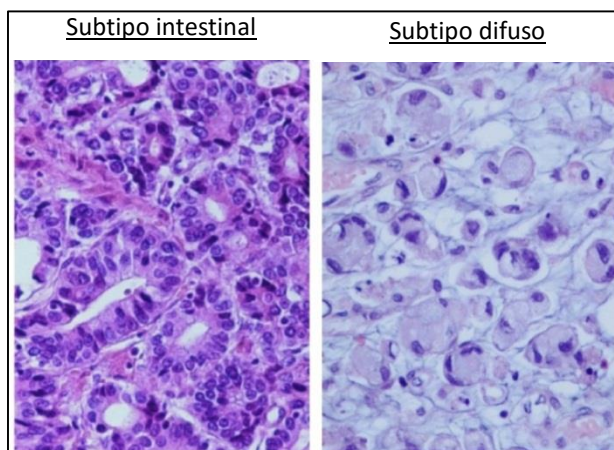


Figura 3.2(1). Principales subtipos histológicos de CG según la clasificación de Lauren¹⁰⁶.

Clasificación de la OMS

En el 2010, la OMS propone una nueva clasificación que reconoce 4 subtipos principales; el tubular, el papilar, el mucinoso, y el pobremente cohesionado (que incluye las células en anillo de sello), así como variantes infrecuentes¹⁰⁷. En la mayoría de los tumores predomina uno de cuatro patrones principales, y el diagnóstico se realiza en base al patrón histológico predominante.

El subtipo tubular contiene túbulos dilatados de manera prominente que varían en su diámetro, pudiendo presentar estructuras acinares. Las células tumorales pueden ser columnares, cuboideas o aplanadas por mucina intraluminal. Pueden detectarse también células claras. Entre las variantes de este tipo histológico se encuentra el Carcinoma Sólido, variante pobremente diferenciada, y el Carcinoma Medular, caracterizado por un prominente estroma linfoide.

El subtipo papilar suele estar más representado en tumores exofíticos bien diferenciados, con procesos papilares/digitales alargados y recubiertos de células cilíndricas o cuboideas unidas a una matriz de tejido conectivo fibrovascular. Algunos de estos tumores pueden mostrar diferenciación tubular o, más raramente, una arquitectura micropapilar. Característicamente el borde tumoral suele estar bien delimitado de las estructuras adyacentes, y el propio tumor puede estar infiltrado de manera aguda o crónica por células inflamatorias.

WHO histological classification of gastric tumours¹

Epithelial tumours		Non-epithelial tumours	
Intraepithelial neoplasia – Adenoma	8140/0 ²	Leiomyoma	8890/0
Carcinoma		Schwannoma	9560/0
Adenocarcinoma	8140/3	Granular cell tumour	9580/0
intestinal type	8144/3	Glomus tumour	8711/0
diffuse type	8145/3	Leiomyosarcoma	8890/3
Papillary adenocarcinoma	8260/3	GI stromal tumour	8936/1
Tubular adenocarcinoma	8211/3	benign	8936/0
Mucinous adenocarcinoma	8480/3	uncertain malignant potential	8936/1
Signet-ring cell carcinoma	8490/3	malignant	8936/3
Adenosquamous carcinoma	8560/3	Kaposi sarcoma	9140/3
Squamous cell carcinoma	8070/3	Others	
Small cell carcinoma	8041/3	Malignant lymphomas	
Undifferentiated carcinoma	8020/3	Marginal zone B-cell lymphoma of MALT-type	9699/3
Carcinoid (well differentiated endocrine neoplasm)	8240/3	Mantle cell lymphoma	9673/3
		Diffuse large B-cell lymphoma	9680/3
		Others	
		Secondary tumours	

¹ The classification is modified from the previous WHO histological classification of tumours (2066) taking into account changes in our understanding of these lesions. In the case of endocrine neoplasms, the classification is based on the recent WHO clinicopathological classification (1784), but has been simplified to be of more practical utility in morphological classification.

² Morphology code of the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) (542) and the Systematized Nomenclature of Medicine (<http://snomed.org>). Behaviour is coded /0 for benign tumours, /3 for malignant tumours, and /1 for unspecified, borderline or uncertain behaviour. Intraepithelial neoplasia does not have a generic code in ICD-O. ICD-O codes are available only for lesions categorized as glandular intraepithelial neoplasia grade III (8148/2), and adenocarcinoma in situ (8140/2).

Tabla 3.2(1). Subtipos de CG según la clasificación histológica de la OMS¹⁰⁷.

El subtipo mucinoso también puede ser denominado carcinoma coloide. Por definición, el 50% de estos tumores contienen lagos de mucina extracelular. Presenta dos tipos de crecimiento fundamental; en forma de glándulas delimitadas por un epitelio columnar secretor de mucina, o en forma de cadenas o acúmulos de células flotando en lagos de mucina. Ocasionalmente pueden verse células en anillo de sello, aunque no son predominantes en la muestra.

Finalmente, el subtipo pobremente cohesivo con células en anillo de sello, formado por células aisladas o por pequeños grupos de células en más del 50% del tumor que contienen mucina intracitoplasmática. Estas células tumorales pueden tener 5 morfologías diferentes: a) un núcleo desplazado hacia la membrana celular, provocando la clásica apariencia en anillo de sello debido a un citoplasma globoide y ópticamente claro (mucina ácida); b) células tumorales con núcleo central que asemejan histiocitos con escasa o nula actividad mitótica; c) células pequeñas profundamente eosinofílicas con pequeños pero prominentes citoplasmas granulares que contienen mucina neutra; d) células pequeñas con escasa o sin mucina; y e) células anaplásicas con escasa o nula presencia de mucina. Estos 5 tipos celulares se entremezclan unos con otros en diversas proporciones en el seno del tumor. Asimismo, los tumores de células en anillo de sello pueden presentar un patrón glandular trabecular junto a zonas de infiltración sólida y difusa. Los carcinomas de células en anillo de sello son por definición infiltrantes, con una relativamente pequeña proporción de células malignas y abundante desmoplasia.

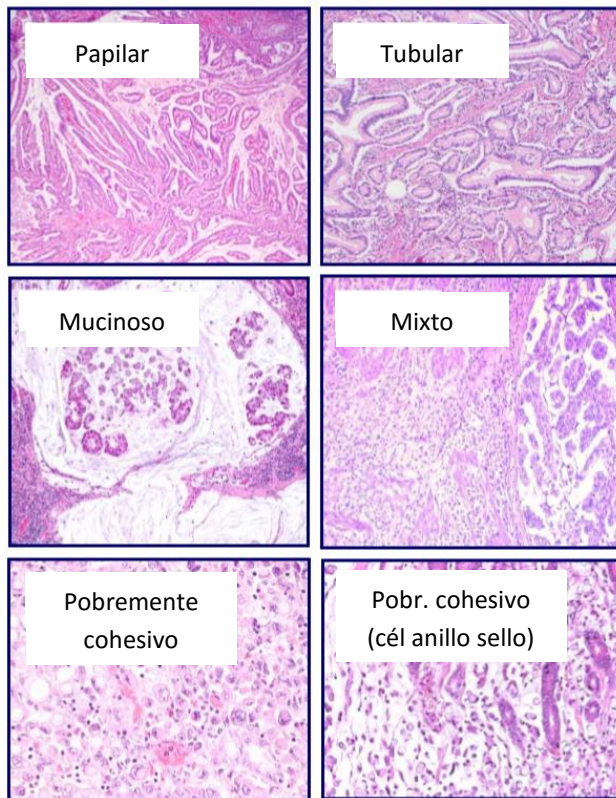


Figura 3.2(2). Principales subtipos histológicos de cáncer gástrico según la clasificación de la OMS¹⁰⁷.

OMS (2010)	Lauren (1965)
Adenocarcinoma papilar	Intestinal
Adenocarcinoma tubular	
Adenocarcinoma mucinoso	
Carcinoma con células en anillo de sello	Difuso
Otros carcinomas pobremente diferenciados	
Carcinoma mixto	Indeterminado

Tabla 3.2(2). Equivalencia entre los subtipos de CG de las clasificaciones histológicas de la OMS y de Lauren.

3.3. Subtipos moleculares

Tal como se ha visto, el CG es una enfermedad heterogénea caracterizada por diferencias epidemiológicas e histopatológicas. En los últimos años, la introducción de técnicas de secuenciación de nueva generación y otras tecnologías genómicas han hecho posible el estudio exhaustivo de las mutaciones genéticas, las aberraciones cromosómicas, y la diferente expresión génica y epigenética que se da en el CG. La integración de todos estos datos de perfil molecular ha permitido la identificación de las vías moleculares aberrantes que conducen a su carcinogénesis, así como a diferentes propuestas de clasificación molecular.

Primeros análisis moleculares

En el año 2012 fueron publicados dos trabajos diferentes con hallazgos similares, en los que se identificó hasta un 37% de los CG con amplificaciones en los genes implicados en las vías de señalización MAPK y PI3K-AKT-mTOR.

El grupo de Dulak et al. (Dana-Farber Cancer Institute, Boston) analizó el perfil genómico mediante matrices de alta resolución en 486 adenocarcinomas gastrointestinales (de los cuales 296 eran gástricos y esofágicos), identificando aberraciones en el número de copias somáticas de los genes. Se identificó una elevada prevalencia de amplificaciones focales en los adenocarcinomas gástricos y esofágicos, con respecto a los tumores colorrectales, con 64 regiones de amplificación/delección recurrente. En los CG se objetivaron hasta un 37% de genes amplificados, muchos de ellos dianas terapéuticas de moléculas dirigidas tales como *HER2*, *FGFR1*, *FGFR2*, *EGFR* y *MET*¹⁰⁸.

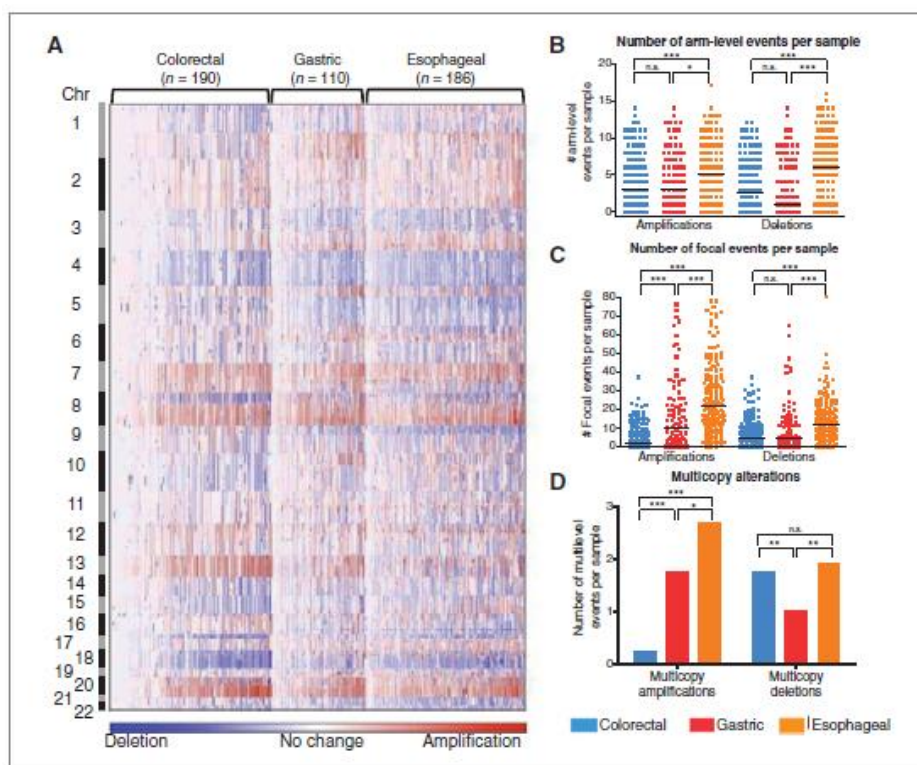


Figura 3.3(1). Patrones de inestabilidad cromosómica identificados en forma de amplificación y delección, entre los adenocarcinomas del tracto gastrointestinal¹⁰⁸.

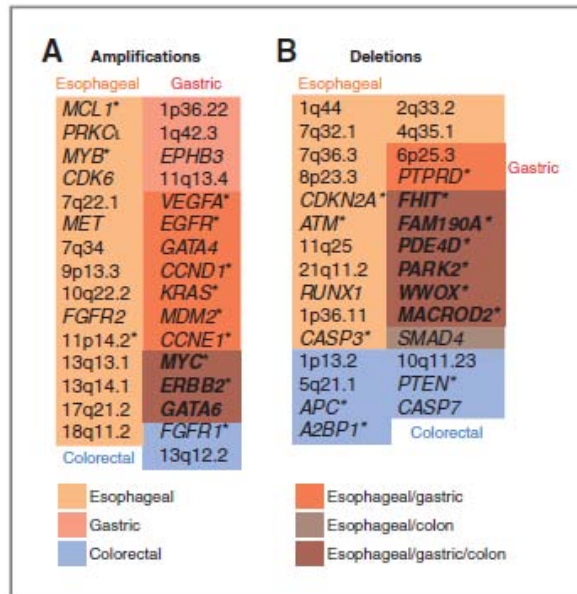


Figura 3.3(2). Diagrama de Venn de los eventos focales comunes en adenocarcinomas del tracto gastrointestinal. Significativamente amplificados (A) o deleccionados (B)¹⁰⁸.

El grupo de Deng et al. (Duke-National University, Singapur) realizó un estudio similar a partir del análisis de las alteraciones en el número de copias génicas mediante matrices de polimorfismo de nucleótidos de alta resolución, en un panel de 233 CG (193 tumores primarios, 40 líneas celulares) y 98 muestras pareadas (no malignas)¹⁰⁹.

Deng et al. identificaron 22 alteraciones focales (13 amplificaciones y 9 deleciones) que incluían tanto dianas terapéuticas de moléculas dirigidas (*HER2*, *EGFR*, *FGFR2* y *MET*) como otros genes novedosos (*KLF5*, *GATA6*). Así mismo, estos los 4 genes (*HER2*, *EGFR*, *FGFR2* y *MET*) se hallaron amplificados de forma mutuamente exclusiva. También se describieron amplificaciones a nivel de *KRAS*, de forma exclusiva con respecto a las otras mutaciones en genes que codifican para receptores tirosina-quinasa (RTK). Estos hallazgos sugerían la identificación de hasta un 37% de casos de CG con la misma vía de señalización activada (RTK/RAS), y por tanto potencialmente susceptibles a terapias dirigidas. Este análisis también correlacionó estos hallazgos con un peor pronóstico de los pacientes.

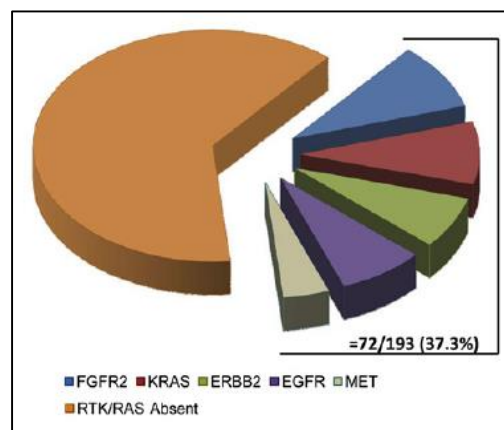


Figura 3.3(3). Genes RTK/RAS mayormente amplificados en CG: *FGFR2* (9.3%), *KRAS* (8.8%), *EGFR* (7.7%) y *HER2* (7.2%)¹⁰⁹.

Es interesante destacar que, a diferencia de otros tumores gastrointestinales como serían el colon y el páncreas, las mutaciones de *KRAS* son infrecuentes (sólo se halló una mutación de *KRAS* entre los 139 CG, mutación en el codón G13D); este hecho sugeriría que en CG la amplificación de *KRAS* sería el mecanismo por el cual se activaría proteína.

También se describen co-amplificaciones a nivel de los genes *EGFR* y *MYC*, así como de *HER2* y *ciclina E*. Ésta última es especialmente interesante; en cáncer de mama se ha descrito que la amplificación de la *ciclina E* podría actuar como factor de resistencia a la terapia anti-HER2¹¹⁰.

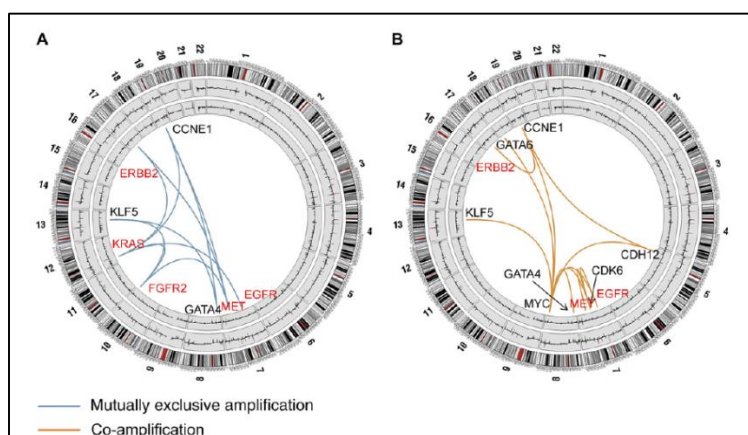


Figura 3.3(4). Alteraciones genómicas mutuamente excluyentes y co-amplificadas en CG. Las líneas azules indican pares de regiones focales (genes) que exhiben patrones de amplificación genómica mutuamente excluyentes; las líneas de color naranja indican pares de regiones focales (genes) que exhiben patrones de co-amplificación¹⁰⁹.

Clasificación molecular de Lei

El grupo de Lei et al (Duke-National University, Singapur) propuso 3 firmas génicas para clasificar el CG: proliferativo, metabólico, y mesenquimal. Lei et al. realizaron este análisis sobre una muestra de 248 casos de tumores gástricos primarios, combinando los datos del análisis del ARN mensajero de 192 casos previamente reportado por su mismo grupo¹¹¹, y de otros 56 nuevos casos más. Se analizaron los patrones de expresión génica mediante técnicas no supervisadas de agrupación jerárquica de consenso, y posteriormente se validaron en 70 tumores de otra población diferente (australiana), así como se testó la sensibilidad a diferentes tratamientos¹¹².

Table 1. Gastric Adenocarcinoma Classifications

	Lauren (1965)		Lei et al. (2013)		
	Diffuse	Intestinal type	Mesenchymal	Proliferative	Metabolic
Intestinal type morphology	0% ^a	100% ^a	30% ^a (7% ^a)	74% ^a (71% ^b)	54% ^a (84% ^b)
Diffuse morphology	100% ^a	0% ^a	59% ^a (93% ^b)	17% ^a (29% ^b)	41% ^a (16% ^b)
Intestinal metaplasia	55%	91%			
Chronic gastritis	45%	88%			
Copy number alteration			Low	High	
Amplified genes				CCNE1, MYC, ERBB2, KRAS	
Aberrant methylation			Hypermethylation	Hypomethylation	
TP53 mutations			Low	High	Low

Tabla 3.3(1). Clasificación del CG propuesta por Lei et al¹¹², comparada con la clasificación de Lauren.

Mientras que el subtipo mesenquimal se caracterizaba por la expresión de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima, el subtipo proliferativo tenía activas las vías de proliferación oncogénicas, y el subtipo metabólico se caracterizaba por la expresión de genes asociados a vías metabólicas.

En el subtipo mesenquimal se hallaba la pérdida de expresión de la E-cadherina, y la mayoría de los tumores contenían células en anillo de sello o habían sido catalogados como subtipo difuso por la clasificación de Lauren. Estos tumores mostraban un alto grado de hipermetilación y un nivel más alto de células madre tumorales (CSC, del inglés *cancer stem cells*). No presentaba apenas mutaciones de *TP53* ni variaciones en el número de copias.

La mayoría de los tumores clasificados en el subtipo proliferativo se correspondían con tumores de tipo intestinal de la clasificación de Lauren. Estos tumores mostraban activación de genes tales como *E2F*, *MYC*, y aquellos implicados en la vía de RAS. También se hallaron mutaciones en genes como la *ciclina E*, *MYC*, *HER2* y *KRAS*. Estos tumores no presentaban metilaciones, aunque sí mutaciones en *TP53*.

La novedad del análisis de Lei et al. fue el hallazgo de un tercer subtipo (metabólico), que histológicamente no correspondía a ninguno de los dos grupos de la clasificación de Lauren. Este grupo tampoco presentaba ninguna expresión génica característica, y las mutaciones de *TP53* eran raras. Podría ser comprensible que por ello los tumores pertenecientes a este grupo se perdieran entre los subtipos tipo intestinal y difuso. Sin embargo, cabe destacar que este grupo de tumores incluía características de la metaplasia que expresan los polipéptidos.

Finalmente, demostraron que los tumores incluidos en el subtipo metabólico eran más sensibles a la quimioterapia con 5-fluorouracilo, y propusieron el tratamiento con terapias dirigidas en los tumores del subtipo proliferativo.

Clasificación molecular del TCGA

En 2014 el TCGA (Atlas del Genoma del Cáncer; del inglés *The Cancer Genome Atlas*) propuso la clasificación molecular del CG más relevante hasta la fecha⁵², a partir del análisis de 295 tumores gástricos de pacientes no tratados previamente.

Para ello se utilizaron 6 plataformas moleculares (77% de los tumores analizados en las 6 plataformas) que incluyeron matrices de análisis del número de copias somáticas, secuenciación génica, matrices de perfil de ADN metilado, secuenciación de ARN mensajero, secuenciación de microARN, y matrices de proteínas de fase inversa. Se realizó también el análisis de la inestabilidad de microsatélites y la secuenciación del genoma en 107 pares/tumores germinales. Para definir los subtipos moleculares se utilizaron técnicas no supervisadas de agrupación de datos, que clasificaron los tumores en cuatro subtipos. El primer subtipo estaba formado por el 9% de los tumores, y se caracterizaba su relación con la infección por el virus Epstein-Barr (EBV); el segundo subtipo, formado por el 22% de la muestra, se caracterizaba por presentar inestabilidad de microsatélites (MSI); los otros dos subtipos se distinguieron básicamente en función del grado de aneuploidía (presencia o ausencia de aberraciones somáticas en el número de copias o SCNAs, del inglés *somatic copy-number aberrations*), siendo clasificados como tumores genómicamente estables (GS),

representando por el 20% del total, y tumores cromosómicamente inestables (CIN), el 50% restante.

Además, se realizó una evaluación de las características clínicas e histológicas de cada subtipo molecular, que permitió la mejor caracterización de cada subtipo. Es importante destacar que los cuatro subtipos se hallaron representados en todo el estómago, aunque algunos fueron más característicos de una zona determinada. No hubo diferencias entre pacientes asiáticos vs no-asiáticos, ni tampoco en supervivencia. Finalmente, no se halló correlación con la infección por *Helicobacter pylori*, hecho que probablemente refleje la tendencia epidemiológica.

	EBV	MSI	GS	CIN
Frecuencia	9%	22%	20%	50%
Género/Edad	Hombres	Mujeres Edades avanzadas	Edades tempranas	Ausencia de Presencia de SCNAs
Localización	↑ fundus y cuerpo			↑ unión gastroesofágica, cardias
Tipo histológico	Difuso			Intestinal
Características principales	Hipermetilación del ADN asociada a la infección por EBV (hipermetilación a nivel del promotor <i>CDKN2A</i> (p16) - no a nivel de <i>MLH1</i> . ↑ mutaciones de <i>PIK3CA</i> (diferentes mutaciones en el exón 20, presentes en demás subtipos) Amplificación <i>CD44</i> , <i>JAK2</i> , <i>CD274</i> (<i>PD-L1</i>) y <i>PDCD1LG2</i> (<i>PD-L2</i>) Mutaciones en <i>ARID1A</i> y <i>BCOR</i> <i>TP53</i> raramente mutado	Tumores hipermutados Índice mutacional ↑ en genes que codifican proteínas oncogénicas targeteables Hipermetilación del promotor <i>MLH1</i> <i>TP53</i> , <i>KRAS</i> , <i>ARID1A</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>HER3</i> , <i>PTEN</i> , <i>RNF43</i> , <i>APC</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>SMAD2</i> , <i>SMAD4</i> , <i>RASA1</i> , <i>HER2</i> Alteraciones MHC clase I (<i>B2M</i> , <i>HLA-B</i>)	Mutaciones de <i>RHOA</i> o reordenamientos -fusiones a nivel de la familia <i>RHOA</i> (<i>CLDN18</i> - <i>ARHGAP</i>) Mutaciones somáticas en <i>CDH1</i> Mutaciones en <i>ARID1A</i> (similar a EBV)	Marcada aneuploidia y amplificaciones focales a nivel de receptores tirosina-quinasa ↑ mutaciones <i>TP53</i> Activación vía RTK-RAS: amplificación <i>EGFR</i> , <i>HER2</i> , <i>HER3</i> , <i>FGFR2</i> , <i>MET</i> , <i>VEGF-A</i> , <i>KRAS/NRAS</i> , <i>PIK3CA</i> ; delección <i>PTEN</i>

Tabla 3.3(2). Principales características diferenciales entre los subtipos moleculares del CG descritos por el TCGA.

El subtipo EBV incluye tumores más frecuentes en hombres y de localización en fundus/cuerpo gástrico; los tumores presentan infección por el virus del Epstein-Barr. Esta infección estaría asociada, o sería la causa, de hallar una elevada tasa de mutaciones de *PIK3CA* (diferentes de las típicas halladas en el exón 20), así como de hallar amplificaciones a nivel de los genes

relacionados con la respuesta inmune. Podríamos pensar que los tumores clasificados dentro de este subtipo se beneficiarían de los nuevos tratamientos con inmunoterapia⁷⁹.

El subtipo MSI se correlacionaba con el diagnóstico en edades avanzadas, y es más frecuente en mujeres. Los tumores de este subtipo se caracterizan por un alto nivel de hipermutaciones probablemente secundarias a la hipermetilación del promotor MLH1. Otra característica son las alteraciones halladas a nivel del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) de clase 1. En este grupo también tendría sentido realizar un tratamiento con inmunoterapia, dado que la respuesta inmune estaría activada por la alta tasa de mutaciones^{79,113}.

El subtipo GS comprende aquellos tumores clasificados como difusos según Lauren et al.¹⁰⁶, y por ello encontraríamos mutaciones o reordenamientos a nivel de *RHOA*.

Finalmente, el subtipo CIN, caracterizado por un alto grado de aneuploidía. Este subtipo se asociaría al subtipo histológico de tipo intestinal de la clasificación de Lauren, e incluiría las amplificaciones a nivel de genes implicados en la vía RTK/RAS. Es en los tumores de este subtipo en los que los deberíamos considerar tratamientos con terapias dirigidas.

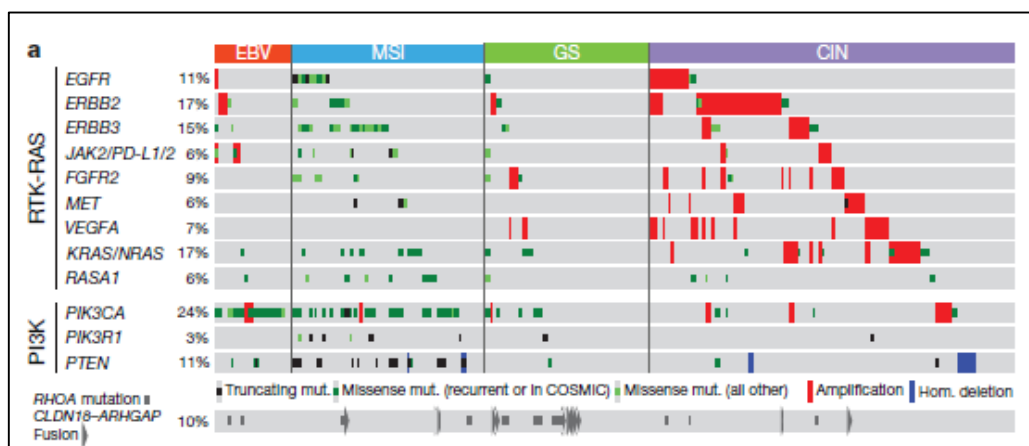


Figura 3.3(5). Mutaciones, cambios en el número de copias, y translocaciones en los distintos subtipos moleculares de CG⁵².

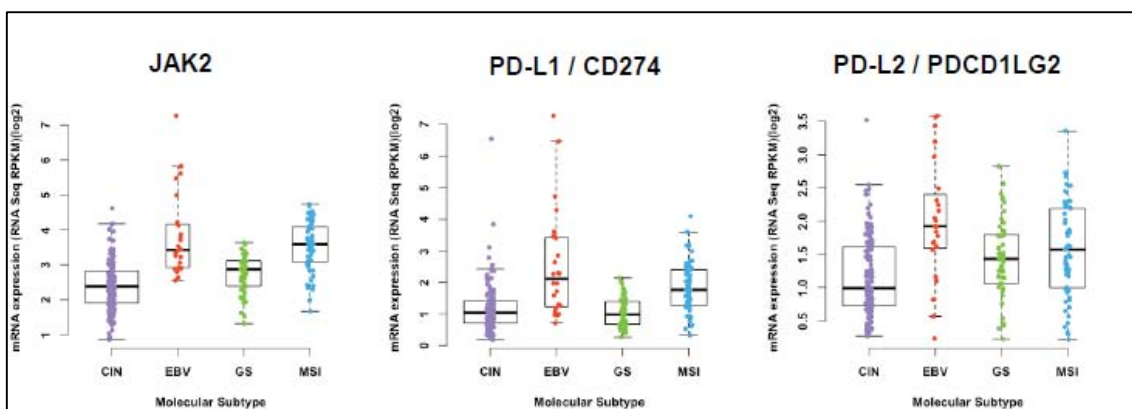


Figura 3.3(6). Expresión génica de JAK2, PD-L1, PD-L2 entre los distintos subtipos moleculares de CG⁵².

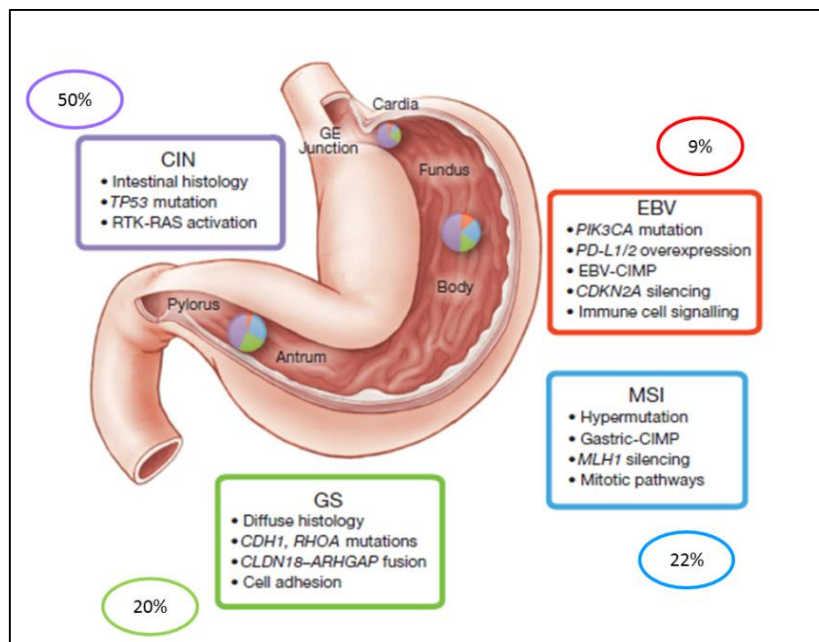


Figura 3.3(7). Figura resumen de los 4 subtipos de CG propuestos por el TCGA⁵².

Otras clasificaciones moleculares

Recientemente han aparecido otras propuestas de clasificación del CG, aunque se considera que la clasificación propuesta del TCGA es la mejor de ellas, dada la metodología de análisis genético y de agrupación de datos, que en ningún caso fue supervisada.

Entre las demás clasificaciones destacaría la publicada por el grupo asiático (ACRG, *Asian Cancer Research Group*)¹¹⁴, porque tiene poder pronóstico.

Cristescu et al. realizaron un análisis genómico de 300 muestras de pacientes operados de CG en el Samsung Medical Center, de Seúl. A partir de un análisis genómico que incluyó secuenciación de todo el genoma y estudio del número de copias por matrices, realizaron el agrupamiento de los datos de forma semi-supervisada. Los grupos se separaban, en parte, según características clínicas predefinidas. Esta “semi-supervisión” de la agrupación de los datos moleculares es probablemente la causa por la que los subtipos se correlacionen con el pronóstico.

Es interesante destacar los 4 subtipos que reconoce el AGCR. Se identifica un subtipo MSI, muy parecido al equivalente del TCGA, así como un subtipo MSS/TP53, similar al subtipo CIN del TCGA (con pérdida de expresión de P53 y amplificaciones a nivel de los genes implicados en las vías RTK/RAS).

	MSS/TP53	MSS/TP53 ⁺	MSI	MSS/EMT
				Pérdida de <i>CDH1</i>
Características clínicas		Infección frecuente EBV	Localización antro Tipo intestinal Estadios I/II	Edades precoces Tipo difuso Estadios III/IV
Pronóstico	3º en pronóstico	2º en pronóstico	Mejor pronóstico	Peor pronóstico
Tipo de recurrencia	Metástasis hepáticas		Metástasis hepáticas	Metástasis peritoneales
Alteraciones genéticas	<i>PIK3CA E542K</i> <i>PIK3CA E545K</i> ↑ mutaciones <i>TP53</i> Amplificaciones <i>HER2, EGFR, ciclina E, ciclina D1, MDM2, ROBO2, GATA6, MYC</i> (todas ellas mutuamente exclusivas)	<i>PIK3CA E542K</i> <i>PIK3CA E545K</i>	<i>PIK3CA H1047R</i> Mutaciones <i>MLH1</i> Hipermutados <i>KRAS, PI3K-PTEN-mTOR, ALK, ARID1A</i>	<i>PIK3CA E542K</i> <i>PIK3CA E545K</i> ↓ mutaciones

Tabla 3.3(3). Principales características de los subtipos moleculares de CG propuestos por el ACRG.

Firmas de expresión inmunológica

El sistema inmunológico juega un papel muy importante en el desarrollo del CG, y durante los últimos años se ha producido un gran avance en cuanto a su caracterización e inicio de terapias inmunológicas^{79,115}. El CG es un tumor con elevado un índice mutacional¹¹³, hecho que se correlaciona con el constante estímulo inmunológico derivado de la presentación de nuevos epítomos.

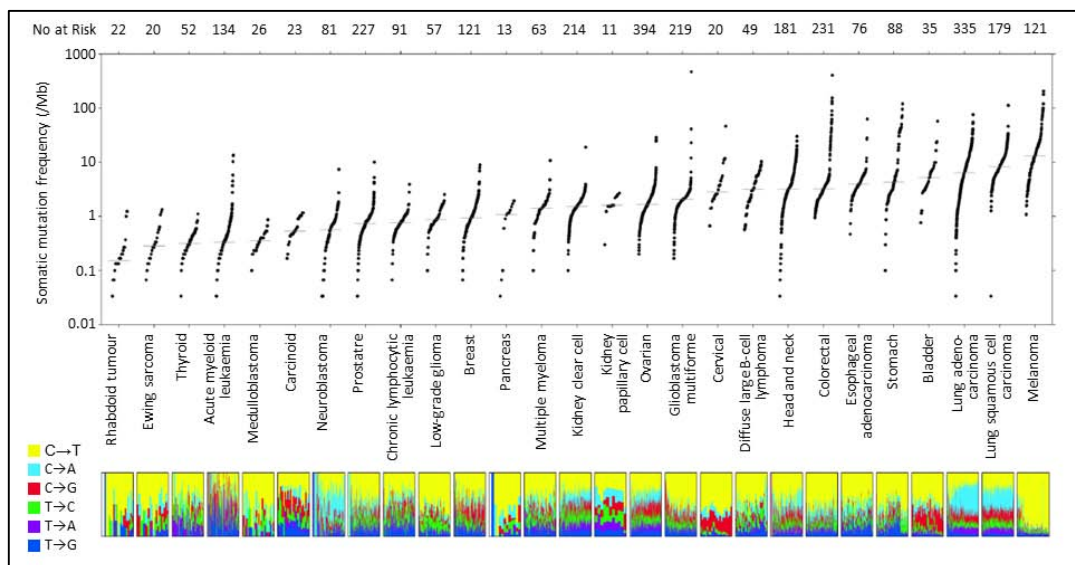


Figura 3.3(8). Frecuencia de mutaciones somáticas genéticas en el cáncer¹¹³.

La proteína PD-L1, del inglés *Programmed death-ligand 1*, es una proteína transmembrana que actúa como co-estimulador inhibiendo la respuesta inmune. Foxp3 es otra proteína que actúa regulando a los linfocitos T reguladores. Ambas proteínas, PD-L1 y Foxp3, están sobreexpresadas en los tumores gástricos, y su expresión se ha correlacionado con un peor pronóstico⁸⁰⁻⁸². Por otro lado, se ha demostrado que el CG asocia un número elevado de TILs, hecho que se correlaciona de forma significativa con la infiltración linfática regional y con la supervivencia de los pacientes⁸³.

Si consideramos los subtipos moleculares del CG propuestos por el TCGA, los subtipos EBV y MSI serían aquellos con mayor implicación de la respuesta inmune. En los tumores EBV debido a la estimulación del virus, y en los tumores MSI por el alto nivel mutacional.

Por último, destacar que se han hallado diferencias entre el CG diagnosticado en pacientes asiáticos vs. no asiáticos. En los pacientes no asiáticos existe una mayor representación de TILs y otras proteínas implicadas en la respuesta inmune. Se cree que estas diferencias podrían explicar parte las diferencias de pronóstico que existen entre ambas poblaciones⁷⁸.

3.4. Vía de señalización de HER2

El oncogén *HER2/neu*, también denominado *c-erb-B2*, *ErbB2* o *HER2*, fue identificado por primera vez como un oncogén activado por una mutación puntual en neuroblastomas químicamente inducidos en roedores, motivo por el cual se denominó con el sufijo neu¹¹⁶; identificándose posteriormente su sobreexpresión en carcinomas de mama humanos¹¹⁷.

El potencial teórico de HER2 como diana para el tratamiento antitumoral fue comprobado en los años 80. Se demostró cómo los anticuerpos monoclonales dirigidos frente al dominio extracelular del receptor HER2 lograban una inhibición del crecimiento de las células de cáncer de mama que sobreexpresaban HER2¹¹⁸. Posteriormente, el empleo de modelos tumorales con ratones modificados genéticamente para hacer que sus tumores de mama fueran altamente dependiente de las señales activadas a través de HER2, demostró cómo la inactivación de este oncogén lograba la regresión tumoral hasta límites clínicamente indetectables^{119,120}. El reconocimiento de la función de *HER2* como oncogén regulador de la evolución del tumor ha promovido el desarrollo de una amplia variedad de agentes antitumorales cuyo mecanismo de acción se basa en interferir la función de HER2 y detener la señalización intracelular en cascada que sigue a la activación del receptor.

Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 selectivo anti-HER2, fue el primer tratamiento que se reconoció para inhibir de la vía de señalización de HER2, en cáncer de mama HER2 positivo¹²¹. Posteriormente se han aprobado otros fármacos en la práctica clínica asistencial del tratamiento del cáncer de mama; lapatinib, pertuzumab y TD-M1¹²²⁻¹²⁴. En CG, el uso de trastuzumab fue aprobado en el 2010 gracias a los resultados del estudio TOGA⁴. Actualmente existen muchos otros fármacos dirigidos a inhibir la vía de activación de HER2 que están siendo investigados a nivel de ensayo clínico, tanto en cáncer de mama, CG, y en otros tipos de tumores^{125,126}.

Estructura y función

El oncogén *HER2/neu* es uno de los cuatro componentes de la familia de receptores transmembrana tipo 1 con actividad tirosina-quinasa (Familia ErbB). En ella se incluyen junto a HER2 (erb-B2) los receptores EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) o HER1 (erb-B1), HER3 (erbB3) y HER4 (erbB4). El proto-oncogén *HER2/neu* está localizado en el cromosoma 17 y codifica una proteína transmembrana de 185-kDa¹²⁷.

Todos los componentes de la familia ErbB presentan una elevada homología entre sí. Se componen de tres dominios funcionales: un dominio extracelular en el cual se produce la unión del ligando, un segmento dominio transmembrana con conformación de hélice α , y un dominio intracelular con actividad enzimática tirosina-quinasa.

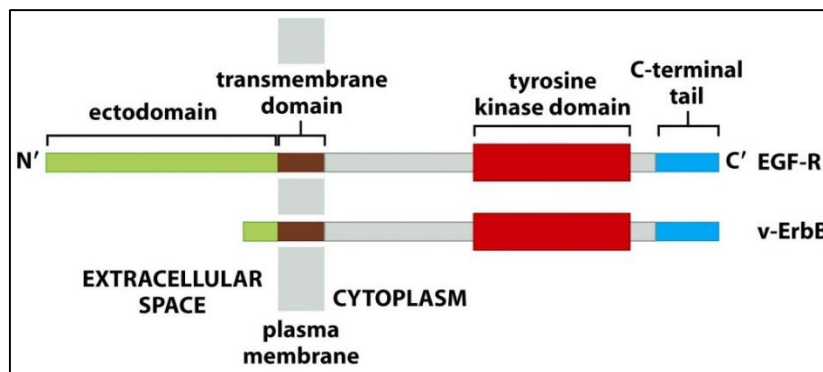


Figura 3.4(1). Estructura del receptor de la familia ErbB. Los receptores ErbB son proteínas complejas con un dominio extracelular (verde), un dominio transmembrana (marrón), y un dominio citoplasmático (rojo y azul)¹²⁷.

De manera genérica, la unión del ligando provoca un cambio conformacional en el receptor que facilita la formación de homodímeros o heterodímeros entre los diversos receptores. Estos dímeros son capaces de desencadenar una serie de fosforilaciones en residuos tirosina de moléculas relacionadas con diversas vías de señalización intracelular, interviniendo de este modo en procesos fundamentales de la célula como son la proliferación celular, la regulación de la apoptosis, la angiogénesis y la progresión del ciclo celular.

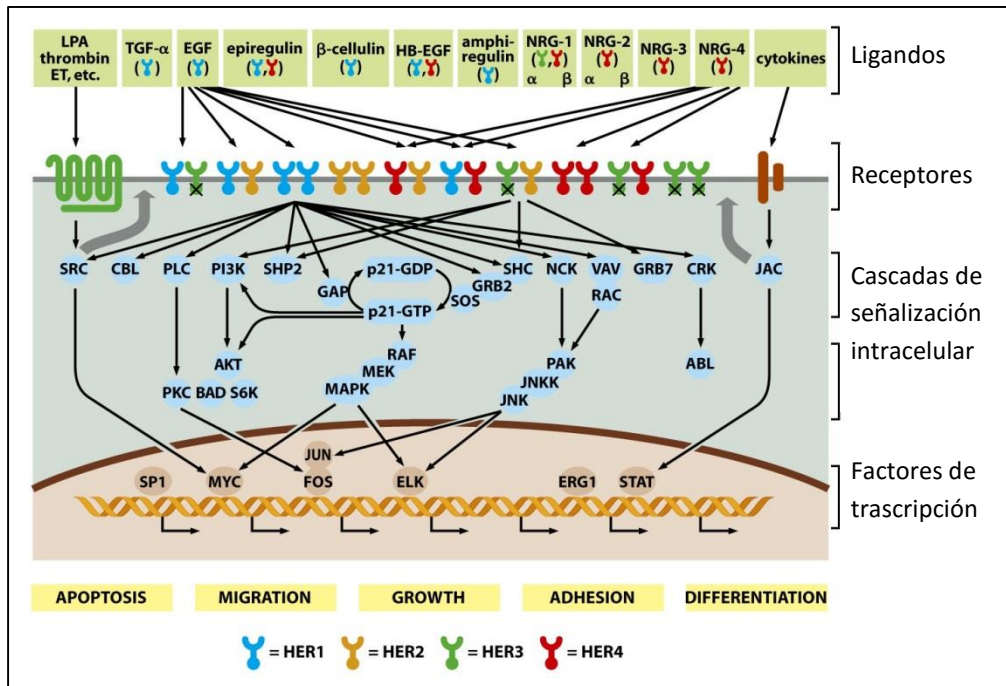


Figura 3.4(2). Vía de señalización de los receptores ErbB. Diferentes proteínas mensajeras (ligandos; representados en los cuadrados verdes) interactúan con los receptores de membrana de la familia ErbB. Éstos traducen la señal al citoplasma (en gris), y a través de una estructura compleja de vías de señalización intracelular se acabará traduciendo a nivel del núcleo (rosa) en una respuesta biológica (rectángulos amarillos)¹²⁷.

Existen tres grupos de ligandos de los receptores ErbB. El primero incluye el EGF, el factor de crecimiento transformante- α , y la anfirregulina, que se unen específicamente al HER1. El segundo incluye la betacelulina, el EGF de unión a heparina (HB-EGF) y la epirregulina, que muestran especificidad dual, vinculante tanto a HER1 como a HER4. El tercer grupo está compuesto por las neuregulinas (NRG), formado por dos subgrupos en función de su capacidad para unirse a HER3 y HER4 (NRG1 y NRG2) o sólo HER4 (NRG3 y NRG4). HER3 carece de actividad quinasa intrínseca, mientras que HER2 parece no tener ligandos directos^{125,128-130}. HER2 ejerce su función principal como co-receptor: es el socio preferido de los demás miembros de la familia ErbB, y el heterodímero HER-HER3 es el dímero de señalización mitogénica más potente¹²⁶. La formación de los homodímeros de HER2 no está inducida por la unión de ningún ligando, sino que se daría por mecanismos alternativos. La sobreexpresión de HER2 en la superficie de la célula tumoral conduce a la activación de HER2; presumiblemente al aumento de las concentraciones de los receptores en la membrana plasmática facilita la formación de heterodímeros y de homodímeros de HER2 de manera espontánea, y por lo tanto la activación de las vías de señalización intracelular secundarias^{125,126}.

Por otro lado, HER2 puede estar activado de manera aberrante por mutaciones espontáneas en su secuencia^{131, 132}. Se han descrito variantes activadoras a nivel del receptor HER2 que actúan como mecanismo de resistencia a trastuzumab; como por ejemplo la forma truncada del receptor HER2 que carece del dominio de unión trastuzumab-extracelular, p95HER2, con actividad quinasa constitutiva¹³³.

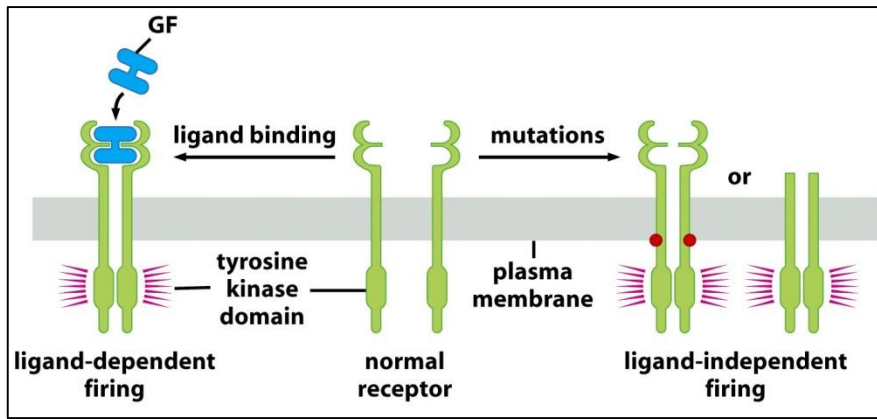


Figura 3.4(3). Activación del receptor erbB. La formación de dímeros produce la fosforilación cruzada de cada uno de los 2 componentes del mismo, creando un cambio conformacional que facilita el reclutamiento y la unión de los subsiguientes efectores de las vías a activar y la transmisión de la señal intracelular¹²⁷.

Los dímeros de la familia erbB activan dos vías de señalización cruciales para la supervivencia celular: la vía de las MAP-quinasas (MAPK) y la vía de PI3K-AKT-mTOR. La activación de la vía MAPK conduce a la transcripción de genes que impulsan la proliferación celular, así como la migración, la diferenciación y la angiogénesis. La señalización a través de la vía PI3K-AKT-mTOR conduce a diferentes objetivos celulares, principalmente a la supervivencia y a la señalización anti-apoptótica^{128,134-136}.

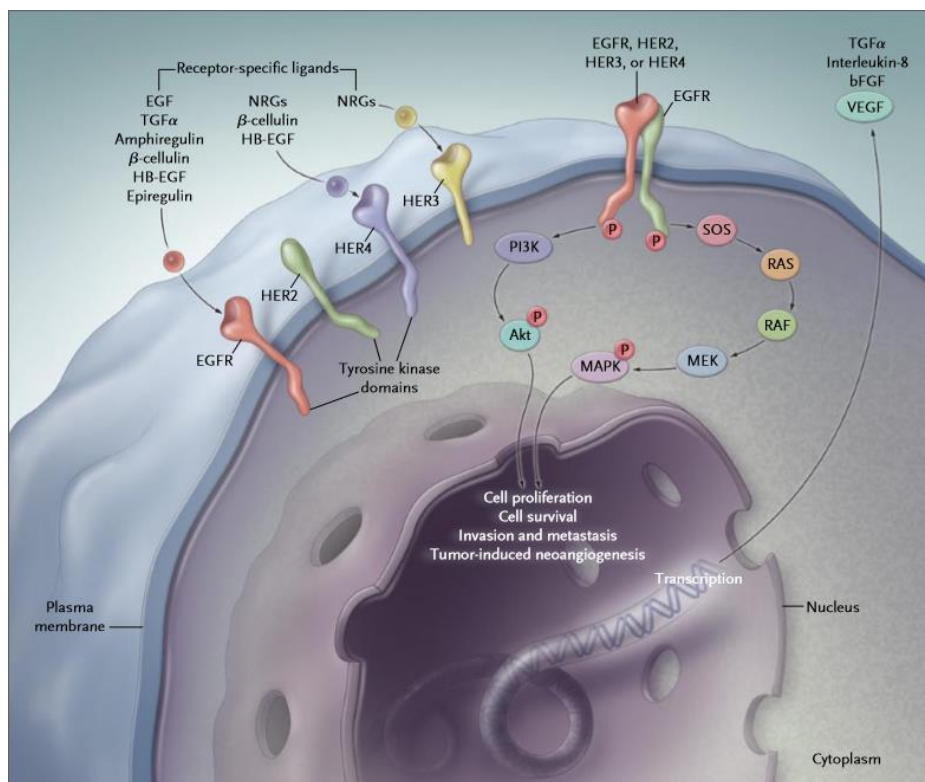


Figura 3.4(4). Vías de señalización claves activadas por los dímeros de la familia ErbB: vía de las MAPK, que estimula la proliferación, y vía de PI3K-AKT-mTOR, que promueve la supervivencia de las células tumorales¹³⁴.

Vía de señalización MAP-quinasas (MAPK o MAP/ERK)

La vía de señalización de las MAP-quinasas (MAPK o MAP/ERK, de las siglas en inglés Mitogen-Activated Protein Kinases – proteína quinasa activada por mitógenos) es una ruta de transducción de señalización intracelular que se activa a nivel de los receptores tirosina-quinasa de la membrana celular. La sobre-activación de la vía de las MAPK es uno de los principales fenómenos en la tumorigénesis¹³⁷⁻¹³⁹.

Como ya se ha mencionado, la activación de la cascada de señalización comienza cuando el dominio tirosina-quinasa de alguno de los receptores efectores de membrana es fosforilado. Tras este proceso, los grupos fosfato incorporados son capaces de atraer los dominios SH2 de algunas de las proteínas activadoras de RAS que reciben el nombre en inglés de Guanine Exchanging Factors (GEPs). Cuando esto sucede, los GEPs son a su vez fosforilados produciéndose un cambio en su conformación que les permite atraer y unirse a las proteínas de la familia RAS. Las proteínas RAS (KRAS, HRAS y NRAS) son GTPasas, cuya función consiste en unir moléculas de guanina trifosforiladas (GTP) y defosforilarlas, proceso mediante el cual sufren un cambio en su conformación que les permite interactuar con otras proteínas. Una vez esta interacción se ha realizado, la proteína RAS recupera su conformación inicial mediante la defosforilación de la molécula de GTP. A continuación, el complejo activo RAS-GTP se une a una proteína serina-treonina quinasa llamada RAF mediante su fragmento N-terminal. La hidrólisis de RAS-GTP a RAS-GDP hace que RAF sea activado mediante fosforilación y posteriormente liberado. BRAF, miembro de la familia de proteínas RAF (A,B,C-RAF) es la principal efectora de RAS en la vía de las MAPK. Cuando BRAF es activada por RAS, ésta interactúa con CRAF para activar a MEK, que a su vez extiende la señal mitogénica a la activación de ERK (señal extracelular quinasa regulada; del inglés extracelular signal-regulated kinase) que finalmente se transloca al núcleo celular donde activa los programas genéticos que resultan en los efectos previamente descritos.

Vía de señalización PI3K-AKT-mTOR

La vía de PI3K-AKT-mTOR constituye un eje central en la señalización celular tanto en tejidos sanos como en la mayoría de tipos tumorales. La desregulación de esta vía de señalización es una de las alteraciones más frecuentes en neoplasias humanas y se considera crucial para el desarrollo tumoral^{136,139}. La señal se desencadena con la estimulación del receptor de membrana, el dominio tirosina-quinasa del cual, una vez fosforilado, atrae hacia sí el dominio SH2 de la parte p85 de PI3K (siglas en inglés de Fosfo-Inositol quinasa). PI3K es una quinasa lipídica formada por dos subunidades, p85 parte reguladora y p110 subunidad catalítica. Cuando la subunidad p85 está unida al grupo fosfato del receptor transmembrana, se produce un cambio conformacional sobre p110 que le posibilita interactuar con las moléculas de fosfoinositol bifosfato (PIP2) fosforilándolas para dar fosfoinositol trifosfato (PIP3), mecanismo que también puede ocurrir por la unión de KRAS directamente a la subunidad p110. El PIP3 puede ser reciclado a PIP2 por acción de la fosfatasa homóloga del tensinógeno (PTEN), que antagoniza la función de PI3K actuando como represor de la vía. PIP3 es capaz de fosforilar AKT (proteína quinasa B) y PDK1 (proteína quinasa 1 dependiente de fosfoinositol), dos proteínas situadas por debajo en la vía, que a su vez tienen como funciones más importantes la activación de los complejos mTOR 1 y 2 (del inglés; *mammalian target of rapamycin*), P70S6 quinasa y también la supresión de FOXO3a (del inglés *Forkhead box O3*), provocando la

activación del metabolismo, la adquisición de resistencia a la apoptosis, un incremento de la motilidad celular, un aumento de la angiogénesis y la progresión del ciclo celular.

Cabe destacar además que existen numerosas interacciones entre las diferentes vías de señalización involucradas en la proliferación y la progresión tumoral. Estas interacciones establecerían mecanismos de escape que permitirían al tumor escaparse del bloqueo farmacológico dirigido. Como ya se ha mencionado, las vías de MAPK y la de PI3K-AKT-mTOR juegan un papel importante en la tumorigénesis a través de la fosforilización de distintas proteínas y factores de transcripción que directamente controlan el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis¹³⁷. Por ejemplo, mutaciones activadoras a nivel de PI3K, o la pérdida de la función de PTEN^{137,140}, podrían estar activando la vía independientemente del estado de los receptores ErbB.

El estímulo de HER2 en la regulación del ciclo celular

El ciclo celular comprende dos períodos de latencia; G1, la fase entre M (división nuclear) y S (síntesis del ADN), y G2, fase entre S y M. En estos períodos se monitorizan y corrigen los posibles errores que se hayan producido durante la replicación del ADN, aunque la fase G1 es crítica en cuanto a que en ella se integran las señales que decidirán si la célula se replica, hace una pausa o sigue viva; hecho que ocurre de forma similar en la fase G0, en las células diferenciadas, que quieren volver a entrar en el ciclo celular¹⁴¹.

Las células son expuestas de forma simultánea tanto a señales estimuladoras como inhibitorias, que deben ser integradas antes de la decisión de replicación. Los factores de crecimiento actúan a modo de red de señalización, tanto estimulando como inhibiendo la replicación, sobreponiéndose los unos a los otros. Las dos vías principales de señalización de los factores de crecimiento son, tal como se ha visto, la cascada mitogénica MAPK, factor clave de la transcripción, y la vía de PI3K-AKT-mTOR, clave para la supervivencia celular.

Las señales de ambas vías actúan de forma sinérgica para permitir la entrada y progresión del ciclo celular, al tiempo que evitan los mecanismos que tratan de desencadenar la muerte celular y la detención del crecimiento. Así pues, no sorprende que factores tales como RAS, PI3K, o PTEN se hayan relacionado con el cáncer^{141,142}.

La progresión del ciclo de la fase G1 a S es un punto crucial en el ciclo celular. De hecho, en esta fase se encuentra el punto R (del inglés *restriction point*), justo antes de la decisión de entrar en la fase S y posterior duplicación del ADN. El resultado de la integración de las señales creadas por los factores de regulación decidirá si la célula progresa a través del punto R, y se ha descrito la pérdida de estos puntos de control en procesos cancerígenos¹⁴¹. En esta fase las quinasas dependientes de ciclina (CDK, del inglés *cycline-dependent kinases*) juegan un papel muy importante, ya que se encargan de conducir a la célula hacia el ciclo celular¹⁴³.

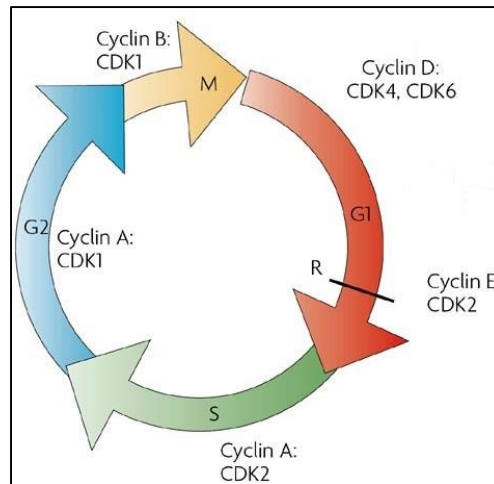


Figura 3.4(5). Sistema de regulación y de señalización del ciclo celular.

Las CDKs se unen a subunidades específicas llamadas ciclinas, formando complejos heterodiméricos compuestos por la subunidad quinasa catalítica y la subunidad de ciclina reguladora. Los complejos CDK-ciclina se pueden dividir en dos grupos, en función de su función en el ciclo celular: (1) aquellos implicados en el componente central del ciclo celular, como los complejos CDK4/6-ciclina D y CDK2-ciclina E, que fosforilan la proteína retinoblastoma (Rb) para facilitar la transición de G1 a S; y (2) aquellos implicados en la progresión de la fase S y la transición de G2 a M, como los complejos dependientes de ciclina A y B, con CDK1¹⁴³.

La desregulación de estos complejos conlleva una mayor proliferación, y se ha descrito en diferentes tipos de cáncer^{144,145}. La activación de la vía se puede producir por diferentes mecanismos, incluyendo la amplificación de genes o reordenamiento, la pérdida de reguladores negativos, alteraciones epigenéticas, y mutaciones puntuales en componentes clave de la vía¹⁴⁶. En pacientes con cáncer de mama receptor de hormona positivo en progresión a terapia endocrina, la combinación de palbociclib (un inhibidor de CDK4/6) con fulvestran (hormonoterapia) ha demostrado aumentar la supervivencia libre de progresión de estas pacientes, comparado con fulvestran en monoterapia ($p < 0.001$)¹⁴⁷.

Determinación del HER2 en cáncer gástrico

Los primeros trabajos sobre la amplificación del gen *HER2* y su sobreexpresión proteica en el CG fueron publicados en 1986¹⁴⁸. Desde entonces, multitud de estudios han corroborado su función como oncogén en este tipo de cáncer.

Los estudios iniciales afirmaban que existía entre un 8.2% y un 28% de los pacientes con CG que sobreexpresaban la proteína HER2^{3,149-154}, mientras que su amplificación se centraba entre el 15 y el 27% de ellos^{4,155,156}. La disparidad observada en la expresión inmunohistoquímica (IHQ) se explica por causas multifactoriales, secundaria a las diferentes poblaciones estudiadas, al empleo de técnicas diagnósticas no estandarizadas, y al diferente criterio de interpretación de los resultados empleados. La mejor concordancia de resultados de la amplificación del gen *HER2* se debe principalmente al carácter cuantitativo de las técnicas de hibridación *in situ* (ISH), frente al semicuantitativo de la inmunohistoquímica. Las discrepancias

entre los resultados de la sobreexpresión proteica y de la amplificación génica se han atribuido a la inmunorreactividad membranosa basolateral de las células glandulares, resultando en una reactividad membranosa incompleta, y a una tasa importante de heterogeneidad tumoral en el CG, en comparación con el cáncer de mama¹⁵⁷.

En el estudio TOGA, el análisis del HER2 se realizó mediante una interpretación estandarizada a nivel internacional, en base a un estudio previo de validación (pre-TOGA) en el que se correlacionaron los hallazgos de la IHQ y del ISH en 168 muestras de CG¹⁵⁷. Se modificó la puntuación (score) para la IHQ previamente establecida en el cáncer de mama, y un paciente era considerado HER2 positivo si mostraba 1+ en la tinción, independientemente del resultado del ISH. De los casi 4000 pacientes analizados en el estudio TOGA, se halló una tasa de positividad del 22.1%³. Por otra parte, las tasas de positividad para HER2 fueron mayores en los CUGE que en los gástricos (33% vs. 21%, $p < 0,001$), y en el subtipo intestinal vs el difuso o mixto (32,2% frente a 6,1% vs. 20,4%, $p < 0,001$). La concordancia entre IHQ y el ISH fue del 87,5%. Mientras que en el cáncer de mama la mayoría de pacientes con IHQ 0 / 1 + tienen un ISH negativo, en el CG la frecuencia de pacientes con IHQ 0/1+ y ISH positivo fue similar con respecto a la frecuencia de pacientes con IHQ 2+ e ISH positivo (23% vs 26%).

En el año 2010, y con la finalidad de identificar a todos aquellos pacientes que potencialmente se podrían beneficiar del tratamiento con trastuzumab, Rüschoff et al. propusieron una serie de recomendaciones para la determinación del HER2 en CG¹⁵⁸; recomendaciones que han sido aceptadas a nivel internacional.

	Gastric cancer		Breast cancer
IHC scoring	Extent (Area Cut-off)	Biopsy specimens ≥ 5 Cells Resection specimens: $\geq 10\%$	$\geq 10\%$ ($\geq 30\%$) ^a
	Circularity	Mostly missing (often only lateral in IHC2+/3+)	A must in IHC2+/3+
(F)ISH analysis	Cell number	20 cohesive tumor cells showing highest gene count (add 20 new if ratio 1.8–2.2)	20 cohesive tumor cells showing highest gene count (add 20 new if ratio 1.8–2.2)
	Amplification	Ratio ≥ 2.0	Ratio ≥ 2.0 (≥ 2.2) ^a
HER2 positivity	Tumor type	About 30% of intestinal-type GC about 15% of mixed-type about 5% of diffuse type (signet ring type typically negative)	15–25% of ductal type (G2/G3); almost never in subtypes such as lobular, medullar and ductal G1
	Tumor location	About 30% at cardiac/GE-junction about 15% of gastric cancer	No correlation
Patient selection	FISH vs. IHC	IHC more predictive than FISH: IHC primary test ^b FISH only if IHC2+	FISH/IHC equally predictive:

Tabla 3.4(1). Diferencias en la interpretación de HER2 entre pacientes afectados de CG y cáncer de mama¹⁵⁸.

Aplicando estas reglas, la tasa de positividad de HER2 en el estudio TOGA sería del 12.16% (del total de 3665 pacientes analizados, 446 de ellos presentaron una IHQ 3+ o IHQ 2+ con amplificación del gen) (*interpretación de los datos publicados del estudio TOGA*).

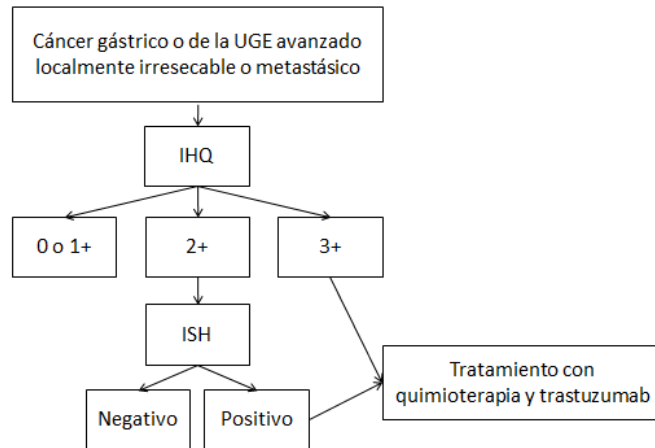


Figura 3.4(6). Algoritmo de consenso para la determinación y tratamiento de los pacientes con CG HER2 positivo. IHQ, inmunohistoquímica; ISH, hibridación in situ.

Correlación de HER2 con otras variables clínicas

Múltiples estudios apoyan que existe una mayor incidencia de casos con sobreexpresión proteica y/o amplificación del gen entre los tumores con tipo histológico intestinal de la clasificación de Lauren. En cuanto a la localización, en general se ha descrito más frecuentemente en CUGE^{4,155,159}.

Papel pronóstico y predictivo de HER2 en cáncer gástrico

En cuanto a su papel como factor pronóstico, los estudios muestran resultados discordantes^{155,159}. Por supuesto, y al ser un biomarcador de respuesta, HER2 tiene un valor predictivo de respuesta a trastuzumab bien demostrado⁴. Por otro lado, el nivel de amplificación del gen se correlaciona perfectamente con la sensibilidad y la supervivencia de aquellos pacientes tratados con trastuzumab¹⁶⁰.

4

Tratamiento sistémico del cáncer gástrico y de la unión gastro-esofágica

4. Tratamiento sistémico del cáncer gástrico y de la unión gastroesofágica

4.1. Papel de la quimioterapia

Tal como se ha mencionado previamente, el 80% de los pacientes diagnosticados de CG y CUGE debutan con metástasis sincrónicas; de los pacientes que se tratan inicialmente de forma radical, la mayoría desarrollan metástasis de forma metacrónica³³.

La supervivencia media de los pacientes en fase metastásica cuando sólo reciben el mejor tratamiento de soporte es de 3 meses, mientras que aumenta hasta aproximadamente 9 meses si se realiza una primera línea de quimioterapia³³. Múltiples estudios fase III apoyan que el mejor tratamiento de primera línea se base en la combinación de un agente platinado con una fluoropirimidina, tal como se describe en la tabla 5.1(1)^{34-42,161}.

Diseño	Estudio	Número pacientes	Brazos de tratamiento	Supervivencia global (meses)	Riesgo relativo
No-inferioridad	REAL-2	964	ECF ECX EOF EOX	9.9 9.9 9.3 11.2	X vs F HR = 0.86 O vs C HR = 0.92 (p = 0.36)
	ML17032	316	XP CF	10.5 9.3	HR = 0.85 p = 0.00
	JCOG9912	704	S1 FU	11.4 10.8	HR = 0.83 p = 0.00
Superioridad	V325	457	DCF CF	9.2 8.6	HR = 1.29 p = 0.02
	V306	333	IF CF	9.0 8.7	HR = 1.08 p = 0.53
	JCOG9912	704	IP FU	12.3 10.8	HR = 0.85 p = 0.055
	SPIRITS	305	S1P S1	13.0 11.0	HR = 0.77 p = 0.04
	TOP-002	326	IS1 S1	12.8 10.5	HR = 0.85 p = 0.23
	FLAGS	1053	S1P CF	8.6 7.9	HR = 0.92 p = 0.20
	START	639	DS1 S1	12.5 10.8	HR = 0.84 p = 0.03
	French Intergroup	416	FOLFIRI ECX	9.5 9.7	HR = 1.01 p = 0.95

Tabla 4.1(1). Principales estudios fase III realizados para evaluar la primera línea de tratamiento en pacientes con CG o CUGE. ECF: epirrubicina, C o P: cisplatino, O: oxaliplatino, F o FU: 5-fluorouracilo, X: capecitabina, S1: S1, D: docetaxel, I: irinotecán, FOLFIRI: irinotecán más 5-fluorouracilo más leucovorín, HR: riesgo relativo (del inglés, *hazard ratio*).

En los últimos años se ha demostrado que realizar una segunda línea de quimioterapia es beneficioso, y que ofrece a estos pacientes aproximadamente otros 5 meses más de supervivencia (tabla 5.1(2))⁴³⁻⁴⁶. Este beneficio se ha demostrado incluso en pacientes con regular estado general (PS, performance status, de 2) y en pacientes cuyos tumores progresan rápidamente a la primera línea de tratamiento¹⁶².

Diseño	Estudio	Número pacientes	Brazos de tratamiento	Supervivencia global (meses)	Riesgo relativo
Superioridad	AIO Study	40 (120)	Irinotecán BSC	4.0 2.4	HR = 0.48 p = 0.02
	NCT00821990	202	2ª línea (D o I) BSC	6.3 3.7	HR = 0.58 p = 0.00
	COUGAR 02	165	Docetaxel BSC	5.2 3.6	HR = 0.72 p = 0.04
No-inferioridad	WJOG4007	219	Irinotecán	8.4	HR = 1.13
			Paclitaxel	9.5	p = 0.38

Tabla 4.1(2). Principales estudios fase III realizados para evaluar la segunda línea de tratamiento en pacientes con CG o de la CUGE. D: docetaxel, I: irinotecán, HR: riesgo relativo (del inglés, *hazard ratio*).

4.2. Nuevas terapias dirigidas

Tal como se ha descrito, la quimioterapia sistémica ofrece un beneficio importante aunque limitado en tiempo. Históricamente el CG y CUGE se ha estudiado como una única entidad; el conocimiento de su biología molecular ha demostrado que hasta casi un 40% de los tumores tienen diferentes amplificaciones a nivel de los genes implicados en la vía de señalización MAPK y PI3K-AKT-mTOR^{52,108,109}. Durante los últimos años se han estudiado diferentes estrategias con terapias dirigidas.

A continuación se resumen los principales ensayos clínicos fase III realizados. De todas las terapias dirigidas analizadas, tan sólo trastuzumab y ramucirumab han llegado a demostrar que son eficaces (objetivo principal del estudio cumplido)^{4,47,48}. Tal como se discute al final del capítulo, el hecho de que la mayoría de estudios con terapias dirigidas hayan sido negativos se debe probablemente a la falta de selección de los pacientes en base al estado molecular de sus tumores.

Inhibición de los receptores del factor de crecimiento EGFR y HER2

Diana terapéutica	Estudio	Línea de tratamiento	N	Brazos de tratamiento	Supervivencia global	Riesgo relativo
EGFR	EXPAND	1ª	904	XP XP + cetuximab	9.4 10.7	HR = 1.00 p = 0.95
	REAL-3	1ª	553	EOX EOX + panitumumab	11.3 8.8	HR = 1.37 p = 0.01

Tabla 4.2(1). Estudios fase III que evalúan la inhibición de EGFR en CG. X: capecitabina, P: cisplatino, O: oxaliplatino, HR: riesgo relativo (del inglés, *hazard ratio*).

Tal como se puede ver en la tabla 5.2(1), dos estudios fase III evaluaron el papel de la inhibición de EGFR: el estudio EXPAND y el estudio REAL-3, con cetuximab y panitumumab respectivamente^{163,164}. Cetuximab y panitumumab son anticuerpos monoclonales específicos para EGFR/HER1; panitumumab tiene la particularidad de ser un anticuerpo totalmente humano, hecho que evita la posible destrucción por parte del sistema inmune innato del paciente. Desafortunadamente, ninguno de los dos estudios consiguió demostrar un beneficio con la adición del anticuerpo.

Cabe destacar que no se realizó una pre-selección molecular de los pacientes en base a la sobreexpresión de EGFR. Importante también mencionar el sub-análisis del estudio EXPAND, que revela una baja expresión de EGFR entre la población seleccionada (mediana en la tinción IHQ de 0), y una tendencia a un mejor pronóstico con el tratamiento con cetuximab en aquellos pacientes con mayor expresión de EGFR. Por su lado, en el sub-análisis del estudio REAL-3 se objetiva un número no despreciable de pacientes con mutaciones en genes que codifican para proteínas como KRAS, BRAF, PIK3, PTEN y HER2, que podrían haber ofrecido resistencia al tratamiento con panitumumab, y justificar así los resultados.

Diana terapéutica	Estudio	Línea de tratamiento	N	Brazos de tratamiento	Supervivencia global	Riesgo relativo
HER2	TOGA	1ª	584	XP/XF	11.1	HR = 0.74 p < 0.01
				XP/XF + trastuzumab	13.8	
	LOGIC	1ª	545	XELOX XELOX + lapatinib	10.5 12.2	HR = 0.91 p = 0.34
	TITAN	2ª		Paclitaxel Paclitaxel + lapatinib	8.9 11.0	HR = 0.54 p = 0.21
	GATSBY	2ª	415	T-DM1	7.9	HR = 1.14 p = 0.31
				Taxano	8.6	

Tabla 4.2(2). Estudios fase III que evalúan la inhibición de HER2 en CG. X: capecitabina, P: cisplatino, F: 5-fluorouracilo, XELOX: combinación de capecitabina y oxaliplatino, HR: riesgo relativo (del inglés, *hazard ratio*).

El estudio TOGA⁴ fue el primer estudio en demostrar la eficacia de una terapia dirigida. Trastuzumab demostró aumentar la supervivencia de aquellos pacientes considerados HER2-positivo, cuando se añadía a una primera línea de quimioterapia basada en cisplatino y fluoropirimidinas (capecitabina o 5-fluorouracilo). Es este estudio, y tal como se ha comentado previamente, se consideraba HER2 positivo cualquier tinción IHQ de 1+ a 3+, independientemente del estado del gen¹⁵⁷. Para la población global incluida en el estudio, trastuzumab añadía un beneficio significativo en supervivencia de 2.7 meses (mediana de 11.1 a 13.8 meses), con un riesgo relativo (HR, del inglés *hazard ratio*) de 0.74. En el sub-análisis de aquellos pacientes que hoy en día consideraríamos HER2 positivos (aquellos con IHQ 3+ o IHQ2+/ISH+)¹⁵⁸, los pacientes tratados con trastuzumab llegaron a vivir una mediana de 16 meses (HR = 0.65). La tasa de respuestas en el brazo de tratamiento con trastuzumab fue del 47%, mientras que en el grupo control fue del 35% (Odds ratio de 1.70, p < 0.01). Se describe una toxicidad aceptable en ambos brazos de tratamiento.

Otros dos estudios han evaluado el papel de inhibir HER2 a nivel intracelular, con el receptor tirosina-quinasa lapatinib: los estudios TRIO/LOGIC y TYTAN, en primera y segunda línea respectivamente^{165,166}. Ninguno de los dos estudios consigue demostrar un beneficio con la

adición de lapatinib, aunque debe mencionarse que ambos estudios incluyeron pacientes considerados HER2 positivo por tinción IHQ de 1+ a 3+, y que el estudio TYTAN fue positivo en el sub-análisis de la población con alta sobreexpresión de HER2 (HR = 0.59, p = 0.01). Otra explicación plausible se basa en la toxicidad derivada de la combinación escogida (oxaliplatino con lapatinib y paclitaxel con lapatinib, respectivamente).

Finalmente, el estudio GATSBY¹⁶⁷, que comparaba la eficacia de T-DM1, trastuzumab anclado a DM1, con taxanos. Este estudio tampoco consiguió demostrar mejoría con el fármaco experimental.

Inhibición de mTOR

Diana terapéutica	Estudio	Línea de tratamiento	N	Brazos de tratamiento	Supervivencia global	Riesgo relativo
mTOR	GRANITE1	2ª y 3ª	656	BSC	4.34	HR = 0.9 p = 0.12
				Everolimus	5.39	

Tabla 4.2(3). Único estudio fase III que evalúa la inhibición de mTOR en CG. BSC: mejor tratamiento de soporte (del inglés, *best supportive care*), HR = riesgo relativo (del inglés, *hazard ratio*).

El estudio GRANITE-1 evaluaba el papel de everolimus, inhibidor alostérico de mTOR, en pacientes con CG refractario. Para una población no seleccionada molecularmente, everolimus no consiguió demostrar un beneficio en la supervivencia global¹⁶⁸.

Inhibición de la vía del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

Diana terapéutica	Estudio	Línea de tratamiento	N	Brazos de tratamiento	Supervivencia global	Riesgo relativo
VEGF y VEGFR2	AVAGAST	1ª	774	CX/CF	10.1	HR = 0.87 p = 0.10
				CX/CF + bevacizumab	12.1	
	REGARD	2ª	355	BSC	3.8	HR = 0.77 p = 0.047
				Ramucirumab	5.2	
	RAIBOW	2ª	665	Paclitaxel	7.36	HR = 0.80 p = 0.02
Paclitaxel+ramucirumab				9.63		
Apatinib	3ª	267	BSC	4.7	HR = 0.71 p = 0.01	
Regorafenib	6.5					
INTEGRATE	3ª	147	BSC	-	-	
				Regorafenib	-	

Tabla 4.2(4). Estudios fase III que evalúan la inhibición de la vía del VEGF en CG.

El estudio AVAGAST¹⁶⁹ fue el primer estudio que evaluaba la inhibición de la vía de VEGF. El estudio randomizaba a los pacientes a recibir una primera línea basada en cisplatino y fluoropirimidinas más/menos bevacizumab, un anticuerpo monoclonal que bloquea VEGF. Desafortunadamente no cumplió su objetivo principal, demostrar un beneficio significativo en términos de supervivencia global. De todas formas, cabe mencionar que tanto la supervivencia libre de progresión como la tasa de respuestas fueron mejores en el grupo de pacientes tratados con bevacizumab, significativamente. Además, para la población de pacientes no-asiáticos, el objetivo principal sí se cumplió. El sub-análisis de biomarcadores demuestra que

tanto unos niveles plasmáticos altos de VEGF-A como unos niveles tisulares bajos de neurofilina-1 se podrían correlacionar con un mejor beneficio a bevacizumab¹⁷⁰.

Ramucirumab, un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor 2 de VEGF, ha demostrado su eficacia en segunda línea de CG, en dos estudios fase III. Tanto en el estudio REGARD⁴⁷, en el que los pacientes eran randomizados a recibir ramucirumab vs el mejor tratamiento de soporte, como en el estudio RAINBOW⁴⁸, en el que los pacientes eran randomizados a recibir paclitaxel más/menos ramucirumab, demostraron un beneficio en términos de supervivencia en aquellos pacientes que recibieron ramucirumab.

Para pacientes refractarios a como mínimo dos líneas previas de tratamiento, el tratamiento con apatinib, un inhibidor tirosina-kinasa del receptor 2 de VEGF, demostró su eficacia cuando se comparaba con el mejor tratamiento de soporte, en población asiática¹⁷¹.

Por último mencionar el estudio INTEGRATE, un estudio fase II que analizó el tratamiento con regorafenib en pacientes refractarios a quimioterapia (población australiana). Regorafenib, un inhibidor tirosina-quinasa que inhibe el receptor 2 de VEGF y TIE2 (angiopoetina 2), consiguió alargar la supervivencia libre de progresión de estos pacientes, de 3.9 a 11.1 semanas (HR = 0.41, p = < 0.01)¹⁷². Tendremos que esperar los resultados del estudio randomizado fase III para poder confirmar el efecto verdadero de este fármaco.

Inhibición de la vía del receptor de crecimiento de los hepatocitos (MET)

Diana terapéutica	Estudio	Línea de tratamiento	N	Brazos de tratamiento	Supervivencia global	Riesgo relativo
MET	RILOMET-1	1ª	609	ECX ECX + rilotumumab	11.5 9.6	HR = 1.37 p = 0.01
	METGastric	1ª	562	FOLFOX FOLFOX + onartuzumab	11.3 11.0 <u>MET 2+/3+:</u> 9.7 vs 11.0	HR = 0.82 p = 0.24 <u>MET 2+/3+:</u> HR 0.64 (p 0.06)

Tabla 4.2(5). Estudios fase III que evalúan la inhibición de la vía de MET en CG. E: epirrubina, C: cisplatino, X: capecitabina, FOLFOX: oxaliplatino + 5-fluorouracilo + leucovorin, HR: riesgo relativo (del inglés, *hazard ratio*):

Basados en los resultados positivos de un estudio inicial fase II¹⁷³, se realizaron de forma paralelas dos estudios con inhibidores de MET; el estudio RILOMET-1¹⁷⁴, con rilotumumab, un anticuerpo monoclonal humanizado que neutraliza el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF, del inglés *hepatocyte growth factor*), y el estudio METGastric¹⁷⁵, con onartuzumab, anticuerpo monoclonal que inhibe la acción del HGF mediante la unión a su receptor c-MET.

Ambos estudios se finalizaron de forma precoz. La decisión de finalizar el estudio RILOMET-1 fue en base al análisis intermedio, que demostró un efecto detrimental en los pacientes tratados con rilotumumab. En el caso del estudio METGastric, la decisión se realizó cuando se conocieron los resultados del estudio fase II pre-METGastric, en los que se vio que onartuzumab no conseguía un adecuado beneficio. De todas formas, el estudio METGastric se había diseñado con dos objetivos primarios: detectar un aumento en la supervivencia tanto en

el grupo global como en el grupo de aquellos pacientes con alta expresión de MET (determinado por IHQ). El grupo de pacientes con alta expresión de MET se beneficia parcialmente del tratamiento con onartuzumab, aunque de forma no significativa.

Inhibición del receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos tipo 2 (FGFR 2)

Diana terapéutica	Estudio	Línea de tratamiento	N	Brazos de tratamiento	Resultados
FGFR	SHINE	2ª	71	AZD4547 Placebo	No diferencias

Tabla 4.2(6). Estudio fase II con el anticuerpo AZD4547, inhibidor de FGFR2, en CG.

Hasta la fecha no se ha podido demostrar que la inhibición de FGFR2 en pacientes con CG sea eficaz. En el estudio SHINE los pacientes fueron seleccionados en función de la amplificación o polisomía del gen *FGFR2* y se randomizaron a recibir AZD4547, un inhibidor selectivo de FGFR1-3 con actividad preclínica en modelos *FGFR2* amplificados, frente a placebo. Los pacientes no obtuvieron ningún beneficio al ser tratados con este fármaco. De todas formas, el estudio de biomarcadores reveló una elevada heterogeneidad intratumoral y una baja concordancia entre la amplificación del gen y su expresión¹⁷⁶.

Nuevos estudios con terapias dirigidas

A día de hoy existen muchos estudios clínicos que siguen evaluando el papel de las terapias dirigidas, los principales pueden verse representados en la Tabla 4.2(7).

Diana terapéutica	Nombre del estudio y referencia (ClinicalTrials.gov)	Línea de tratamiento	Tipo de tratamiento
HER2	JACOB (NCT01774786)	1ª Línea	CT + Ttz +/- pertuzumab
	INNOVATION (NCT02205047)	Perioperatorio	CT + Ttz +/- pertuzumab
	ROG 1010 (NCT01196390)	Perioperatorio	CRT +/- Ttz
EGFR	NCT01813253	2ª Línea	Irinotecán +/- nimotuzumab
VEGFR2	RAINFALL (NCT02314117)	1ª Línea	CT +/- ramucirumab
mTOR	AIO-ST-0111 (NCT01248403)	2ª Línea	Paclitaxel +/- everolimus
FGFR	NCT01719549	2ª Línea	Dovitinib
	NCT01921673	2ª Línea	Paclitaxel +/-dovitinib
MET	AMG2013011S-1 (NCT02016534)	2ª/3ª Línea	AMG337

Tabla 4.2(7). Principales estudios activos con terapias dirigidas en CG, en fase III. Ttz = trastuzumab

4.3. Inhibición de las células madre tumorales

Según Hanahan y Weinberg¹²⁷, el tumor está constituido por un conjunto de diferentes tipos celulares (parénquima) envueltos de un estroma característico que incluye tanto células del endotelio vascular como aquellas implicadas en los procesos inflamatorios. El conjunto es el que permite el crecimiento y la progresión tumoral, aunque la célula tumoral es la base. La célula tumoral es homogénea al principio, pero la progresión del tumor conlleva a una hiperproliferación combinado con un aumento de inestabilidad genética, por lo que la célula progresa en distintas subpoblaciones clonales. La célula madre tumoral conserva la capacidad de originar, mantener y expandir los tumores, así como dar lugar a las metástasis y recidivas. Esta célula madre tumoral es más resistente a los tratamientos convencionales, y por tanto supone un reto en la oncología.

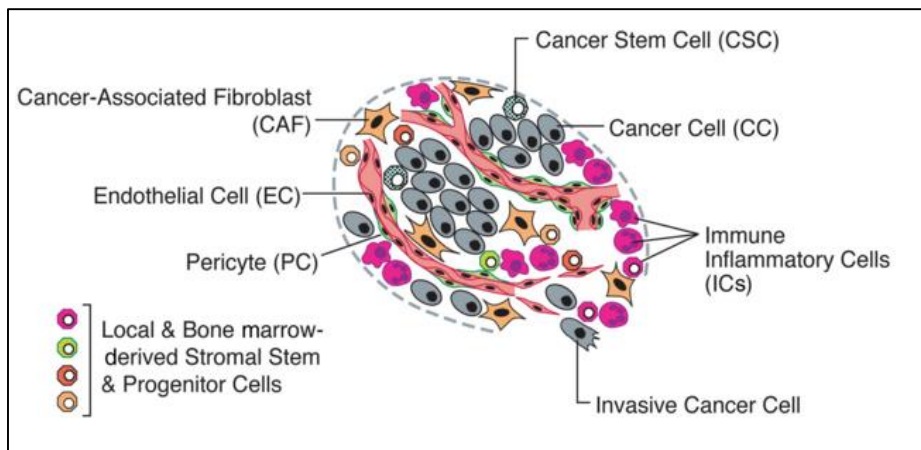


Figura 4.3(1). Conjunto de diferentes tipos de células que constituyen el tumor⁵³.

BBI608 es un nuevo fármaco capaz de bloquear la reproducción de las células madre tumorales, e inducir su muerte celular, principalmente mediante la inhibición de STAT3. *STAT3* es un miembro de la familia STAT, oncogén que se activa en respuesta a citoquinas y a factores de crecimiento, y a través de la activación de JAK traslada señales de transcripción nuclear.

La actividad de BBI608 se ha demostrado en modelos preclínicos y en un estudio fase I/II en combinación con paclitaxel. Actualmente existe un estudio fase III en marcha, para pacientes con CG refractarios a una primera línea de tratamiento, en combinación con paclitaxel (ClinicalTrials.gov NCT02178956).

4.4. Inmunoterapia

Tal como se ha comentado anteriormente, la respuesta del sistema inmune juega un papel muy importante en la tumorigénesis del CG⁷⁷⁻⁷⁹, y sobre todo en los subtipos EBV y MSI propuestos por el TCGA⁵². La incorporación de los nuevos fármacos inhibidores de los puntos de control, en inglés *checkpoint inhibitors*, representa una nueva opción de tratamiento para estos pacientes.

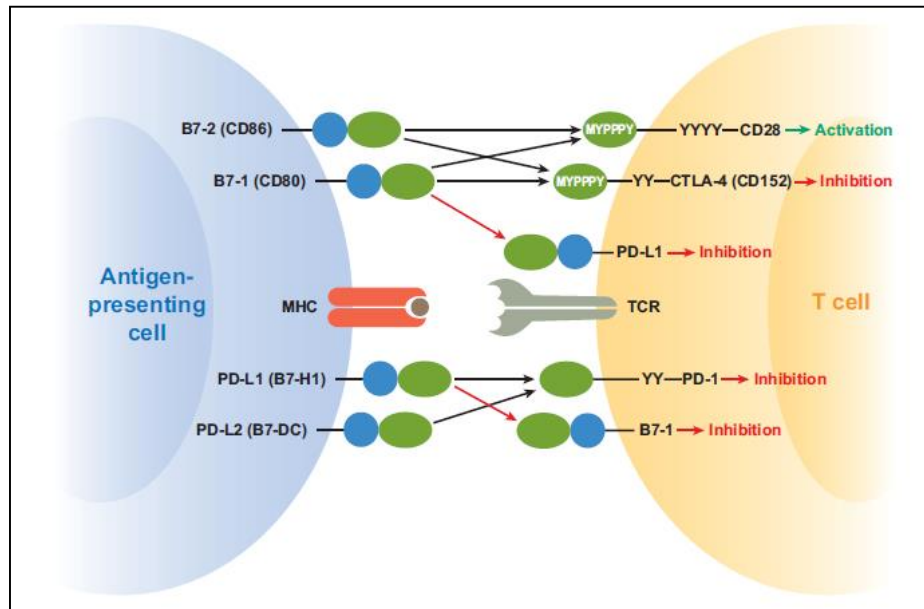


Figura 4.4(1). Presentación del antígeno al linfocito T. La célula inmune se activa con la presentación del antígeno dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), las señales de co-estímulo (interacción B7-CD28), y liberación de citoquinas. Este proceso puede verse inhibido por la interacción de otras moléculas checkpoint, como serían la unión de CTLA a B7, o la interacción de PD1 con PDL1¹⁷⁷.

Los resultados de los primeros ensayos fase I/II demuestran el beneficio de esta estrategia, traducido en unas tasas de respuesta y supervivencia excepcionales¹⁷⁸⁻¹⁸³.

Tal como puede observarse en la Tabla 4.4(1), los inhibidores de checkpoints prometen ser una buena estrategia dentro de los tratamientos del CG. Con pembrolizumab por ejemplo, en pacientes seleccionados por altos niveles de PD-L1, se consiguen tasas de respuesta de un 22% y supervivencias de hasta 11 meses¹⁷⁹. Considerando que se trata de una población refractaria a tratamiento estándar, estos datos son muy alentadores.

Checkpoint	Fármaco	Fase	Población	N	Resultados
CTLA-4	Tremelimumab	II	2ª línea	18	1 respuesta parcial 4 estabilizaciones
	Ipilimumab	II	Mantenimiento	114	
PD-1	Pembrolizumab	Ib	PDL1 positivos >2ª línea	39	Tasa de respuesta 22% Mediana de supervivencia global 11 meses
	Nivolumab	I	EBV positivo		
	Nivolumab	I/II	>2ª línea	59	Tasa de respuesta 12% Mediana de supervivencia libre de progresión 7.1 meses
PD-L1	Durvalumab	I	>2ª línea	16/346	Tasa de respuesta 25%
	Atezolizumab	I	>2ª línea	1	1 respuesta parcial
	Avelumab (pacientes Japoneses)	Ib	2ª línea	20	Tasa de respuesta 15%
	Mantenimiento		55	Tasa de respuesta 7.3%	

Tabla 4.4(1). Principales estudios realizados con inmunoterapia en CG.

4.5. Conclusiones

Históricamente, y tal como se puede deducir de los estudios con quimioterapia y de los primeros estudios con terapias dirigidas, el CG y CUGE se ha considerado como una única entidad. Gracias a las distintas clasificaciones histológicas y, sobre todo, a su clasificación molecular, se puede afirmar que se trata de una entidad heterogénea^{52,107}.

El tratamiento con quimioterapia es eficaz, aunque su beneficio llega a un *plateau*³³. El tratamiento con nuevas terapias dirigidas intenta conseguir superar este límite, aunque sólo trastuzumab y ramucirumab han podido demostrar ser eficaces^{4,47,48}.

Si nos fijamos en el diseño de la mayoría de los estudios, podemos observar que no existe una selección molecular. Teniendo en cuenta que la proporción de alteraciones moleculares de forma individual es < 10%, es lógico pensar que si administramos un fármaco sin seleccionar previamente al paciente, la posible eficacia queda diluida.

Por ejemplo, el estudio AVAGAST es negativo para supervivencia global (objetivo principal), pero positivo para otros objetivos secundarios¹⁶⁹. Este hecho refleja cierta eficacia del fármaco. Si además tenemos en cuenta los resultados positivos conseguidos con ramucirumab y apatinib^{47,48,171}, podríamos pensar que bevacizumab probablemente es activo en una parte de los pacientes.

Por lo tanto, se confirma que la identificación de biomarcadores de respuesta es indispensable para poder tratar correctamente a los pacientes.

Los resultados de las terapias con inhibidores de las células madres del cáncer, y sobre todo los anhelados resultados de los estudios con inmunoterapia, ayudarán a mejorar el pronóstico de estos pacientes.

Práctica clínica habitual

A día de hoy, los pacientes con CG o CUGE se tratan con una 1ª línea de quimioterapia basada en un agente platinado y una fluoropirimidina. Además, es mandatorio determinar el HER2 al diagnóstico; y en aquellos en los que se halla positivo, se debe añadir trastuzumab a la quimioterapia.

La 2ª línea de estos pacientes se puede realizar con taxanos o con irinotecán. La reciente aprobación del ramucirumab por parte de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) ha promovido que se haya iniciado su uso en algunas comunidades autónomas del país.

El ensayo clínico es normalmente una de las mejores opciones terapéuticas. La incorporación de las técnicas de selección molecular facilitará la identificación de terapias eficaces en cada caso.

5 Justificación

5. Justificación

Trastuzumab es el primer fármaco dirigido que demuestra un beneficio en términos de supervivencia y supervivencia libre de progresión (SLP) en pacientes con CG y CUGE, específicamente en aquellos tumores con el receptor HER2 positivo.

Los resultados del estudio TOGA demuestran que la administración de trastuzumab junto con cisplatino y fluoropirimidinas en 1ª línea de tratamiento aporta un aumento en la supervivencia mediana de estos pacientes de 11.1 a 13.8 meses (HR = 0.74, $p < 0.01$)⁴. Para aquellos pacientes considerados HER2 positivos en base a los criterios actuales (IHQ 3+ o IHQ 2+/ISH positivo)¹⁵⁸, la supervivencia mediana alcanza los 16.0 meses (HR = 0.65).

La tasas de respuesta entre los pacientes tratados con trastuzumab es del 47%, mientras que en el grupo control es del 35% (Odds ratio de 1.70, $p < 0.01$). La mediana de duración de la respuesta también es mayor entre el grupo de pacientes tratados con trastuzumab (6.9 vs 4.8 meses; HR = 0.53, $p < 0.01$).

De estos resultados se puede inferir que, aunque el análisis sea positivo de forma global en todos los pacientes incluidos en el estudio TOGA (pacientes con HER2 sobrepresado 1+ a 3+), no todos los pacientes responden (resistencia primaria) y, al final, la mayoría progresan al tratamiento tras una respuesta inicial (resistencia secundaria).

En esta tesis doctoral se estudian las alteraciones moleculares de algunos genes/proteínas implicadas en las vías de crecimiento y regulación del ciclo celular que podrían estar relacionadas con la resistencia primaria al tratamiento con trastuzumab.

6 Hipótesis

6. Hipótesis

Se propone la identificación de las siguientes alteraciones moleculares de efectores implicados en la tumorigénesis gástrica, y que podrían ser la causa de la resistencia primaria al tratamiento con quimioterapia y trastuzumab, en pacientes afectados de CG o CUGE con HER2 positivo.

Alteración molecular	Función celular	Estudio
Ciclina E	Regulación del ciclo celular	Amplificación del gen Sobreexpresión de la proteína
Ciclina D1	Regulación del ciclo celular	Amplificación del gen Sobreexpresión de la proteína
PIK3CA	Crecimiento tumoral	Amplificación del gen Mutación del gen
PTEN	Crecimiento tumoral	Pérdida de expresión de la proteína
HER3	Crecimiento tumoral	Sobreexpresión de la proteína
P95	Crecimiento tumoral	Sobreexpresión de la proteína Cuantificación de la proteína

Tabla 6(1). Alteraciones moleculares analizadas, potencialmente responsables de la resistencia primaria a trastuzumab.

6.1. Hipótesis 1. Ciclinas E y D1

Tal como se ha comentado anteriormente, las ciclinas E y D1 actúan regulando la transición del ciclo celular en el punto R, de la fase G1 a S¹⁴³. Las ciclinas se unen a las CDK para formar los complejos CDK2-ciclina E y CDK4/6-ciclina D1, respectivamente. La desregulación de estos complejos se ha descrito en diferentes tipos de cáncer^{144,145}. La activación de los complejos CDK-ciclina puede ocurrir por diferentes mecanismos, incluyendo la amplificación de los genes de la ciclina E y D1¹⁴⁶. Debido a su importancia en el ciclo celular, están empezando a estudiarse como candidatas prometedoras para el tratamiento del cáncer. Palbociclib, un inhibidor de las CDK4/6, ha demostrado ser eficaz en pacientes con cáncer de mama con receptor hormonal positivo¹⁴⁷, y a nivel preclínico se ha demostrado cómo la inhibición de CDK4/6 es capaz de re-sensibilizar el cáncer de mama HER2 positivo al bloqueo EGFR/HER2¹⁸⁴.

En CG, se ha descrito la sobreexpresión de la ciclina E hasta en un 25-33% de los casos^{185,186}, correlacionándose con un peor pronóstico. La sobreexpresión de ciclina D1 también ha sido identificada en el CG, entre un 40.5-72%^{187,188}, aunque no ha sido tan claramente correlacionada con el pronóstico.

La amplificación/sobreexpresión de ciclina E se ha identificado como mecanismo de resistencia a trastuzumab, en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo¹¹⁰.

6.2. Hipótesis 2. PIK3CA

PIK3CA juega un papel crucial en la vía de señalización de los receptores de crecimiento epidérmico; la vía de PI3K-AKT-mTOR, eje central de señalización celular. La desregulación de esta vía es una de las alteraciones más frecuentes en neoplasias humanas y se considera crucial para el desarrollo tumoral¹³⁶. Las mutaciones y amplificaciones de *PIK3CA* son las dos principales causas de sobre-activación de esta vía en el cáncer.

Se han descrito mutaciones en *PIK3CA* en CG, en aproximadamente el 4-7% de los casos^{52,189,190}. Las amplificaciones se han descrito más frecuentemente, entre un 10-65% de los casos^{52,108,109,189,190}, y se ha correlacionado con un peor pronóstico.

Las mutaciones de *PIK3CA* se han identificado como mecanismo de resistencia a trastuzumab, en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo¹⁹¹⁻¹⁹³.

6.3. Hipótesis 3. PTEN

La proteína PTEN es también clave en la regulación de la vía de señalización PIK3CA-AKT-mTOR. PTEN actúa como freno de la vía, induciendo la de-fosforilización de PIP3 a PIP2 y por tanto antagonizando la función de PIK3CA¹³⁹.

La pérdida/baja expresión de PTEN se ha descrito en un 20% – 60% de los CG, y se ha asociado a un peor pronóstico^{52,194-196}.

El papel que juega PTEN como mecanismo de resistencia a trastuzumab en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo es controvertido^{140,197}. La falta de estandarización de su determinación podría ser la causa de esta controversia¹⁹⁷.

6.4. Hipótesis 4. HER3

Dentro de los posibles dímeros que pueden crearse a nivel de los receptores de crecimiento epidérmico, HER2-HER3 es el heterodímero de señalización mitogénica más potente¹²⁶.

La sobreexpresión de HER3 se ha descrito en un 20% - 60% de los CG, y se ha asociado a un peor pronóstico¹⁹⁸⁻²⁰⁰.

La sobreexpresión de HER3 podría actuar como factor de resistencia a inhibidores de otros receptores de crecimiento epidérmico de membrana, como EGFR/HER1 y HER2^{201,202}. La asociación de pertuzumab, anticuerpo que inhibe la dimerización HER2-HER3, a la combinación de quimioterapia y trastuzumab en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo ha demostrado aumentar la eficacia del tratamiento¹²⁴.

6.5. Hipótesis 5. p95HER2

El receptor HER2 puede estar activado de forma aberrante por su forma truncada p95HER2, que carece del sitio de unión a trastuzumab-, pero contiene un dominio quinasa hiperactivo¹³³.

En cáncer de mama HER2 positivo, la expresión de p95HER2 se consideró como un mecanismo de resistencia a la terapia basada en trastuzumab^{133,203,204}, aunque actualmente se ha revocado esta afirmación, y se considera un biomarcador positivo de respuesta^{205,206}. Tanto los niveles altos de HER2 como de p95HER2 se correlacionarían positivamente con la respuesta a la combinación de lapatinib, inhibidor tirosina-quinasa de HER2, y trastuzumab en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo²⁰⁵. Este hallazgo se debe probablemente a la estrecha asociación que existe entre los niveles de p95HER2 y HER2.

La sobreexpresión de p95HER2 ha sido descrita en un 77% de CG HER2 positivo, en una sola serie (24 casos, de 31 totales)²⁰⁷, y se ha correlacionado con la resistencia a trastuzumab en modelos preclínicos²⁰⁸.

7 Objetivos

7. Objetivos

Esta tesis doctoral tiene dos objetivos principales: (1) realizar un análisis descriptivo en pacientes con CG y CUGE HER2 positivos de las alteraciones moleculares descritas en el capítulo anterior, y (2) correlacionar dichos hallazgos con la supervivencia de los pacientes y con el tipo de respuesta que realizan al tratamiento con trastuzumab.

Los datos del estudio TOGA muestran que hasta un 50% de los pacientes considerados HER2 positivo presentan una resistencia primaria al tratamiento con quimioterapia y trastuzumab, hecho que se podría explicar por alteraciones moleculares ocurridas nivel de las proteínas efectoras de las vías de señalización intracelular que activa HER2: la vía de las MAP-quinasas (MAPK) y la vía de PIK3CA-AKT-mTOR, responsables mayoritariamente de la proliferación y de la supervivencia celular, respectivamente.

El estudio se realiza en una muestra de 100 pacientes afectos de CG y CUGE HER2 positivo, en estadio localmente avanzado irreseccable o metastásico, tratados con una primera línea basada en quimioterapia y trastuzumab. Se analizan las biopsias tumorales de los pacientes, obtenidas previo al inicio del tratamiento, con el objetivo de determinar el estado de las ciclinas E y D1 (amplificación, sobreexpresión), PIK3CA (amplificación, secuenciación), PTEN (expresión), HER3 (sobreexpresión), y p95HER2 (sobreexpresión, cuantificación).

Dada la baja frecuencia de CG y CUGE HER2 positivo, ha sido imprescindible reunir muestras de varios centros para tener un número de casos significativos. No existen series publicadas que recojan estas alteraciones en CG y CUGE HER2 positivo, y por lo tanto la descripción de los hallazgos moleculares se considera inédita.

Además, se correlacionan los resultados del análisis molecular con los datos clínicos de los pacientes, con el objetivo de hallar si alguna de las alteraciones moleculares está más representada en algún subtipo determinado de pacientes, así como para valorar si alguna de ellas juega un papel pronóstico y/o predictivo de respuesta al tratamiento con trastuzumab.

8 Métodos

8. Métodos

8.1. Tipo de estudio

Estudio observacional no-EPA (se entiende por EPA aquel Estudio Post-Autorización, según la clasificación de la AEMPS). Dada la confidencialidad de los datos a observar y analizar de los pacientes incluidos en el estudio, este proyecto se presentó al Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona, valorándose positivamente y autorizando su realización según dictamen del mismo con fecha 26 de Mayo de 2014.

8.2. Selección de la muestra

La muestra está compuesta por 100 casos correspondientes a pacientes diagnosticados y tratados en 10 hospitales de España.

Se contactó con los médicos oncólogos responsables del CG de los hospitales seleccionados, solicitándose su colaboración. Cada investigador debía seleccionar a los pacientes, recoger los datos clínicos respectivos, y enviar una muestra de tejido tumoral.

De los 126 pacientes de la serie inicial, el análisis final sólo incorpora 100. Las principales causas de pérdida de casos han sido el incumplimiento de alguno de los criterios de inclusión, la falta de suficiente cantidad de células tumorales en la biopsia recogida, así como incongruencias en los datos.

Criterios de inclusión/exclusión de la población a incluir

Se han seleccionado pacientes diagnosticados de CG o CUGE localmente avanzado irresecable y/o metastásico HER2 positivo.

Los pacientes debían haber iniciado (al menos) una 1ª línea de tratamiento con quimioterapia basada en un agente platinado y una fluoropirimidina, asociado a trastuzumab. Se requería el seguimiento clínico del paciente durante el tratamiento onco-específico. Se requería la evaluación de los pacientes mediante los criterios de evaluación de respuesta de tumores sólidos (RECIST v1.1)²⁰⁹.

Los pacientes debían aceptar su participación de forma voluntaria, autorizándola mediante la firma del consentimiento informado (véase *Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado*, al final del capítulo). Para aquellos pacientes fallecidos en el momento de la inclusión en el estudio, el CEIC dio autorización para el uso de sus muestras tumorales así como su información clínica, eximiéndose la obtención del consentimiento informado, de acuerdo con el artículo 24 del RD 1716/2011.

Se solicitaba muestra de tejido tumoral de cada paciente obtenida previamente al inicio del primer tratamiento onco-específico, considerándose válidas aquellas muestras con un grosor mínimo de 40 µm.

Procedimientos utilizados para garantizar la confidencialidad de los datos

Con el objetivo de mantener la identidad de cada paciente en el anonimato, la información clínica y el bloque tumoral de cada paciente se asociaron a un código.

8.3. Centros participantes

En un principio se seleccionaron los principales hospitales de Cataluña. Dado el bajo reclutamiento inicial, se decidió incluir otros hospitales de diferentes comunidades autónomas de España.

Hospital	Ciudad	Investigador Principal
Hospital Universitario Vall d'Hebron	Barcelona	Dra. Maria Alsina
Hospital Clínico San Carlos	Madrid	Dr. Javier Sastre
ICO - Hospital Universitari Dr. Josep Trueta	Girona	Dra. Raquel Guardado
Hospital Clínic	Barcelona	Dra. Estela Pineda
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla	Santander	Dr. Fernando Rivera
ICO – Hospital Universitari Germans Trias i Pujol	Badalona	Dr. Jose Luis Manzano
Hospital Universitario Reina Sofia	Córdoba	Dr. Enrique Aranda
ICO – Hospital Duran i Reynals	Barcelona	Dra. Maica Galán
Hospital Universitario Ramón y Cajal	Madrid	Dr. Federico Longo
Hospital del Mar	Barcelona	Dra. Laura Visa

Tabla 8.3(1). Relación entre los centros participantes.

8.4. Datos clínicos recogidos

Cada investigador ha recogido los datos clínicos de los pacientes mediante documentos individuales en formato Excel. Todos los documentos se revisaron e incorporaron a una base de datos global.

Los datos clínico-patológicos recogidos son los siguientes:

- Datos epidemiológicos: fecha de nacimiento, sexo.
- Datos relacionados con la biopsia: fecha de obtención y localización de la biopsia, tipo histológico, grado de diferenciación, estado de HER2.
- Datos clínicos: fecha del debut del tumor primario y de las metástasis, estadiaje clínico y patológico (en caso de aplicar), localización del tumor primario (CG vs CUGE), localización de la afectación metastásica, tratamiento de 1ª línea metastásica (tipo, tiempo, número de ciclos, tipo de respuesta, causa de fin de tratamiento, toxicidades graves), tratamientos posteriores (mismas variables que en el tratamiento de 1ª línea), estado del paciente (vivo vs muerto), fecha de último seguimiento, fecha de óbito (en caso de aplicar).

8.5. Análisis molecular

Se realiza un primer análisis del tejido tumoral en los laboratorios de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona, concretamente en el VHIO -Vall d'Hebron Instituto de Oncología, liderados por los Dres. Paolo Nuciforo y Javier Hernández.

Posteriormente se realiza un segundo análisis en los Laboratorios Monogram Biosciences, de San Francisco, Estados Unidos, liderado por el Dr. Jeff Sperinde, en colaboración con el laboratorio de Memorial Sloan Kettering Cancer Center, liderado por el Dr. Maurizio Scaltriti.

Los análisis moleculares realizados se resumen en la tabla siguiente:

Alteración	Análisis	Técnica	Laboratorio
Ciclina E	Amplificación del gen	ISH	Dr. Paolo Nuciforo
	Sobreexpresión de la proteína	IHQ	Dr. Paolo Nuciforo
Ciclina D	Amplificación del gen	ISH	Dr. Paolo Nuciforo
	Sobreexpresión de la proteína	IHQ	Dr. Paolo Nuciforo
PIK3CA	Amplificación del gen	ISH	Dr. Paolo Nuciforo
	Mutación del gen	Secuenciación directa	Dr. Javier Hernández
PTEN	Sobreexpresión de la proteína	IHQ	Dr. Paolo Nuciforo
HER3	Sobreexpresión de la proteína	IHQ	Dr. Javier Hernández
p95HER2	Sobreexpresión de la proteína	IHQ	Dr. Paolo Nuciforo
p95HER2	Cuantificación de la proteína	Fluorescencia	Drs. Scaltriti/Sperinde
HER2	Cuantificación de la proteína	Fluorescencia	Drs. Scaltriti/Sperinde

Tabla 8.5(1). Cuadro de determinaciones moleculares realizadas. ISH: hibridación in situ; IHQ: inmunohistoquímica.

Aclaración sobre las muestras biológicas

Este estudio tiene un carácter retrospectivo. Las muestras tumorales analizadas son restantes derivados de las biopsias que en su momento se obtuvieron con finalidad asistencial (diagnóstico histológico de la enfermedad oncológica). Toda aquella parte sobrante y no utilizada en este estudio se ha depositado en una colección (nº de registro C0003160), guardada en el Laboratorio de Oncología Molecular en las instalaciones de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron.

Técnicas Moleculares

Hibridación in situ (ISH)

Para el análisis del ISH de las *ciclinas E y D1* se utilizan las sondas RP11-345J21/RP11-995M24 - Chr19 (Genome Resources Facility, Hospital for Sick Children, Toronto, Canada) y ZytoLight® SPEC CCND1/CEN 11 Dual Color Probe (Zytovision), respectivamente. Se evalúan como mínimo 20 células representativas en un mínimo de 3 áreas tumorales, y se obtiene un número medio de copias de genes (GEN) y de centrómero (CEP), así como la relación (ratio) GEN/CEP. La amplificación del gen se considera cuando las muestras presentan una ratio GEN/CEP de $\geq 1.5^{110,186}$ y de ≥ 2 (según criterio genético más común). La variación del número de copias se considera con un número medio de copias ≥ 5 y ≥ 6 .

Para el análisis del ISH de *PIK3CA* se utilizan las sondas ZytoLight® SPEC PIK3CA/CEN 3 Dual Color Probe (Zytovision). La amplificación del gen se considera cuando las muestras presentan una ratio GEN/CEP ≥ 2 (según criterio genético más común). La variación del número de copias se considera con un número medio de copias ≥ 5 y ≥ 6 .

Inmunohistoquímica (IHQ)

Las biopsias analizadas, muestras de tejido tumoral fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE, del inglés *formalin-fixed paraffin-embedded*), son cortadas y teñidas con los respectivos anticuerpos monoclonales.

Para el análisis de las ciclinas E y D1 se utilizan los anticuerpos anti-Cyclin E, clone HE12 – (Millipore) y Cyclin D1 (92G2) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology), respectivamente. Dado que no existe consenso, se ha interpreta la sobreexpresión de las ciclinas como variable continua.

Para el análisis de PTEN se utiliza el anticuerpo monoclonal de DAKO (clon 6H2.1). La pérdida de PTEN se considera cuando el H-Score es < 50 , evaluado en el componente invasivo del área tumoral. Se consideran un primer análisis en tres categorías posibles: expresión nula (ningún tipo de tinción), baja (H-Score entre 1-49), y alta (H-Score ≥ 50), y un segundo análisis con dos categorías: positivo (si la expresión es baja o alta) y negativo (si la expresión es nula).

Para el análisis de HER3 se utilizada el anticuerpo monoclonal Rabbit policlonal 1/75²⁰¹. Se considera un primer análisis con tres categorías posibles: expresión ausente o leve (sin expresión IHQ, o leve en $< 10\%$ de las células neoplásicas), moderada (tinción moderada en $>10\%$ de las células neoplásicas) y alta (fuerte expresión). En un segundo análisis se clasifican los casos en dos categorías: positivo (si la expresión es alta) y negativo (cuando la expresión es ausente-leve-moderada).

Para el análisis de la sobreexpresión de p95HER2 se utiliza el anticuerpo monoclonal 32H2²¹⁰. Dado que no existe consenso, se interpreta la sobreexpresión de p95HER2 como una variable continua.

Técnicas de secuenciación

Se realiza la extracción del ADN de los bloques FFPE con el Biorobot EZ1, siguiendo el protocolo de la casa comercial EZ1-DNA Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). Para la detección de las mutaciones en el gen *PIK3CA* se siguen las instrucciones del kit comercial CLART® CMA

KRAS-BRAF-PI3K de la casa comercial GENOMICA. Las mutaciones *PIK3CA* que puede detectar son E542K, E545D, E545K y H1047R. Además, se realiza la comprobación de los casos positivos a través de la amplificación de los exones 9 y 20 del gen *PIK3CA*, y su posterior secuenciación por el método Sanger.

Técnicas utilizadas para cuantificar p95HER2 y HER2

La cuantificación (expresión del total de la proteína) de p95HER2 y de HER2 se realiza mediante técnicas de fluorescencia VeraTag^{211,212}. Para la identificación de p95HER2 se utiliza el anticuerpo monoclonal p95 (D9, Monogram Biosciences)²¹³.

8.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realiza utilizando la aplicación informática SPSS versión 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Se han considerado como diferencias estadísticamente significativas aquellas en las que la p es ≤ 0.05 .

El estudio estadístico consta de dos partes:

Análisis descriptivo

Se realiza un análisis descriptivo de las diferentes variables clínicas y moleculares:

- Distribución de frecuencias absolutas y relativas (porcentajes) en las variables cualitativas.
- Determinación de la media y mediana y sus intervalos de confianza (IC) del 95% respectivos.
- Correlaciones entre las variables clínicas.
- Correlaciones entre las variables moleculares y las variables clínicas.
- Curvas ROC en aquellas variables cuantitativas en las que no existe ningún valor de corte (*cut-off*) de consenso. Las curvas ROC (Característica Operativa del Receptor, del inglés *Receiver Operating Characteristic*) es una representación gráfica de la sensibilidad frente a (1 – especificidad) para un sistema clasificador binario según se varía el umbral de discriminación. En este estudio, el estado de la variable continua (positivo vs negativo) se realiza en base a la variable “tasa de control de la enfermedad” (DCR, del inglés *disease control rate*).

Supervivencia y supervivencia libre de progresión (SLP)

La supervivencia global se entiende como el tiempo transcurrido entre el diagnóstico de la enfermedad metastásica y la muerte. Los casos vivos en la fecha del cierre de datos se han considerado como censurados.

La supervivencia libre de progresión (SLP) se entiende como el tiempo transcurrido entre el inicio del primer ciclo de tratamiento de 1ª línea y la fecha de progresión. Los casos no progresados en la fecha del cierre de datos se han considerado como censurados.

Se analiza la supervivencia y la SLP e la muestra globalmente, y en función de cada una de las variables.

El objetivo final de este análisis es detectar si algunas de las variables (clínicas y moleculares) tiene impacto en la supervivencia global (a efectos de considerarlas como factores pronóstico) o en la SLP (para considerarlas como factores predictivos de respuesta a quimioterapia y trastuzumab).

Consideraciones estadísticas

En todos los análisis realizados se considera un riesgo bilateral, o nivel de significación, $\alpha = 0.05$.

A efectos de analizar si existen relaciones entre las variables, se realizan los siguientes test: Chi-Cuadrado de Pearson, test exacto de Fisher, coeficiente de correlación de Pearson, coeficiente de Correlación Tau de Kendall.

Para analizar si existen diferencias significativas entre las medias y las medianas de diferentes grupos, se realizan los siguientes contrastes: test de Wilcoxon, test de Kruskal-Wallis, test U de Mann-Whitney.

Para intentar establecer un punto de corte (*cut-off*) de aquellas variables continuas en las que no existe consenso, se realizan las curvas de ROC.

El análisis de la Supervivencia y de la SLP se realiza mediante las curvas de Kaplan-Meier, y se han seleccionado las curvas de supervivencia significativas mediante el test de Mantel-Cox^{214,215}.

8.7. Hoja de Información al Paciente

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Proyecto de investigación titulado “**Caracterización molecular del cáncer gástrico; mecanismos de resistencia al tratamiento con anticuerpos monoclonales dirigidos**”.

Objetivos

Le solicitamos su participación en este proyecto cuya finalidad es la investigación de las alteraciones oncogénicas en vías de señalización celular y su posible significación pronóstica y/o predictiva en el cáncer gástrico.

Beneficios

Es posible que de su participación en el estudio no se obtenga un beneficio directo. Sin embargo, la identificación de posibles factores pronósticos y/o predictivos del cáncer podría beneficiar en un futuro a otros pacientes que la sufren y contribuir a un mejor conocimiento y tratamiento de esta enfermedad.

El ADN es un elemento que está presente en todas sus células; lleva un código en forma de “genes” que determina las características y función de cada célula. El ADN tumoral es aquél que se encuentra en la célula tumoral, y por tanto la diferencia de la célula normal. El conocimiento de las características del ADN tumoral es imprescindible para que entendamos el porqué y el cómo se desarrolla el cáncer, y para que podamos anticipar la respuesta del mismo a los tratamientos onco-específicos.

Procedimiento del estudio

Le solicitamos su autorización para la utilización de sus muestras de tumor, que están conservadas en el servicio de Anatomía Patológica de su hospital.

Molestias y posibles riesgos

Participar en este estudio no le causará ninguna molestia.

Lugar de realización del análisis

Las muestras de tumor serán analizadas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d’Hebron y del VHIO (Vall d’Hebron Instituto de Oncología), así como en el Laboratorio del Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Nueva York, USA.

Protección de datos personales

De acuerdo con la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, los datos personales que se obtengan serán los necesarios para cubrir los fines del estudio. En ninguno de los informes del estudio aparecerá su nombre, y su identidad no será revelada a persona alguna salvo para cumplir con fines del estudio, y en el caso de urgencia médica o requerimiento legal. Cualquier información de carácter personal que pueda ser identificable será conservada por métodos informáticos en condiciones de seguridad por el Hospital Universitario Vall d’Hebron, o por una institución designada por ella. El acceso a dicha información quedará restringido al personal de Base de datos, designado al efecto o a otro personal autorizado que estará obligado a mantener la confidencialidad de la información.

De acuerdo con la ley vigente, tiene usted derecho al acceso de sus datos personales; asimismo, y si está justificado, tiene derecho a su rectificación y cancelación. Si así lo desea, deberá solicitarlo al médico que le atiende en este estudio.

Implicaciones de la información obtenida en el estudio

Si decide participar en el estudio, es posible que en el análisis de sus muestras biológicas se obtenga información relevante para su salud o la de su familia. De acuerdo con la legislación vigente, tiene derecho a ser informado de los datos genéticos que se obtengan en el curso del estudio.

Si quiere conocer los datos genéticos relevantes para su salud que se obtengan, infórmese a través de su médico sobre las implicaciones que esta información puede tener para su persona y su familia. Esta información se le comunicará si lo desea; en caso de que prefiera no ser informado, su decisión se respetará.

Uso futuro de las muestras

Además le pedimos su consentimiento para que autorice al investigador a almacenar su muestra para realizar posibles futuros estudios genéticos relacionados con el cáncer y en la misma línea de investigación. Sus datos se mantendrán codificados a fin de garantizar la confidencialidad en su utilización, tal como prevé la legislación vigente.

Sus muestras se conservarán en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron. Su muestra sólo se utilizará en proyectos de investigación aprobados por el Comité de Ética de la Investigación del Hospital.

Derecho de revocación del consentimiento

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria y para ello es necesario que usted dé su consentimiento por escrito. No percibirá ninguna recompensa económica o de otro tipo por las muestras y datos proporcionados y éstas no tendrán valor comercial.

Si usted decide no participar en el estudio, su asistencia médica estará igualmente garantizada y puede cancelar su participación cuando lo desee.

Si cambia de opinión después de dar las muestras biológicas para el estudio de investigación biomédica, puede pedir que se destruyan las muestras; para ello puede contactar con el responsable del estudio.

En el caso de que usted lo solicite, se le podrá facilitar información acerca de los estudios de investigación en los que hayan utilizado las muestras.

Si tiene dudas o preguntas referentes a su participación puede ponerse en contacto con el médico que le ha ofrecido la participación o con la investigadora principal del estudio, la Dra. Maria Alsina (telf. 932746000; extensión 6608).

8.8. Consentimiento Informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PACIENTE

Proyecto titulado **“Caracterización molecular del cáncer gástrico; mecanismos de resistencia al tratamiento con anticuerpos monoclonales dirigidos”**.

Yo, _____, he leído la hoja de información que se me ha entregado y he entendido los objetivos del estudio de alteraciones oncogénicas así como de los riesgos y beneficios potenciales de mi participación en él.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He hablado con _____ (nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Estoy de acuerdo en participar según las condiciones y los procedimientos establecidos y entiendo que puedo cancelar mi participación cuando lo desee, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

DOY

NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que pueda realizarse el estudio sobre posibles factores genéticos relacionados con el cáncer en mi muestra de tejido.

DOY

NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que mi muestra tumoral se almacene para utilizarla en otros estudios sobre factores genéticos relacionados con el cáncer. Mi tejido y mi ADN se identificarán con un número codificado y mi identidad se mantendrá en secreto.

Entiendo que es poco probable que mi participación en los estudios efectuados tenga implicaciones directas para mi salud. No obstante, si la información obtenida tuviera una importancia directa para el desarrollo de enfermedades en mí o en mi familia

DOY

NO DOY permiso para que me comuniquen esta información.

Paciente, familiar o representante legal (señalar)

Fecha

Investigador

Fecha

9
Análisis
Descriptivo

9. Análisis Descriptivo

La descripción de las variables se realiza en un total de 100 pacientes diagnosticados de CG o CUGE, HER2 positivos, cuyo debut metastásico se reporta entre Julio del 2006 y Julio del 2015.

A continuación se detallan los resultados del análisis descriptivo de las variables clínicas y moleculares.

9.1. Variables Epidemiológicas

Del total de 100 casos estudiados, 83 debutan con enfermedad diseminada y 17 desarrollan metástasis a distancia durante la evolución de su enfermedad. El 75% son varones y la edad media al diagnóstico del debut de las metástasis es de 65 años.

El comportamiento de los datos epidemiológicos se describe mediante las habituales medias de síntesis y sus correspondientes intervalos de confianza (IC):

Características Clínicas	Valor
N	N = 100
Edad debut (años)	Media: 64.8 años (IC 95% 62.7 – 66.9) Mediana: 65.0 años (IC 95% 64.0– 69.0).
Edad debut metástasis	Media: 65.2 años (IC 95% 63.1 – 67.4) Mediana: 66.0 años (IC 95% 64.0– 69.0)
Sexo: Hombre/Mujer	75 (75%) – 25 (25%)
Tumor Primario: Gástrico - CUGE	59 (59%) – 41 (41%)
Tipo Histológico: Intestinal – difuso – mixto – indiferenciado	N = 79 (en 21 casos desconocido) 58 (73.4%) – 10 (12.7%) – 10 (12.7%) – 1 (1.2%)
Grado Histológico: Bien – moderado – pobremente diferenciado	N = 65 (en 35 casos desconocido) 8 (12.3%) – 29(38.7%) – 28 (43.0%)

Tabla 9.1(1). Características clínicas epidemiológicas.

En la fecha del corte de datos, la media de seguimiento desde el diagnóstico de las metástasis es de 16.5 meses (IC del 95% de 13.6 – 19.5), y la mediana de 12.8 meses (IC 95% 10.6– 15.2). En aquellos pacientes vivos en el momento del corte de datos (23), la media de seguimiento es de 30.1 meses (IC 95% 19.9 – 40.2), y la mediana de 21.7 meses (IC 95% 19.7– 27.7).

Análisis de relaciones entre variables clínicas

A fin de determinar las posibles relaciones entre las variables estudiadas se realizan los siguientes análisis:

- Histología del tumor en función del sexo: el test Chi Cuadrado (excluyendo el único caso indiferenciado para evitar frecuencias inferiores a 5) objetiva que los tumores se dan en ambos sexos sin diferencias significativas ($p = 0.979$).
- Grado histológico en función del sexo: el test Chi Cuadrado tampoco objetiva que haya relación ($p = 0.788$).

- Localización del tumor en función del sexo: la prueba aplicada es el test exacto de Fisher. La localización del tumor primario no es independiente del sexo de los pacientes ($p < 0.001$).

	Mujer	Varón	Total
CG	22 88.0%	37 49.3%	59 59%
CUGE	3 12.0%	38 50.7%	41 41%
Total	25 100%	75 100%	100 100%

Tabla 9.1(2). Cross-tab entre el sexo (mujer vs varón) y la localización del tumor primario (CG vs CUGE).

El riesgo de tener CUGE es 7.5 veces más alto en hombres que en mujeres; el 93% de los CUGE se han diagnosticado en hombres y sólo un 7% en mujeres. En cuanto al riesgo relativo de un tumor sobre el otro para cada sexo por separado, mientras las mujeres tienen 5.1 veces más riesgo de tener CG que CUGE, los hombres tienen 1.5 veces más riesgo de tener CUGE que CG (véase tabla 9.1(2)).

- Localización del tumor primario en función de la histología: el test Chi Cuadrado (excluyendo el único caso indiferenciado para evitar frecuencias inferiores a 5) concluye que no existe relación entre ambas variables ($p = 0.214$).
- Localización del tumor primario en función del grado histológico: en este caso, el test Chi Cuadrado constata que existe relación entre ambas variables ($p = 0.029$).

	Bien diferenciado	Mod diferenciado	Mal diferenciado	Total
CG	3 37.5%	16 55.2%	23 82.1%	42 64.6%
CUGE	5 62.5%	13 44.8%	5 17.9%	23 35.4%
Total	8 100%	29 100%	28 100%	65 100%

Tabla 9.1(3). Cross-tab entre la localización del tumor primario y el grado histológico.

Mientras que los tumores moderadamente diferenciados se comportan casi por igual en los dos tipos de localización, los tumores mal diferenciados se observan más en CG que en CUGE (82.1% vs 17.9%) (Tabla 9.1(3)).

- Edad del debut de las metástasis en función de la histología: el test Kruskal-Wallis no objetiva diferencias significativas entre ambas variables ($p = 0.962$).
- Edad del debut de las metástasis en función del grado histológico: el test Kruskal-Wallis no objetiva diferencias significativas entre ambas variables ($p = 0.35$).

- Edad del debut de las metástasis en función de la localización del tumor primario: la edad difiere según la localización del tumor primario ($p = 0.002$, test U de Mann-Whitney). Los CUGE se diagnostican en edades más tempranas (véase tabla 9.1(4)).

CG	Media 67.97 años (IC 95% 65.6 – 70.3)
	Mediana 69.0 años (IC 95% 65 - 74)
CUGE	Media 61.3 años (IC 95% 57.5 – 65.0)
	Mediana 64.0 años (IC 95% 59 – 66)

Tabla 9.1(4). Edad del diagnóstico de las metástasis en función de la localización del tumor primario.

Teniendo en cuenta el debut de las metástasis (sincrónicas vs metacrónicas), no se hallan ninguna relación con respecto las variables anteriores; ni con la edad ($p = 0.085$, test U de Mann-Whitney), ni con la localización del tumor primario ($p = 0.418$, test exacto de Fisher), ni con el tipo histológico ($p = 0.138$, test Chi Cuadrado), ni con el grado histológico ($p = 0.087$, test Chi Cuadrado).

9.2. Localización de las metástasis

La media de localizaciones metastásicas por paciente es de 1.8 localizaciones (IC 95% 1.62-1.94) y una mediana de 2 (IC 95% 1-2). Las metástasis más frecuentes son las hepáticas y adenopáticas, seguidas de la carcinomatosis peritoneal y de la afectación pulmonar.

Localización de la metástasis	N (%)
Hepática	60 (34%)
Adenopática	53 (30%)
Carcinomatosis peritoneal	26 (15%)
Pulmonar	17 (9%)
Ósea	8 (4%)
Loco-regional	3 (1.7%)
Suprarrenal	3 (1.7%)
SNC	3 (1.7%)
Otras	5 (2.8%)
Total localizaciones	178 (100%)

Tabla 9.2(1). Localización de las metástasis. Se valoran las localizaciones como casos independientes; por ejemplo, dos metástasis en un mismo paciente se consideran dos casos diferentes.

Al estudiar la posible relación entre la localización de las metástasis más frecuentes y las demás variables clínicas (sexo, edad, localización del tumor primario, tipo histológico, grado histológico) se han constatado las siguientes relaciones:

- El sexo está relacionado con la localización de las metástasis en el peritoneo ($p = 0.001$, test Exacto de Fisher; Odds ratio 5.15). Las mujeres tienen más probabilidad de presentar metástasis en el peritoneo.
- La edad de debut de las metástasis es significativamente inferior en los pacientes con metástasis pulmonares ($p = 0.001$, test U de Mann-Whitney). La mediana de edad en los pacientes con metástasis pulmonares es 63 años (IC 95% 50 – 65), mientras que la del resto de pacientes es de 67 años (IC 95% 65 - 70).

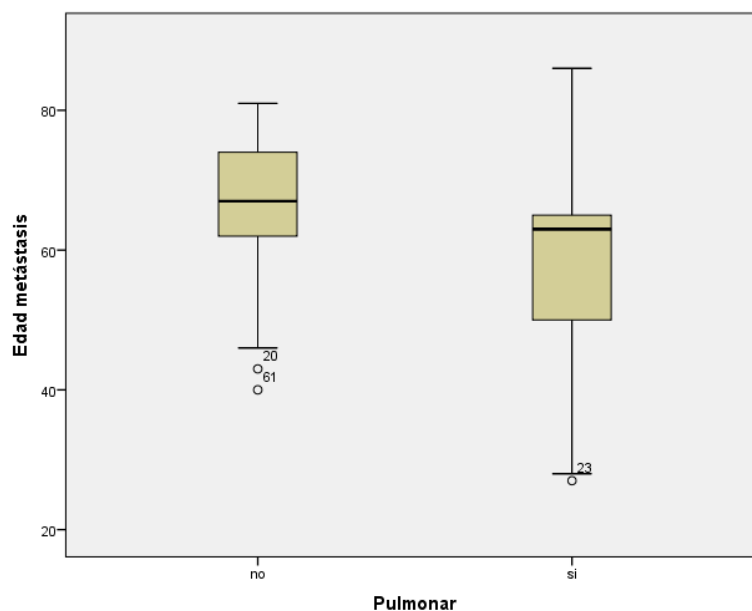


Figura 9.2(1). Box-plot de la edad de debut de las metástasis en función de la localización pulmonar (si vs no).

- La localización del tumor primario aparece relacionada con las metástasis hepáticas, la carcinomatosis peritoneal y las metástasis pulmonares. Las metástasis hepáticas se observan en el 73% de los pacientes con CUGE, mientras que este porcentaje baja al 50% en los pacientes con CG ($p = 0.004$, test Exacto de Fisher; Odds ratio 2.64). La carcinomatosis peritoneal es más típica en los CG que en los CUGE ($p = 0.011$, test Exacto de Fisher; Odds ratio 3.98). En cambio las metástasis pulmonares se observan más frecuentemente en los CUGE ($p < 0.001$, test Exacto de Fisher; Odds ratio 9.68).
- En cuanto a la histología, las metástasis hepáticas se asocian más con el subtipo intestinal ($p = 0.053$, test Chi Cuadrado), mientras que las óseas se dan muy poco en este subtipo ($p = 0.040$, test Chi Cuadrado).
- El grado histológico aparece relacionado con las metástasis peritoneales ($p=0.025$, test Chi Cuadrado): el 68% presentan grado mal diferenciado, frente a un 31% moderado y un 11% bien diferenciado. También se constata relación con las metástasis pulmonares, que una gran mayoría aparece con grado moderado (80%) ($p = 0.041$, test Chi Cuadrado).

9.3. Primera línea de tratamiento onco-específico

Todos los pacientes han recibido una primera línea de tratamiento basada en un agente platinado y una fluoropirimidina, asociada a trastuzumab. Doce pacientes (12%) reciben

tratamiento dentro del ensayo clínico JACOB (con el número de registro NCT01774786, en Clinicaltrials.gov), de los que no sabemos si han sido tratados con pertuzumab o placebo, asociado al trastuzumab.

Tipo de Tratamiento	N
Cisplatino + Capecitabina + Trastuzumab	37
Cisplatino + 5-fluorouracilo + Trastuzumab	26
Cisplatino + Capecitabina + Trastuzumab + Pertuzumab-Placebo	10
Oxaliplatino + Capecitabina + Trastuzumab	10
Carboplatino + Capecitabina + Trastuzumab	8
Oxaliplatino + 5-fluorouracilo + Trastuzumab	4
Cisplatino + 5-fluorouracilo + Trastuzumab + Pertuzumab-Placebo	2
Carboplatino + 5-fluorouracilo + Trastuzumab	2
Irinotecán + Trastuzumab	1
Total	100

Tabla 9.3(1). Tipos de tratamiento recibidos en 1ª línea.

Los pacientes han recibido una media de 11.98 ciclos con trastuzumab (IC 95% 8.3-15.7), y una mediana de 8 ciclos (IC 95% 7-10). La media de ciclos con quimioterapia es 8.33 (IC 95% 6.5-10.1), y la mediana 6 ciclos (IC 95% 6-7).

9.4. Toxicidades

Cincuenta y tres pacientes (53%) han experimentado alguna toxicidad grado 3-4. La media de toxicidades por paciente es de 0.85 (IC 95% 0.64 – 1.06), y la mediana es de 1 (IC 95%, 0-1).

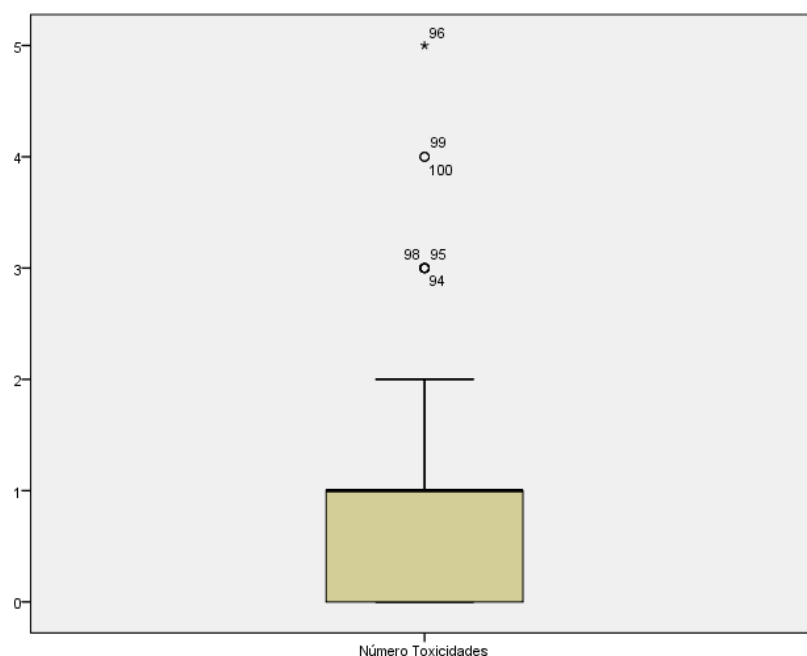


Figura 9.4(1). Box-plot del número de toxicidades presentadas por paciente.

En la siguiente tabla se resume las toxicidades grado 3-4 reportadas, según los criterios CTCAE v 4.0.

Tipo de toxicidad grado 3-4	N (%)
Hematológica	27 (35.1%)
Gastro-intestinal	20 (26.0%)
Astenia	17 (22.1%)
Síndrome mano-pie	4 (5.2%)
Neuropatía	3 (3.9%)
Anorexia	2 (2.6%)
Otras	4 (5.2%)
Total	77 (100%)

Tabla 9.4(1). Toxicidades grado 3-4 reportadas durante el tratamiento de primera línea. Se valoran las toxicidades como casos independientes; es decir, si un mismo paciente presenta varias toxicidades diferentes se han contado como casos separados.

9.5. Valoración de la respuesta

La tasa de control de la enfermedad, definida como la suma de aquellos pacientes en los que se objetiva una respuesta completa o parcial, o una estabilidad durante más de ≥ 4.2 meses (equivalente a 6 ciclos de tratamiento), es del 74.7%.

Mejor respuesta	N	%
Respuesta completa	11	11%
Respuesta parcial	46	46%
Estabilidad	23	23%
Progresión	19	19%
Desconocido	1	1%
Control de la enfermedad	74	74.7%
Total	100	100%

Tabla 9.5(1). Mejor respuesta conseguida durante el tratamiento de primera línea.

Con respecto a las causas de finalización del tratamiento de primera línea, la progresión de la enfermedad es la más frecuente (74%).

Razón fin tratamiento	N
Progresión	74
Protocolo	9
En curso	7
Toxicidad	4
Comorbilidad	3
Éxito	2
Cirugía radical	1
Total	100

Tabla 9.5(2). Causas de finalización del tratamiento de primera línea.

Existe un paciente que finaliza el tratamiento con el fin de llevar a cabo una cirugía radical; este paciente sigue libre de progresión en la fecha del cierre de datos.

La mejor respuesta obtenida en los pacientes no se relaciona de forma significativa con ninguna de las variables consideradas: ni con histología (p= 0.866, test Chi-Cuadrado), ni con el grado tumoral (p= 0.594, test Chi-Cuadrado), ni con la localización del tumor primario (p= 0.313, test Chi-Cuadrado), ni con el tipo de positividad de HER2 (IHQ 3+ vs 2+) (p= 0.759, test Chi-Cuadrado).

9.6. Tratamientos onco-específicos posteriores

Cincuenta pacientes (50%) han recibido una segunda línea, y 20 de ellos (20%) han recibido 3 o más líneas.

Tratamientos de segunda línea	N	%
Tratamiento basado en taxanos	25	50
Tratamiento basado en irinotecán	10	20
Otros ensayos clínicos	5	10
Re-tratamiento con platinos y fluoropirimidinas y trastuzumab	5	10
Taxanos y trastuzumab	3	6
Re-tratamiento con platinos y fluoropirimidinas	2	4
Total	50	100

Tabla 9.6(1). Tipos de tratamiento de segunda línea recibidos.

Tratamientos de tercera línea	N	%
Tratamiento basado en irinotecán	10	50
Ensayo clínico	7	35
Tratamiento basado en taxanos	3	15
Total	20	100

Tabla 9.6(2). Tipos de tratamiento de tercera línea recibidos.

9.7. Análisis descriptivo de las variables moleculares

Análisis de HER2

El estado de HER2 no se ha podido analizar de forma centralizada dado que se priorizaron las demás determinaciones, y el material sobrante fue insuficiente. Se han considerado como válidos los resultados hallados en los respectivos centros hospitalarios.

En 71 pacientes (71.7%) el HER2 es positivo por tinción IHQ de 3+, y en 28 (28.3%) por tinción IHQ 2+ y amplificación génica (ISH positivo). Existe 1 paciente (1%) del que no sabemos por qué motivo se dio como positivo.

Análisis de la ciclinas E y D1

El análisis del estado de las ciclinas E y D1 se ha realizado tanto a nivel del gen (amplificación) como de la proteína (sobrexpresión).

Amplificación de los genes de las ciclinas E y D1

Tal como se explica en el capítulo de “Métodos”, la amplificación de los genes que codifican para las proteínas E y D1 se ha considerado en aquellos casos que presentaban una ratio GEN/CEP de ≥ 1.5 y de ≥ 2 , o un número medio de copias ≥ 5 y ≥ 6 .

En la tabla siguientes se describen la media y mediana del ratio GEN/CEP, para las *ciclinas E* y *D1*.

Ciclina E	Media	1.88	IC 95%	1.50 – 2.27
	Mediana	1.09	IC 95%	1.06 – 1.18
Ciclina D1	Media	1.54	IC 95%	1.34 – 1.74
	Mediana	1.22	IC 95%	1.14 – 1.33

Tabla 9.7(1). Media y mediana de la ratio GEN/CEP de las *ciclinas E* y *D1*.

El test Wilcoxon concluye que no existen diferencias significativas entre las medianas de los tipos de *ciclinas* ($p = 0.528$). El coeficiente de correlación lineal tampoco objetiva correlación entre ellas ($p = 0.636$).

De los 95 pacientes en los que se ha podido analizar el estado de la *ciclina E*, 18 (18.9%) presentan una ratio GEN/CEP ≥ 2 , y 25 (26.3%) ≥ 1.5 .

De los 99 pacientes en los que se ha podido analizar la *ciclina D1*, 15 (15.2%) presentan una ratio GEN/CEP ≥ 2 , y 33 (33.3%) ≥ 1.5 .

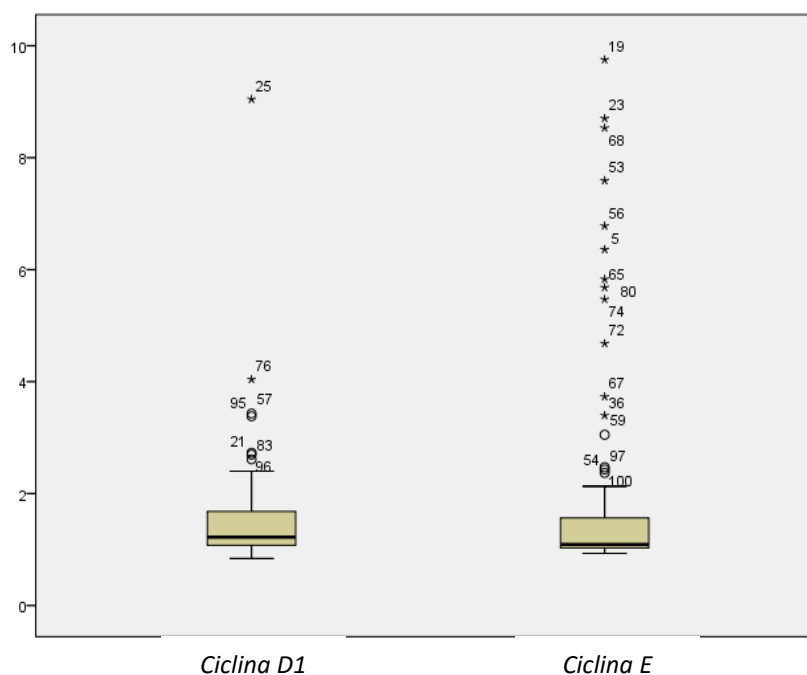


Figura 9.7(1). Box-plot de la amplificación de la *ciclinas E* y *D1*, según ratio GEN/CEP.

Si consideramos la amplificación en función del número de copias del gen, entre un 13.7% - 15.8% de los pacientes presentan amplificación de la *ciclina E*, mientras que entre un 12.1% - 14.1% presentan amplificación de la *ciclina D1*.

Ciclina E	N (%)	Ciclina D1	N (%)
< 5	80 (84.2%)	< 5	85 (85.9%)
≥ 5	15 (15.8%)	≥ 5	14 (14.1%)
< 6	82 (86.3%)	< 6	87 (87.9%)
≥ 6	13 (13.7%)	≥ 6	12 (12.1%)
Total	95	Total	99

Tabla 9.7(2). Amplificación de las *ciclinas E* y *D1* considerando el nº de copias del gen (≥ 5/≥ 6).

Las diferencias en la proporción de la amplificación de las *ciclinas E* y *D1* no son significativas (p=0.685 considerando el valor de 5, y p=0.351 considerando el valor 6; test exacto de Fisher).

Sobrexpresión de las proteínas ciclinas E y D

Tal como se explica en el capítulo de “Métodos”, se ha interpretado la sobrexpresión de la ciclina E/D1 considerando el resultado de la tinción IHQ como variable continua.

La ciclina E se encuentra más frecuentemente sobrexpresada con respecto a la ciclina D1 (p < 0.001, test de Wilcoxon). La media y mediana de la sobrexpresión de las ciclinas E y D1 se describen en la tabla 9.7(3).

Ciclina E	Media	40.66%	IC 95%	33.89% - 47.42%
	Mediana	32.50%	IC 95%	25.00% - 50.00%
Ciclina D1	Media	14.52%	IC 95%	9.95% - 19.09%
	Mediana	5.00%	IC 95%	1.00% - 10.00%

Tabla 9.7(3). Media y mediana de expresión de las ciclinas E/D1.

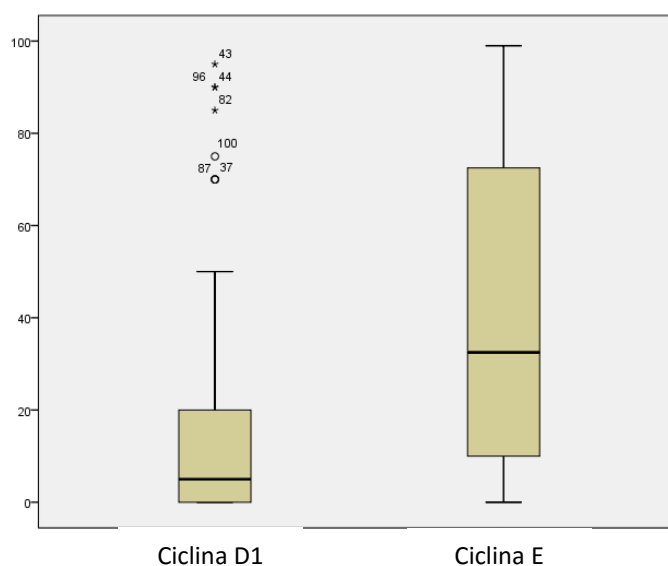


Figura 9.7(2). Box-plot de la expresión de las ciclinas E y D1.

Correlación entre la amplificación y la sobreexpresión de las ciclinas E y D1

Se analiza si existe correlación entre la amplificación del gen y la sobreexpresión de cada una de las ciclinas.

En el caso de la ciclina E, el coeficiente de correlación lineal de Pearson muestra una correlación positiva ($r = 0.51$, $p = 0.000$); que no existe en el caso de la ciclina D1 ($r = 0.091$, $p = 0.372$). La conclusión es la misma en base al cálculo de coeficiente Tau de Kendall (ciclina E: $\tau = 0.378$, $p = 0.000$; y ciclina D1: $\tau = -0.003$, $p = 0.966$).

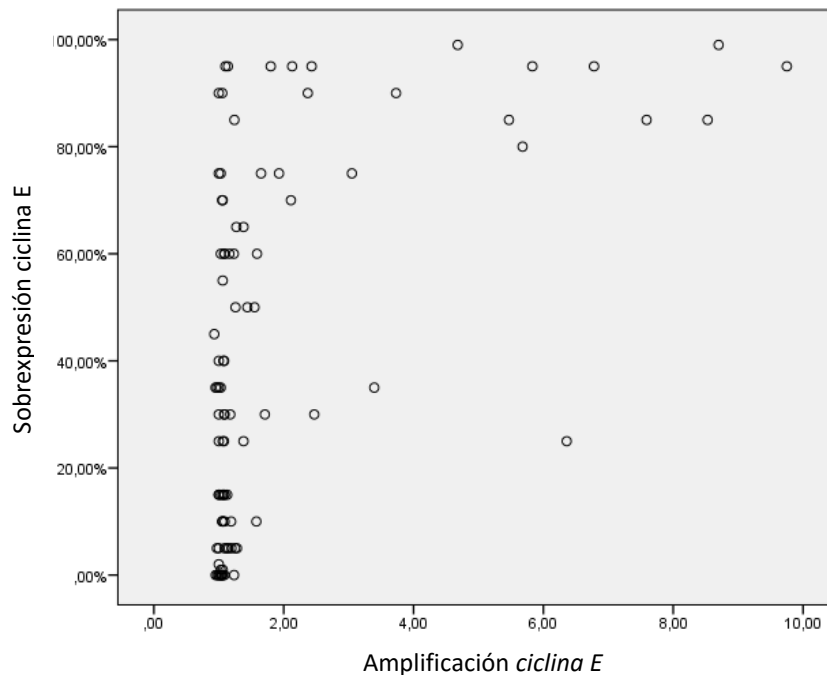


Figura 9.7(3). Correlación lineal de Pearson entre la amplificación y la sobreexpresión de ciclina E ($r = 0.51$, $p = 0.000$).

Es importante destacar el comportamiento de la correlación que existe entre la amplificación génica y la expresión de la ciclina E. Si nos fijamos en la figura 9.7(3), podemos ver dos comportamientos distintos, hecho que sugiere que la relación entre la sobreexpresión y la amplificación de la ciclina E es diferente para valores altos y bajos. La amplificación del gen de la ciclina E explica su sobreexpresión (cuadrante superior derecho). De todas formas, existen otras causas que hacen que la ciclina E esté sobreexpresada (cuadrante superior izquierdo).

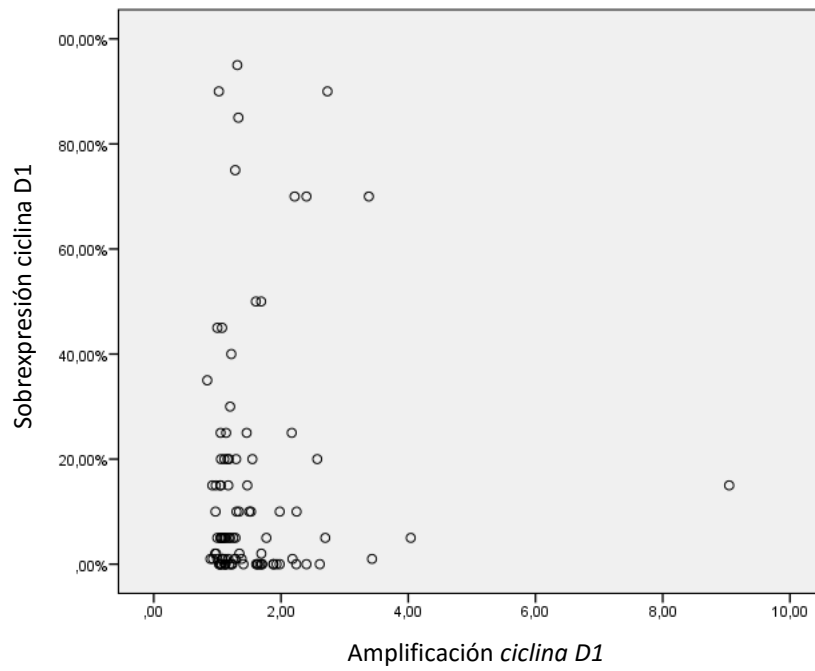


Figura 9.7(4). El coeficiente de correlación lineal de Pearson entre la amplificación y la sobreexpresión de ciclina D1 no muestra que haya ninguna correlación ($r = 0.091$, $p = 0.378$).

Curvas ROC para las ciclinas E y D1

Para determinar el *cut-off* óptimo para definir qué consideramos “amplificación” y “sobrexpresión” de las ciclinas E y D1, se realiza el análisis de la curva ROC. Desafortunadamente, los resultados no han permitido identificar en ningún caso el *cut-off*.

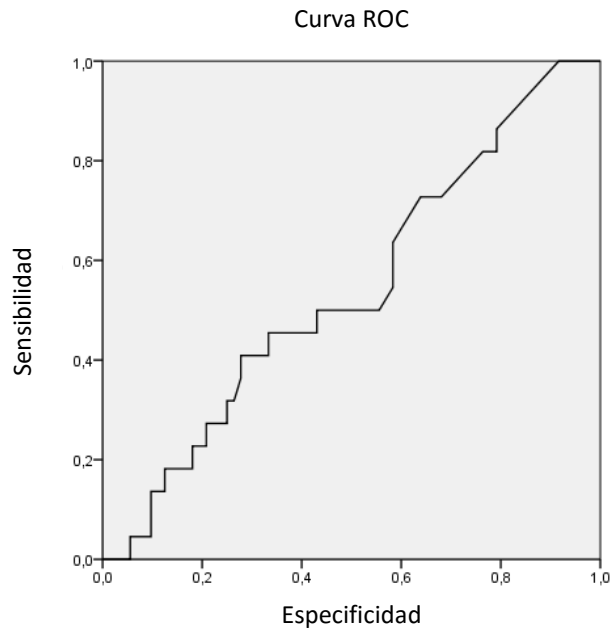


Figura 9.7(5). Curva ROC de la ratio GEN/CEP de la *ciclina E* (área bajo la curva = 0.542, $p = 0.556$). Al posicionar el valor “2”, escogido a priori como *cut-off* por su lógica genética, en la curva de ROC se estima que en este punto la sensibilidad es del 22.7% y la especificidad es del 81.9%.

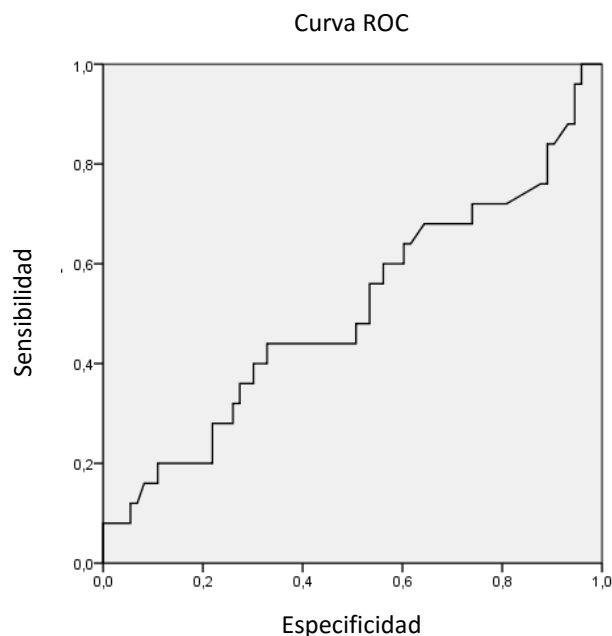


Figura 9.7(6). Curva ROC de la ratio GEN/CEP de la *ciclina D1* (área bajo la curva = 0.506, $p = 0.925$). Al posicionar el valor “2”, escogido a priori como *cut-off* por su lógica genética, en la curva de ROC se estima que en este punto la sensibilidad es del 20.0% y la especificidad es del 86.3%.

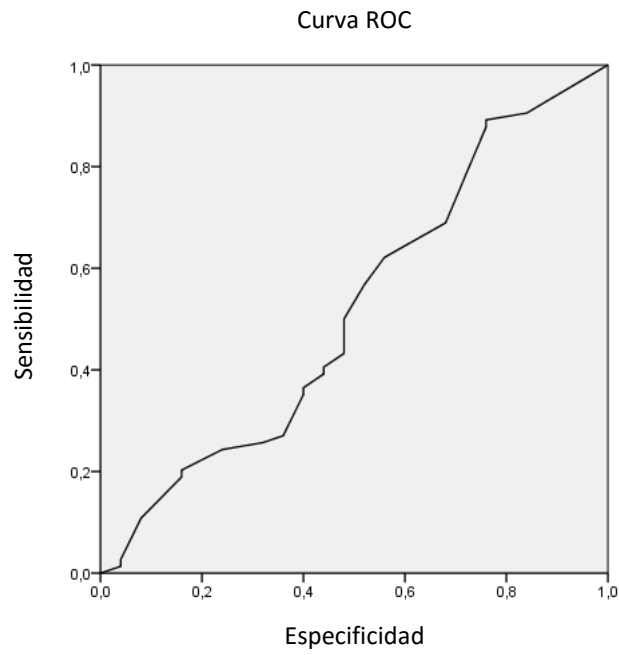


Figura 9.7(7). Curva ROC de la sobreexpresión de la ciclina E (área bajo la curva = 0.518, $p = 0.784$)

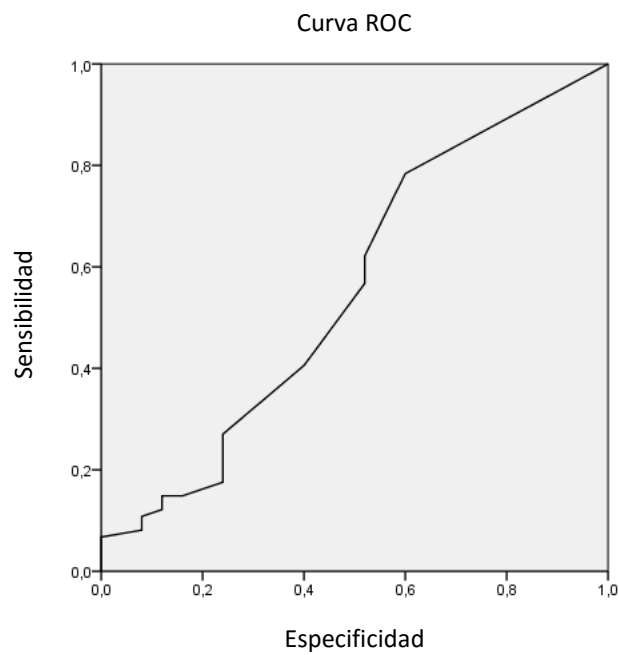


Figura 9.7(8). Curva ROC de la sobreexpresión de la ciclina D1 (área bajo la curva = 0.555, $p = 0.414$)

Análisis de PIK3CA

Se ha estudiado el estado de *PIK3CA* a nivel del gen, tanto analizando su posible amplificación como secuenciándolo con la intención de hallar posibles mutaciones.

Amplificación de *PIK3CA*

Tal como se explica en el capítulo de “Métodos”, se ha considerado la amplificación de *PIK3CA* a partir de una ratio GEN/CEP ≥ 2 , o un número medio de copias ≥ 5 y ≥ 6 .

La media/mediana de amplificación de *PIK3CA* es de 1.11/1.00. Sólo 4 pacientes (4%) lo presentan amplificado.

PIK3CA	Media	1.11	IC 95%	1.04 – 1.17
	Mediana	1.00	IC 95%	1.00 – 1.03

Tabla 9.7(4). Media y mediana de la ratio GEN/CEP de *PIK3CA*.

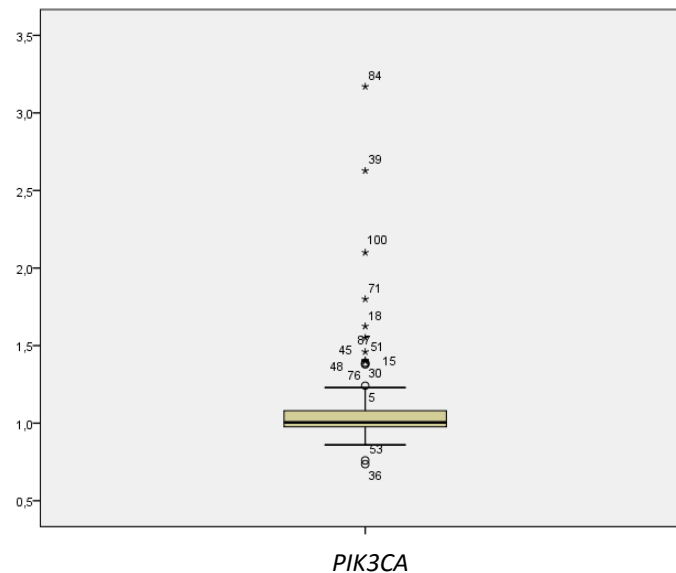


Figura 9.7(9). Box-plot de la amplificación de *PIK3CA*.

Si consideramos la amplificación en función del número de copias del gen, sólo un 3%-4% de los pacientes presentan dicha amplificación, dependiendo el *cut-off* escogido.

PI3K	N (%)
< 5	94 (96%)
≥ 5	4 (4%)
< 6	95 (97%)
≥ 6	3 (3%)
Total	98

Tabla 9.7(5). Amplificación de *PIK3CA* considerando el nº de copias del gen ($\geq 5/\geq 6$).

Secuenciación de *PIK3CA*

Se han podido secuenciar 97 casos. Tres pacientes (3.1%) presentan mutaciones de *PIK3CA*: dos en p.E545K (exón 9, dominio helical) y uno en p.H1047R (exón 20, dominio catalítico).

Curva ROC para *PIK3CA*

El resultado del análisis de la curva de ROC no permite determinar el *cut-off* de la amplificación de *PIK3CA*.

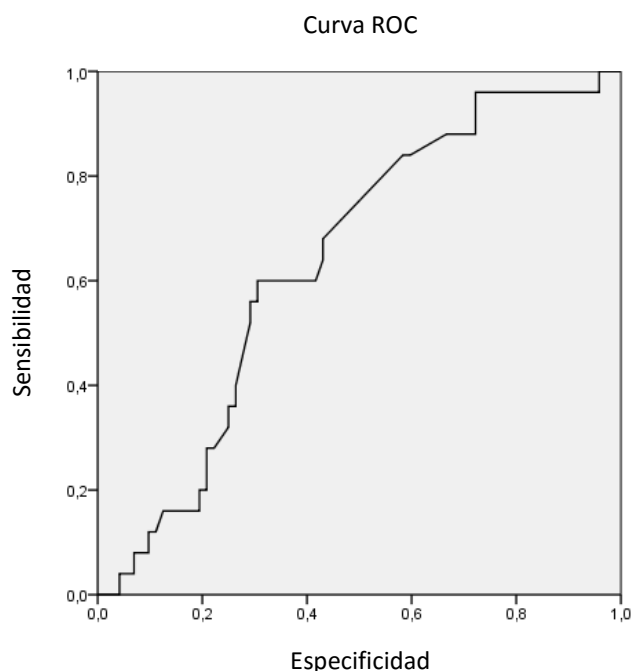


Figura 9.7(10). Curva ROC de la ratio GEN/CEP de *PIK3CA* (área bajo la curva = 0.639 p=0.04). Si consideráramos válido el test, el valor *cut-off* que mejor discriminaría el comportamiento de la ratio GEN/CEP de *PIK3CA* sería 1.2, con una sensibilidad del 60% y una especificidad de 70%, aproximadamente. Cuando buscamos el valor “2”, escogido a priori como *cut-off* por su lógica genética, vemos que se sitúa en el punto que tiene una sensibilidad es del 0% y la especificidad del 97.2%.

Análisis de PTEN

Tal como se ha explicado en el capítulo de “Métodos”, se han considerado un primer análisis con tres categorías: expresión nula (ningún tipo de tinción), baja (H-Score 1-49), y alta (H-Score ≥ 50); y un segundo análisis con sólo dos categorías: expresión nula (ningún tipo de tinción) vs positiva (H-Score ≥ 1).

Sobreexpresión de PTEN	N (%)
Nula	4 (4%)
Baja	11 (11%)
Alta	85 (85%)
TOTAL	100

Tabla 9.7(6). Sobreexpresión de PTEN considerando tres categorías.

Sobreexpresión de PTEN	N (%)
Nula	4 (4%)
Positiva	96 (96%)
TOTAL	100

Tabla 9.7(7). Sobreexpresión de PTEN considerando dos categorías.

Análisis de HER3

El estado de la proteína HER3 se ha analizado mediante IHQ sobre el 85% de la muestra. Tal como se ha explicado en el capítulo de “Métodos”, se ha considerado un primer análisis con tres valores posibles: expresión ausente o leve (sin expresión IHQ, o leve en < 10% de las células neoplásicas), expresión moderada (tinción moderada en >10% de las células neoplásicas), y expresión alta (fuerte expresión). En un segundo análisis se han dividido los casos en positivos (si la expresión era alta), y negativos (si la expresión era ausente-leve-moderada).

Tal como puede verse en la tabla 9.7(8), la distribución de la expresión de HER3 es muy homogénea.

Sobreexpresión de HER3	N (%)
Ausente o leve	19 (22.4%)
Moderada	33 (38.8%)
Alta	33 (38.8%)
TOTAL	85 (100%)

Tabla 9.7(8). Sobreexpresión de HER3 considerando tres categorías.

Sobreexpresión de HER3	N (%)
Ausente, leve o moderada	52 (61.2%)
Alta	33 (38.8%)
TOTAL	85 (100%)

Tabla 9.7(9). Sobreexpresión de HER3 considerando dos categorías.

Análisis de p95HER2

Sobreexpresión de p95HER2

Tal como se explica en el capítulo de “Métodos”, se ha analizado el H-Score de p95HER2 como una variable continua (tabla 9.7(10)).

p95	Media	56.0	IC 95%	37.7 – 74.3
	Mediana	0.00	IC 95%	0.00 – 12.00

Tabla 9.7(10). Media y mediana de la expresión de p95HER2.

Tal como puede verse en el siguiente box-plot, esta variable es muy dispersa y claramente asimétrica por la derecha, y por tanto la media no es representativa

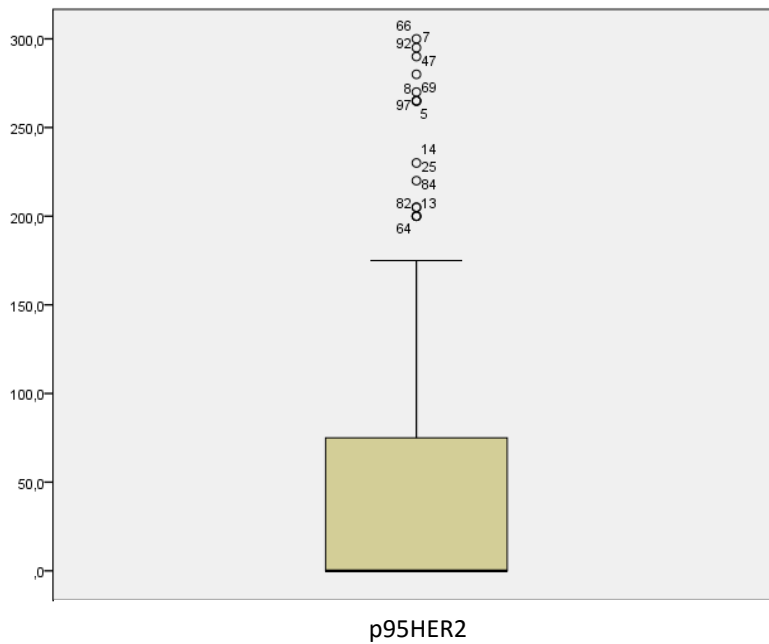


Figura 9.7(11). Box-plot del H-Score de p95HER2.

En la tabla 9.7(11) puede observarse que p95HER2 es positivo en un 43% o en un 27% de los casos, en función de que se considere como positivo su representación $\geq 10\%$ como H-Score o como tinción 3+, respectivamente.

H-Score de p95HER2	N (%)
< 10	57 (57%)
≥ 10	43 (43%)
IHQ 3+ de p95HER2	N (%)
< 10	73 (73%)
≥ 10	27 (27%)
Total	100

Tabla 9.7(11). Sobreexpresión de p95HER2, según H-Score y tinción IHQ 3+.

Curva ROC de p95HER2

No se puede identificar un *cut-off* para la sobreexpresión de p95HER2, dado el comportamiento de esta variable.

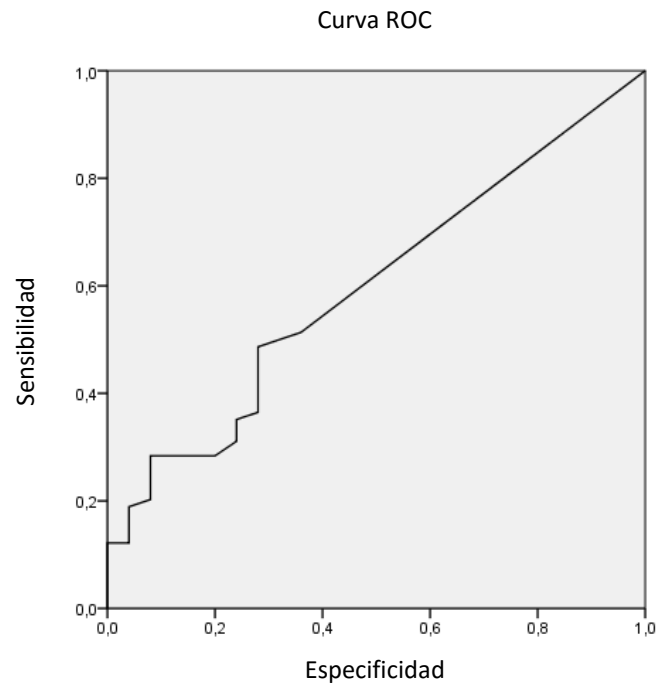


Figura 9.7(12). Curva ROC para el H-Score de p95HER2 (área bajo la curva 0.597, $p = 0.147$)

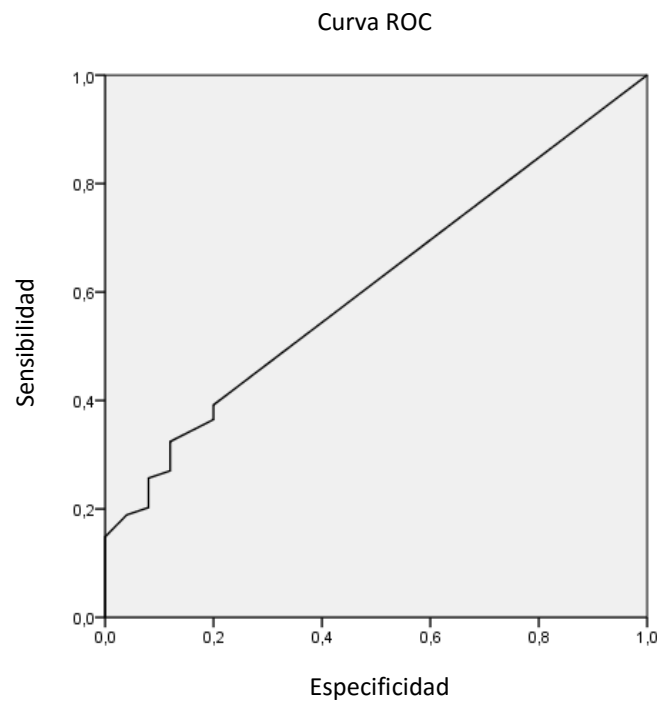


Figura 9.7(13). Curva ROC para la tinción IHQ 3+ de p95HER2 (área bajo la curva 0.609, $p = 0.103$)

Cuantificación de HER2 y p95HER2

Se cuantifican tanto a HER2 como p95HER2, y se analiza su posible relación mediante la correlación de Pearson, en valores absolutos y en base logarítmica. Tal como puede verse en las tablas 9.7(12) y 9.7(13), existe una correlación positiva entre ambas variables.

		HER2 (RF/sqmm)	p95HER2 (RF/sqmm)
HER2 (RF/sqmm)	Correlación Pearson	1	0.280*
	Sig. (2-colas)		0.019
	N	90	70
p95HER2 (RF/sqmm)	Correlación Pearson	0.280*	1
	Sig. (2- colas)	0.019	
	N	70	70

Tabla 9.7(12). Correlación de Pearson entre HER2 y p95HER2. *La correlación es significativa con nivel de 0.05 (2-colas). RF/sqmm: promedio de expresión tumoral, expresado en unidades de fluorescencia relativa por milímetro cuadrado de tumor.

		Log HER2	Log p95HER2	Log ratio p95/HER2
Log HER2	Correlación Pearson	1	0.529	-.886
	Sig. (2- colas)		0.000	0.000
	N	90	70	70
Log p95HER2	Correlación Pearson	.529	1	-.074
	Sig. (2- colas)	.000		0.544
	N	70	70	70
Log ratio p95/HER2	Correlación Pearson	-.886	-.074	1
	Sig. (2- colas)	.000	0.544	
	N	70	70	70

Tabla 9.7(13). Correlación de Pearson entre HER2 y p95HER2 en base logarítmica. *La correlación es significativa en el nivel 0.05 (2-colas).

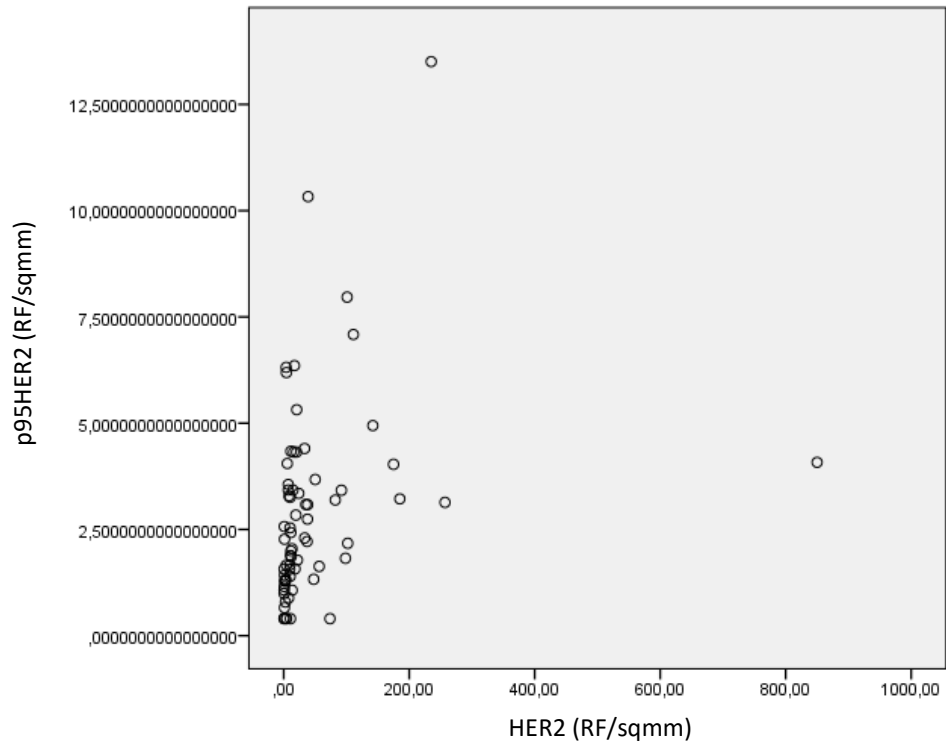


Figura 9.7(14). Correlación entre los valores absolutos de la determinación de p95HER2 y HER2.

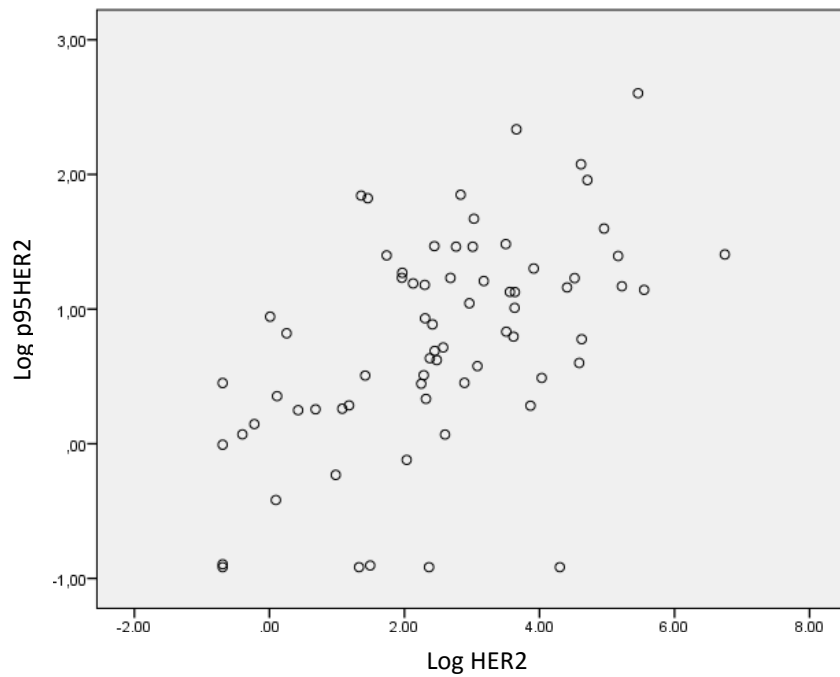


Figura 9.7(15). Correlación entre los valores de p95HER2 y HER2, en base logarítmica.

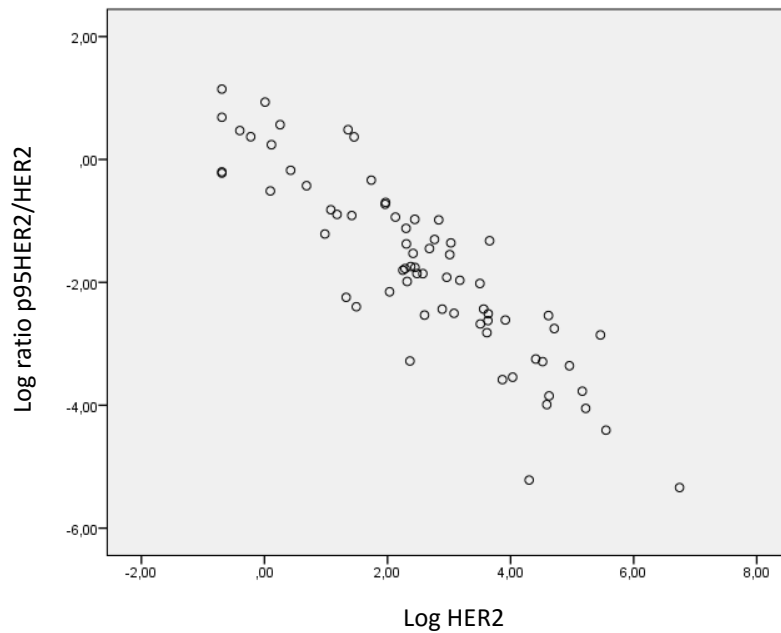


Figura 9.7(16). Correlación entre los valores de HER2 y la ratio p95HER2/HER2, en base logarítmica. En valores relativos, hay menos cantidad de p95HER2 cuanto más cantidad de HER2.

Curvas ROC para HER2 y p95HER2

Tampoco se ha podido hallar un *cut-off* significativo a partir del cual podamos discriminar los casos positivo/negativos en función de la cuantificación de HER2, p95HER2, ratio p95HER2/HER2 (áreas bajo la curva de 0.529 con $p=0.722$, 0.509 con $p = 0.915$, y 0.454 con $p = 0.579$, respectivamente).

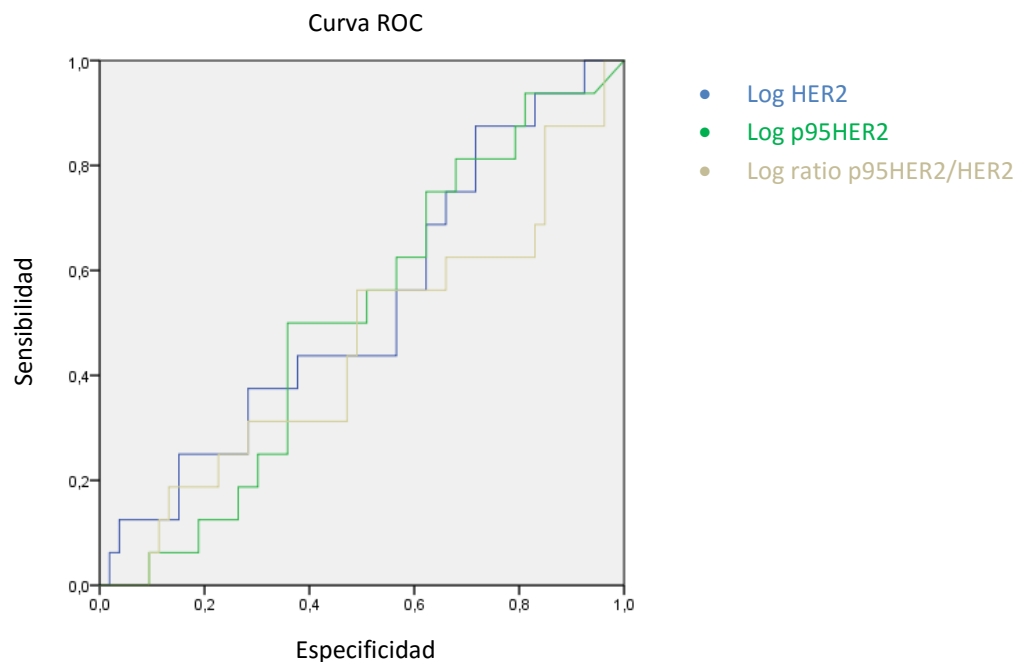


Figura 9.7(17). Curvas Roc para los logaritmos de HER2, p95HER2, y ratio p95HER2/HER2.

10
**Supervivencia
y supervivencia libre
de progresión (SLP)**

10. Supervivencia y supervivencia libre de progresión (SLP)

10.1. Población global y en función del sexo

La mediana de supervivencia de toda la población incluida en el estudio es de 12.71 meses (IC 95% 10.30 – 15.13), y la mediana de SLP es de 7.26 meses (IC 95% 6.71 – 7.81).

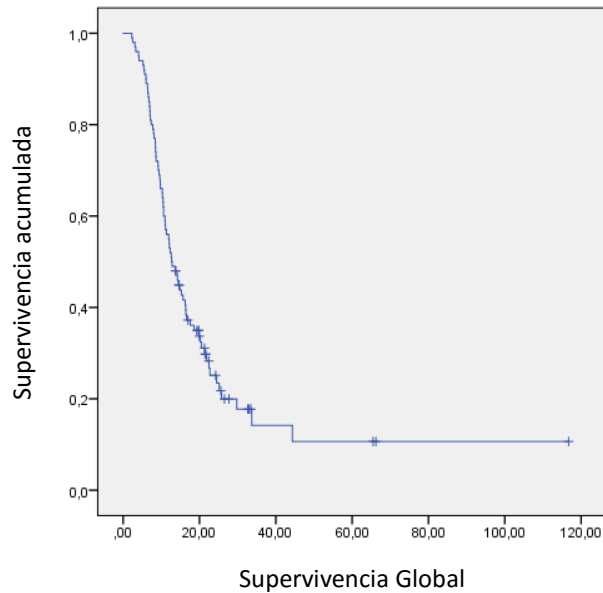


Figura 10.1(1). Curva de supervivencia de la población total incluida en el estudio.

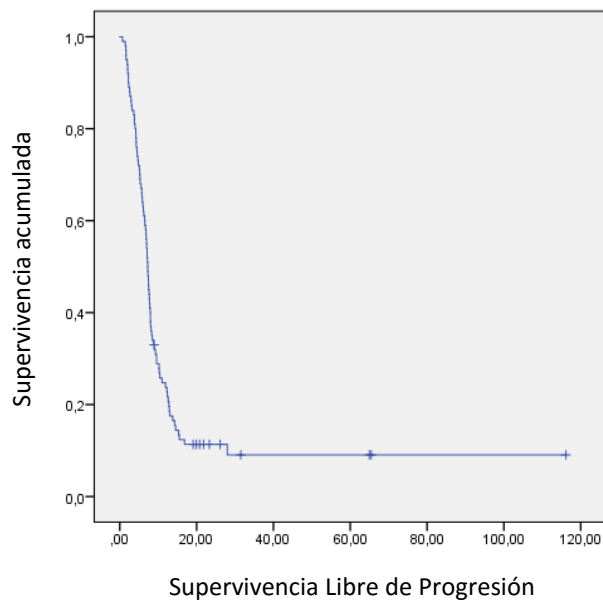


Figura 10.1(2). Curva de SLP de la población total incluida en el estudio.

No hay diferencias en supervivencia ni en SLP en función del sexo ($p = 0.575$ y $p = 0.882$ respectivamente, test de Mantel-Cox). La mediana de supervivencia en hombres es de 14.42 meses (IC 95% 10.45 – 18.40), y en mujeres de 11.93 meses (IC 95% 9.08 – 14.77). La mediana de SLP en hombres es de 7.29 meses (IC 95% 6.80 – 7.79), y en mujeres de 6.97 meses (IC 95% 3.91 – 10.02).

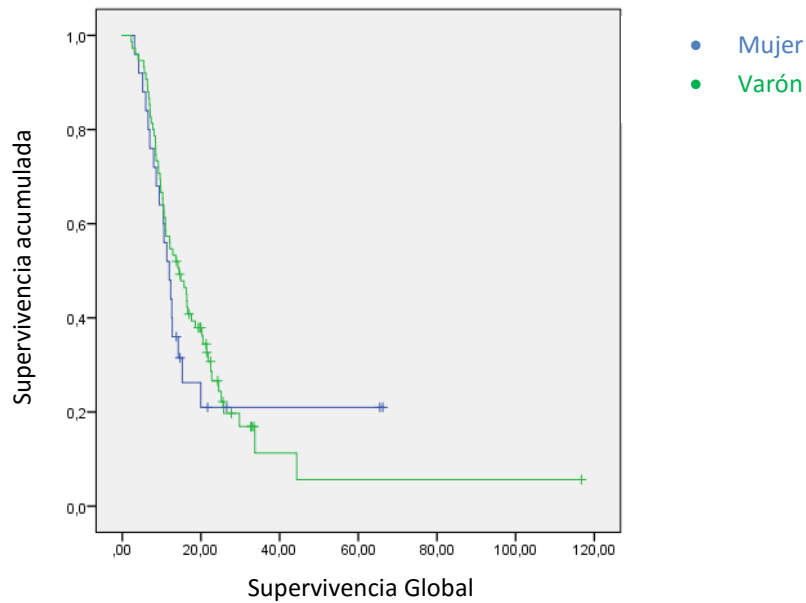


Figura 10.1(3). Curvas de supervivencia en función del sexo, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.575$).

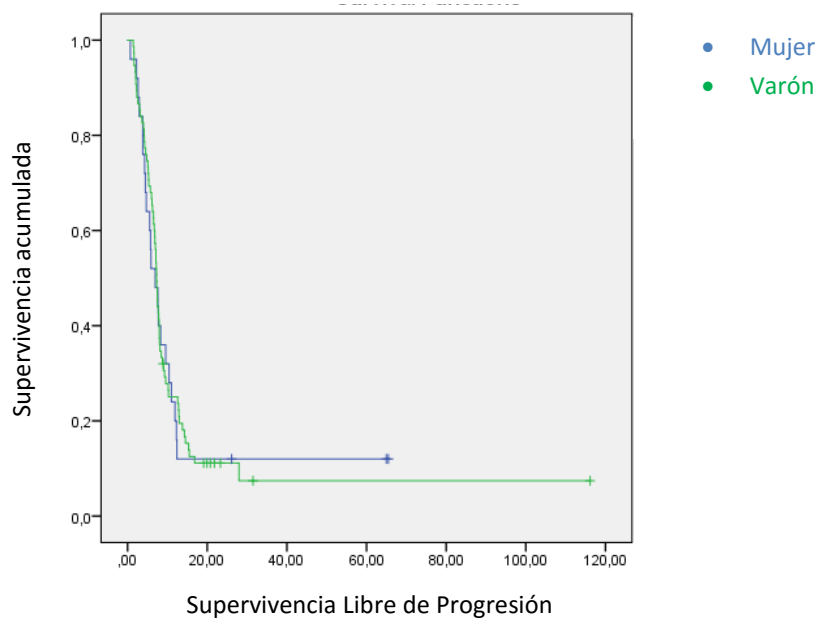


Figura 10.1(4). Curvas de SLP en función del sexo, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.882$).

10.2. Localización del tumor primario

En cuanto a la localización del tumor primario, no existen diferencias estadísticamente significativas en supervivencia ($p = 0.925$, test Mantel-Cox); la mediana de supervivencia es de 12.58 meses (IC 95% 9.49 – 15.67) en CG, y de 14.16 meses (IC 95% 7.61 – 20.71) en CUGE. En cambio, sí que existen diferencias en cuanto a la SLP ($p = 0.024$, test Mantel-Cox); la mediana de SLP es de 7.69 meses (IC 95% 7.02 – 8.36) en CG, y de 6.83 meses (IC 95% 6.26 – 7.41) en CUGE.

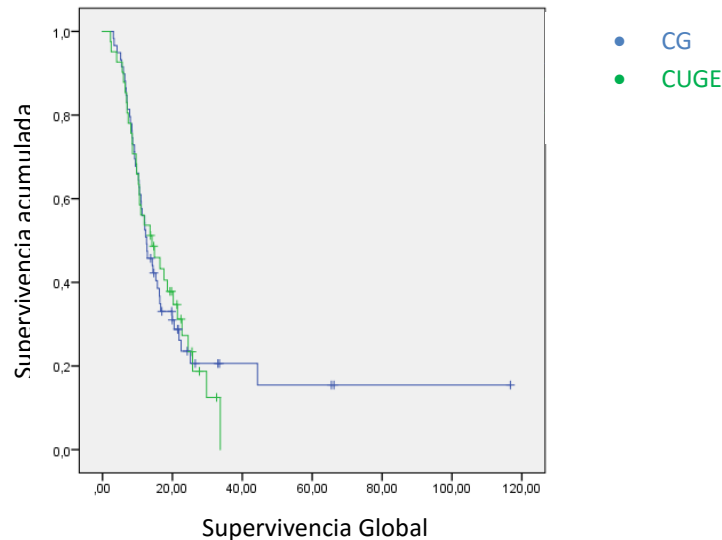


Figura 10.2(1). Curvas de supervivencia en función de la localización del tumor primario, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.925$).

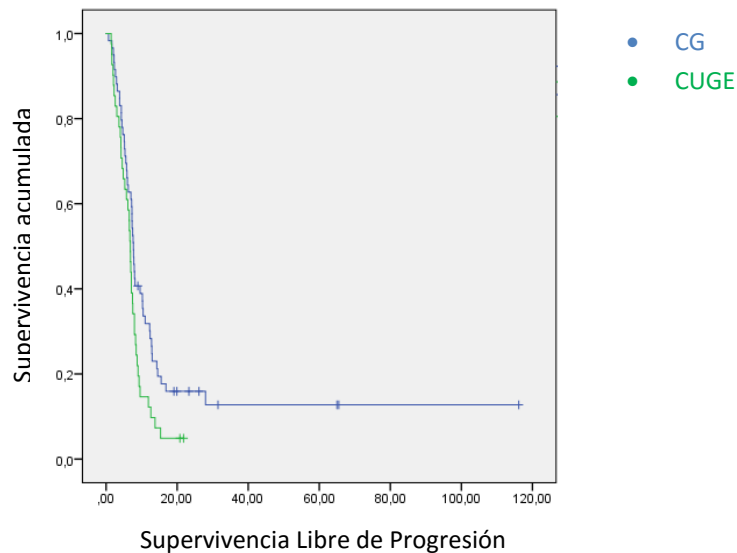


Figura 10.2(2). Curvas de SLP en función de la localización del tumor primario, con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.024$). La SLP es de 7.69 meses en CG, y de 6.83 meses en CUGE.

10.3. Tipo y grado histológico

En cuanto a la histología, no se evidencian diferencias estadísticamente significativas ni en supervivencia ni en SLP ($p = 0.377$ y $p = 0.607$ respectivamente, test Mantel-Cox). Los tumores de tipo intestinal presentan una supervivencia mediana de 14.23 meses (IC 95% 9.06 – 19.39), mientras que los de tipo difuso de 9.72 meses (IC 95% 5.96 – 13.49); y los tumores de tipo mixto de 12.58 meses (IC 95% 8.87 – 16.30). Con respecto a la SLP, la mediana es de 7.26 meses (IC 6.32 – 8.20) en el tipo intestinal, de 7.00 meses (IC 95% 4.40 – 9.59) en el tipo difuso, y de 7.49 meses (IC 95% 6.27 – 8.71) en el tipo mixto.

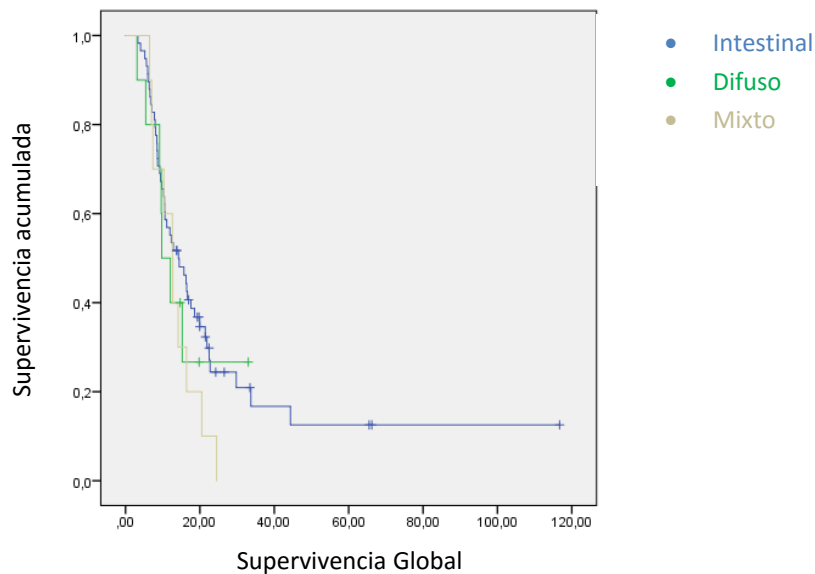


Figura 10.3(1). Supervivencia en función del subtipo histológico, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.377$).

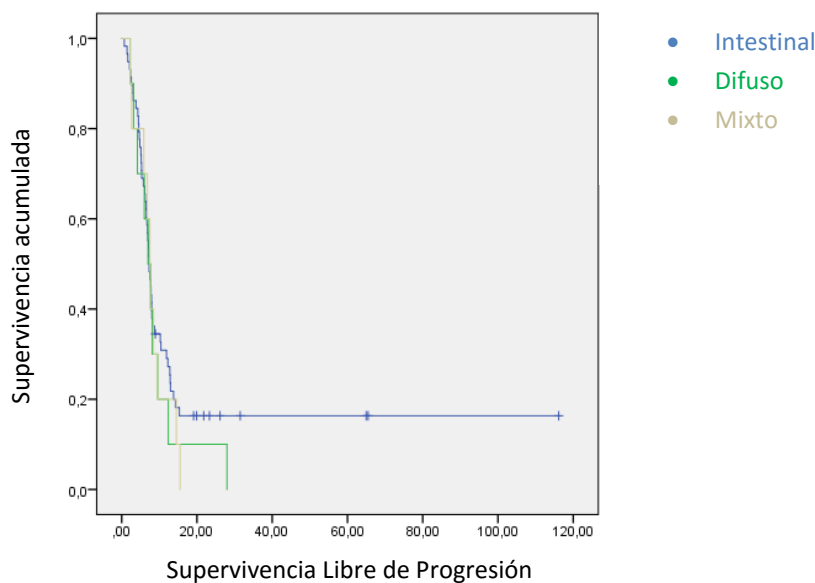


Figura 10.3(2). SLP en función del subtipo histológico, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.607$).

Atendiendo al grado histológico tumoral, tampoco existen diferencias estadísticamente significativas en supervivencia ni en SLP ($p = 0.370$ y $p = 0.399$ respectivamente, test Mantel-Cox). Los pacientes con tumores bien diferenciados presentan una supervivencia mediana de 22.73 meses (IC 95% 17.17 – 28.30), mientras que en aquellos con tumores moderadamente y mal diferenciados las medianas son inferiores: 15.70 meses (IC 95% 11.33 – 20.07) y 10.51 meses (IC 95% 8.26 – 12.77), respectivamente. En cuanto a la SLP, la mediana en los pacientes con tumores bien diferenciados es de 9.56 meses (IC 95% 2.55 – 16.57), en moderadamente diferenciados es de 7.82 meses (IC 95% 6.95 – 8.69), y en mal diferenciados es de 7.00 meses (IC 95% 5.08 – 8.91).

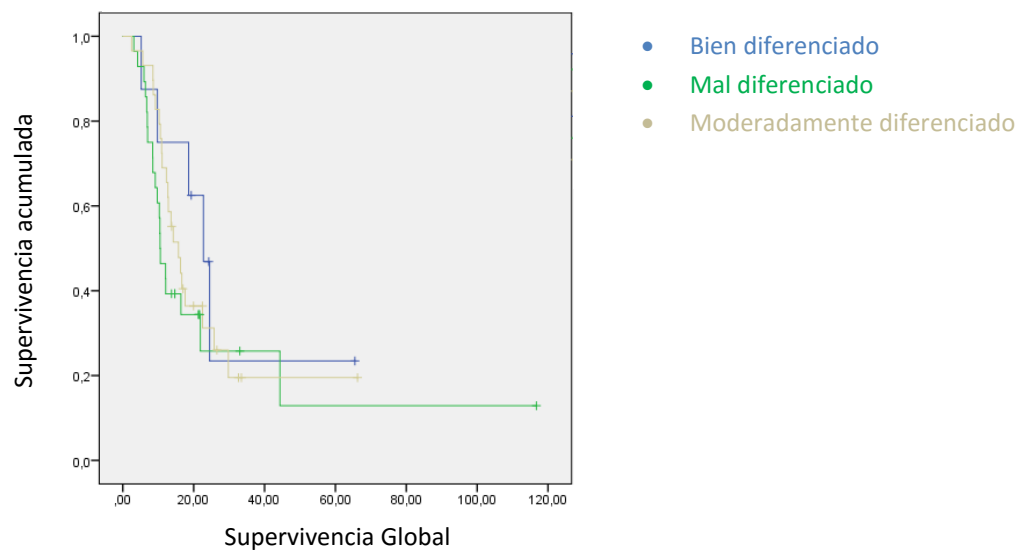


Figura 10.3(3). Supervivencia en función del grado tumoral, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.370$).

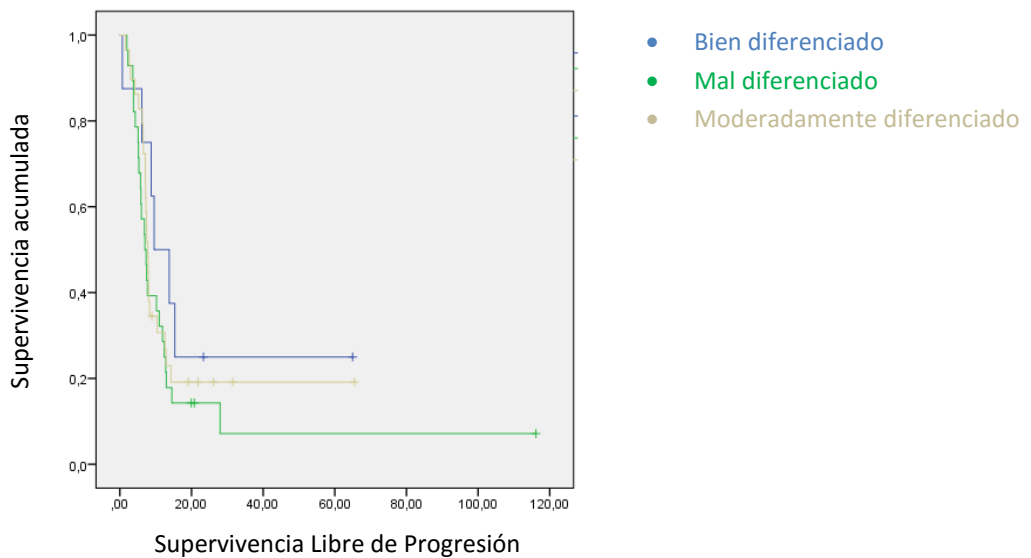


Figura 10.3(4). SLP en función del grado tumoral, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.399$).

10.4. Número de localizaciones metastásicas

Considerando el número de localizaciones metastásicas, los pacientes con sólo una localización metastásica no presentan una mejor supervivencia respecto a los demás ($p = 0.115$, test Mantel-Cox). La mediana de supervivencia es de 15.24 meses (IC 95% 11.56 – 18.93) para aquellos pacientes con sólo una localización metastásica, comparado con 11.01 meses (IC 95% 8.64 – 13.37) para los que debutan con > 1 localización metastásica.

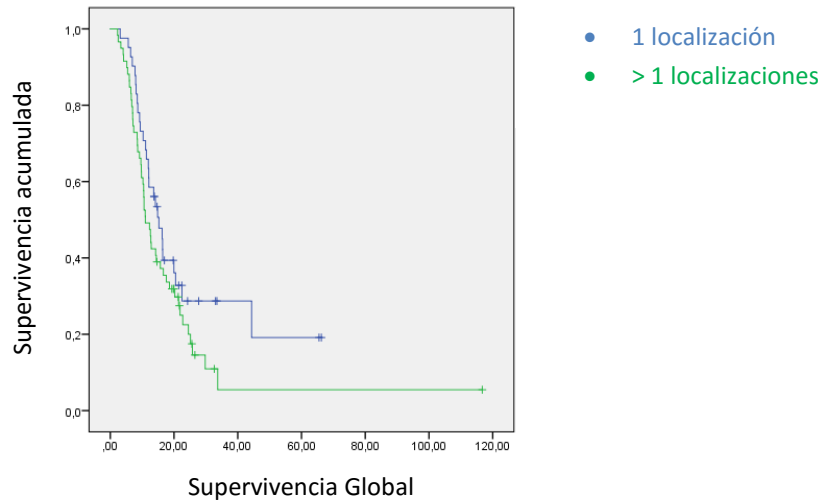


Figura 10.4(1). Supervivencia en función del número de localizaciones metastásicas, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.115$).

En cambio, sí presentan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la SLP ($p = 0.015$, test Mantel-Cox). La mediana de SLP de los pacientes con una única localización metastásica es de 8.48 meses (IC 95% 6.54 – 10.41), comparado con los 6.70 meses (IC 95% 5.78 – 7.62) en el resto de los pacientes.

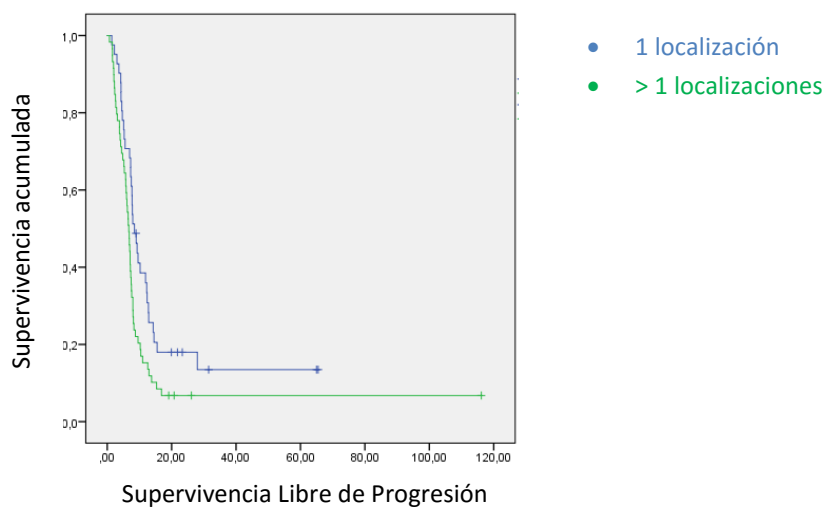


Figura 10.4(2). SLP en función de una o más localizaciones metastásicas, con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.015$). La SLP de los pacientes con una única localización metastásica es de 8.48 meses vs 6.70 meses en el resto de los pacientes.

10.5. Tipo de 1ª línea

Existen diferencias estadísticamente significativas (aunque muy discretas y probablemente sin significación clínica) en supervivencia entre los pacientes que realizan la 1ª línea dentro del ensayo clínico JACOB (12 pacientes) vs los demás ($p = 0.043$, test Mantel-Cox). La mediana de supervivencia en el grupo de pacientes tratados dentro del ensayo JACOB no se ha podido estimar dado que la gran mayoría de los pacientes siguen vivos, y la mediana en los demás pacientes es de 12.32 meses (IC95% 9.50 – 15.14).

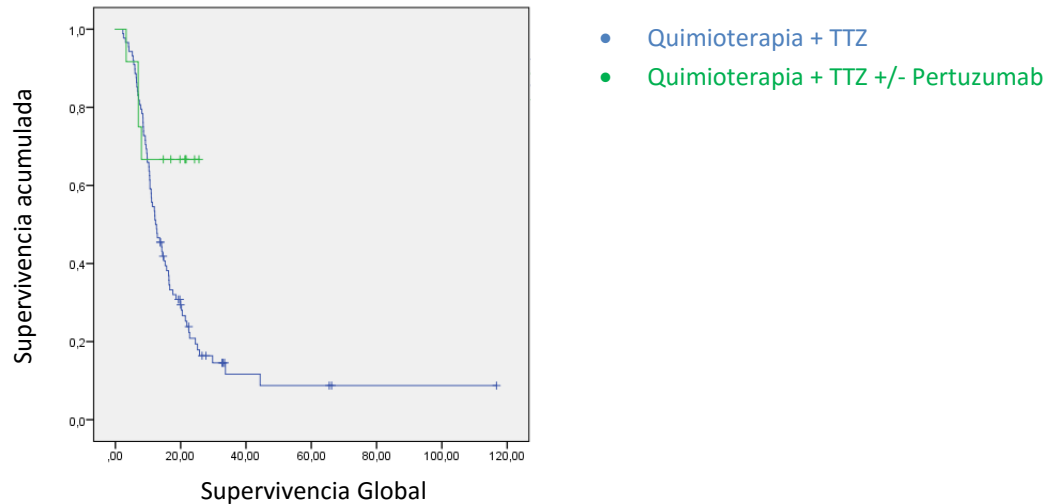


Figura 10.5(1). Curvas de supervivencia en función del tratamiento recibido (ensayo clínico JACOB sí vs no), con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.043$).

Sin embargo, no se evidencian diferencias significativas en cuanto a la SLP ($p = 0.260$, test Mantel-Cox). Los pacientes tratados dentro del ensayo clínico JACOB presentan una mediana de SLP de 7.82 meses (IC 95% 3.97 – 11.67), mientras que en los demás de 7.19 meses (IC 95% 6.62 – 7.77).

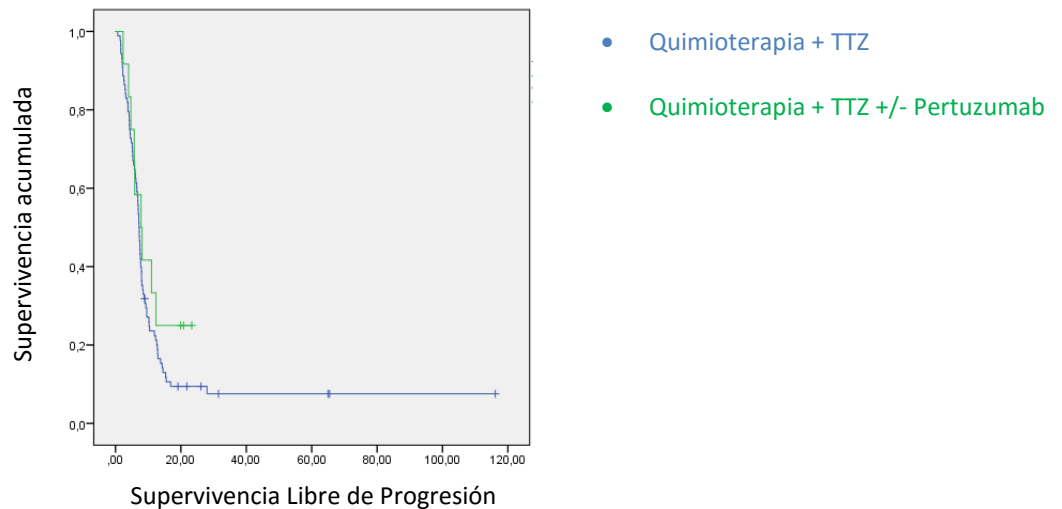


Figura 10.5(2). SLP en función del tratamiento recibido (ensayo clínico JACOB sí vs no), no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.260$).

10.6. Tipo de respuesta al tratamiento

Como cabía esperar, existen claras diferencias en función de la respuesta al tratamiento ($p = 0.000$, test de Mantel-Cox). En supervivencia, la mediana en los pacientes con respuesta completa es de 44.35 meses (IC 95% no se ha podido estimar dado que la mayoría de los pacientes siguen vivos), en los pacientes con respuesta parcial es de 16.26 meses (IC 95% 11.67 – 20.85), en los pacientes con estabilidad es de 10.97 meses (IC 95% 9.79 – 12.16), y en aquellos con progresión es de 7.10 meses (IC 95% 5.97 – 8.22).

Igualmente, en SLP se evidencian diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.000$, test de Mantel-Cox). Los pacientes con respuesta parcial, estabilidad y progresión presentan medianas y progresión presentan medianas de 7.95 meses (IC 95% 7.19 – 8.71), 6.50 meses (IC 95% 5.42 – 7.58), y 2.56 meses (IC 95% 1.93 – 3.19), respectivamente. La mediana de SLP en los pacientes con respuesta completa no se ha podido estimar dado que la mayoría de ellos no han progresado.

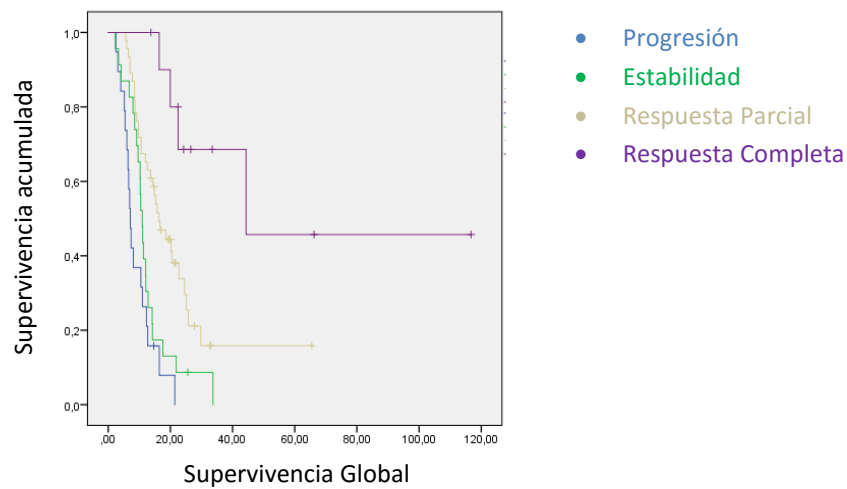


Figura 10.6(1). Diferencias en supervivencia en función de la respuesta al tratamiento de primera línea, estadísticamente significativas ($p = 0.000$).

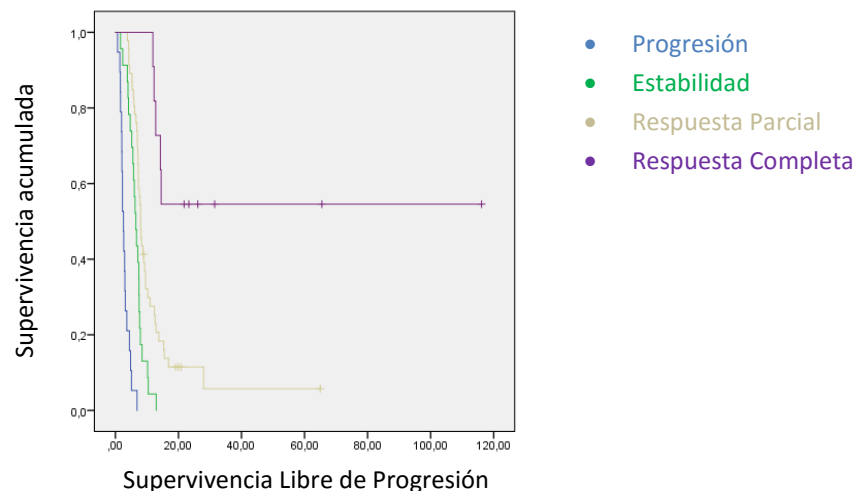


Figura 10.6(2). Diferencias en SLP en función del tipo de respuesta al tratamiento de primera línea estadísticamente significativas ($p = 0.000$).

Considerando la tasa de control de la enfermedad, y en la misma línea que el análisis del apartado anterior, también existen diferencias singificativas en cuanto a la supervivencia y a la SLP ($p = 0.000$ y $p = 0.000$ respectivamente, test Mantel-Cox). Aquellos pacientes con control de la enfermedad presentan una mejor supervivencia (mediana de 16.26 meses, IC 95% 12.71 – 19.82) que los que no la presentan (mediana de 6.90 meses, IC 95% 5.72 – 8.08). La mediana de SLP es de 8.02 meses (IC 95% 7.05 – 8.99) en los pacientes con control de la enfermedad, y de 2.66 meses (IC 95% 1.70 – 3.63) en los demás.

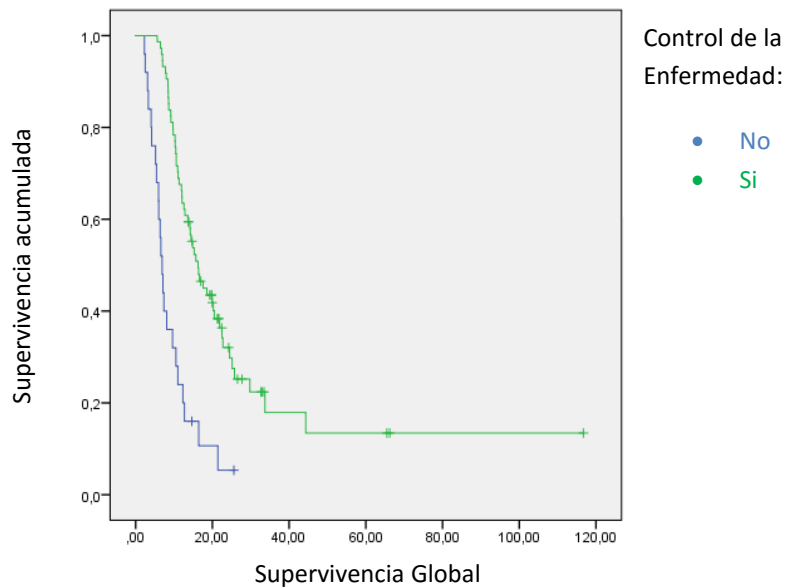


Figura 10.6(3). Diferencias en supervivencia en función del control de la enfermedad (sí vs no), estadísticamente significativas ($p = 0.000$).

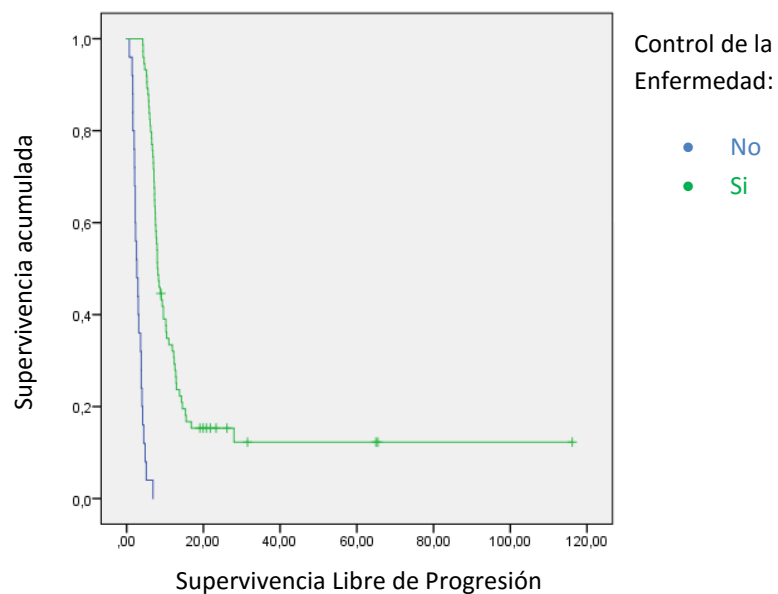


Figura 10.6(4). Diferencias en SLP en función del control de la enfermedad (sí vs no), estadísticamente significativas ($p = 0.000$).

10.7. Tipo de positividad de HER2

La supervivencia entre los pacientes HER2 positivos según IHQ 2+ vs 3+ no presenta diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.576$, test Mantel-Cox). La supervivencia mediana es de 13.63 meses (IC 95% 11.22 – 16.05) en los pacientes con IHQ 3+, y de 11.07 meses (IC 95% 7.96 – 14.18) en los pacientes con IHQ 2+. Tampoco se observan diferencias en SLP ($p = 0.210$, test Chi-Cuadrado). La SLP mediana es de 7.42 meses (IC 95% 6.76 – 8.09) en los pacientes con IHQ 3+, y 6.87 meses (IC 6.06 – 7.68) en los pacientes con IHQ2+.

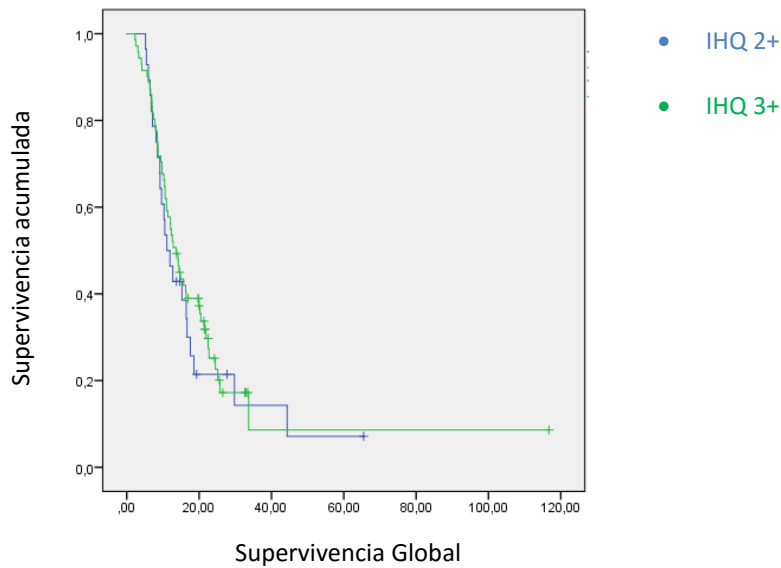


Figura 10.7(1). Supervivencia en función de la IHQ del HER2, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.576$).

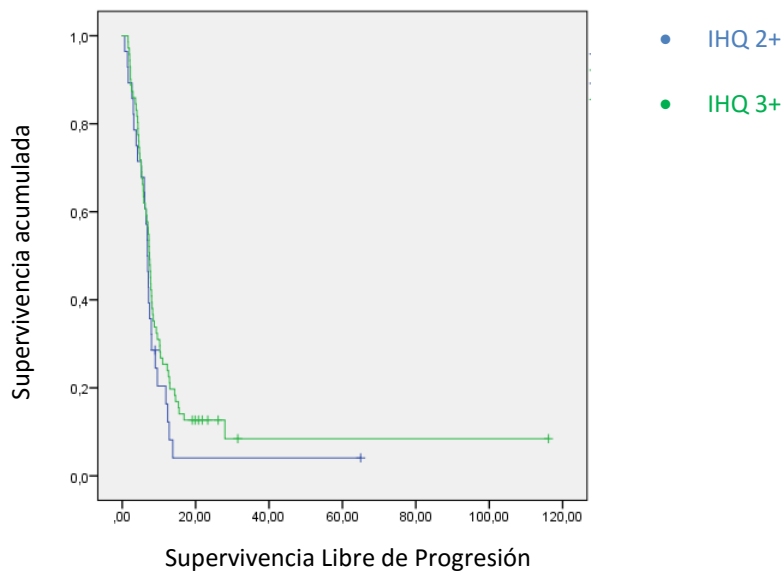


Figura 10.7(2). SLP en función de la positividad IHQ de HER2, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.210$).

10.8. Ciclina E

La supervivencia de los pacientes en función de la amplificación de la *ciclina E* es significativamente diferente ($p = 0.016$, test Mantel-Cox), aunque no lo es la SLP ($p = 0.309$, test Mantel-Cox).

Considerando la ratio $GEN/CEP \geq 2$, la supervivencia mediana de los pacientes con amplificación de la *ciclina E* es de 8.61 meses (IC 95% 7.31 – 9.91), mientras que para los demás es de 14.23 meses (IC 95% 10.60 – 17.85). La mediana de SLP en los pacientes con amplificación de la *ciclina E* es de 6.50 meses (IC 95% 3.57 – 9.44), y en los demás es de 7.49 meses (IC 95% 6.89 – 8.09).

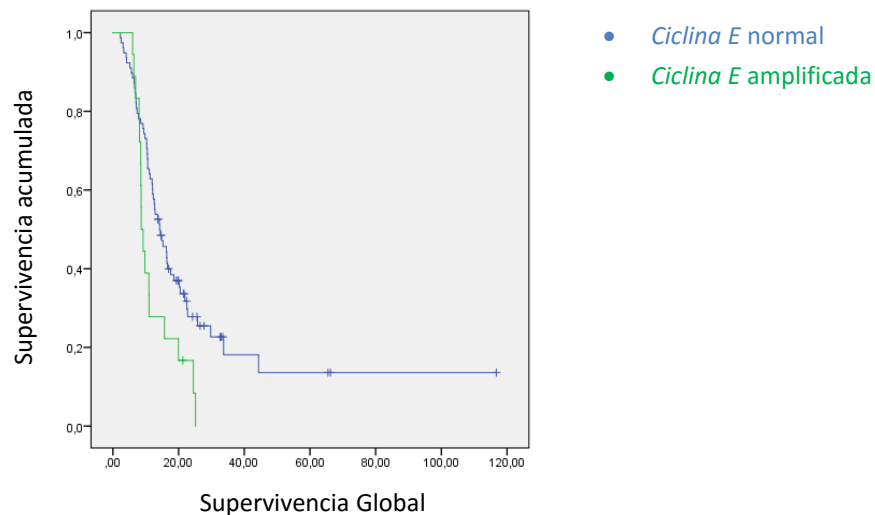


Figura 10.8(1). Curvas de supervivencia considerando la amplificación de la *ciclina E* según ratio $GEN/CEP \geq 0 < 2$, con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.016$). Mediana de 8.61 meses para los pacientes con amplificación de la *ciclina E*, y de 14.23 meses para los demás.

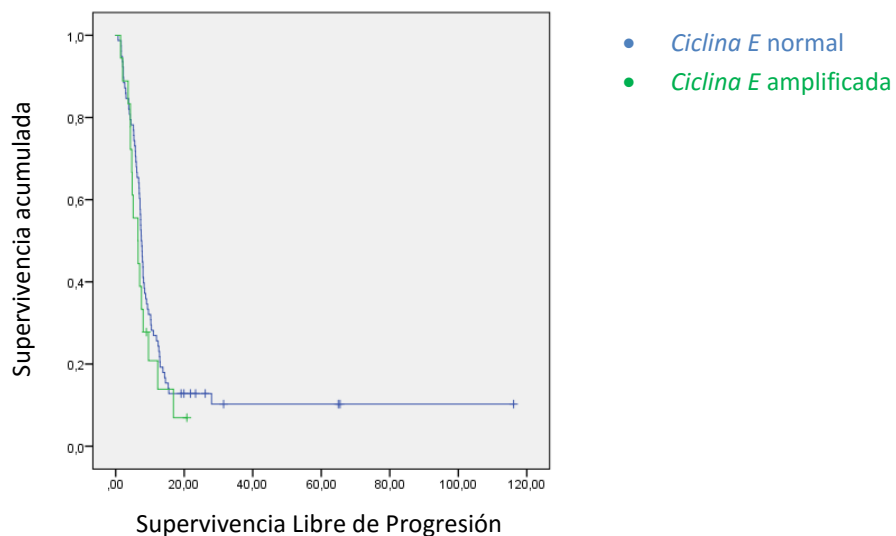


Figura 10.8(2). Curvas de SLP considerando la amplificación de la *ciclina E* según ratio $GEN/CEP \geq 0 < 2$, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.309$).

Considerando la amplificación según el número de copias del gen, las curvas en supervivencia también presentan diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.014$ y $p = 0.028$ según consideremos el punto de corte en 5 o 6 copias del gen, respectivamente; test Mantel-Cox). La supervivencia mediana según nº copias $\geq 0 < 5$ es de 9.20 meses (IC 95% 7.75 – 10.65) vs 14.23 meses (IC 95% 10.40 – 18.05), respectivamente. Según nº copias $\geq 0 < 6$, es de 9.20 meses (IC 95% 7.85 – 10.55) vs 14.16 meses (IC 95% 11.39 – 16.93), respectivamente.

La SLP en estos casos no presenta diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.255$ y $p = 0.331$ según consideremos el punto de corte en 5 o 6 copias del gen, respectivamente; test Mantel-Cox). La mediana de SLP según nº copias $\geq 0 < 5$ es de 6.54 meses (IC 95% 4.26 – 8.82) vs 7.49 meses (IC 95% 6.99 – 7.99), respectivamente; y según nº copias $\geq 0 < 6$ es de 6.54 meses (IC 95% 4.34 – 8.74) vs 7.49 meses (IC 95% 6.94 – 8.04), respectivamente.

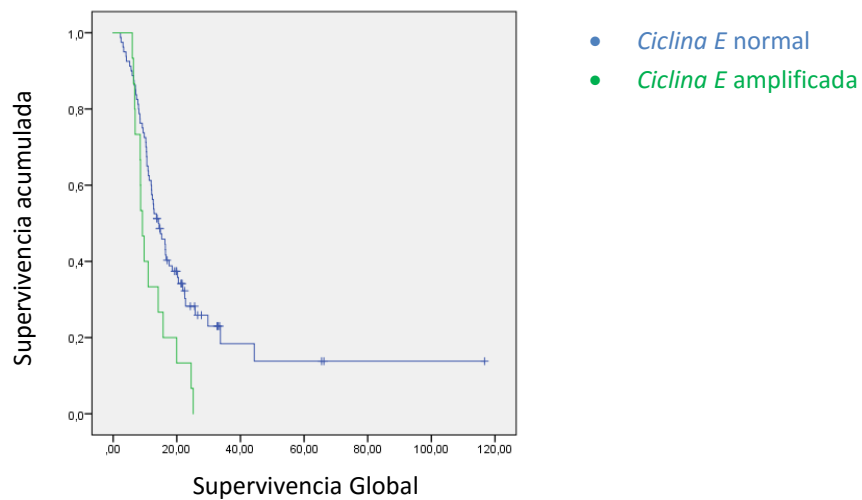


Figura 10.8(3). Curvas de supervivencia considerando la amplificación de la *ciclina E* según $\geq 0 < 5$ copias del gen, con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.014$). La supervivencia mediana según nº copias $\geq 0 < 5$ es de 9.20 meses vs 14.23 meses, respectivamente.

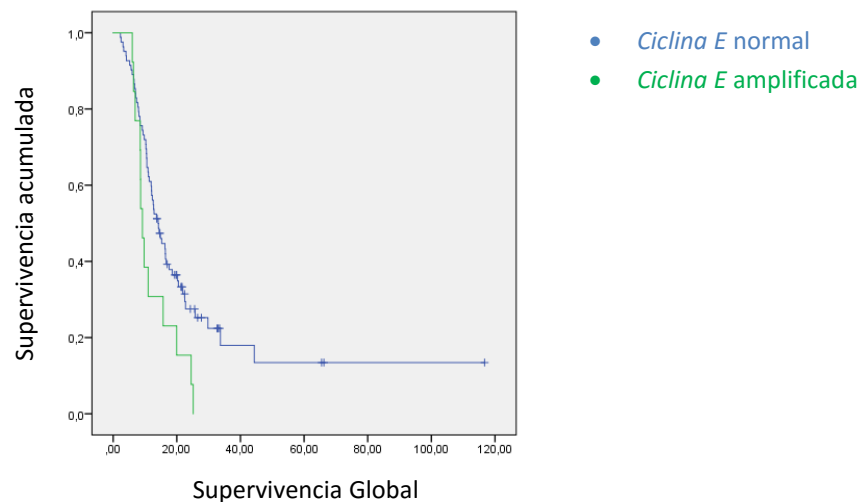


Figura 10.8(4). Curvas de supervivencia considerando la amplificación de la *ciclina E* según $\geq 0 < 6$ copias del gen, con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.028$). La supervivencia mediana según nº copias $\geq 0 < 6$ es de 9.20 meses vs 14.16 meses, respectivamente.

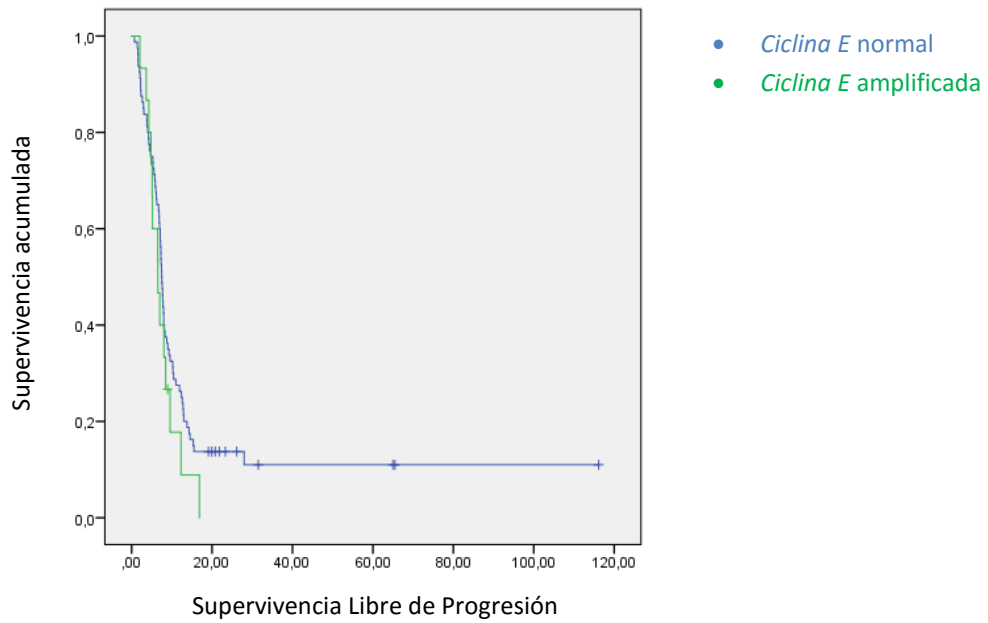


Figura 10.8(5). Curvas de SLP considerando la amplificación de la *ciclina E* según \geq o $<$ 5 copias del gen, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.255$).

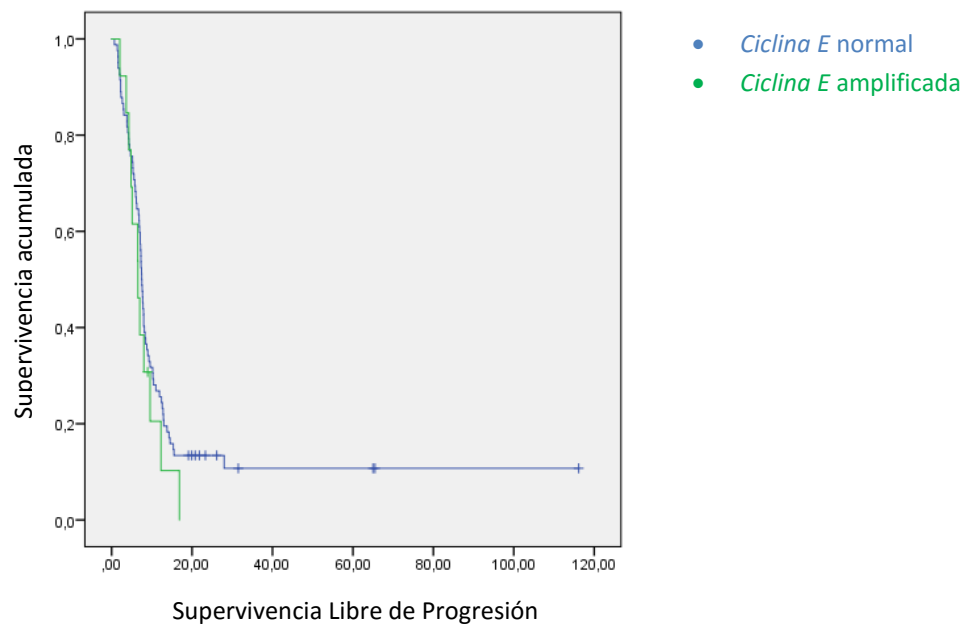


Figura 10.8(6). Curvas de SLP considerando la amplificación de la *ciclina E* según \geq o $<$ 5 copias del gen, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.331$).

10.9. Ciclina D1

No se hallan diferencias significativas en supervivencia ni en SLP en función de la amplificación de la *ciclina D1* considerando los casos amplificados por una ratio GEN/CEP ≥ 2 ($p = 0.225$ y $p = 0.682$ respectivamente, test Mantel-Cox).

La supervivencia mediana es de 11.93 meses (IC 95% 3.479 – 20.06) en los pacientes con amplificación de la *ciclina D1*, y de 13.71 meses (IC 95% 9.27 – 16.16) en aquellos sin dicha amplificación. La SLP mediana es de 6.96 meses (IC 95% 4.73 – 9.20) en los pacientes con amplificación de la *ciclina D1*, y de 7.29 meses (IC 95% 6.67 – 7.91) en el resto.

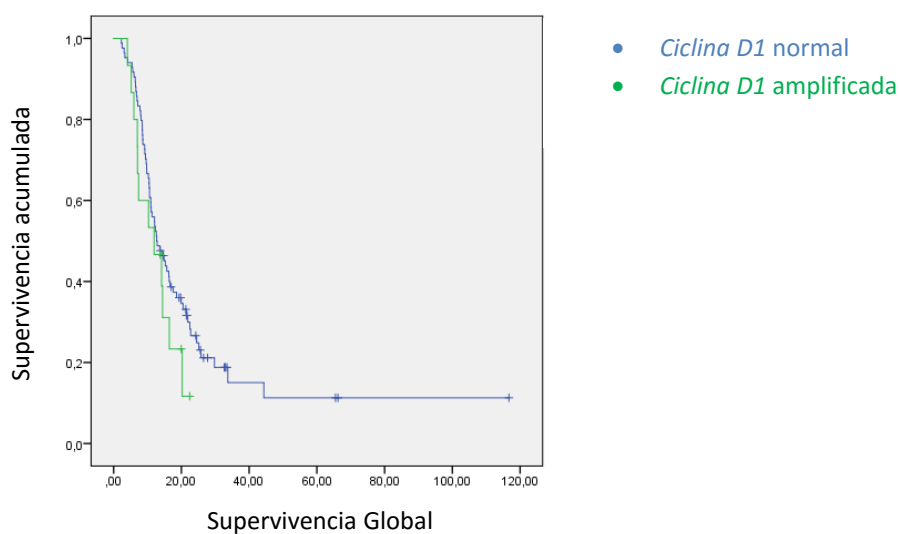


Figura 10.9(1). Curvas de supervivencia considerando la amplificación de la *ciclina D1* (según ratio GEN/CEP $\geq 0 < 2$), no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.225$).

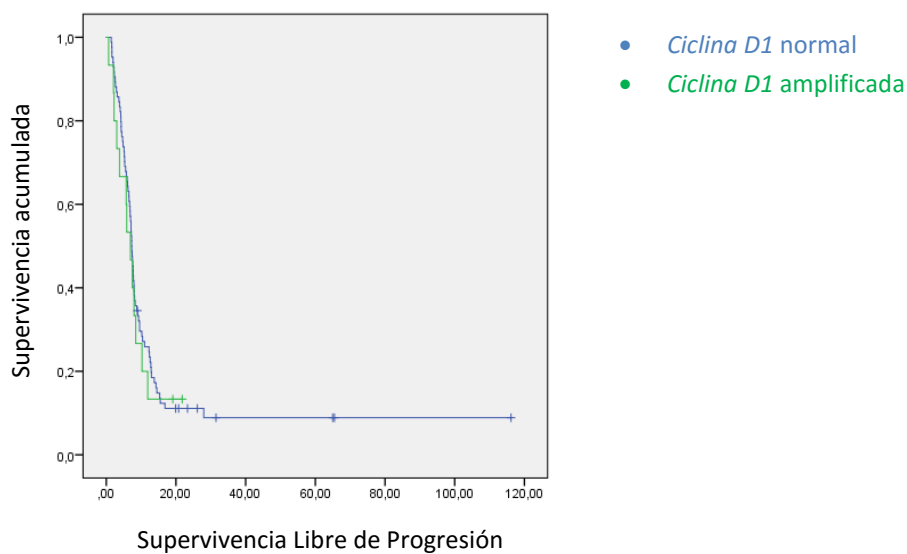


Figura 10.9(2). Curvas de SLP considerando la amplificación de la *ciclina D1* (según ratio GEN/CEP $\geq 0 < 2$), no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.682$).

Si consideramos la amplificación según el número de copias del gen, tampoco existen diferencias en cuanto a la supervivencia ($p = 0.637$ y $p = 0.880$ según consideremos el punto de corte en 5 o 6 copias del gen, respectivamente; test Mantel-Cox) ni a la SLP ($p = 0.824$ y $p = 0.983$ según consideremos el punto de corte en 5 o 6 copias del gen, respectivamente; test Mantel-Cox). La mediana de supervivencia según nº copias $\geq 0 < 5$ es de 11.93 meses (IC 95% 8.67 – 15.18) vs 12.85 meses (IC 95% 9.37 – 16.32), respectivamente; y la mediana en supervivencia según nº copias $\geq 0 < 6$ es de 12.09 meses (IC 95% 4.38 – 19.80) vs 12.71 meses (IC 95% 9.59 – 15.83), respectivamente. La mediana de SLP según nº copias $\geq 0 < 5$ es de 7.49 meses (IC 95% 5.68 – 9.30) vs 7.26 meses (IC 95% 6.60 – 7.92), respectivamente; y según nº copias $\geq 0 < 6$ es de 7.95 meses (IC 95% 3.77 – 12.13) vs 7.26 meses (IC 95% 6.73 – 7.79), respectivamente.

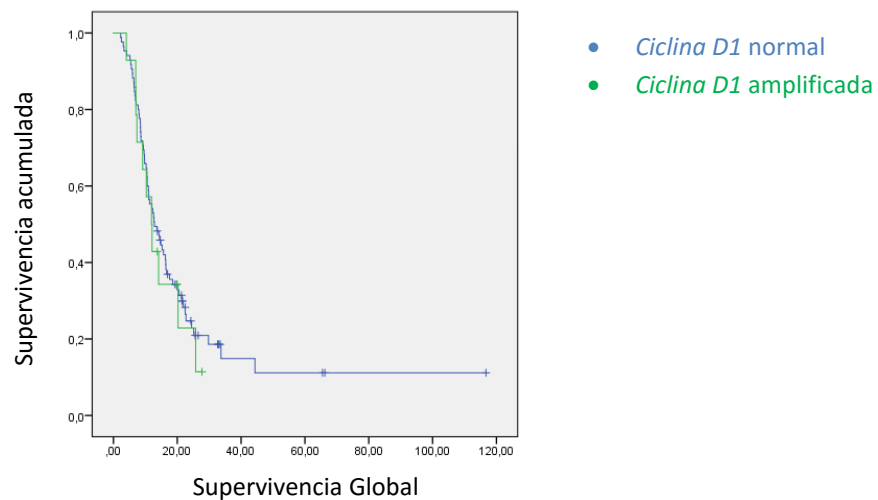


Figura 10.9(3). Curvas de supervivencia considerando la amplificación de la *ciclina D1* según $\geq 0 < 5$ copias del gen, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.637$).

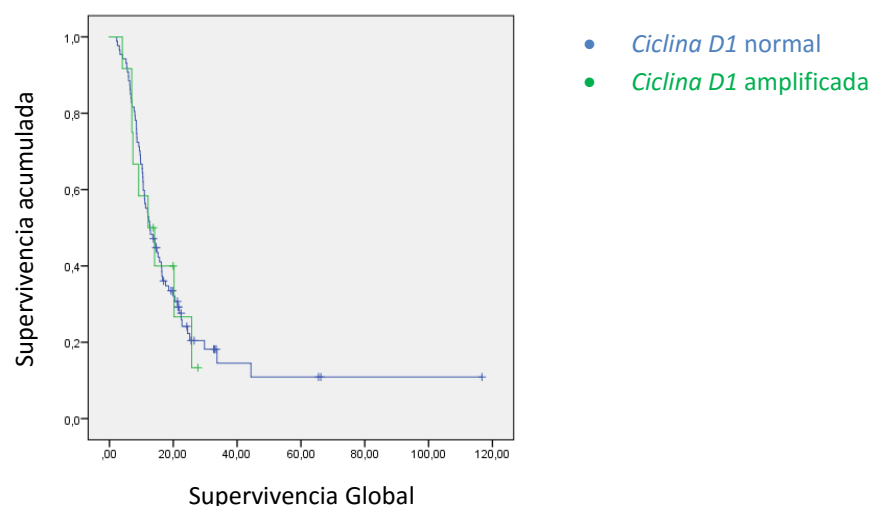


Figura 10.9(4). Curvas de supervivencia considerando la amplificación de la *ciclina D1* según $\geq 0 < 6$ copias del gen, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.880$).

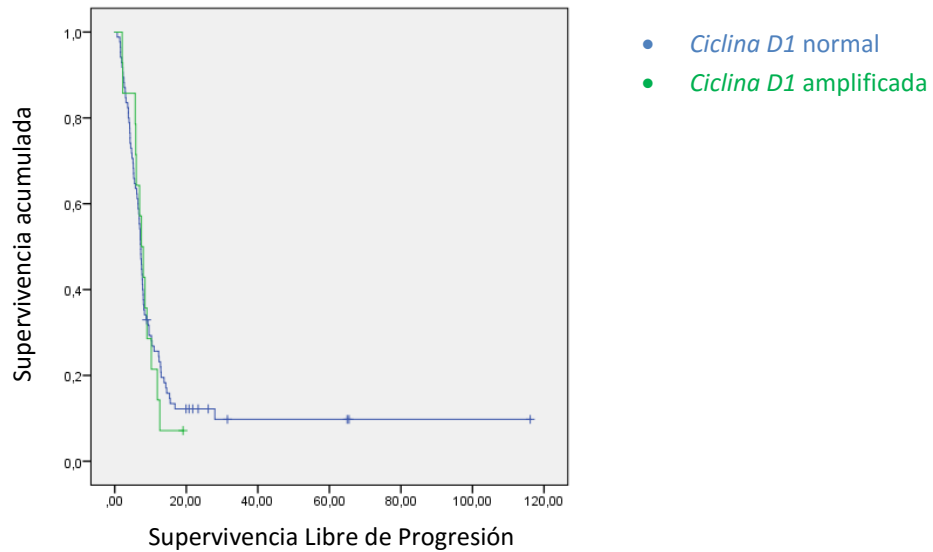


Figura 10.9(5). Curvas de SLP considerando la amplificación de la *ciclina D1* según \geq o $<$ 5 copias del gen, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.824$).

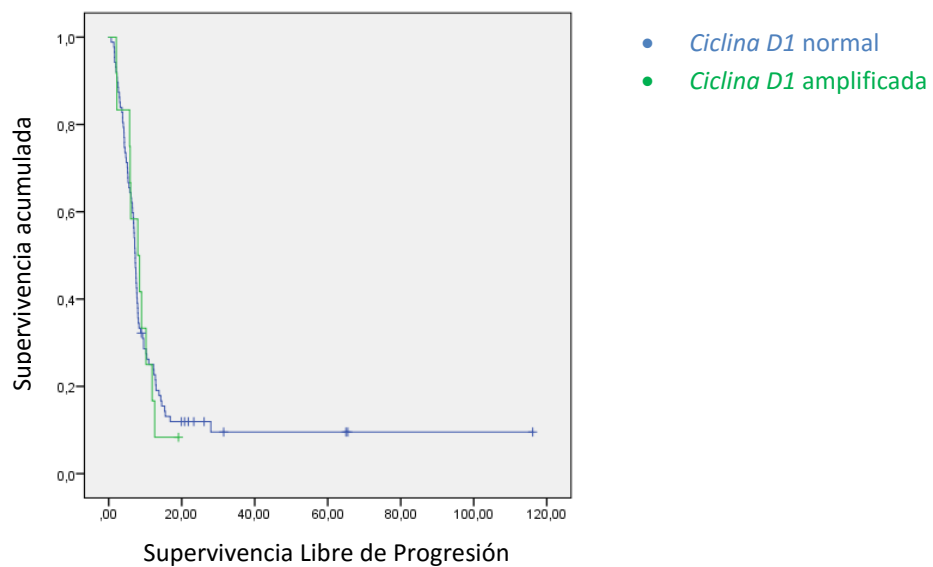


Figura 10.9(6). Curvas de SLP considerando la amplificación de la *ciclina D1* según \geq o $<$ 6 copias del gen, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.983$).

10.10. PIK3CA

Considerando su amplificación según $\text{ratio GEN/CEP} \geq 2$, no se hallan diferencias significativas en función de la amplificación de *PIK3CA* en supervivencia ni en SLP ($p = 0.476$ y $p = 0.319$, test Mantel-Cox).

La supervivencia mediana de los pacientes con amplificación de *PIK3CA* es de 14.23 meses (IC 95% 4.97 – 23.48), vs 12.58 meses (IC 95% 9.64 – 15.52) en los demás. La SLP de los pacientes con amplificación de *PIK3CA* es de 10.41 meses (IC 95% 0.58 – 20.25), versus 7.26 meses (IC 95% 6.72 – 7.80) en el resto.

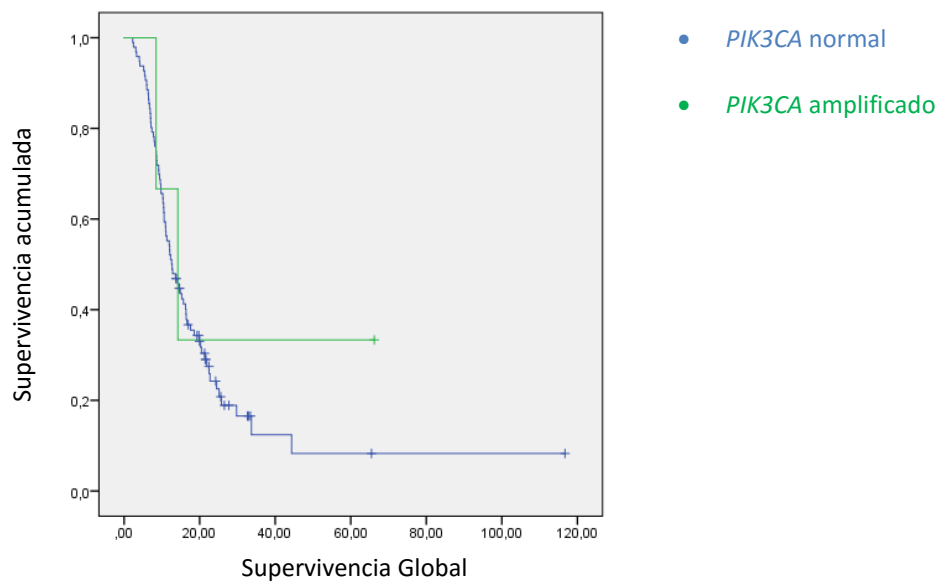


Figura 10.10(1). Curvas de supervivencia considerando la amplificación de *PIK3CA* según ratio GEN/CEP \geq o $<$ 2, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.476$).

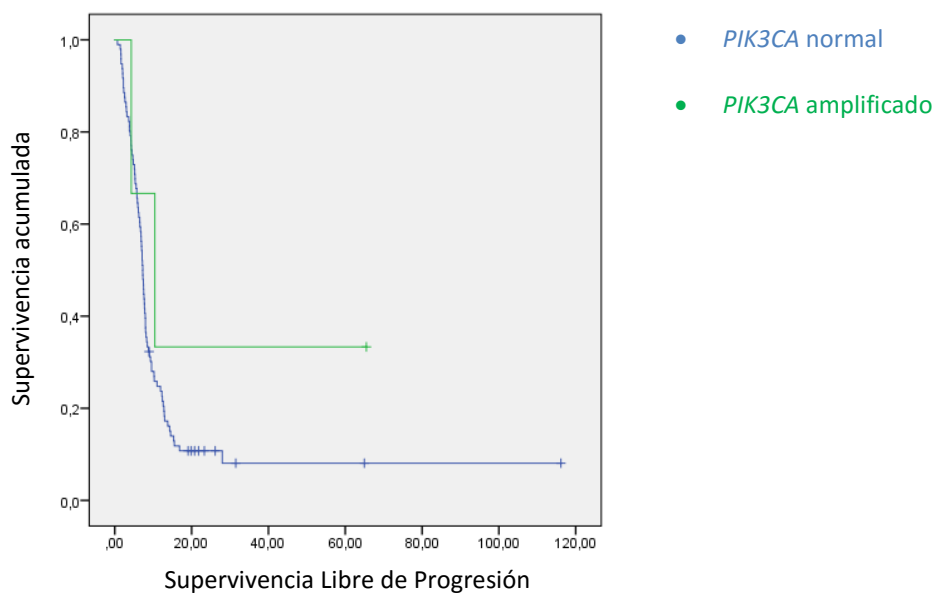


Figura 10.10(2). Curvas de SLP considerando la amplificación de *PIK3CA* según ratio GEN/CEP \geq o $<$ 2, no existen diferencias estadísticamente significativas, ($p = 0.319$).

Considerando su amplificación según el número de copias del gen (≥ 5 y ≥ 6), tampoco se hallan diferencias significativas en supervivencia ($p = 0.582$ y $p = 0.368$ según consideremos el punto de corte en 5 o 6 copias del gen, test Mantel-Cox) y ni en SLP ($p = 0.336$ y $p = 0.225$ según consideremos el punto de corte en 5 o 6 copias del gen, test Mantel-Cox)

La supervivencia mediana según nº copias \geq o $<$ 5 es de 12.58 meses (IC 95% 8.17 – 17.00) vs 12.32 meses (IC 95% 9.17 – 15.47), respectivamente; y la supervivencia mediana según nº

copias $\geq 0 < 6$ es de 14.23 meses (IC 95% 11.60 – 16.85) vs 12.32 meses (IC 95% 9.38 – 15.26), respectivamente.

La mediana de SLP según nº copias $\geq 0 < 5$ es de 7.62 meses (IC 95% 4.27 – 10.97) vs 7.19 meses (IC 95% 6.57 – 7.82), respectivamente; y según nº copias $\geq 0 < 6$ es de 10.41 meses (IC 95% 5.95 – 14.88) vs 7.19 meses (IC 95% 6.62 – 7.77), respectivamente.

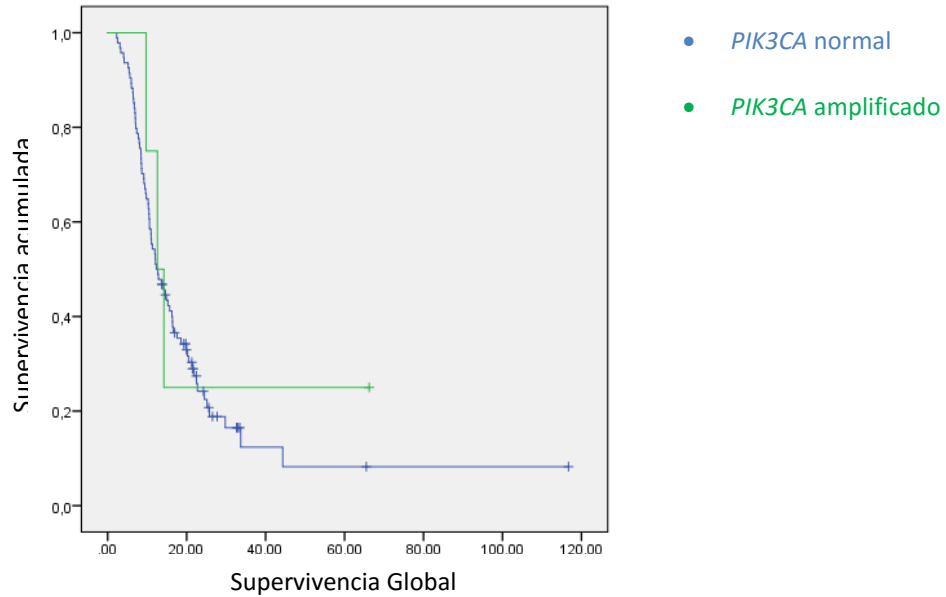


Figura 10.10(3). Curvas de supervivencia considerando la amplificación de *PIK3CA* según $\geq 0 < 5$ copias del gen, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.582$).

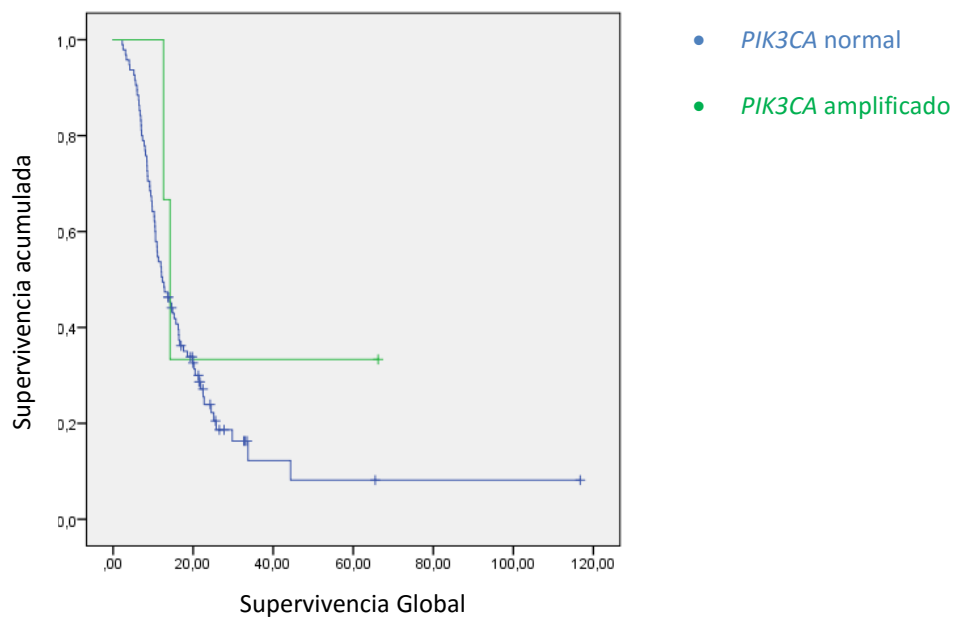


Figura 10.10(4). Curvas de supervivencia considerando la amplificación de *PIK3CA* según $\geq 0 < 6$ copias del gen, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.368$).

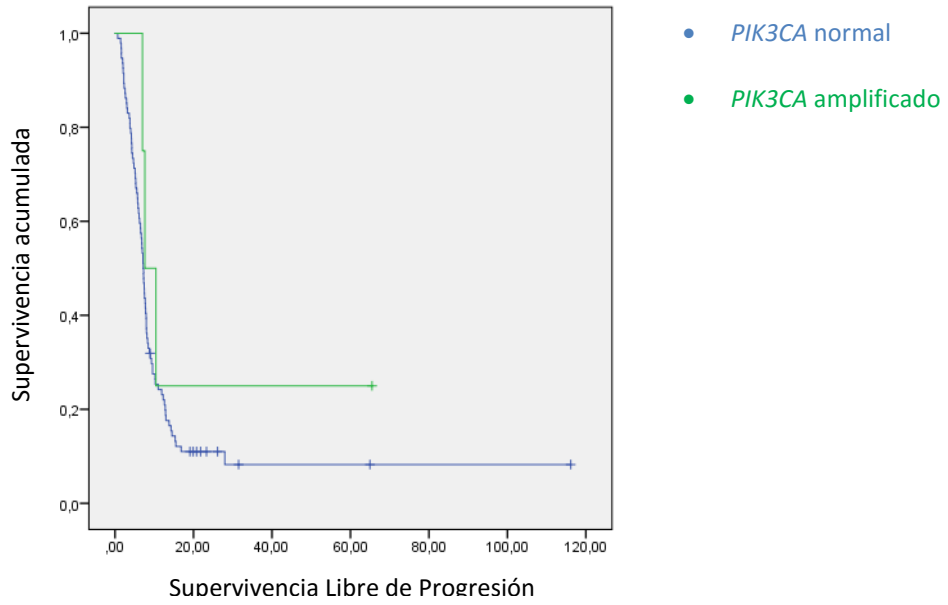


Figura 10.10(5). Curvas de SLP considerando la amplificación *PIK3CA* según \geq o $<$ 5 copias del gen, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.336$).

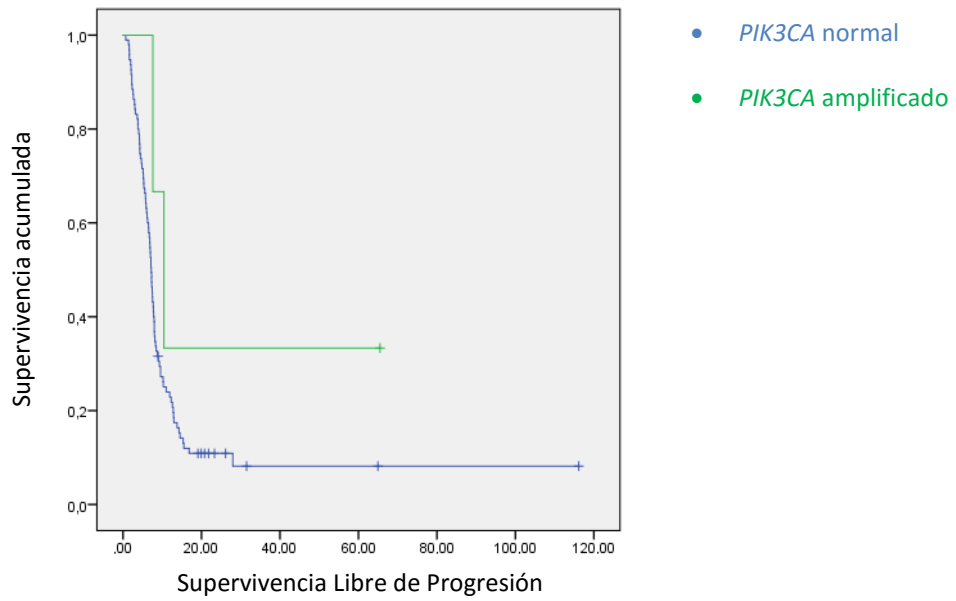


Figura 10.10(6). Curvas de SLP considerando la amplificación *PIK3CA* según \geq o $<$ 6 copias del gen, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.225$).

10.11. PTEN

La supervivencia de los pacientes es independiente del estado de PTEN ($p = 0.801$, test Mantel-Cox). Los pacientes con PTEN alto - bajo - nulo tienen una mediana de supervivencia de 12.85 meses (IC 95% 9.08 – 16.61) – 12.71 meses (IC 95% 5.98 – 19.45) – 12.32 (IC 95% 7.62 – 17.02), respectivamente.

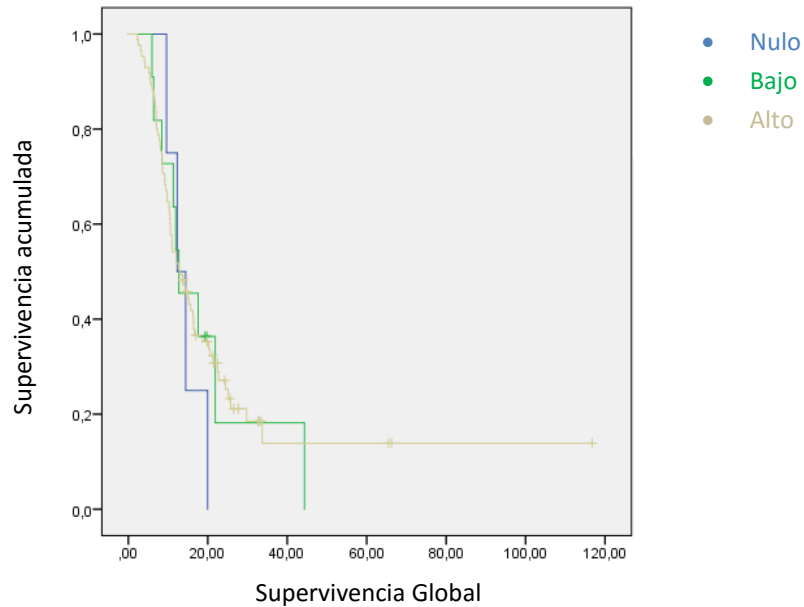


Figura 10.11(1). Supervivencia según estado de PTEN, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.801$).

La SLP también es independiente del estado de PTEN ($p = 0.477$, test Mantel-Cox). La mediana de SLP según PTEN alto – bajo – nulo es de 7.42 meses (IC 95% 6.86 – 7.99) – 5.55 meses (IC 95% 3.57 – 7.54) – 4.17 meses (IC 95% 0.00 – 11.35), respectivamente.

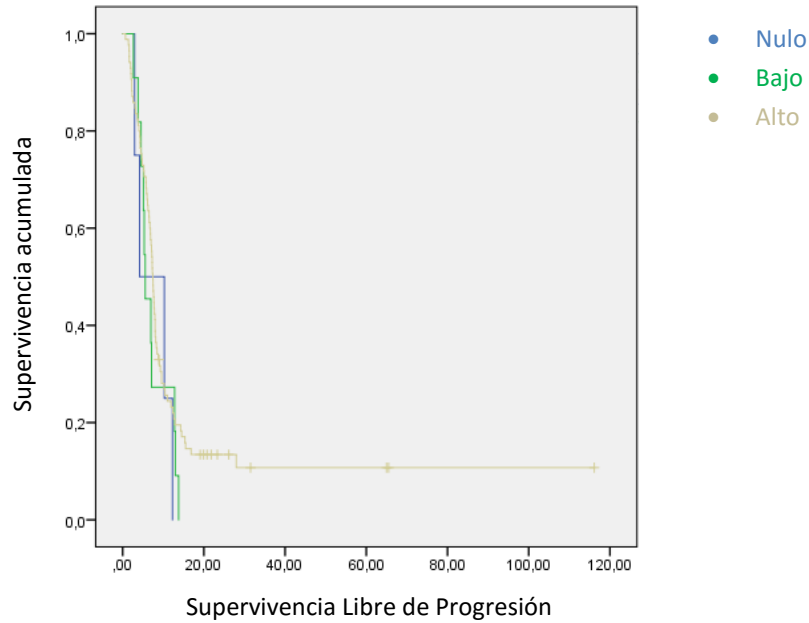


Figura 10.11(2). SLP según estado de PTEN, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.477$).

Considerando sólo dos valores de PTEN: positivo vs nulo, tampoco se hallan diferencias significativas en supervivencia ($p = 0.510$, test Mantel-Cox) ni en SLP ($p = 0.623$, test Mantel-Cox). La mediana de supervivencia en los pacientes con PTEN positivo y nulo es de 12.71 meses (IC 95% 9.40 – 16.03) y 12.32 meses (IC 95% 7.62 – 17.02), respectivamente. La mediana de SLP en los pacientes con PTEN positivo y nulo es de 7.26 meses (IC 95% 6.72 – 7.80) y 4.17 meses (IC 95% 0.00 – 11.35), respectivamente.

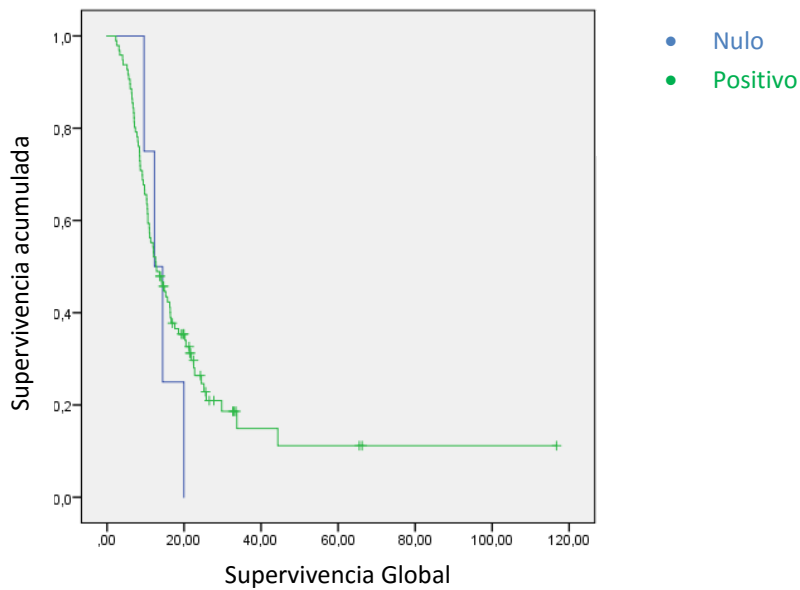


Figura 10.11(3). Supervivencia según estado de PTEN (positivo vs nulo), no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.510$).

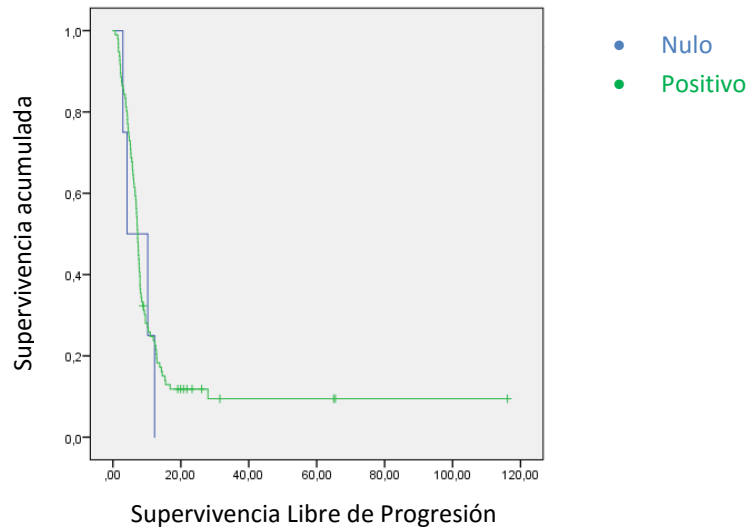


Figura 10.11(4). SLP según estado de PTEN (positivo vs nulo), no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.623$).

10.12. HER3

Si consideramos la expresión de HER3 en tres categorías (ausente, moderada, alta), los pacientes no presentan diferencias significativas en supervivencia ($p = 0.105$, test Mantel-Cox) ni en SLP ($p = 0.583$, test Mantel-Cox).

La supervivencia mediana es de 21.88 meses (IC 95% 13.98 – 29.78), 11.33 meses (IC 95% 9.67 – 13.00), y 14.16 meses (IC 95% 9.62 – 18.70) según expresión ausente, moderada, y alta, respectivamente. La SLP mediana es de 7.13 meses (IC 95% 5.96 – 8.30), 7.26 meses (IC 95% 5.60 – 8.92), y 7.62 meses (IC 95% 6.45 – 8.79) según expresión ausente, moderada, y alta, respectivamente.

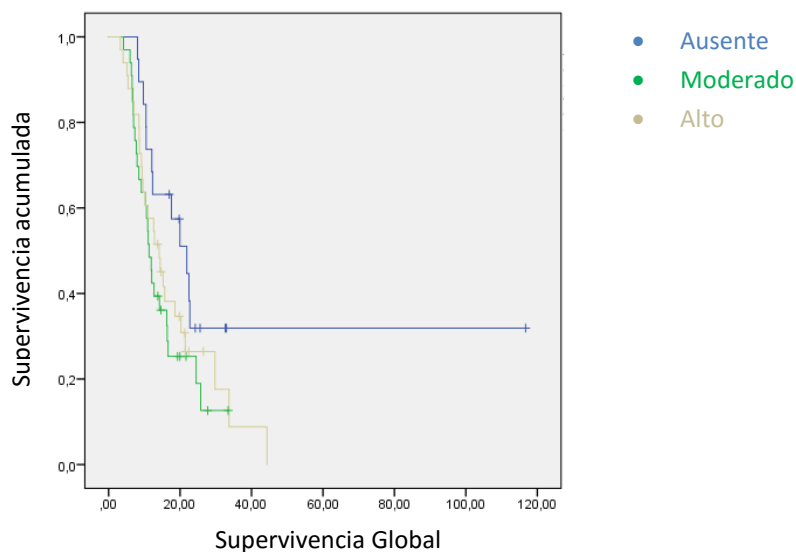


Figura 10.12(1). Supervivencia según estado de HER3 (ausente, moderado, alto), no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.105$).

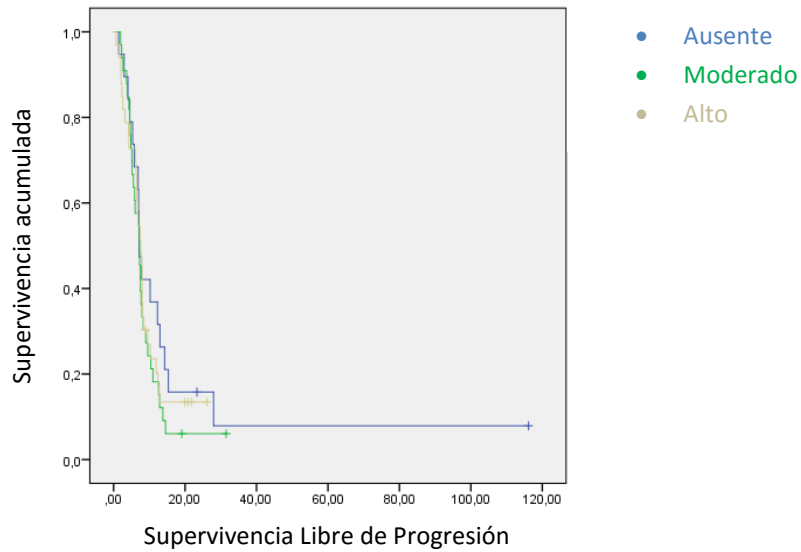


Figura 10.12(2). SLP según estado de HER3 (ausente, moderado, alto), no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.583$).

Cuando sólo consideramos dos valores: positivo (expresión alta) vs negativo (las demás), tampoco existen diferencias significativas en cuanto a supervivencia ($p = 0.161$, test Chi-Cuadrado). Para aquellos pacientes con alta expresión de HER3 (positivos) la mediana de supervivencia es de 14.16 meses (IC 95% 9.62 – 18.70), mientras que es de 12.32 meses (IC 95% 7.32 – 17.32) en los demás (negativos).

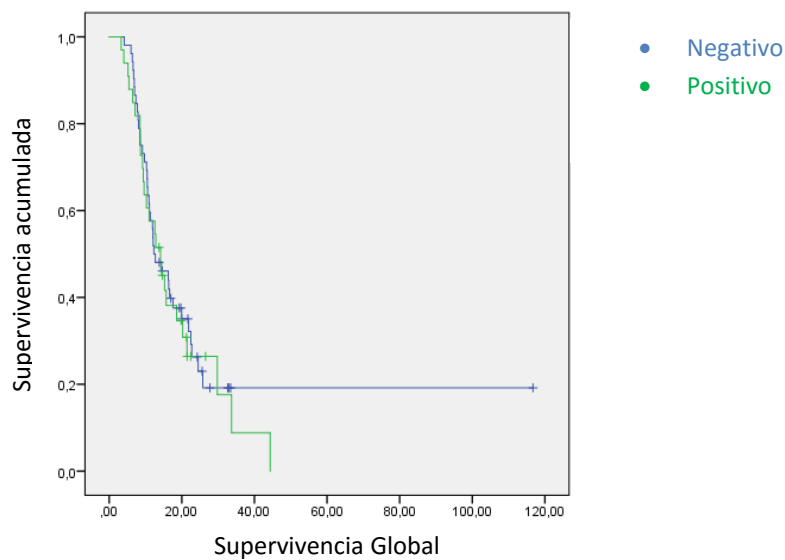


Figura 10.12(3). Supervivencia en función del estado de HER3 (positivo vs negativo), no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.161$).

Tampoco hay diferencias en cuanto la SLP ($p = 0.966$, test Mantel Cox). La mediana de SLP es de 7.19 meses (IC 95% 6.62 – 7.78) vs 7.62 meses (IC 95% 6.45 – 8.79), según expresión negativa o positiva, respectivamente.

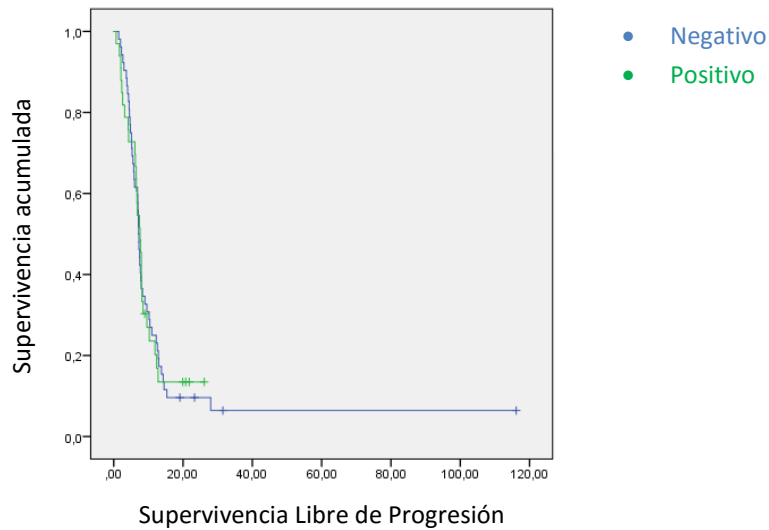


Figura 10.12(4). SLP en función del estado de HER3 (positivo vs negativo), no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.966$).

10.13. p95HER2

En cuanto a p95HER2, no pueden concluirse diferencias significativas en supervivencia ($p = 0.079$ y $p = 0.112$ según consideremos la positividad por el H-Score o la tinción IHQ 3+, respectivamente; test Mantel-Cox), pero sí en SLP ($p = 0.022$ y $p = 0.018$ según consideremos la positividad por el H-Score o la tinción IHQ 3+, respectivamente; test Mantel-Cox).

Considerando el H-Score ≥ 10 o < 10 , la supervivencia mediana de los pacientes es de 16.39 meses (IC 95% 8.09 – 24.69) vs 11.33 meses (IC 95% 9.42 – 13.24), respectivamente. Considerando su tinción IHQ 3+ ≥ 10 o < 10 , la supervivencia mediana de los pacientes es de 21.42 meses (IC 95% 14.41 – 28.43) vs 11.93 meses (IC 95% 9.94 – 13.91), respectivamente.

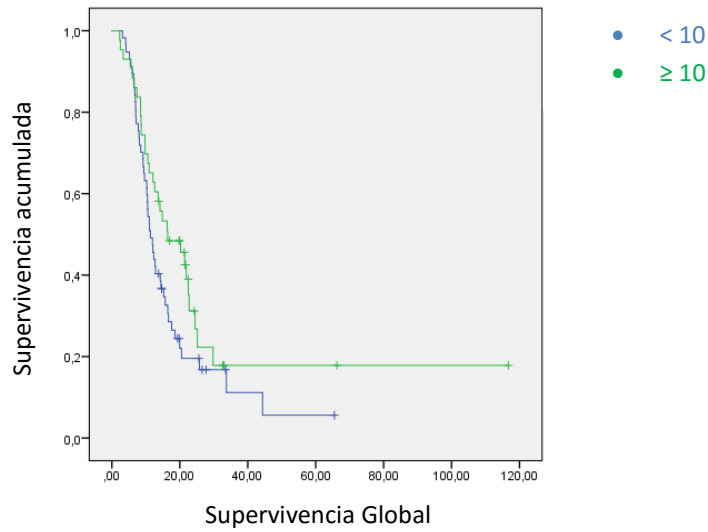


Figura 10.13(1). Supervivencia según H-Score de p95HER2 \geq o $<$ 10, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.079$).

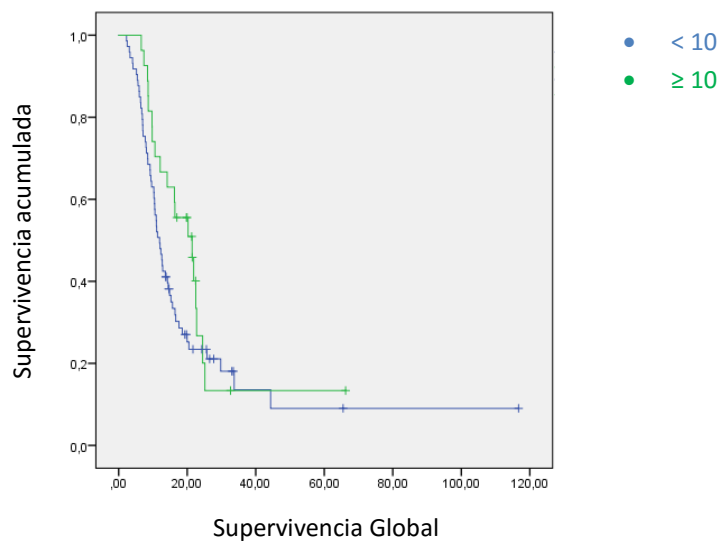


Figura 10.13(2). Supervivencia según tinción IHQ3+ de p95HER2 \geq o $<$ 10, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.112$).

Considerando el H-Score \geq o $<$ 10, la mediana de SLP es de 7.95 meses (IC 95% 6.73 – 9.17) vs 6.83 meses (IC 95% 5.79 – 7.87), respectivamente; y considerando la tinción IHQ 3+ \geq o $<$ 10, la mediana de SLP es de 8.74 meses (IC 95% 6.01 – 11.47) vs 6.87 meses (IC 95% 5.83 – 7.91), respectivamente.

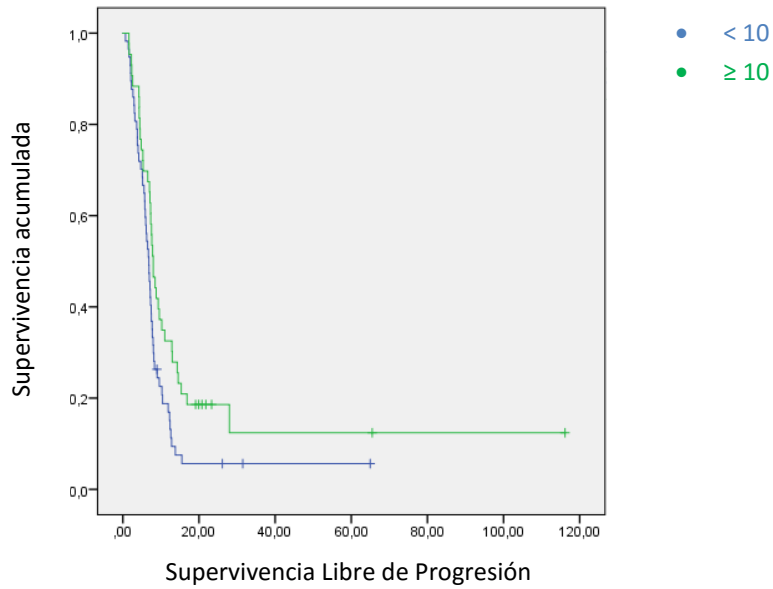


Figura 10.13(3). Curvas de SLP según H-Score de p95HER2 \geq o $<$ 10, con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.022$). La mediana de SLP es de 7.95 meses vs 6.83 meses, respectivamente.

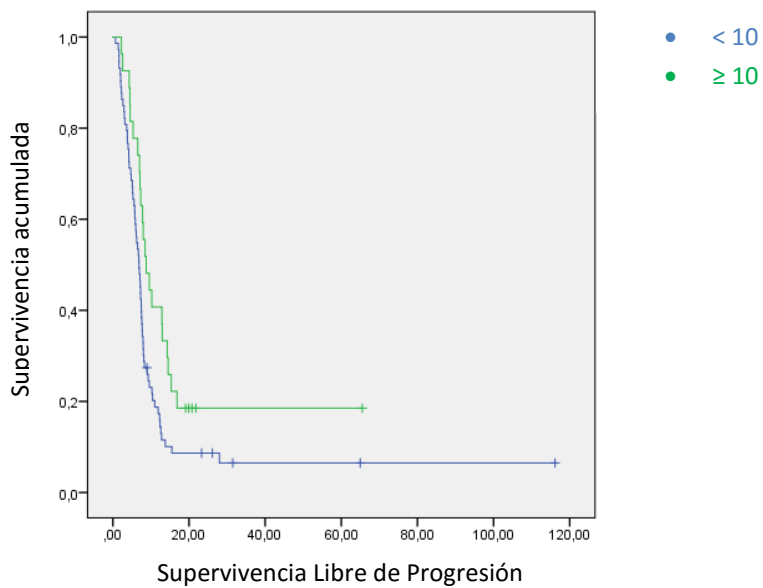


Figura 10.13(4). SLP según tinción IHQ3+ de p95HER2 \geq o $<$ 10, con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.018$). La mediana de SLP es de 8.74 meses vs 6.87 meses, respectivamente.

11 Discusión

11. Discusión

El CG y el CUGE representan un problema a nivel mundial; si bien es la 5ª causa más frecuente de cáncer, se sitúa en la 3ª posición como causa de muerte por cáncer¹. El pronóstico de los pacientes con CG metastásico es muy desfavorable; la quimioterapia consigue un beneficio limitado en el tiempo³³. Trastuzumab y ramucirumab son los primeros fármacos dirigidos que han demostrado mejorar el pronóstico de estos pacientes, aunque de forma discreta^{4,47,48}.

La investigación de los mecanismos moleculares de desarrollo y progresión del cáncer ha permitido conocer los eventos genéticos y epigenéticos fundamentales, así como las principales vías de señalización celular necesarias para su progresión, supervivencia, y potencial metastásico. Se requiere de una investigación translacional que integre la investigación básica con la clínica, para poder diseñar nuevas drogas dirigidas que ayuden a mejorar el pronóstico de estos pacientes. En CG y CUGE, el descubrimiento del papel de HER2 y del potencial terapéutico de trastuzumab marcaron el punto de inflexión hacia una práctica clínica oncológica como la que entendemos a día de hoy, abordando la enfermedad desde el conocimiento de su biología molecular; se abría un nuevo paradigma para estos pacientes.

La amplificación/sobreexpresión de HER2 es un biomarcador indispensable de respuesta a trastuzumab, aunque no suficientemente específico. De los datos del estudio TOGA, sabemos que hasta un 50% de los pacientes no responden, y de los que sí lo hacen, la mayoría acaban progresando⁴. Se desconocen las causas de esta resistencia primaria al tratamiento con trastuzumab.

HER2 juega un papel fundamental como uno de los receptores de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o HER). La dimerización de este receptor activa las principalmente vías de proliferación y supervivencia celular, vía de MAPK (o ERK) y vía de PIK3CA-AKT-mTOR, respectivamente. Cualquier alteración molecular en los efectores implicados en alguna de estas vías podría potencialmente activarlas de forma independiente, y ser la causa de la resistencia a trastuzumab.

11.1. Variables clínicas

Análisis descriptivo

Se analiza una muestra de 100 pacientes afectos de CG o CUGE localmente avanzado irresecable o metastásico, con estado HER2 positivo y que habían sido tratados como mínimo con una 1ª línea con quimioterapia y trastuzumab.

Por las características clínicas descritas, pensamos que se trata de una muestra de pacientes representativa de este tipo de población. La edad media del debut metastásico (65 años) así como la mayor representación de varones (75%) y del subtipo intestinal (73.4%) concuerdan con los datos descritos en la literatura el CG o CUGE HER2 positivo.

Otros datos que también apoyan esta representatividad de la población serían las relaciones que existen entre la localización del tumor primario con el sexo ($p < 0.001$), con el grado histológico ($p = 0.029$), y con la edad ($p = 0.002$). Los CUGE son más frecuentes en hombres que en mujeres, son los más agresivos (grado histológico), y su debut se produce en edades más tempranas en comparación con el CG^{9,11,216}.

Las relaciones en función de la localización metastásica también serían concordantes con los datos descritos en la literatura^{2,17}. Las metástasis hepáticas (34%) y adenopáticas (30%) son las más frecuentes, seguidas por la carcinomatosis peritoneal (15%) y las metástasis pulmonares (9%). Otras localizaciones tales como hueso (4%), suprarrenal (1.7%) y SNC (1.7%) son infrecuentes. Las metástasis hepáticas están más representadas en los CUGE (73%) que en los CG (50%) ($p = 0.004$). Por otro lado, la carcinomatosis peritoneal es más frecuente en mujeres ($p = 0.001$), en CG ($p = 0.011$), y en los tumores mal diferenciados ($p = 0.025$). En cambio, las metástasis pulmonares son más típicas de pacientes jóvenes ($p = 0.001$) y de los CUGE ($p < 0.001$). Finalmente, las metástasis óseas raramente se observan en el subtipo intestinal ($p = 0.040$).

Todos los pacientes incluidos en el estudio han recibido como mínimo una primera línea de tratamiento con quimioterapia basada en un agente platinado y una fluoropirimidina, con trastuzumab. Doce de ellos (12%) tuvieron la oportunidad de recibir, además, pertuzumab (pacientes incluidos dentro del ensayo clínico JACOB), aunque no sabemos cuántos de ellos por ser un estudio a doble ciego. La media de ciclos de quimioterapia es de 8.33 y la media de ciclos de trastuzumab es de 11.98. Se describen hasta 77 toxicidades grados 3-4, hecho que se traduce en una mediana de 1 toxicidad grado 3-4 por paciente (IC 95% 0-1). En el 74.7% de los pacientes se logró el control de la enfermedad, entendiendo como control aquellas respuestas completas/parciales y las estabilizaciones de > 4.2 meses (6 ciclos). Un 50% de los pacientes reciben una segunda línea de tratamiento onco-específico, y un 20% recibe tres o más líneas. Debe destacarse que un 7% de los pacientes todavía continúa con el tratamiento de primera línea, sin progresión.

El tiempo de seguimiento es el que se observa en la literatura referenciada con una media de 16.5 meses (IC 95% 13.6 – 19.5) y mediana de 12.8 meses (IC 95% 10.6 – 15.2). Para aquellos pacientes vivos en el momento del corte de datos, la media de seguimiento es de 30.1 meses (IC 95% 19.9 – 40.2) y la mediana de 21.7 meses (IC 95% 19.7 – 27.7).

Supervivencia y supervivencia libre de progresión (SLP)

Las medianas en supervivencia (12.7 meses) y en SLP (7.26 meses) de los pacientes incluidos en el estudio tienen un comportamiento que consideramos normal. Se debe considerar que se trata de pacientes afectados de CG o CUGE HER2 positivos tratados mayoritariamente de forma asistencial^{4,33}. La mediana de SLP en los pacientes con CUGE es más baja en comparación a la de los pacientes con CG (mediana de 6.38 vs 7.69 meses respectivamente, $p = 0.024$), hecho que refleja el peor pronóstico ya descrito que presentan estos pacientes^{10,217}. La mediana de SLP de los pacientes con sólo una localización metastásica es mejor con respecto a los demás (mediana de 8.48 vs 6.70 meses respectivamente, $p = 0.015$), concordante con la literatura²¹⁸.

Las diferencias en supervivencia ($p = 0.043$) que se observan entre los pacientes que reciben pertuzumab con respecto al resto no se consideran clínicamente relevantes y podrían explicarse por distintas razones. Por un lado el bajo número de pacientes que recibe pertuzumab, que hace que el análisis sea poco valorable (considerando que cada uno de los pacientes incluidos en el ensayo clínico JACOB tenía un 50% de posibilidades de recibir o no pertuzumab, el número real de pacientes que recibe pertuzumab es muy bajo). Por otro lado, el menor seguimiento de estos pacientes (supervivencia mediana no estimada dado que la mayoría de pacientes siguen vivos), así como el hecho de que son pacientes incluidos en ensayo clínico y por tanto con mejor pronóstico, podría justificar esta diferencia hallada en supervivencia. La mediana de SLP entre ambos grupos no varía ($p = 0.260$), dato que corrobora las afirmaciones anteriores.

Obviamente, los pacientes que presentan control de la enfermedad presentan mejor supervivencia ($p = 0.000$) y SLP ($p = 0.000$), en comparación a los demás.

11.2. Análisis de las variables moleculares

Hay pocas series de casos de CG o de CUGE que describan las alteraciones moleculares analizadas en este trabajo. Además, la mayoría de ellas consideran el CG independientemente del estado de HER2. De todas formas, lo que hace que este trabajo sea único es que todos los pacientes de la serie tienen tumores HER2 positivos y han recibido tratamiento específico con trastuzumab. Además, en este estudio se han correlacionado las alteraciones moleculares presentes con las características clínicas y los resultados clínicos. Si añadimos la falta de consenso en cuanto a (1) el tipo de análisis y (2) el valor *cut-off* a partir del cual clasificar los hallazgos, nos encontramos frente a un tipo de población muy poco estudiada.

Ciclina E

La amplificación de la *ciclina E* se ha descrito en aproximadamente el 30% de los CG^{185,186}, independientemente de HER2, y se ha correlacionado con un peor pronóstico. En cáncer de mama se ha demostrado que es está implicada en la resistencia al tratamiento con trastuzumab¹¹⁰.

En este estudio, la *ciclina E* se encuentra amplificada en aproximadamente una cuarta parte de los pacientes (18.9% si consideramos la ratio GEN/CEP ≥ 2 , 26.3% si consideramos la ratio GEN/CEP ≥ 1.5 , 15.8% si consideramos el nº de copias del gen ≥ 5).

La amplificación y la expresión de la ciclina E están positivamente correlacionadas ($r = 0.51$, $p = 0.000$). Es interesante observar cómo se comporta esta correlación (figura 9.7(3)): la amplificación del gen claramente provoca la sobreexpresión de la proteína (cuadrante superior derecho de la figura), pero este evento no explica el total de casos de sobreexpresión de la ciclina E (cuadrante superior izquierdo de la figura). Deben existir otras causas responsables de la sobreexpresión de la ciclina E, independientes del estado del gen.

Por otro lado, de acuerdo con los datos descritos para CG y CUGE, la amplificación de la *ciclina E* se asocia a un peor pronóstico: la supervivencia de los pacientes con amplificación de la *ciclina E* presentan peor supervivencia en comparación a los demás (mediana de 8.61 vs 14.23

meses considerando la ratio GEN/CEP ≥ 2 , $p = 0.016$; y mediana de 9.20 vs 14.23 meses considerando el nº de copias del gen $\geq 0 < 5$, $p = 0.028$).

Debe destacarse que no existen diferencias en SLP, ni considerando la ratio GEN/CEP ≥ 2 ni considerando el nº de copias del gen $\geq 0 < 5$. Este hallazgo se contradice con los hallazgos previos en cáncer de mama HER2 positivo, en el que parece que la amplificación de la *ciclina E* podría ser causa de la resistencia a trastuzumab¹¹⁰.

En el laboratorio de Anatomía Patológica del VHIO se testó, a modo experimental, la combinación de trastuzumab y roscovitine (inhibidor de CDK2/7/9) en un modelo PDX (xenoinjerto de tumor derivado de paciente) generado a partir de un paciente afecto de CG HER2 positivo que había sido incluido en este estudio, y que presentaba amplificación de la *ciclina E*. Desafortunadamente no se logró revertir la resistencia a trastuzumab (datos no publicados); este experimento apoyaría de forma indirecta los resultados del presente estudio en CG y CUGE.

Ciclina D1

La amplificación de la *ciclina D1* se ha descrito en un 40-70% de los casos de CG, y su correlación con el pronóstico es dudosa^{185,187}. En este estudio, que valora únicamente pacientes HER2 positivos, la amplificación de la *ciclina D1* es menos frecuente (15.2% si consideramos la ratio GEN/CEP ≥ 2 , 14.1% si consideramos el nº de copias del gen ≥ 5). Además, no existe correlación entre la amplificación del gen y la sobreexpresión de la proteína ($p = 0.378$). Tampoco existen diferencias significativas en supervivencia ni en SLP entre los pacientes con o sin la amplificación de la ciclina D1.

PIK3CA

El gen *PIK3CA* se encuentra amplificado/mutado en un 4-7% de los pacientes con CG y CUGE^{189,190}. Entre los pacientes HER2 positivos incluidos en este estudio se recogen un 4% de amplificaciones (considerando una ratio GEN/CEP ≥ 2 , o el nº de copias del gen ≥ 5) y un 3.1% de mutaciones (dos en el dominio catalítico – E545K – y una en el dominio helical – H1047R –, ambas conocidas causas de incremento de la actividad catalítica de la subunidad p110 α de *PIK3CA*)²¹⁹. El hecho de que la tasa de amplificaciones/mutaciones sea tan baja hace que no podamos valorar el papel pronóstico y/o predictivo de dicho hallazgo.

PIK3CA actúa como efector de la vía de señalización que lleva su nombre, PI3K-AKT-mTOR, y su amplificación y/o mutación está descrita en procesos cancerígenos¹³⁶. Tal como se ha explicado anteriormente, en el estudio GRANITE-1 no se pudo demostrar la eficacia de everolimus (inhibidor de mTOR)¹⁶⁸. Dado la baja probabilidad en que PIK3CA se encuentra alterado, los resultados de este estudio podrían explicarse por la falta de selección molecular de los pacientes.

PTEN

La pérdida de expresión de PTEN se ha descrito en un 20 – 60% de los pacientes con CG¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. En este estudio, considerando sólo pacientes HER2 positivos, se describe un 4% de expresión nula y un 11% de expresión baja.

PTEN antagoniza la función de PIK3CA actuando como represor de la vía, aunque cabe mencionar que su posible acción como factor de resistencia a trastuzumab no está claramente demostrada^{140,197}. En concordancia con estos datos, la supervivencia y SLP de los pacientes incluidos en este estudio es independiente de la expresión de PTEN.

HER3

La sobreexpresión de HER3 se ha descrito en un 20 - 60% de los pacientes con CG y se ha asociado a un peor pronóstico¹⁹⁸⁻²⁰⁰; además, se ha demostrado como causa de resistencia a tratamientos con inhibidores de receptores de factores de crecimiento epidérmico^{201,202}.

Una tercera parte de los pacientes incluidos en el estudio presenta sobreexpresión alta de HER3. La supervivencia y la SLP de los pacientes no varían en función del estado de HER3.

A día de hoy existen múltiples estudios que combinan estrategias dirigidas a inhibir tanto HER2 como HER3, como mecanismo sinérgico¹²⁶. Los resultados del estudio JACOB, que evalúan el papel de pertuzumab (anticuerpo que bloquea el punto de unión HER2-HER3), aportarán un mejor conocimiento de la verdadera función que ejerce HER3 en CG.

p95HER2

p95HER2 representa una forma truncada del receptor HER2 que carece de dominio extracelular, y actualmente se considera un biomarcador de respuesta positiva a trastuzumab en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo^{205,206}. En CG HER2 positivo se ha descrito en un 77% (de 31 casos analizados), mientras que es muy infrecuente en CG HER2 negativo²⁰⁷.

En este estudio entre un 27% (tomando como referencia una tinción IHQ 3+ \geq o < de 10) y un 43% (tomando como referencia un H-Score \geq o < de 10) de los pacientes presentaban sobreexpresión de p95HER2.

No se ha podido demostrar que p95HER2 ejerza un papel como factor pronóstico, aunque si como factor de respuesta predictivo al tratamiento con trastuzumab. La SLP es claramente mejor entre los pacientes con sobreexpresión de p95HER2, en comparación con los demás ($p = 0.022$ y $p = 0.018$, considerando el H-Score \geq o < 10 y la tinción IHQ 3+ \geq o < 10 respectivamente). La mediana de SLP es de 8.74 meses vs 6.87 meses (según H-Score \geq o < 10), y de 7.95 vs 6.38 meses (según tinción IHQ 3+ \geq o < 10).

Además, existe una correlación positiva entre los niveles de HER2 y de p95HER2 (figura 9.7(15), $p = 0.000$), pero negativa entre los niveles de HER2 y la ratio p95HER2/HER2 (figura 9.7(16), $p = 0.000$); en valores relativos, a más cantidad de HER2, menos cantidad de p95HER2. Este hallazgo justifica el papel predictivo positivo que ejerce p95HER2.

Los resultados son concordantes con la literatura descrita en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo²⁰⁶.

Curvas ROC

Con la intención de determinar el *cut-off* óptimo para definir a partir de qué valor consideramos “amplificación” o “sobrexpresión” de aquellas variables moleculares continuas, se realiza el análisis de la curva de ROC en cada una de ellas.

Desafortunadamente, los resultados no han permitido identificar en ningún caso el *cut-off*, probablemente debido al bajo número muestral.

Cuantificación de p95HER2 y HER2

El análisis de la correlación entre la cantidad de p95HER2 y HER2 muestra una correlación positiva entre ambas variables ($r = 0.28$, $p = 0.019$), que es más claro cuando se analizan en base logarítmica ($r = 0.529$, $p = 0.000$). A más cantidad de HER2, más cantidad de p95HER2. Se concluye, de acuerdo con la literatura²⁰⁷, que p95HER2 estaría representado en aquellos casos con cantidades suficientes de HER2.

Lógicamente, la correlación del logaritmo de HER2 con el logaritmo de la ratio p95HER2/HER2 es negativa. En valores relativos, la cantidad de p95HER2 es más baja a más cantidad de HER2.

En cáncer de mama HER2 positivo se ha demostrado que las formas truncadas p95HER2 ofrecen resistencia a trastuzumab^{133,204}, aunque su cuantificación está correlacionada positivamente con la respuesta a trastuzumab²⁰⁵. De hecho, la resistencia que ofrece esta mutación truncada de HER2 se revierte con fármacos como lapatinib, que bloquean tanto el receptor HER2 como su forma truncada²⁰⁵. En el laboratorio de Anatomía Patológica del VHIO se ha iniciado, a modo experimental, el tratamiento con trastuzumab y un anticuerpo bi-específico HER2/p95HER2 en el mismo modelo PDX generado a partir del paciente con CG HER2 positivo, que presentaba tanto amplificación de la ciclina E como sobrexpresión de p95HER2. Todavía no se dispone de resultados de eficacia de este planteamiento terapéutico.

Aportaciones y limitaciones del estudio

Este estudio presenta dos limitaciones importantes, (1) el tamaño muestral relativamente pequeño (100 casos), y (2) el carácter retrospectivo del análisis.

De todas formas, debe considerarse que el CG y el CUGE no es una entidad frecuente, en comparación a otros tumores como sería el cáncer de colon o el cáncer de mama HER2 positivo, y que además los pacientes HER2 positivos representan sólo 15% de ellos, aproximadamente. Se constata, por tanto, la gran dificultad para realizar estudios en esta población tan específica. Así, este estudio representa uno de los análisis de CG y de CUGE HER2 positivo con mayor número de pacientes.

Por otro lado, se evalúan de forma paralela alteraciones moleculares en genes y proteínas poco descritas a día de hoy; en las ciclinas E y D1, en PIK3CA, en PTEN, en HER3, y en p95HER2. Se describe, no sólo las frecuencias de dichas alteraciones, sino que se correlacionan con las características clínicas de los pacientes y las características anatomo-patológicas de sus tumores, así como con la supervivencia y la SLP. El carácter retrospectivo del análisis del estudio queda justificado por la falta de información clínica, necesaria previamente a la valoración de un estudio prospectivo.

12 Conclusiones

12. Conclusiones

1. El conocimiento de la biología molecular del cáncer es indispensable para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas, y consecuente aplicación clínica. El descubrimiento del papel HER2 en el cáncer gástrico (CG) y cáncer de la unión gastro-esofágica (CUGE), junto con los resultados del estudio TOGA, representaron el punto de inflexión en este tipo de cáncer.
2. El receptor HER2 tiene un papel indispensable como activador de las vías de proliferación y supervivencia celular, vías MAPK y PIK3CA-AKT-mTOR respectivamente. Trastuzumab, anticuerpo monoclonal específico contra HER2, mejora el pronóstico de los pacientes con CG y CUGE HER2 positivo. A pesar de ello, hasta un 50% de pacientes no responden al tratamiento.
3. Esta tesis doctoral analiza posibles alteraciones moleculares en proteínas efectoras de las vías de señalización intracelular MAPK y PIK3CA-AKT-mTOR como posible causa de resistencia primaria a trastuzumab, en una cohorte de 100 pacientes afectados de CG y CUGE HER2 positivo.
4. En este estudio, el 25% de los pacientes presenta amplificación de la *ciclina E*, y este hecho se asocia a un peor pronóstico. La amplificación de la *ciclina E* es causa de su sobreexpresión. No se demuestra que la amplificación de la *ciclina E* tenga valor predictivo de respuesta a trastuzumab.
5. El 15% de los pacientes presenta amplificación de la *ciclina D1*. La supervivencia y SLP no difiere en función de este hallazgo. La sobreexpresión de la ciclina D1 no está correlacionada con la amplificación del gen.
6. Un 4% de los pacientes presentan amplificación a nivel del gen de *PIK3CA*, mientras que un 3.1% presentan mutaciones a nivel de los dominios helical y catalítico del gen.
7. Un 4% de los pacientes presentan pérdida de la expresión de PTEN, y un 11% presentan baja expresión. El estado de PTEN no influye en la supervivencia ni en la SLP de los pacientes.

8. Una tercera parte (39%) de los pacientes presentan sobreexpresión de HER3. No se demuestra que HER3 tenga un papel pronóstico ni predictivo de respuesta.

9. Entre un 27% y un 43% de los pacientes(según método utilizado para su cuantificación) presentan sobreexpresión de p95HER2. La mediana de SLP de los pacientes con sobreexpresión de esta proteína truncada constitutivamente activa de HER2 es significativamente mejor. Se describe por primera vez el valor predictivo de la sobreexpresión de p95HER2 en pacientes con CG y CUGE; y se corrobora, por tanto, como factor predictor de respuesta al tratamiento con trastuzumab.

10. La cuantificación de p95HER5 se correlaciona positivamente con HER2, y por tanto apoya a que se estudie la doble inhibición (tanto del receptor HER2 como de su forma truncada p95HER2).

11. La selección de los pacientes en base a la caracterización molecular de los tumores es fundamental. El desarrollo de los nuevos fármacos dirigidos a alteraciones moleculares específicas requiere profundizar en el conocimiento del funcionamiento de estas vías de señalización celular, que promueven el crecimiento, progresión y metastatización del cáncer.

12. La clasificación molecular del CG y del CUGE es un objetivo primordial en la investigación de esta entidad, indispensable para el desarrollo de terapias dirigidas que impacten en la supervivencia de estos pacientes.

Relación de Tablas y Figuras

13. Relación de Tablas y Figuras

13.2. Figuras

- Figura 2.1(1). Curvas de Incidencia y Mortalidad del CG en Estados Unidos 1975-2013.
- Figura 2.1(2). Tendencia de la incidencia del cáncer de esófago, de CUGE, y del estómago no cardias.
- Figura 2.1(3). Tendencia de la incidencia del CUGE.
- Figura 2.2(1). Tasas de supervivencia de pacientes con CG resecaado.
- Figura 3.1(1). Factores de riesgo para el desarrollo del CG.
- Figura 3.1(2). Carcinogénesis del CG.
- Figura 3.1(4). Carcinogénesis del CG, según F. Carneiro, MD PhD.
- Figura 3.2(1). Principales subtipos histológicos de cáncer gástrico según la clasificación de Lauren.
- Figura 3.2(2). Principales subtipos histológicos de cáncer gástrico según la clasificación de la OMS.
- Figura 3.3(1). Patrones de inestabilidad cromosómica en los adenocarcinomas del tracto gastrointestinal.
- Figura 3.3(2). Diagrama de Venn de los eventos focales comunes en adenocarcinomas del tracto gastrointestinal.
- Figura 3.3(3). Los genes RTK/RAS amplificados.
- Figura 3.3(4). Alteraciones genómicas mutuamente excluyentes y co-amplificadas en CG.
- Figura 3.3(5). Mutaciones, cambios en el número de copias, y translocaciones en los distintos subtipos moleculares.
- Figura 3.3(6). Expresión génica de JAK2, PD-L1, PD-L2 entre los distintos subtipos moleculares.
- Figura 3.3(7). Figura resumen de los 4 subtipos de cáncer gástrico propuestos por el TCGA.
- Figura 3.3(8). Frecuencia de mutaciones somáticas genéticas en el cáncer.
- Figura 3.4(1). Estructura del receptor de la familia ErbB.
- Figura 3.4(2). La vía de señalización de los receptores ErbB.
- Figura 3.4(3). Activación del receptor HER2.
- Figura 3.4(4). Las dos vías de señalización: MAPK y PI3K-AKT-mTOR.
- Figura 3.4(5). Sistema de regulación y de señalización del ciclo celular.
- Figura 3.4(6). Algoritmo de consenso para la determinación y tratamiento de los pacientes con CG HER2 positivo.
- Figura 4.3(1). Conjunto de diferentes tipos de células que constituyen el tumor.
- Figura 4.4(1). Presentación del antígeno al linfocito T.
- Figura 9.2(1). Box-plot de la edad de debut de las metástasis en función de la localización pulmonar (si vs no).
- Figura 9.4(1). Box-plot del número de toxicidades presentadas por paciente.
- Figura 9.7(1). Box-plot de la amplificación de la *ciclinas E y D1*, según ratio GEN/CEP.
- Figura 9.7(2). Box-plot de la expresión de las ciclinas E y D1.
- Figura 9.7(3). Correlación lineal de Pearson entre la amplificación y la sobreexpresión de ciclina E.
- Figura 9.7(4). Correlación lineal de Pearson entre la amplificación y la sobreexpresión de ciclina D1.
- Figura 9.7(5). Curva ROC de la ratio GEN/CEP de la *ciclina E*.
- Figura 9.7(6). Curva ROC de la ratio GEN/CEP de la *ciclina D1*.
- Figura 9.7(7). Curva ROC de la sobreexpresión de la ciclina E.
- Figura 9.7(8). Curva ROC de la sobreexpresión de la ciclina D1.
- Figura 9.7(9). Box-plot de la amplificación de *PIK3CA*.
- Figura 9.7(10). Curva ROC de la ratio GEN/CEP de *PIK3CA*.
- Figura 9.7(11). Box-plot del H-Score de p95HER2.
- Figura 9.7(12). Curva ROC para el H-Score de p95HER2.
- Figura 9.7(13). Curva ROC para la tinción IHQ 3+ de p95HER2.
- Figura 9.7(14). Correlación entre los valores de p95HER2 y HER2.
- Figura 9.7(15). Correlación entre p95HER2 y HER2 en base logarítmica.
- Figura 9.7(16). Correlación entre HER2 y la ratio p95HER2/HER2, en base logarítmica.
- Figura 9.7(17). Curvas ROC para los logaritmos de HER2, p95HER2, y ratio p95HER2/HER2.
- Figura 10.1(1). Curva de supervivencia de la población total incluida en el estudio.
- Figura 10.1(2). Curva de SLP de la población total incluida en el estudio.
- Figura 10.1(3). Curvas de supervivencia en función del sexo.
- Figura 10.1(4). Curva de SLP en función del sexo.
- Figura 10.2(1). Curvas de supervivencia en función de la localización del tumor primario.
- Figura 10.2(2). Curvas de SLP en función de la localización del tumor primario.
- Figura 10.3(1). Supervivencia en función del subtipo histológico.
- Figura 10.3(2). SLP en función del subtipo histológico.
- Figura 10.3(3). Supervivencia en función del grado tumoral.
- Figura 10.3(4). SLP en función del grado tumoral.
- Figura 10.4(1). Supervivencia en función del número de localizaciones metastásicas.
- Figura 10.4(2). SLP en función de una o más localizaciones metastásicas.

Figura 10.5(1). Curvas de supervivencia en función del tratamiento recibido (ensayo clínico JACOB sí vs no).
Figura 10.5(2). SLP en función del tratamiento recibido (ensayo clínico JACOB sí vs no).
Figura 10.6(1). Diferencias en supervivencia en función de la respuesta al tratamiento de primera línea.
Figura 10.6(2). SLP en función del tipo de respuesta al tratamiento de primera línea.
Figura 10.6(3). Supervivencia en función de si los pacientes consiguen control de la enfermedad (sí vs no).
Figura 10.6(4). SLP en función de si los pacientes consiguen control de la enfermedad (sí vs no).
Figura 10.7(1). Supervivencia en función de la IHQ del HER2.
Figura 10.7(2). SLP en función de la positividad IHQ de HER2.
Figura 10.8(1). Curvas de supervivencia considerando la amplificación de la *ciclina E* según ratio GEN/CEP $\geq 0 < 2$.
Figura 10.8(2). Curvas de SLP considerando la amplificación de la *ciclina E* según ratio GEN/CEP $\geq 0 < 2$.
Figura 10.8(3). Curvas de supervivencia considerando la amplificación de la *ciclina E* según $\geq 0 < 5$ copias del gen.
Figura 10.8(4). Curvas de supervivencia considerando la amplificación de la *ciclina E* según $\geq 0 < 6$ copias del gen.
Figura 10.8(5). Curvas de SLP considerando la amplificación de la *ciclina E* según $\geq 0 < 5$ copias del gen.
Figura 10.8(6). Curvas de SLP considerando la amplificación de la *ciclina E* según $\geq 0 < 5$ copias del gen.
Figura 10.9(1). Curvas de supervivencia considerando la amplificación de la *ciclina D1* (según ratio GEN/CEP $\geq 0 < 2$).
Figura 10.9(2). Curvas de SLP considerando la amplificación de la *ciclina D1* (según ratio GEN/CEP $\geq 0 < 2$).
Figura 10.9(3). Curvas de supervivencia considerando la amplificación de la *ciclina D1* según $\geq 0 < 5$ copias del gen.
Figura 10.9(4). Curvas de supervivencia considerando la amplificación de la *ciclina D1* según $\geq 0 < 6$ copias del gen.
Figura 10.9(5). Curvas de SLP considerando la amplificación de la *ciclina D1* según $\geq 0 < 5$ copias del gen.
Figura 10.9(6). Curvas de SLP considerando la amplificación de la *ciclina D1* según $\geq 0 < 6$ copias del gen.
Figura 10.10(1). Curvas de supervivencia considerando la amplificación de *PIK3CA* según ratio GEN/CEP $\geq 0 < 2$.
Figura 10.10(2). Curvas de SLP considerando la amplificación de *PIK3CA* según ratio GEN/CEP $\geq 0 < 2$.
Figura 10.10(3). Curvas de supervivencia considerando la amplificación de *PIK3CA* según $\geq 0 < 5$ copias del gen.
Figura 10.10(4). Curvas de supervivencia considerando la amplificación de *PIK3CA* según $\geq 0 < 6$ copias del gen.
Figura 10.10(5). Curvas de SLP considerando la amplificación *PIK3CA* según $\geq 0 < 5$ copias del gen.
Figura 10.10(6). Curvas de SLP considerando la amplificación *PIK3CA* según $\geq 0 < 6$ copias del gen.
Figura 10.11(1). Supervivencia según estado de PTEN.
Figura 10.11(2). SLP según estado de PTEN.
Figura 10.11(3). Supervivencia según estado de PTEN (positivo vs nulo).
Figura 10.11(4). SLP según estado de PTEN (positivo vs nulo).
Figura 10.12(1). Supervivencia según estado de HER3 (ausente, moderado, alto).
Figura 10.12(2). SLP según estado de HER3 (ausente, moderado, alto).
Figura 10.12(3). Supervivencia en función del estado de HER3 (positivo vs negativo).
Figura 10.12(4). SLP en función del estado de HER3 (positivo vs negativo).
Figura 10.13(1). Supervivencia según H-Score de p95HER2 $\geq 0 < 10$.
Figura 10.13(2). Supervivencia según tinción IHQ3+ de p95HER2 $\geq 0 < 10$.
Figura 10.13(3). SLP según H-Score de p95HER2 $\geq 0 < 10$.
Figura 10.13(4). SLP según tinción IHQ3+ de p95HER2 $\geq 0 < 10$.

13.2. Tablas

- Tabla 3.1(1). Tipos de CG según componente genético.
- Tabla 3.1(2). El CG en el contexto de síndromes hereditarios.
- Tabla 3.1(3). Principales síndromes hereditarios de CG, según Oliveira et. al.
- Tabla 3.2(1). Subtipos de cáncer gástrico según la clasificación histológica de la OMS.
- Tabla 3.2(2). Equivalencia entre las clasificaciones histológicas de la OMS y de Lauren.
- Tabla 3.3(1). Clasificación propuesta por Lei et al¹², comparada con la clasificación de Lauren.
- Tabla 3.3(2). Principales características diferenciales entre los subtipos moleculares descritos por el TCGA.
- Tabla 3.3(3). Principales características de los subtipos moleculares propuestos por el ACRG.
- Tabla 3.4(1). Diferencias de interpretación del HER2 entre pacientes afectos de CG y cáncer de mama.
- Tabla 4.1(1). Principales estudios fase III realizados para evaluar la primera línea de tratamiento en pacientes con CG o CUGE.
- Tabla 4.1(2). Principales estudios fase III realizados para evaluar la primera línea de tratamiento en pacientes con CG o CUGE.
- Tabla 4.2(1). Estudios fase III que evalúan el papel de inhibir EGFR.
- Tabla 4.2(2). Estudios fase III que evalúan el papel de la inhibición de HER2.
- Tabla 4.2(3). Único estudio fase III que evalúa el papel de la inhibición de mTOR.
- Tabla 4.2(4). Estudios fase III que evalúan el papel de la inhibición de la vía del VEGF.
- Tabla 4.2(5). Estudios fase III que evalúan el papel de la inhibición de la vía de MET.
- Tabla 4.2(6). Estudio fase II que con AZD4547, inhibidor de FGFR2.
- Tabla 4.2(7). Principales estudios activos con terapias dirigidas, en fase III.
- Tabla 4.4(1). Principales estudios realizados con inmunoterapia en cáncer gástrico.
- Tabla 6(1). Alteraciones moleculares analizadas, potencialmente responsables de la resistencia primaria a trastuzumab.
- Tabla 8.3(1). Relación entre los centros participantes.
- Tabla 8.5(1). Cuadro de determinaciones moleculares realizadas.
- Tabla 9.1(1). Características clínicas epidemiológicas.
- Tabla 9.1(2). Cross-tab entre el sexo (mujer vs varón) y la localización del tumor primario (CG vs CUGE).
- Tabla 9.1(3). Cross-tab entre la localización del tumor primario y el grado histológico.
- Tabla 9.1(4). Edad del diagnóstico de las metástasis en función de la localización del tumor primario.
- Tabla 9.2(1). Localización de las metástasis.
- Tabla 9.3(1). Tipos de tratamiento recibidos en 1ª línea.
- Tabla 9.4(1). Toxicidades grado 3-4 reportadas durante el tratamiento de primera línea.
- Tabla 9.5(1). Mejor respuesta conseguida durante el tratamiento de primera línea
- Tabla 9.5(2). Causas de finalización del tratamiento de primera línea.
- Tabla 9.6(1). Tipos de tratamiento de segunda línea recibidos.
- Tabla 9.6(2). Tipos de tratamiento de tercera línea recibidos.
- Tabla 9.7(1). Media y mediana de la ratio GEN/CEP de las *ciclinas E y D1*.
- Tabla 9.7(2). Amplificación de las *ciclinas E y D1* considerando el nº de copias del gen ($\geq 5/\geq 6$).
- Tabla 9.7(3). Media y mediana de expresión de las *ciclinas E/D1*.
- Tabla 9.7(4). Media y mediana de la ratio GEN/CEP de *PIK3CA*.
- Tabla 9.7(5). Amplificación de *PIK3CA* considerando el nº de copias del gen ($\geq 5/\geq 6$).
- Tabla 9.7(6). Sobreexpresión de PTEN considerando tres categorías.
- Tabla 9.7(7). Sobreexpresión de PTEN considerando dos categorías.
- Tabla 9.7(8). Sobreexpresión de HER3 considerando tres categorías.
- Tabla 9.7(9). Sobreexpresión de HER3 considerando dos categorías.
- Tabla 9.7(10). Media y mediana de la expresión de p95HER2.
- Tabla 9.7(11). Sobreexpresión de p95HER2, según H-Score y tinción IHQ 3+.
- Tabla 9.7(12). Correlación de Pearson entre HER2 y p95HER2.
- Tabla 9.7(13). Correlación de Pearson entre HER2 y p95HER2 en base logarítmica.

14

Abreviaciones

14. Abreviaciones

ACRG	Grupo Asiático de investigación del cáncer (del inglés, <i>Asian Cancer Research Group</i>)
ADN	Ácido desoxirriboucleico
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AID	Del inglés, <i>activation-induced cytidine deaminase</i>
AINE	Fármaco antiinflamatorio no esteroideo
BSC	Mejor tratamiento de soporte (del inglés, <i>best supportive care</i>)
CDH1	Gen de la E-cadherina
CKD	Quinasas dependientes de ciclina (del inglés, <i>cycline-dependent kinases</i>)
CG	Cáncer gástrico
CIN	Cromosómicamente inestables
CSC	Células madre tumorales (del inglés, <i>cancer stem cells</i>)
CTNNB1	Gen de la alfa-E-catenina
CUGE	Cáncer de la unión gastro-esofágica
Cut-off	Punto límite o tope
DCR	Tasa de control de la enfermedad (del inglés, <i>disease control rate</i>)
EBV	Virus Epstein-Barr
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Del inglés, <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ErbB	Receptores transmembrana tipo 1 con actividad tirosina-quinasa
ERK	Señal extracelular quinasa regulada (del inglés, <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
EOGC	Early onset gastric carcinoma
FDGC	Cáncer gástrico familiar tipo difuso
FFPE	Del inglés <i>formalin-fixed paraffin-embedded</i>
FGC	Cáncer gástrico familiar
FIGC	Cáncer gástrico familiar tipo intestinal
FOXO3a	Del inglés, <i>forkhead box O3</i>
GAPPS	Adenocarcinoma gástrico y poliposis proximal del estómago
GEP	Del inglés, <i>Guanine Exchanging Factors</i>
GS	Genómicamente estable
HDGC	Cáncer gástrico hereditario tipo difuso
HER2	Receptor de crecimiento epidérmico de tipo 2
HGF	Del inglés, <i>hepatocyte growth factor</i>
HR	Riesgo relativo (del inglés, <i>hazard ratio</i>)
IC	Intervalo de confianza
IHQ	Inmunohistoquímica
ISH	Hibridación in situ
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos (del inglés, <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, <i>major histocompatibility complex</i>)
MIS	Inestabilidad de microsatélites
MTOR	Del inglés; <i>mammalian target of rapamycin</i>
NCI	Instituto Nacional del Cáncer
RNG	Neuregulinas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PD-L1	Del inglés, <i>Programmed death-ligand 1</i>
PDX	Xenoinjerto de tumor derivado de paciente
PIK	Del inglés, <i>Fosfo-Inositol quinasa</i>
PIP2 y PIP3	Del inglés, fosfo-inositol bifosfato (PIP2) y fosfo-inositol trifosfato
PS	Del inglés, <i>performance status</i>
Punto R	Del inglés, <i>restriction point</i> , entre la fase G1 y S del ciclo celular
PTEN	Del inglés, <i>fosfatasa homóloga del tensinógeno</i>
RF/sqmm	Promedio de expresión tumoral (unidades de fluorescencia relativa /milímetro cuadrado de tumor)
ROC, curva	Característica Operativa del Receptor (del inglés, <i>Receiver Operating Characteristic</i>)
RTK	Receptor tirosina-quinasa
SEER	Programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados, del NCI
SCNAs	Aberraciones somáticas en el número de copias, del inglés <i>somatic copy-number aberrations</i>
SLP	Supervivencia libre de progresión
TCGA	Atlas del Genoma del Cáncer (del inglés, <i>The Cancer Genome Atlas</i>)
TIE-2	Angiopoetina 2
TILs	Linfocitos infiltrantes de tumor (del inglés, <i>tumor infiltrating lymphocytes</i>)
TLR	Del inglés, <i>toll-like receptor</i>
TNM	Del inglés, <i>tumor, node, metastasis</i>

15
Bibliografía

15. Bibliografía

1. International Agency for Research on Cancer (IARC) WHO. GLOBOCAN 2012, Section of Cancer Surveillance. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Fecha de acceso 16 de Abril de 2016.
2. (NCI) NCI. Disponible en <http://www.cancer.org/cancer/stomachcancer/detailedguide/stomach-cancer-survival-rates>. Fecha de acceso 16 de Abril de 2016.
3. Bang Y, Chung H, Xu J, et al. Pathological features of advanced gastric cancer (GC): Relationship to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positivity in the global screening programme of the ToGA trial. ASCO Annual Meeting Proceedings; 2009. p. 4556.
4. Bang Y-J, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet* 2010;376:687-97.
5. SEER Database NCIN. Disponible en <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/stomach.html>. Fecha de acceso 16 de Abril de 2016.
6. Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Jama* 1991;265:1287-9.
7. Botterweck AA, Schouten LJ, Volovics A, Dorant E, van den Brandt PA. Trends in incidence of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia in ten European countries. *International journal of epidemiology* 2000;29:645-54.
8. Hansson LE, Sparen P, Nyren O. Increasing incidence of carcinoma of the gastric cardia in Sweden from 1970 to 1985. *British Journal of surgery* 1993;80:374-7.
9. Parfitt JR, Miladinovic Z, Driman DK. Increasing incidence of adenocarcinoma of the gastroesophageal junction and distal stomach in Canada—An epidemiological study from 1964 to 2002. *Canadian journal of gastroenterology* 2006;20:271.
10. Wayman J, Forman D, Griffin SM. Monitoring the changing pattern of esophago-gastric cancer: data from a UK regional cancer registry. *Cancer Causes & Control* 2001;12:943-9.
11. Buas MF, Vaughan TL. Epidemiology and risk factors for gastroesophageal junction tumors: understanding the rising incidence of this disease. *Seminars in radiation oncology*; 2013: Elsevier. p. 3-9.
12. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós J, Alemán A. Estimaciones de la incidencia y supervivencia del cáncer en España y su situación en Europa. . Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN) 2014.
13. Ming SC, Goldman H. Gastric polyps. A histogenetic classification and its relation to carcinoma. *Cancer* 1965;18:721-6.
14. Roder DM. The epidemiology of gastric cancer. *Gastric cancer* 2002;5:5-11.
15. La Vecchia C, Negri E, Gentile A, Franceschi S. Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. *Cancer* 1992;70:50-5.
16. Oliveira C, Pinheiro H, Figueiredo J, Seruca R, Carneiro F. Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *The Lancet Oncology* 2015;16:e60-e70.
17. Milne AN, Carneiro F, O'morain C, Offerhaus G. Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer. *Human genetics* 2009;126:615-28.
18. Shikata K, Doi Y, Yonemoto K, et al. Population-based Prospective Study of the Combined Influence of Cigarette Smoking and Helicobacter pylori Infection on Gastric Cancer Incidence The Hisayama Study. *American journal of epidemiology* 2008;168:1409-15.

19. Crane SJ, Locke GR, Harmsen WS, et al. Subsite-specific risk factors for esophageal and gastric adenocarcinoma. *The American journal of gastroenterology* 2007;102:1596-602.
20. Whiteman DC, Sadeghi S, Pandeya N, et al. Combined effects of obesity, acid reflux and smoking on the risk of adenocarcinomas of the oesophagus. *Gut* 2008;57:173-80.
21. Forman D, Newell D, Fullerton F, et al. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *Bmj* 1991;302:1302-5.
22. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *New England Journal of Medicine* 1991;325:1127-31.
23. Coglianò VJ, Baan R, Straif K, et al. Preventable exposures associated with human cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 2011;103:1827-39.
24. Organization WH, Humans IWGotEoCRt. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter Pylori*: International Agency for Research on Cancer; 1994.
25. O'Doherty MG, Freedman ND, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. A prospective cohort study of obesity and risk of oesophageal and gastric adenocarcinoma in the NIH–AARP Diet and Health Study. *Gut* 2011;gutjnl-2011-300551.
26. Zhang ZF, Kurtz RC, Yu GP, et al. Adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia: the role of diet. 1997.
27. Bahmanyar S, Ye W. Dietary patterns and risk of squamous-cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia: a population-based case-control study in Sweden. *Nutrition and cancer* 2006;54:171-8.
28. Whiteman DC, Parmar P, Fahey P, et al. Association of *Helicobacter pylori* infection with reduced risk for esophageal cancer is independent of environmental and genetic modifiers. *Gastroenterology* 2010;139:73-83.
29. Yang L, Lu X, Nossa CW, Francois F, Peek RM, Pei Z. Inflammation and intestinal metaplasia of the distal esophagus are associated with alterations in the microbiome. *Gastroenterology* 2009;137:588-97.
30. Liao LM, Vaughan TL, Corley DA, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use reduces risk of adenocarcinomas of the esophagus and esophagogastric junction in a pooled analysis. *Gastroenterology* 2012;142:442-52. e5.
31. Washington K. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. *Ann Surg Oncol* 2010;17:3077-9.
32. Adachi Y, Yasuda K, Inomata M, Sato K, Shiraishi N, Kitano S. Pathology and prognosis of gastric carcinoma. *Cancer* 2000;89:1418-24.
33. Wagner AD, Unverzagt S, Grothe W, et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;3.
34. Cunningham D, Starling N, Rao S, et al. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. *N Engl J Med* 2008;358:36-46.
35. Kang YK, Kang WK, Shin DB, et al. Capecitabine/cisplatin versus 5-fluorouracil/cisplatin as first-line therapy in patients with advanced gastric cancer: a randomised phase III noninferiority trial. *Ann Oncol* 2009;20:666-73.
36. Boku N, Yamamoto S, Fukuda H, et al. Gastrointestinal Oncology Study Group of the Japan Clinical Oncology Group Fluorouracil versus combination of irinotecan plus cisplatin versus S-1 in metastatic gastric cancer: a randomised phase 3 study. *Lancet Oncol* 2009;10:1063-9.
37. Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, et al. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. *Journal of Clinical Oncology* 2006;24:4991-7.
38. Dank M, Zaluski J, Barone C, et al. Randomized phase III study comparing irinotecan combined with 5-fluorouracil and folinic acid to cisplatin combined with 5-fluorouracil in

chemotherapy naive patients with advanced adenocarcinoma of the stomach or esophagogastric junction. *Annals of oncology* 2008;19:1450-7.

39. Koizumi W, Narahara H, Hara T, Takagane A, Akiya T, Takagi M. Randomized phase III study of S-1 alone versus S-1 cisplatin in the treatment for advanced gastric cancer (The SPIRITS trial): a phase III trial. *Lancet Oncol* 2008;9:215-21.

40. Narahara H, Iishi H, Imamura H, et al. Randomized phase III study comparing the efficacy and safety of irinotecan plus S-1 with S-1 alone as first-line treatment for advanced gastric cancer (study GC0301/TOP-002). *Gastric Cancer* 2011;14:72-80.

41. Ajani JA, Rodriguez W, Bodoky G, et al. Multicenter phase III comparison of cisplatin/S-1 with cisplatin/infusional fluorouracil in advanced gastric or gastroesophageal adenocarcinoma study: the FLAGS trial. *Journal of clinical oncology* 2010;28:1547-53.

42. Koizumi W, Kim YH, Fujii M, et al. Addition of docetaxel to S-1 without platinum prolongs survival of patients with advanced gastric cancer: a randomized study (START). *Journal of cancer research and clinical oncology* 2014;140:319-28.

43. Thuss-Patience PC, Kretzschmar A, Bichev D, et al. Survival advantage for irinotecan versus best supportive care as second-line chemotherapy in gastric cancer—a randomised phase III study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *European Journal of Cancer* 2011;47:2306-14.

44. Kang JH, Lee SI, Lim DH, et al. Salvage chemotherapy for pretreated gastric cancer: a randomized phase III trial comparing chemotherapy plus best supportive care with best supportive care alone. *Journal of Clinical Oncology* 2012;30:1513-8.

45. Ford HE, Marshall A, Bridgewater JA, et al. Docetaxel versus active symptom control for refractory oesophagogastric adenocarcinoma (COUGAR-02): an open-label, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet Oncology* 2014;15:78-86.

46. Ueda S, Hironaka S, Yasui H, et al. Randomized phase III study of irinotecan (CPT-11) versus weekly paclitaxel (wPTX) for advanced gastric cancer (AGC) refractory to combination chemotherapy (CT) of fluoropyrimidine plus platinum (FP): WJOG4007 trial. *ASCO Annual Meeting Proceedings*; 2012. p. 4002.

47. Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ, et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2013;383:31-9.

48. Wilke H, Muro K, Van Cutsem E, et al. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15:1224-35.

49. El-Rifai We, Powell SM. Molecular biology of gastric cancer. *Seminars in radiation oncology*; 2002: Elsevier. p. 128-40.

50. Siewert J, Stein H. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *British journal of surgery* 1998;85:1457-9.

51. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer: principles and practice of oncology—advances in oncology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2010.

52. Network CGAR. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014;513:202-9.

53. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell* 2011;144:646-74.

54. Skierucha M, Milne AN, Offerhaus GJA, Polkowski WP, Maciejewski R, Sitarz R. Molecular alterations in gastric cancer with special reference to the early-onset subtype. *World journal of gastroenterology* 2016;22:2460.

55. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *New England Journal of Medicine* 2002;347:1175-86.

56. Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. *Gastroenterology* 1998;115:642-8.

57. Sheh A, Fox JG. The role of the gastrointestinal microbiome in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Gut microbes* 2013;4:505-31.
58. Hamilton SR, Aaltonen LA, Cancer IAFRo, Organization WH. Pathology and genetics of tumours of the digestive system: IARC press Lyon; 2000.
59. González CA, Pera G, Agudo A, et al. Fruit and vegetable intake and the risk of stomach and oesophagus adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC–EURGAST). *International journal of cancer* 2006;118:2559-66.
60. MA M, Pera G, Agudo A, et al. Cereal fiber intake may reduce risk of gastric adenocarcinomas: The EPIC-EURGAST study. *International journal of cancer* 2007;121:1618-23.
61. Yuasa Y, Nagasaki H, Akiyama Y, et al. DNA methylation status is inversely correlated with green tea intake and physical activity in gastric cancer patients. *International journal of Cancer* 2009;124:2677-82.
62. Pelucchi C, Tramacere I, Bertuccio P, Tavani A, Negri E, La Vecchia C. Dietary intake of selected micronutrients and gastric cancer risk: an Italian case-control study. *Annals of oncology* 2008;mdn536.
63. Kato S, Tsukamoto T, Mizoshita T, et al. High salt diets dose-dependently promote gastric chemical carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils associated with a shift in mucin production from glandular to surface mucous cells. *International journal of cancer* 2006;119:1558-66.
64. Chen SY, Liu TY, Shun CT, et al. Modification effects of GSTM1, GSTT1 and CYP2E1 polymorphisms on associations between raw salted food and incomplete intestinal metaplasia in a high-risk area of stomach cancer. *International journal of cancer* 2004;108:606-12.
65. Sjødahl K, Jia C, Vatten L, Nilsen T, Hveem K, Lagergren J. Salt and gastric adenocarcinoma: a population-based cohort study in Norway. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2008;17:1997-2001.
66. Jenab M, Riboli E, Ferrari P, et al. Plasma and dietary carotenoid, retinol and tocopherol levels and the risk of gastric adenocarcinomas in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *British journal of cancer* 2006;95:406-15.
67. Baik S-C, Youn H-S, Chung M-H, et al. Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Cancer Research* 1996;56:1279-82.
68. Farinati F, Cardin R, Cassaro M, et al. *Helicobacter pylori*, inflammation, oxidative damage and gastric cancer: a morphological, biological and molecular pathway. *European journal of cancer prevention* 2008;17:195-200.
69. Fu S, Ramanujam KS, Wong A, et al. Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Gastroenterology* 1999;116:1319-29.
70. Machado AMD, Figueiredo C, Touati E, et al. *Helicobacter pylori* infection induces genetic instability of nuclear and mitochondrial DNA in gastric cells. *Clinical Cancer Research* 2009;15:2995-3002.
71. Sobala G, Schorah C, Shires S, et al. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut* 1993;34:1038-41.
72. Touati E, Michel V, Thiberge J-M, Wuscher N, Huerre M, Labigne A. Chronic *Helicobacter pylori* infections induce gastric mutations in mice. *Gastroenterology* 2003;124:1408-19.
73. Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, et al. *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nature medicine* 2007;13:470-6.
74. Cai X, Stoicov C, Li H, et al. Overcoming Fas-mediated apoptosis accelerates *Helicobacter*-induced gastric cancer in mice. *Cancer research* 2005;65:10912-20.
75. Chochi K, Ichikura T, Kinoshita M, et al. *Helicobacter pylori* augments growth of gastric cancers via the lipopolysaccharide-toll-like receptor 4 pathway whereas its lipopolysaccharide

attenuates antitumor activities of human mononuclear cells. *Clinical Cancer Research* 2008;14:2909-17.

76. Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *The Journal of clinical investigation* 2007;117:60-9.

77. Lin W-W, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of clinical investigation* 2007;117:1175-83.

78. Lin SJ, Gagnon-Bartsch JA, Tan IB, et al. Signatures of tumour immunity distinguish Asian and non-Asian gastric adenocarcinomas. *Gut* 2015;64:1721-31.

79. Alsina M, Moehler M, Hierro C, Guardado R, Tabernero J. Immunotherapy for Gastric Cancer: A Focus on Immune Checkpoints. *Targeted oncology* 2016:1-9.

80. Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J, Zhang XG, Xu N. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem* 2006;108:19-24.

81. Hou J, Yu Z, Xiang R, et al. Correlation between infiltration of FOXP3+ regulatory T cells and expression of B7-H1 in the tumor tissues of gastric cancer. *Experimental and molecular pathology* 2014;96:284-91.

82. Geng Y, Wang H, Lu C, et al. Expression of costimulatory molecules B7-H1, B7-H4 and Foxp3+ Tregs in gastric cancer and its clinical significance. *International journal of clinical oncology* 2015;20:273-81.

83. Lee H, Chae S, Lee Y, et al. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *British journal of cancer* 2008;99:1704-11.

84. Capelle LG, Van Grieken NC, Lingsma HF, et al. Risk and epidemiological time trends of gastric cancer in Lynch syndrome carriers in the Netherlands. *Gastroenterology* 2010;138:487-92.

85. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Human mutation* 2002;19:607-14.

86. Van Lier M, Wagner A, Mathus-Vliegen E, Kuipers E, Steyerberg E, Van Leerdam M. High cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and surveillance recommendations. *The American journal of gastroenterology* 2010;105:1258-64.

87. Vasen HF, Moeslein G, Alonso A, et al. Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP). *Gut* 2008;57:704-13.

88. Howe J, Sayed M, Ahmed A, et al. The prevalence of MADH4 and BMPR1A mutations in juvenile polyposis and absence of BMPR2, BMPR1B, and ACVR1 mutations. *Journal of medical genetics* 2004;41:484-91.

89. Friedenson B. BRCA1 and BRCA2 pathways and the risk of cancers other than breast or ovarian. *MedGenMed: Medscape general medicine* 2004;7:60-.

90. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 1998;392:402-5.

91. Majewski IJ, Kluijdt I, Cats A, et al. An α -E-catenin (CTNNA1) mutation in hereditary diffuse gastric cancer. *The Journal of pathology* 2013;229:621-9.

92. Oliveira C, Pinheiro H, Figueiredo J, Seruca R, Carneiro F. E-cadherin alterations in hereditary disorders with emphasis on hereditary diffuse gastric cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013;116:337-59.

93. Shah M, Salo-Mullen E, Stadler Z, et al. De novo CDH1 mutation in a family presenting with early-onset diffuse gastric cancer. *Clinical genetics* 2012;82:283-7.

94. Fitzgerald RC, Hardwick R, Huntsman D, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *Journal of medical genetics* 2010;47:436-44.

95. Frebourg T, Oliveira C, Hochain P, et al. Cleft lip/palate and CDH1/E-cadherin mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *Journal of medical genetics* 2006;43:138-42.

96. Pharoah PD, Guilford P, Caldas C, Consortium IGCL. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology* 2001;121:1348-53.
97. Gayther SA, Goringe KL, Ramus SJ, et al. Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. *Cancer Research* 1998;58:4086-9.
98. Guilford PJ, Hopkins JB, Grady WM, et al. E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. *Human mutation* 1999;14:249-55.
99. Suriano G, Oliveira C, Ferreira P, et al. Identification of CDH1 germline missense mutations associated with functional inactivation of the E-cadherin protein in young gastric cancer probands. *Human molecular genetics* 2003;12:575-82.
100. Fitzgerald R, Caldas C. Clinical implications of E-cadherin associated hereditary diffuse gastric cancer. *Gut* 2004;53:775-8.
101. Worthley D, Phillips K, Wayte N, et al. Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS): a new autosomal dominant syndrome. *Gut* 2012;61:774-9.
102. Yanaru-Fujisawa R, Nakamura S, Moriyama T, et al. Familial fundic gland polyposis with gastric cancer. *Gut* 2012;61:1103-4.
103. Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, et al. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management*. *Journal of medical genetics* 1999;36:873-80.
104. Corso G, Roncalli F, Marrelli D, Carneiro F, Roviello F. History, pathogenesis, and management of familial gastric cancer: original study of John XXIII's family. *BioMed research international* 2012;2013.
105. Carneiro F. Molecular events and classification in gastric cancer. *ESMO Preceptorship* September 2015;Brussels.
106. Lauren P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;64:31-49.
107. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. WHO classification of tumours of the digestive system: World Health Organization; 2010.
108. Dulak AM, Schumacher SE, van Lieshout J, et al. Gastrointestinal adenocarcinomas of the esophagus, stomach, and colon exhibit distinct patterns of genome instability and oncogenesis. *Cancer Res* 2012;72:4383-93.
109. Deng N, Goh LK, Wang H, et al. A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. *Gut* 2012;61:673-84.
110. Scaltriti M, Eichhorn PJ, Cortes J, et al. Cyclin E amplification/overexpression is a mechanism of trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:3761-6.
111. Ooi CH, Ivanova T, Wu J, et al. Oncogenic pathway combinations predict clinical prognosis in gastric cancer. *PLoS Genet* 2009;5:e1000676.
112. Lei Z, Tan IB, Das K, et al. Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to PI3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil. *Gastroenterology* 2013;145:554-65.
113. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 2013;499:214-8.
114. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med* 2015;21:449-56.
115. Moehler M, Delic M, Goepfert K, et al. Immunotherapy in gastrointestinal cancer: Recent results, current studies and future perspectives. *European Journal of Cancer* 2016;59:160-70.
116. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. 1984.

117. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 1985;229:974-6.
118. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim Y-M, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin™) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer research* 1998;58:2825-31.
119. Moody SE, Sarkisian CJ, Hahn KT, et al. Conditional activation of Neu in the mammary epithelium of transgenic mice results in reversible pulmonary metastasis. *Cancer cell* 2002;2:451-61.
120. Ursini-Siegel J, Schade B, Cardiff RD, Muller WJ. Insights from transgenic mouse models of ERBB2-induced breast cancer. *Nature Reviews Cancer* 2007;7:389-97.
121. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine* 2001;344:783-92.
122. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *New England Journal of Medicine* 2006;355:2733-43.
123. Verma S, Miles D, Gianni L, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *New England Journal of Medicine* 2012;367:1783-91.
124. Baselga J, Cortés J, Kim S-B, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine* 2012;366:109-19.
125. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews Cancer* 2005;5:341-54.
126. Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nature Reviews Cancer* 2009;9:463-75.
127. Weinberg R. *The biology of cancer*: Garland science; 2013.
128. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European journal of cancer* 2001;37:3-8.
129. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO journal* 2000;19:3159-67.
130. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental cell research* 2003;284:31-53.
131. Stephens P, Hunter C, Bignell G, et al. Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* 2004;431:525-6.
132. Wang SE, Narasanna A, Perez-Torres M, et al. HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer cell* 2006;10:25-38.
133. Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2007;99:628-38.
134. Ciardello F, Tortora G. EGFR Antagonists in Cancer Treatment (vol 358, pg 1160, 2008). *New England Journal of Medicine* 2009;360:1579-.
135. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002;296:1655-7.
136. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics* 2006;7:606-19.
137. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews Molecular cell biology* 2001;2:127-37.
138. Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, et al. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Progress in Hormone Research* 2000;56:127-55.
139. Marais R, Marshall C. Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer surveys* 1995;27:101-25.

140. Nagata Y, Lan K-H, Zhou X, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer cell* 2004;6:117-27.
141. Pelengaris S, Khan M. *The molecular biology of cancer: A bridge from bench to bedside*: John Wiley & Sons; 2013.
142. Neve RM, Holbro T, Hynes NE. Distinct roles for phosphoinositide 3-kinase, mitogen-activated protein kinase and p38 MAPK in mediating cell cycle progression of breast cancer cells. *Oncogene* 2002;21:4567-76.
143. Ishidate T, Elewa A, Kim S, Mello CC, Shirayama M. Divide and differentiate: CDK/Cyclins and the art of development. *Cell Cycle* 2014;13:1384-91.
144. Shapiro GI. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *Journal of Clinical Oncology* 2006;24:1770-83.
145. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer* 2009;9:153-66.
146. Hamilton E, Infante JR. Targeting CDK4/6 in patients with cancer. *Cancer Treatment Reviews* 2016;45:129-38.
147. Turner NC, Ro J, André F, et al. Palbociclib in hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *New England Journal of Medicine* 2015;373:209-19.
148. Fukushige S, Matsubara K, Yoshida M, et al. Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. *Molecular and Cellular Biology* 1986;6:955-8.
149. Takehana T, Kunitomo K, Kono K, et al. Status of c-erbB-2 in gastric adenocarcinoma: A comparative study of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization and enzyme-linked immuno-sorbent assay. *International journal of cancer* 2002;98:833-7.
150. Ooi A, Kobayashi M, Mai M, Nakanishi I. Amplification of c-erbB-2 in gastric cancer: detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by fluorescence in situ hybridization. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1998;78:345-51.
151. Ishikawa T, Kobayashi M, Mai M, Suzuki T, Ooi A. Amplification of the c-erbB-2 (HER-2/neu) gene in gastric cancer cells. Detection by fluorescence in situ hybridization. *The American journal of pathology* 1997;151:761.
152. Park K, Kim J, Lim S, Han S, Lee JY. Comparing fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization methods to determine the HER2/neu status in primary breast carcinoma using tissue microarray. *Modern pathology* 2003;16:937-43.
153. Barros-Silva J, Leitao D, Afonso L, et al. Association of ERBB2 gene status with histopathological parameters and disease-specific survival in gastric carcinoma patients. *British Journal of Cancer* 2009;100:487-93.
154. Yu GZ, Chen Y, Wang JJ. Overexpression of Grb2/HER2 signaling in Chinese gastric cancer: their relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2009;135:1331-9.
155. Tanner M, Hollmen M, Junttila T, et al. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase II α gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Annals of Oncology* 2005;16:273-8.
156. Yano T, Ohtsu A, Boku N, Hashizume K, Nakanishi M, Ochiai A. Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncology reports* 2006;15:65-71.
157. Hofmann M, Stoss O, Shi D, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008;52:797-805.
158. Ruschoff J, Dietel M, Baretton G, et al. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch* 2010;457:299-307.
159. Park DI, Yun JW, Park JH, et al. HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Digestive diseases and sciences* 2006;51:1371-9.

160. Gomez-Martin C, Plaza JC, Pazo-Cid R, et al. Level of HER2 gene amplification predicts response and overall survival in HER2-positive advanced gastric cancer treated with trastuzumab. *Journal of Clinical Oncology* 2013;31:4445-52.
161. Guimbaud R, Louvet C, Ries P, et al. Prospective, randomized, multicenter, phase III study of fluorouracil, leucovorin, and irinotecan versus epirubicin, cisplatin, and capecitabine in advanced gastric adenocarcinoma: a French intergroup (Federation Francophone de Cancerologie Digestive, Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer, and Groupe Cooperateur Multidisciplinaire en Oncologie) study. *Journal of Clinical Oncology* 2014;32:3520-6.
162. Janowitz T, Thuss-Patience P, Marshall A, et al. Chemotherapy vs supportive care alone for relapsed gastric, gastroesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma: a meta-analysis of patient-level data. *British journal of cancer* 2016;114:381-7.
163. Lordick F, Kang YK, Chung HC, et al. Capecitabine and cisplatin with or without cetuximab for patients with previously untreated advanced gastric cancer (EXPAND): a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013;14:490-9.
164. Waddell T, Chau I, Cunningham D, et al. Epirubicin, oxaliplatin, and capecitabine with or without panitumumab for patients with previously untreated advanced oesophagogastric cancer (REAL3): a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013;14:481-9.
165. Hecht JR, Bang Y-J, Qin S, et al. Lapatinib in combination with capecitabine plus oxaliplatin (CapeOx) in HER2-positive advanced or metastatic gastric, esophageal, or gastroesophageal adenocarcinoma (AC): The TRIO-013/LOGiC Trial. *J Clin Oncol* 2013 (suppl; abstr LBA4001).
166. Satoh T, Xu R-H, Chung HC, et al. Lapatinib plus paclitaxel versus paclitaxel alone in the second-line treatment of HER2-amplified advanced gastric cancer in Asian populations: TyTAN—a randomized, phase III study. *Journal of Clinical Oncology* 2014;JCO. 2013.53. 6136.
167. Kang Y-K, Shah MA, Ohtsu A, et al. A randomized, open-label, multicenter, adaptive phase 2/3 study of trastuzumab emtansine (T-DM1) versus a taxane (TAX) in patients (pts) with previously treated HER2-positive locally advanced or metastatic gastric/gastroesophageal junction adenocarcinoma (LA/MGC/GEJC). *ASCO Annual Meeting Proceedings*; 2016. p. 5.
168. Ohtsu A, Ajani JA, Bai YX, et al. Everolimus for previously treated advanced gastric cancer: results of the randomized, double-blind, phase III GRANITE-1 study. *J Clin Oncol* 2013;31:3935-43.
169. Ohtsu A, Shah MA, Van Cutsem E, et al. Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *J Clin Oncol* 2011;29:3968-76.
170. Van Cutsem E, de Haas S, Kang YK, et al. Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a biomarker evaluation from the AVAGAST randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2012;30:2119-27.
171. Li J, Qin S, Xu J, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of apatinib in patients with chemotherapy-refractory advanced or metastatic adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *Journal of Clinical Oncology* 2016;34:1448-54.
172. Pavlakis N, Sjoquist KM, Tsohanis E, et al. INTEGRATE: A randomized phase II double-blind placebo-controlled study of regorafenib in refractory advanced oesophagogastric cancer (AOGC)—A study by the Australasian Gastrointestinal Trials Group (AGITG), first results. *J Clin Oncol* 2015;33:4003.
173. Iveson T, Donehower RC, Davidenko I, et al. Rilotumumab in combination with epirubicin, cisplatin, and capecitabine as first-line treatment for gastric or oesophagogastric junction adenocarcinoma: an open-label, dose de-escalation phase 1b study and a double-blind, randomised phase 2 study. *Lancet Oncol* 2014;15:1007-18.
174. Cunningham D, Tebbutt NC, Davidenko I, et al. Phase III, randomized, double-blind, multicenter, placebo (P)-controlled trial of rilotumumab (R) plus epirubicin, cisplatin and capecitabine (ECX) as first-line therapy in patients (pts) with advanced MET-positive (pos)

gastric or gastroesophageal junction (G/GEJ) cancer: RILOMET-1 study. ASCO Annual Meeting Proceedings; 2015. p. 4000.

175. Cunningham D, Bang Y-J, Tabernero J, Shah MA, Lordick F, Hack SP. MetGastric: A randomized phase III study of onartuzumab (MetMab) in combination with mFOLFOX6 in patients with metastatic HER2-negative and MET-positive adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. ASCO Annual Meeting Proceedings; 2013. p. TPS4155.

176. Bang Y-J, Van Cutsem E, Mansoor W, et al. A randomized, open-label phase II study of AZD4547 (AZD) versus Paclitaxel (P) in previously treated patients with advanced gastric cancer (AGC) with Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2) polysomy or gene amplification (amp): SHINE study. ASCO Annual Meeting Proceedings; 2015. p. 4014.

177. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008;26:677-704.

178. Ralph C, Elkord E, Burt DJ, et al. Modulation of lymphocyte regulation for cancer therapy: a phase II trial of tremelimumab in advanced gastric and esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2010;16:1662-72.

179. Muro K, Bang Y, Shankaran V, et al. LBA15A phase 1B study of pembrolizumab (PEMBRO; MK-3475) in patients (Pts) with advanced gastric cancer. *Annals of Oncology* 2014;25:mdu438. 15.

180. Le DT, Bendell JC, Calvo E, et al. Safety and activity of nivolumab monotherapy in advanced and metastatic (A/M) gastric or gastroesophageal junction cancer (GC/GEC): Results from the CheckMate-032 study. *J Clin Oncol* 2016;34:6.

181. Segal N, Hamid O, Hwu W, et al. 1058PDA phase I multi-arm dose-expansion study of the anti-programmed cell death-ligand-1 (Pd-L1) antibody Medi4736: preliminary data. *Annals of Oncology* 2014;25:iv365-iv.

182. Herbst RS, Gordon MS, Fine GD, et al. A study of MPDL3280A, an engineered PD-L1 antibody in patients with locally advanced or metastatic tumors. ASCO Annual Meeting Proceedings; 2013. p. 3000.

183. Yamada Y, Nishina T, Iwasa S, et al. A phase I dose expansion trial of avelumab (MSB0010718C), an anti-PD-L1 antibody, in Japanese patients with advanced gastric cancer. ASCO Annual Meeting Proceedings; 2015. p. 4047.

184. Goel S, Wang Q, Watt AC, et al. Overcoming Therapeutic Resistance in HER2-Positive Breast Cancers with CDK4/6 Inhibitors. *Cancer cell* 2016;29:255-69.

185. Lee W-M, Baikf H-K. Expression of cyclin D1 and cyclin E in human gastric carcinoma and its clinicopathologic significance. *J Korean Med Sci* 1998;13:513-8.

186. Alsina M, Landolfi S, Aura C, et al. Cyclin E amplification/overexpression is associated with poor prognosis in gastric cancer. *Ann Oncol* 2015;26:438-9.

187. Arici D, Tuncer E, Ozer H, Simek G, Koyuncu A. Expression of retinoblastoma and cyclin D1 in gastric carcinoma. *Neoplasma* 2008;56:63-7.

188. Kumari S, Prasad SB, Yadav SS, et al. Cyclin D1 and cyclin E2 are differentially expressed in gastric cancer. *Medical Oncology* 2016;33:1-10.

189. Li VS, Wong CW, Chan TL, et al. Mutations of PIK3CA in gastric adenocarcinoma. *BMC cancer* 2005;5:29.

190. Shi J, Yao D, Liu W, et al. Highly frequent PIK3CA amplification is associated with poor prognosis in gastric cancer. *BMC cancer* 2012;12:50.

191. Cizkova M, Susini A, Vacher S, et al. PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ERa, PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Res* 2012;14:R28.

192. Majewski IJ, Nuciforo P, Mittempergher L, et al. PIK3CA mutations are associated with decreased benefit to neoadjuvant human epidermal growth factor receptor 2-targeted therapies in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2015;33:1334-9.

193. Baselga J, Phillips GDL, Verma S, et al. Relationship Between Tumor Biomarkers and Efficacy in EMILIA, a Phase III Study of Trastuzumab Emtansine in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 2016:clincanres. 2499.015.

194. Kang Y-H, Lee HS, Kim WH. Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Laboratory investigation* 2002;82:285-91.
195. Zhang L-L, Liu J, Lei S, Zhang J, Zhou W, Yu H-G. PTEN inhibits the invasion and metastasis of gastric cancer via downregulation of FAK expression. *Cellular signalling* 2014;26:1011-20.
196. Fei G, Ebert MP, Mawrin C, et al. Reduced PTEN expression in gastric cancer and in the gastric mucosa of gastric cancer relatives. *European journal of gastroenterology & hepatology* 2002;14:297-303.
197. Nuciforo P, Aura C, Holmes E, et al. Benefit to neoadjuvant anti-human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-targeted therapies in HER2-positive primary breast cancer is independent of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN) status. *Annals of Oncology* 2015:mdv175.
198. Hayashi M, Inokuchi M, Takagi Y, et al. High expression of HER3 is associated with a decreased survival in gastric cancer. *Clinical Cancer Research* 2008;14:7843-9.
199. Begnami MD, Fukuda E, Fregnani JH, et al. Prognostic implications of altered human epidermal growth factor receptors (HERs) in gastric carcinomas: HER2 and HER3 are predictors of poor outcome. *Journal of Clinical Oncology* 2011;29:3030-6.
200. Zhang XL, Yang YS, Xu DP, et al. Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer. *World journal of surgery* 2009;33:2112-8.
201. Juliachs M, Castillo-Ávila W, Vidal A, et al. ErbBs inhibition by lapatinib blocks tumor growth in an orthotopic model of human testicular germ cell tumor. *International Journal of Cancer* 2013;133:235-46.
202. Tao JJ, Castel P, Radosevic-Robin N, et al. Antagonism of EGFR and HER3 enhances the response to inhibitors of the PI3K-Akt pathway in triple-negative breast cancer. *Science signaling* 2014;7:ra29.
203. Duchnowska R, Sperinde J, Chenna A, et al. Quantitative measurements of tumoral p95HER2 protein expression in metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab: independent validation of the p95HER2 clinical cutoff. *Clinical Cancer Research* 2014;20:2805-13.
204. Arribas J, Baselga J, Pedersen K, Parra-Palau JL. p95HER2 and breast cancer. *Cancer research* 2011;71:1515-9.
205. Scaltriti M, Nuciforo P, Bradbury I, et al. High HER2 expression correlates with response to the combination of lapatinib and trastuzumab. *Clinical Cancer Research* 2015;21:569-76.
206. Loibl S, Bruey J, Von Minckwitz G, et al. Validation of p95 as a predictive marker for trastuzumab-based therapy in primary HER2-positive breast cancer: A translational investigation from the neoadjuvant GeparQuattro study. *ASCO Annual Meeting Proceedings*; 2011. p. 530.
207. Lee J, Kim S, Kim P, et al. A novel proteomics-based clinical diagnostics technology identifies heterogeneity in activated signaling pathways in gastric cancers. *PLoS One* 2013;8:e54644.
208. Oshima Y, Tanaka H, Murakami H, et al. Lapatinib sensitivities of two novel trastuzumab-resistant HER2 gene-amplified gastric cancer cell lines. *Gastric Cancer* 2014;17:450-62.
209. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;45:228-47.
210. Lopez JA, Pedersen K, Angellini P-D, Palau JLP, Laos S, Torres JB. Method for diagnosing cancers expressing the HER2 receptor or its truncated variants. *Google Patents*; 2013.
211. Huang W, Reinholz M, Weidler J, et al. Comparison of central HER2 testing with quantitative total HER2 expression and HER2 homodimer measurements using a novel proximity-based assay. *American journal of clinical pathology* 2010;134:303-11.
212. Larson JS, Goodman LJ, Tan Y, et al. Analytical validation of a highly quantitative, sensitive, accurate, and reproducible assay (HERmark®) for the measurement of HER2 total

- protein and HER2 homodimers in FFPE breast cancer tumor specimens. *Pathology research international* 2010;2010.
213. Sperinde J, Jin X, Banerjee J, et al. Quantitation of p95HER2 in paraffin sections by using a p95-specific antibody and correlation with outcome in a cohort of trastuzumab-treated breast cancer patients. *Clinical Cancer Research* 2010;16:4226-35.
214. Sidney S, Castellan N. *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta*. México, Trillas 1990.
215. Barton B, Peat J. *Medical Statistics: A Guide to SPSS, Data Analysis and Critical Appraisal*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd; 2014.
216. Nafteux PR, Lerut TE, Villeneuve PJ, et al. Signet ring cells in esophageal and gastroesophageal junction carcinomas have a more aggressive biological behavior. *Annals of surgery* 2014;260:1023-9.
217. Yang D, Hendifar A, Lenz C, et al. Survival of metastatic gastric cancer: significance of age, sex and race/ethnicity. *Journal of gastrointestinal oncology* 2011;2:77-84.
218. Xu C, Xie J, Liang N, et al. Concurrent involved-field radiotherapy and XELOX in gastric cancer patients with postoperative oligometastatic recurrence. *Journal of cancer research and therapeutics* 2014;10:267.
219. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *The lancet oncology* 2010;11:753-62.

