



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

Facultad de Medicina



**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA**

CURSO DE POSGRADO

ESPECIALISTA EN MEDICINA

FUNDACIÓN CLÍNICA MEDICA SUR



**“DETERMINACIÓN TISULAR DE LIPOCALINA ASOCIADA A
GELATINASA DE NEUTROFILOS (NGAL) Y
METALOPROTEINASA DE MATRIZ 9 (MMP-9) COMO
MARCADORES PRONÓSTICOS EN ADENOCARCINOMA
GÁSTRICO”**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA**

**PRESENTA:
DR. GABRIEL ORLANDO GARCÍA ACEVEDO**

**TUTOR DE TESIS:
DR. NORBERTO CHÁVEZ TAPIA**

MÉXICO, DF. NOVIEMBRE DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

Marco teórico	2
Epidemiología	2
Factores de riesgo y etiología	2
Fisiopatología y carcinogénesis	6
Presentación clínica y diagnóstico	9
Estadificación	10
Pronóstico	12
Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL)	13
Metaloproteínasa de matriz 9 (MMP-9)	14
Planteamiento del problema y justificación	16
Hipótesis	16
Objetivos	16
Métodos	16
Técnica de inmunohistoquímica	18
Análisis estadístico	19
Resultados	20
Discusión	24
Conclusiones	26
Referencias	27

MARCO TEÓRICO

EPIDEMIOLOGIA

A nivel mundial, el cáncer gástrico presenta una incidencia importante, acompañada de altas tasas de mortalidad. En 2008 se presentó con una incidencia de 989,600 casos nuevos y 738,000 muertes estimadas por esta causa, siendo la segunda causa de muerte por cáncer en hombres y la cuarta en mujeres [1]. En Estados Unidos, el cáncer gástrico tiene una incidencia estimada de 21,600 casos en 2013, con una mortalidad de 10,990 de estos pacientes [2]. Por otro lado, se ha visto una reducción en la incidencia de cáncer gástrico en pacientes migrantes de poblaciones con alta incidencia de esta neoplasia (Japón) a países con menor incidencia de la misma [3]. A pesar de la disminución en la incidencia, el número total de casos va en aumento, en

En México, las cifras son menos exactas, pero no menos impactantes. En 2008 el cáncer gástrico se colocó como la quinta neoplasia maligna más frecuente en ambos sexos, aunque se encuentra en tercer lugar en hombres y mujeres tomados por separado. En este año se identificó una incidencia de 4,327 casos en hombres y 3,532 casos en mujeres (total de 7,859), mientras que el número de defunciones por cáncer gástrico en ambos sexos fue de 6,751 [4].

Cabe destacar que estos números, aunque impresionantes, son parte de una estadística decreciente en la incidencia y mortalidad del cáncer gástrico en el mundo. Antes de 1990, el cáncer gástrico era la primera causa de muerte por cáncer a nivel mundial. Pero en la actualidad la incidencia y tasas de mortalidad han disminuido, permaneciendo cifras altas de incidencia en Japón, Rusia, Chile y algunos países de América Latina, mientras que en América del Norte y África se registran las menores incidencias [5].

En México, la tendencia es similar a otras partes del mundo, donde se ha visto una disminución en la mortalidad por cáncer gástrico, en particular en la última década, donde se registró una disminución de 24.51% en hombres y 20.95% en mujeres, ambos en el período comprendido entre 1999 y 2007 [6].

Mientras la incidencia global de cáncer gástrico ha mostrado una disminución importante, la incidencia de neoplasias a nivel de la unión gastroesofágica y del estómago proximal (cardias) ha mostrado un aumento de su incidencia, según reportes en los años noventa [7], así como la incidencia de cáncer gástrico en poblaciones más jóvenes [8].

FACTORES DE RIESGO Y ETIOLOGÍA

Esta disminución notable en la incidencia y mortalidad del cáncer gástrico, en particular en países desarrollados, se cree que se relaciona con la disminución de factores de riesgo relacionados con la dieta y otros factores ambientales [5].

Como se verá más adelante, el adenocarcinoma gástrico se puede dividir en dos tipos histológicos según Lauren, tipo intestinal y difuso [9], de los cuales el primero está más asociado con los factores de riesgo actualmente descritos.

Los factores de riesgo detectados para el desarrollo de carcinoma gástrico se pueden dividir principalmente en dos tipos, los relacionados con el ambiente (extrínsecos al paciente) y los relacionados al hospedero (intrínsecos al paciente).

Los principales factores de riesgo ambientales que se han caracterizado son:

1. Infección por *Helicobacter pylori*:

Actualmente la infección por *H. pylori* está considerada el factor de riesgo más importante para la carcinogénesis gástrica, siendo considerado un carcinógeno tipo 1 según la International Agency for Research on Cancer (IARC) [10] y llegando a ser una causa asociada de hasta el 80% de los casos de cáncer gástrico a nivel mundial.

Se ha propuesto que la infección por *H. pylori* en relación con la carcinogénesis gástrica depende de tres factores principales: Un hospedero susceptible genéticamente, una cepa virulenta y un medio gástrico favorable. El efecto carcinogénico de *H. pylori* parece depender de una inflamación crónica sostenida, la cual produce una cascada de eventos que llevan a la progresión secuencial de un epitelio gástrico normal a una lesión de gastritis atrófica. Ésta a su vez progresa a metaplasia intestinal, displasia y, de manera última, al adenocarcinoma gástrico [11].

Los mecanismos involucrados por parte de este agente infeccioso incluyen el daño a la mucosa gástrica mediante enzimas como ureasa, proteasa, fosfolipasa y sustancias como el amonio y el acetaldehído [12]. Estos procesos culminan en un daño oxidativo al DNA por especies reactivas de oxígeno y mediadores inflamatorios [11].

Cabe destacar que, además de la propia infección, el rol del sistema inmune del hospedero juega un papel importante al participar en la inflamación crónica que se ha descrito como precursora de la gastritis atrófica precedente a la cascada de la carcinogénesis [13,14]

La prevalencia global de la infección por *H. pylori* alcanza casi el 50%, siendo más prevalente en países en vías de desarrollo por la vía de transmisión fecal-oral propuesta [15]. Esto favorece las diferencias geográficas y socioeconómicas en la incidencia del cáncer gástrico.

2. Dieta

Los factores dietéticos juegan un papel primordial en la patogénesis del cáncer gástrico, siendo estos y su modificación a través de las últimas décadas, responsables en parte de la disminución de la incidencia de cáncer gástrico antes mencionada.

Los principales factores de riesgo en este rubro combinan el consumo excesivo de sal, el consumo de dietas ricas en almidones y pobres en frutas, vegetales y proteínas de alta calidad, así como el consumo de alimentos ricos en nitratos, nitritos y compuestos N-nitroso. El papel de la refrigeración de alimentos también ha tenido repercusiones en la modificación de estos factores de riesgo.

Se ha demostrado que el consumo excesivo de sal y alimentos salados como el pescado seco, carne seca o madurada, conservas en salmuera, entre otros; se asocian con un

aumento progresivo del riesgo de padecer cáncer gástrico, y este riesgo aumenta de manera proporcional al nivel de consumo de sal [16]. El alto consumo propicia la infección con *H. pylori*, además de que se sabe que la sal induce un estado de hipergastrinemia, gastritis atrófica, mutaciones endógenas y, en último término, proliferación endotelial [17, 18]. Incluso, se ha demostrado en modelos murinos que la administración de solución salina saturada induce la formación de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) y la consecuente formación de adenocarcinoma gástrico [19].

Por otro lado, el consumo de nitratos en la dieta se relaciona con la carcinogénesis gástrica por la producción de nitritos y agentes nitrosantes por las bacterias e incluso por macrófagos activados. El jugo gástrico *per se* convierte a los nitratos en compuestos N-nitroso, altamente carcinogénicos, y los nitritos de las bacterias se convierten en estos mismos compuestos al combinarse con otros compuestos nitrogenados [20]. Ciertos alimentos contienen de manera natural cantidades significativas de nitratos, como la coliflor, zanahoria, espinaca y betabel, mientras que la mayoría de los nitratos de la dieta provienen de conservadores agregados a los alimentos. Además, ciertas prácticas de la cocina como el asado, freído, rostizado, el secado al sol y el salado de los alimentos, incrementan la cantidad de nitrosaminas y compuestos N-nitroso en los mismos [12].

El ahumado de los alimentos, en particular de ciertos tipos de carnes y pescados, también se asocia con la carcinogénesis al depositar en los alimentos compuestos aromáticos policíclicos, principalmente benzo[a]pireno, conocidos también por su alto efecto carcinogénico [21].

En contraste, el consumo de vegetales y frutas se asocia con una disminución del riesgo de padecer cáncer gástrico, aunque los estudios aún no son del todo concluyentes [22,23]. Se ha propuesto que el mecanismo protector es el mayor aporte de antioxidantes, lo cual protege de las especies reactivas de oxígeno que se asocian al daño directo al DNA.

El aumento del uso de la refrigeración a nivel mundial se ha asociado a la disminución en las tasas globales de incidencia de cáncer gástrico[24]. Esto debido al menor uso de conservación agregada, salado, y una mayor posibilidad de transporte y almacenamiento de alimentos frescos, vegetales y frutas, que se asocian a un menor riesgo.

3. Obesidad

Se ha encontrado una asociación entre un índice de masa corporal (IMC) por arriba de 25 kg/m² y el riesgo de cáncer gástrico, además de un aumento en la fuerza de la relación conforme aumenta el IMC [25]. Cabe mencionar que este aumento de riesgo solo se ha relacionado a cáncer en la región proximal del estómago (cardias) y un estudio de cohorte reportó una razón de riesgo (*hazard ratio*, HR) de 2.46 [26].

4. Nivel socioeconómico y riesgo ocupacional

Se ha visto una mayor incidencia de cáncer gástrico distal en pacientes de menor nivel socioeconómico, aumentando el riesgo hasta dos veces en comparación de aquellos con mayor nivel [27]. Esta relación no se encontró con el cáncer gástrico proximal, mismo que parece ser más frecuente en pacientes de nivel socioeconómico medio a alto [28].

En cuanto a factores ocupacionales que aumentan el riesgo de padecer cáncer gástrico, podemos mencionar a los trabajadores del campo, mineros, pescadores, aquellos expuestos a calor excesivo, como los cocineros, trabajadores de aserraderos y lugares expuestos a polvos, así como aquellos que laboran donde hay una exposición significativa a polvo de arsénico y radiactividad [12].

5. Tabaquismo y consumo de alcohol

El tabaquismo se ha ligado a un riesgo aumentado de cáncer gástrico y, según un estudio, conlleva hasta 53% más del riesgo en comparación con los no fumadores. Se ha visto que este riesgo regresa a valores similares a los no fumadores después de 10 años de cesar el tabaquismo [29]. En el estudio European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) se encontró relación entre la intensidad del tabaquismo además de la duración, y se determinó el tabaquismo como un factor independiente para la mortalidad por cáncer gástrico incluso en aquellos sometidos a resección con objetivo curativo [30].

El consumo de alcohol no se ha podido relacionar de manera consistente a un incremento en el riesgo de cáncer gástrico, e incluso un estudio realizado en Europa demuestra un leve beneficio del consumo de vino blanco como factor protector [31].

Los principales factores de riesgo relacionados al paciente comprenden:

1. Predisposición hereditaria

Si bien los factores de riesgo ambientales son de suma importancia en la génesis del cáncer gástrico, también se han identificado factores heredados que suponen un riesgo mayor de padecer esta neoplasia.

En el caso del adenocarcinoma de tipo difuso, se considera clásicamente una enfermedad genética el cual, cuando se presenta como “cáncer gástrico hereditario”, alberga una mutación de línea germinal en el gen *CDH1*, mismo que codifica la cadherina-E, una molécula de adhesión. Los pacientes afectados presentan un riesgo de toda la vida de padecer cáncer gástrico de 70%, con un promedio de edad al diagnóstico de 40 años [32].

Otros síndromes de cáncer hereditario se han relacionado con un aumento importante en el riesgo de padecer cáncer gástrico. En el caso de la Poliposis Adenomatosa Familiar (*Familial Adenomatous Polyposis*, FAP) se sabe que hasta del 35 al 100% de los pacientes presentan adenomas gástricos, y presentan 10 veces más riesgo de presentar cáncer gástrico que la población general, siendo éste de predominio en glándulas fúndicas [33]. Por otro lado, los pacientes con Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipósico (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, HNPCC), presentan hasta 11% de riesgo de padecer adenocarcinoma gástrico, de tipo intestinal, con una edad promedio al diagnóstico de 56 años. Por último, los pacientes con Poliposis Juvenil, presentan un riesgo de hasta 20% de incidencia de cáncer gástrico.

Los síndromes de cáncer hereditario no son los únicos factores de este tipo relacionados. Se ha visto que los pacientes con historia familiar de cáncer gástrico tienen una frecuencia aumentada de aclorhidria, gastritis atrófica y metaplasia intestinal, y hay resultados inconclusos si tienen una mayor prevalencia de infección por *H. pylori*

[34,35].

Finalmente, debido a que la patogénesis que relaciona la infección por *H. pylori* involucra de manera importante la respuesta inmunológica del hospedero en la progresión de esta infección hacia las lesiones precursoras, se han identificado alteraciones que podrían aumentar este riesgo. Se ha descrito a la respuesta inmune de predominio TH1 como promotor de la gastritis atrófica. Además, polimorfismos en el gen que codifica la IL-1 β , así como su receptor, se han asociado con aumento en el riesgo de progresión hacia lesiones premalignas [36].

2. Lesiones precursoras de malignidad

La gastritis atrófica crónica, condición en la que se pierde el tejido glandular especializado en su región apropiada del estómago, es un cambio morfológico temprano que se ha establecido como parte de la secuencia hacia el desarrollo del cáncer gástrico. La gastritis atrófica presenta una incidencia anual de progresión a cáncer de 0.5-1%, la cual se relaciona a la extensión de la misma. Se distinguen dos tipos de gastritis atrófica [36]:

- a. Gastritis Atrófica Multifocal: Principalmente se asocia a la infección por *H. pylori*, además de asociarse mas a metaplasia intestinal así como progresión a cáncer. La infección por *H. pylori* se asocia a un riesgo aumentado 10 veces de presentar gastritis atrófica [37].
- b. Gastritis Atrófica Corporal: Se asocia a anticuerpos anti-células parietales o anti-factor intrínseco. Se localiza principalmente en fondo y cuerpo gástrico y tiene un menor riesgo de progresión a cáncer gástrico que la anterior [36].

Por su parte, la presencia de metaplasia intestinal, se puede dividir en tres tipos. La tipo I, la cual se considera una metaplasia completa, la tipo II, que es una metaplasia incompleta, y la tipo III que representa un estadio intermedio entre las primeras dos. Se ha descrito que la tipo I no representa un riesgo aumentado de cáncer, mientras que la presencia de tipo II o III incrementa el riesgo de padecerlo en 20 veces [36,38].

La displasia, se divide en displasia de bajo y alto grado. La primera se relaciona con regresión en 60% y progresión a displasia de alto grado en 20%. La displasia de alto grado se asocia con una progresión a cáncer gástrico de 2-6% anual, y se considera una lesión sincrónica asociada con cáncer gástrico [39].

Por último, pero no menos importante, los pólipos gástricos son lesiones que se presentan principalmente en fondo gástrico (77%), y el resto en el cuerpo, subdividiéndose a su vez en hiperplásicos y adenomatosos. De todos ellos, éstos últimos son los que confieren un aumento en el riesgo de cáncer gástrico, progresando a adenocarcinoma in situ el 11% en 4 años [36,39].

FISIOPATOLOGÍA Y CARCINOGENÉISIS

Alrededor del 90% de los casos de cáncer gástrico corresponden a adenocarcinomas, siendo el 10% restante una combinación de linfomas, carcinoides y tumores del estroma gastrointestinal (*GIST*) [40,41].

Los adenocarcinomas gástricos clásicamente se clasifican en 2 tipos, según Lauren [9]

como previamente se mencionó.

1. **Tipo intestinal:** Aparece con mayor frecuencia en el antro y la curvatura menor. Tiende a formar masas de estructuras glandulares cohesivas en forma exofítica o ulcerada. Las células neoplásicas por lo general muestran vacuolas apicales con mucina [40]. Representa el 50% de los adenocarcinomas gástricos y destaca por surgir, en hasta un 50% de los casos, de cambios metaplásicos y displásicos, siendo este el más relacionado a los factores de riesgo descritos previamente [41].
2. **Tipo difuso:** Aparece en cualquier parte del estómago, con predilección por el cardias. Se compone de células discohesivas que no forman glándulas, tienden a formar grandes vacuolas de mucina que desplazan al núcleo y citoplasma, dando frecuentemente la apariencia de “células en anillo de sello”. Tiene un patrón de crecimiento infiltrativo sin llegar a formar masas, además de inducir una reacción desmoplástica intensa que produce una rigidez en la pared gástrica conocida como “*linitis plástica*”. Representa hasta el 33% de los adenocarcinomas gástricos, y representa un peor pronóstico por la invasión transmural y mayor diseminación peritoneal [40,41].

Otra clasificación con buena aceptación es la creada por la Organización Mundial de la Salud en 2010 sobre tumores del tracto digestivo. Esta clasifica al cáncer gástrico en 5 tipos a diferencia de la anterior:

1. Papilar
2. Tubular
3. Mucinoso (tumores con cúmulos mucinosos excediendo el 50% del tumor)
4. Pobremente cohesivo (incluye adenocarcinoma con células en anillo de sello)
5. Mixto

Las primeras tres clasificaciones corresponden a variantes del tipo intestinal en la clasificación de Lauren, mientras que la cuarta corresponde al tipo difuso de esta misma clasificación [42].

Se cree que las vías de carcinogénesis son diferentes para el adenocarcinoma de tipo intestinal y el difuso.

En cuanto al adenocarcinoma de tipo intestinal, se ha propuesto que la carcinogénesis involucra un proceso de múltiples pasos donde la mucosa gástrica normal padece una gastritis crónica por *H. pylori*, misma que se convierte a gastritis atrófica, posteriormente progresa a metaplasia intestinal y esta a su vez a displasia de bajo grado y posteriormente de alto grado, siendo esta última lesión la que evoluciona a adenocarcinoma gástrico.

A pesar de que no se ha logrado caracterizar totalmente las anomalías genéticas en cada paso, a diferencia del modelo de carcinogénesis en colon y recto, se han identificado anomalías a tres niveles [39]:

1. Silenciamiento de genes supresores de tumores y activación de oncogenes:

En cuanto a genes supresores de tumores se han encontrado alteraciones en el gen TP53 en al menos 30% de regiones de metaplasia intestinal y en hasta el 58% de adenomas. Se observa inactivación de TP53 en hasta un 40% de adenocarcinoma intestinal en comparación de < 21% en adenocarcinoma difuso. Se observan mutaciones somáticas en el gen APC en 6% de metaplasias intestinales y en hasta 40% de los adenomas. Entre un 20 y 40% de adenocarcinomas intestinales presentan mutación en APC, en comparación con los de tipo difuso que la presentan en < 2%.

Por otro lado, entre los oncogenes amplificados se encuentra el HER2, que se detecta hasta en un 34% de los adenocarcinomas, principalmente en el adenocarcinoma de tipo intestinal, además de observarse un incremento significativo de su expresión en la progresión de displasia de bajo a alto grado. EGFR también se ha demostrado amplificado en 27% de los carcinomas, mientras que KRAS se ha detectado mutado en hasta el 28% de los adenocarcinomas intestinales, mientras que esta mutación no se encuentra en los de tipo intestinal.

2. Inestabilidad genómica

Se ha detectado inestabilidad microsatelital (microsatellite instability, MSI) en fases tempranas de la carcinogénesis gástrica, incluyendo gastritis crónica, metaplasia y adenoma. En el adenocarcinoma se encuentra MSI hasta en el 49% de los casos. Aproximadamente 11% de pacientes con síndrome de Lynch presentan adenocarcinoma gástrico, debido a mutaciones de línea germinal de los genes MLH1, MSH2 o MSH6; genes involucrados con sistemas de reparación de DNA. Estos tumores son, en su mayoría, de tipo intestinal.

La inestabilidad cromosomal, proceso que resulta en pérdidas o ganancias cromosomales y aneuploidia, representa un evento temprano en la carcinogénesis gástrica.

3. Alteraciones epigenéticas

La metilación de islas CpG en múltiples genes ha sido detectada, aunque es más prevalente en el adenocarcinoma de tipo difuso.

En el caso del adenocarcinoma de tipo difuso, la mayoría surgen de una manera esporádica. Sólo 10% de ellos tienen una etiología familiar y no más del 3% forman parte de un síndrome de cáncer hereditario.

Los genes involucrados en la génesis de este tipo de adenocarcinoma incluyen a los que codifican a moléculas de adherencia celular: E-cadherina, proteínas de “*tight junction*” y proteínas de “*gap junction*”. En general, mutaciones de línea germinal en el gen CDH1, que codifica para la E-cadherina, se encuentran hasta en un 40% de los tumores asociados a un síndrome de cáncer hereditario. En el caso de los casos esporádicos, esta mutación se encuentra *de novo* en un 4-7% de los pacientes antes de los 35 años [43]. Es evidente que aún no se han identificado los orígenes genéticos y moleculares de los casos restantes en los que no hay mutaciones en el gen *CDH1*, por lo que se requiere mayor investigación. La ausencia de expresión de E-cadherina en lesiones tempranas, incluso en lesiones *in situ*, sugiere que la pérdida de la expresión de esta molécula es un

evento temprano en la carcinogénesis de este tipo.

Es destacable que este tipo de cáncer no se encuentra en el contexto de lesiones premalignas tempranas, apareciendo en la mucosa gástrica normal. Es también importante mencionar que el pronóstico del adenocarcinoma difuso en etapa temprana es mejor que el de tipo intestinal, pero en etapas avanzadas la relación se invierte, teniendo un pronóstico peor [39].

PRESENTACIÓN CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO

Los pacientes con adenocarcinoma gástrico temprano se refieren asintomáticos en un 80% y los síntomas más frecuentes, cuando ocurren, simulan a los de la enfermedad ácido-péptica. Cuando se presenta en estadio avanzado, los síntomas más frecuentes son pérdida de peso en un 60% y el dolor o molestia abdominal en un 50% [44]. Otros síntomas frecuentes incluyen plenitud temprana, náusea y vómito, anorexia, disfagia y melena [36].

A la exploración física, comúnmente no se encuentran datos significativos hasta las etapas avanzadas, donde la caquexia y los signos de obstrucción intestinal son los más frecuentes. También se puede documentar una masa epigástrica, hepatomegalia, ascitis, sangrado de tubo digestivo, el cual suele ser oculto pero puede llegar a ser masivo [36, 45].

Al diagnóstico, el cáncer gástrico es metastásico en 33% de los casos, siendo el hígado y el peritoneo los lugares más frecuentes. En estas etapas avanzadas se pueden encontrar signos clásicamente descritos de diseminación como el nudo de la hermana Mary Joseph (área periumbilical), nudo de Virchow (nodos supraclaviculares izquierdos), signo rectal de Blumer (fondo de saco de Douglas) o el tumor de Krukenberg (metástasis a ovario). Estos signos son poco frecuentes [36].

Históricamente, el diagnóstico se realizaba con series radiográficas complementadas con contraste oral con bario. Actualmente el método de elección para el diagnóstico es la esofagogastroduodenoscopia (EGD), ya que permite la visualización directa del tumor, toma de biopsia la cual lleva a un diagnóstico citológico en un 90% de los casos. Las lesiones ulceradas y la linitis plástica son los tumores que más reto proponen para la endoscopia [36, 45, 46].

Los estudios adyuvantes en el diagnóstico y, como se verá mas adelante, en la estadificación, incluyen al ultrasonido endoscópico (UE), la tomografía computada (TC), la laparoscopia y se han estudiado algunos marcadores séricos, con poco éxito.

El UE tiene una gran precisión en determinar la profundidad de invasión del tumor, a pesar de tener menor precisión para determinar el involucro de nodos linfáticos regionales. El uso concomitante de la biopsia con aguja fina en esta técnica permite la evaluación precisa de nodos linfáticos regionales y hasta algunas metástasis distantes, en específico el hígado, aumentando su papel en el diagnóstico y la estadificación [46].

La TC tiene un papel importante en determinar la extensión de la enfermedad en el abdomen, en especial las metástasis hepáticas > 1 cm, involucro de nodos periaórticos o celiacos, y extensión extragástrica. Tiene deficiencias, por otro lado, en descartar metástasis hepáticas < 1 cm, o diseminación peritoneal. Es útil la TC de otros

segmentos corporales para descartar metástasis a sitios más distantes, las cuales pueden ser acompañadas de pruebas [46].

La laparoscopia ofrece la posibilidad de visualizar metástasis peritoneales o pequeñas metástasis serosas o hepáticas pequeñas [46].

Finalmente, en cuanto al uso de marcadores séricos para el diagnóstico del cáncer gástrico, no se ha encontrado un marcador confiable con la suficiente sensibilidad y especificidad. Se ha estudiado extensivamente al antígeno carcinoembrionario (ACE) y al antígeno carbohidrato (CA) 19-9 con sensibilidades bajas para el diagnóstico de cáncer gástrico temprano, y niveles elevados que se observan en otras neoplasias epiteliales, lo que los hacen marcadores de poco valor para el diagnóstico [47]. Investigaciones actuales han identificado marcadores potenciales como el factor transformador de crecimiento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), el CA 72-4, el factor de crecimiento de hepatocitos, entre otros. Sin embargo aún no existen estudios concluyentes para establecer alguno como valioso para el diagnóstico [36].

ESTADIFICACIÓN

La estadificación se lleva a cabo mediante las técnicas antes descritas para determinar la extensión y sitios distantes donde exista el cáncer gástrico. La estadificación se lleva a cabo para clasificar al tumor y determinar tanto el pronóstico y las opciones terapéuticas, mas concretamente, decidir si el tumor es candidato para manejo quirúrgico, quirúrgico con adyuvancia de quimioterapia o plantear un manejo con objetivo no curativo.

Existen varios métodos de clasificación. Ya fue mencionada la clasificación de Lauren, que lo clasifica en intestinal y difuso, confiriendo un peor pronóstico para este último. También se ha clasificado en temprano y avanzado, definiéndose el primero como aquel que no ha invadido más ala de la submucosa, sin importar el involucro de nodos linfáticos existentes. Este conlleva un muy buen pronóstico.

La clasificación desarrollada por la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y la *International Union Against Cancer* (UICC) es la más usada en la estadificación del adenocarcinoma gástrico, incluso en países asiáticos. La 7ª edición (2010) tiene una discreta pero significativa mejora en pronóstico y decisión de tratamiento.

La definición de TNM incluye:

Tumor primario (T)

TX: No se puede evaluar el tumor primario

T0: Sin evidencia de tumor primario

Tis: Carcinoma in situ (sin invasión de la *lamina propria*)

T1: El tumor invade la lamina propria, muscularis mucosae o submucosa

T1a: El tumor invade la lamina propria o la muscularis mucosae

T1b: El tumor invade la submucosa

T2: El tumor invade la muscularis propria

T3: El tumor invade el tejido conectivo subseroso sin invasión del peritoneo visceral

T4: El tumor invade la serosa (peritoneo visceral) o estructuras adyacentes

T4a: El tumor invade la serosa
 T4b: El tumor invade estructuras adyacentes

Nodos linfáticos regionales (N)

NX: No se pueden evaluar los nodos regionales
 N0: Sin metástasis en nodos regionales
 N1: Metástasis en 1-2 nodos regionales
 N2: Metástasis en 3-6 nodos regionales
 N3: Metástasis en 7 o más nodos regionales
 N3a: Metástasis en 7-15 nodos regionales
 N3b: Metástasis en 16 o más nodos regionales

Metástasis distantes (M)

M0: Sin metástasis a distancia
 M1: Metástasis a distancia

Esto nos lleva a la siguiente estadificación anatómica, que se traduce en grupos pronósticos, como se menciona adelante [48].

ESTADIO ANATÓMICO / GRUPO PRONÓSTICO			
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
Estadio IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
Estadio IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
Estadio IIIA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
Estadio IIIB	T4b	N0	M0
	T4b	N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
Estadio IIIC	T4b	N2	M0
	T4b	N3	M0
	T4a	N3	M0

Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1
------------	-------------	-------------	----

Es importante mencionar que esta clasificación no incluye a los tumores en el estómago proximal u la unión gastroesofágica.

PRONÓSTICO

El pronóstico, salvo en diagnóstico de cáncer gástrico temprano, por lo general es sombrío. La tasa global de supervivencia a 5 años en Estados Unidos de cáncer gástrico es de 24%, aunque en la mayoría de los países la tasa se calcula entre un 11-12% [36, 45].

El factor pronóstico mas importante para el adenocarcinoma gástrico es el tratamiento. Los pacientes que no se someten a resección tienen una supervivencia entre 3 y 11 meses. La profundidad de la invasión tumoral correlaciona con la supervivencia pero, la diseminación a nodos regionales es el factor pronóstico mas importante después del tratamiento [48].

Hablando en específico de los pacientes que se someten a resección completa, los factores pronósticos incluyen la localización del tumor en el estómago, siendo menos favorable en localizaciones proximales en el estomago; el grado histológico y la invasión linfovascular. La raza asiática, sexo femenino y menor edad confieren un mejor pronóstico [48]. Podemos hacer un resumen comparativo en relación a tasas de supervivencia a 5 años, comparando tres países industrializados con diferentes incidencias y de acuerdo al estadio clínico de la AJCC [49]:

TASAS DE SUPERVIVENCIA (%) A 5 AÑOS PARA PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO DE ACUERDO A ESTADIAJE CLÍNICO.			
Estadio	Estados Unidos	Japón	Alemania
IA	78	95	86
IB	58	75	72
II	34	46	47
IIIA	20	48	34
IIIB	8	18	25
IV	7	5	16

En relación al pronóstico de acuerdo a marcadores biológicos, ya sea séricos o expresados en el tumor, los niveles preoperatorios elevados de ACE y CA 19-9 séricos se relacionan con un peor pronóstico [48].

En este apartado, cabe mencionar que cada vez cobra más importancia la participación de los biomarcadores en la evaluación del pronóstico del adenocarcinoma gástrico. Y esto debido a varias condiciones.

Primero, a pesar de que el estadio determinado por patología es la herramienta más importante usada en la evaluación del pronóstico y la determinación de terapia

adyuvante en los pacientes con tumores resecables (estadios I a III), cabe mencionar que el cáncer gástrico es una enfermedad heterogénea tanto biológica como genéticamente, haciendo que el comportamiento del tumor no dependa únicamente de la estadificación clínica y patológica [50].

Segundo, en el caso de los pacientes con enfermedad metastásica (estadio IV), el pronóstico y la decisión de tratamiento se basan únicamente en factores clínicos [51].

Finalmente, Estos marcadores, nos pueden ayudar a estratificar a los pacientes de acuerdo a un comportamiento biológico del tumor y, posiblemente, hasta determinen cierta probabilidad de respuesta a la terapia sistémica [50]. Es aquí donde se necesita la validación de marcadores que puedan utilizarse de manera común en la práctica clínica.

Estos biomarcadores pueden ser investigados a varios niveles [50]:

1. Análisis genéticos que incluyan la evaluación de polimorfismos, perfiles de expresión génica o secuenciación de DNA.
2. Determinación de niveles de mRNA mediante estudios como la reacción en cadena de la polimerasa reversa transcripcional (RT-PCR).
3. Pruebas traduccionales como la inmunohistoquímica y el Western Blot para determinación de la expresión de proteínas.

Actualmente ningún marcador molecular, además del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), ha entrado en la práctica clínica común. La proteína HER2 es un receptor transmembrana del tipo de la tirosín-cinasa de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La proteína se codifica por el oncogén HER2 y constituye la primera molécula que su determinación se utiliza con éxito para la terapia dirigida, en este caso con el fármaco biológico trastuzumab [52].

A continuación hablaremos específicamente de dos marcadores que prometen un papel importante en la evaluación del pronóstico del cáncer y que por su participación en el crecimiento e invasión tumoral, su determinación puede ser importante en la estratificación del pronóstico en los pacientes e, incluso, formar parte de moléculas blanco para el tratamiento dirigido de la neoplasias, en este caso, del adenocarcinoma gástrico.

LIPOCALINA ASOCIADA A GELATINASA DE NEUTRÓFILO (NGAL)

La lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo (NGAL), también se conoce con nombres como lipocalina-2, siderocalina, uterocalina y 24p3. Es una proteína de 25 kDa perteneciente a la superfamilia de lipocalinas, las cuales desempeñan el papel de transportadores de sustancias hidrofóbicas [53].

En particular, la NGAL captura hierro en el espacio extracelular, transportándolo al espacio intracelular a través de su receptor transmembrana específico (24p3R, megalina), aumentando los niveles intracelulares de hierro. Este es el mecanismo que relaciona a la NGAL con su función en la inmunidad innata al ser liberado por los neutrófilos. Esto a su vez ha llevado al descubrimiento de que la NGAL se libera como una proteína de fase aguda en la inflamación, activando vías enzimáticas dependientes de hierro [53].

Sin embargo, recientemente sea encontrado a la NGAL como un participante activo en el proceso de crecimiento y diferenciación de tejidos desde la etapa embrionaria, lo que se traduce en un regulador fisiológico de la multiplicación celular. De hecho, se ha descubierto que su unión con el receptor 24p3R regula la proliferación celular mediante un mecanismo de depleción o aumento del hierro intracelular, el cual deriva a la célula hacia la apoptosis o hacia la supervivencia celular, respectivamente [53,54].

Por otro lado, se ha determinado que la NGAL actúa en la carcinogénesis no sólo por las vías mencionadas, sino mediante la regulación de la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9), ya que forma un homodímero o heterodímero con esta enzima (de aquí su nombre, al ser la MMP-9 una gelatinasa), lo cual protege a esta última de la degradación y, se ha planteado incluso, que acelera su activación [53,54].

La relación entre un aumento de la expresión de NGAL en ciertos tipos de cáncer se ha establecido, con resultados variables y contradictorios. A pesar de su claro papel en la proliferación celular y la cooperación en el degradado de la matriz extracelular (véase más adelante el apartado de la MMP-9), los resultados muestran una incipiente relación con un peor estadio clinicopatológico, pronóstico y supervivencia en tumores de mama, esófago, estómago, páncreas y colon [54-58], y correlación con un pronóstico menos desfavorable en tumores anaplásico de tiroides, ovario y páncreas [53,58].

METALOPROTEINASA DE MATRIZ 9 (MMP-9)

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son una familia de enzimas que consisten en al menos 28 endopeptidasas dependientes de zinc, las cuales se encargan de la degradación de los componentes de la matriz extracelular (MEC). Esta familia comparte componentes específicos funcionales y estructurales los cuales incluyen principalmente un péptido señal hidrofóbico, un dominios de propéptido para la latencia enzimática y un dominio catalítico con un sitio de unión a zinc altamente conservado [59,60]. Las MMP pueden actuar como enzimas secretadas libres o como proenzimas transmembrana. Ambas requieren su activación posterior a su secreción.

Las MMP se encargan de la degradación de los componentes de la MEC en situaciones fisiológicas y patológicas. De estas últimas, la progresión e invasión tumoral es la que concierne a este texto. Se ha descrito el papel de las MMP en este proceso a varios niveles. Por un lado, las MMP modulan las interacciones entre las células dentro del tumor, degradando la E-cadherina en las uniones; y por otro lado modula la relación del tumor con la MEC, procesando sus componentes y sus integrinas, lo que propicia la capacidad de invasión del tumor. Además, las MMP activan moléculas de señalización como citosinas y factores de crecimiento, ya sea liberándolas de la MEC o exponiéndolas de la superficie celular del tumor [61].

Las MMP se pueden clasificar en 6 subfamilias de acuerdo a su principal sustrato de la MEC, así como su homología en las secuencias del dominio catalítico. Actualmente se reconocen las siguientes subfamilias: matrilisinas, colagenasas, estromelisininas, gelatinasas, MMP unidas a membrana y un grupo no clasificable en las anteriores.

Dentro de las gelatinasas se encuentran la MMP-2 (gelatinasa A), y la MMP-9 (gelatinasa B). Las gelatinasas poseen un dominio de unión a colágeno dentro del dominio catalítico. Este dominio posee tres repeticiones de fibronectina tipo II y es responsable de la unión a sustratos colagenosos, elastina, ácidos grasos y

trombospondina. Esto hace que las gelatinasas puedan degradar varios componentes de la MEC, y a su vez, degradar moléculas que no son parte de la MEC [60]. Las gelatinasas cobran una gran importancia como biomarcadores en el cáncer debido a que se ha demostrado el aumento de su expresión en diversos tumores como mama, colon, páncreas, ovario, próstata, entre otros; y esta expresión aumentada se ha relacionado con un peor pronóstico en estos tumores mencionados [60,61].

Hablando en específico de la MMP-9, esta gelatinasa puede degradar los siguientes sustratos [60]:

1. Sustratos de la MEC: Colágenos III, IV y V, gelatina, elastina, vitronectina, entactina.
2. Otros sustratos: proTGF- β , proTNF- α , IL-2R α , ICAM-1, EGFR-1, Kit-ligando, CXCL1/GRO- α , CXCL4/PF4, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL11/ITAC, CXCL12/SDF-1, α 1-*proteinase-inhibitor*, plasminógeno, KISS-1, IFN- β .

La MMP-9 descubre sitios específicos de la MEC al degradarla, los cuales son críticos para la angiogénesis. Además, a través de esta degradación, pone al descubierto factores de crecimiento secuestrados dentro de la MEC, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), TGF- β y el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2).

A su vez, las gelatinasas exponen y activan TNF- α , TGF- β e IL-1 β , íntimamente relacionadas con la regulación del crecimiento, angiogénesis e inflamación. También procesan la proteína supresora de tumores kisspeptina (KiSS-1) para generar metastina, molécula que aumenta el potencial invasivo del tumor.

MMP-9 degrada el interferón IFN β (IFN- β), lo cual disminuye la actividad inmune antiviral en el tumor; disminuye la proliferación de linfocitos T al degradar el receptor α de la Interleucina 2 (IL-2R α), lo cual puede ser parte de la inmunosupresión inducida por el tumor; libera Kit-ligando, mismo que juega un papel importante en el crecimiento tumoral y la angiogénesis; y expone la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la cual ayuda al tumor a escapar de la citotoxicidad mediada por células *natural-killer* (NK) [60].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

El adenocarcinoma gástrico se encuentra en las primeras causas de muerte por cáncer en nuestro país, teniendo una tasa de mortalidad mayor que los tumores de colon. El pronóstico de los pacientes con cáncer gástrico es pobre aun en estadios tempranos y el riesgo de recurrencia posterior a tratamiento quirúrgico con intento curativo es alto. Actualmente el tratamiento perioperatorio con quimioterapia sistémica ha demostrado aumentar la supervivencia y disminuir la recurrencia en los pacientes con cáncer gástrico, y de manera concomitante, el pronóstico y la elección del tratamiento de los pacientes con metástasis al diagnóstico depende únicamente en el estadio clínico.

Existen marcadores moleculares cuya expresión en células tumorales han predicho supervivencia y respuesta al tratamiento en pacientes seleccionados con adenocarcinoma gástrico. Específicamente se revisó el papel de NGAL y MMP-9 en la tumorigénesis, invasión y metástasis, y su utilización como marcadores tisulares de pronóstico en el tumor. En México existen escasos estudios que combinen la determinación de estas moléculas y su asociación con pronóstico o supervivencia.

HIPOTESIS

La expresión aumentada, determinada por inmunohistoquímica, de las moléculas NGAL y MMP-9, en tejido de adenocarcinoma gástrico reseccable, se asocia con estadios patológicos más avanzados, mayor invasión local, ganglionar y metastásica, metaplasia intestinal, menor diferenciación, características como metaplasia intestinal, células en anillo de sello, así como relación positiva con infección por *Helicobacter pylori*.

OBJETIVOS

Determinar si existe relación entre la expresión aumentada de las moléculas NGAL y MMP-9, con un estadio patológico más avanzado, mayor invasión local, ganglionar y metastásica, metaplasia intestinal, menor diferenciación, presencia de metaplasia intestinal, células en anillo de sello, así como relación positiva con infección por *Helicobacter pylori*.

METODOS

Se realizó un estudio retrospectivo en el Centro Oncológico Integral Diana Laura Riojas de Colosio en conjunto con el Departamento de Anatomía Patológica del hospital Médica Sur. Se revisaron los casos de pacientes con adenocarcinoma gástrico reseccable diagnosticados y operados de 1999 al 2006, obteniendo los fragmentos de las biopsias correspondientes a cada resección. Se determinaron variables clínicas y patológicas que incluyen:

- Género
 - Masculino
 - Femenino
- Edad al diagnóstico
- Tipo de adenocarcinoma

- Intestinal.
Adenocarcinoma que tiende a formar masas de estructuras glandulares cohesivas en forma exofítica o ulcerada. Las células neoplásicas por lo general muestran vacuolas apicales con mucina [40].
- Difuso.
Adenocarcinoma compuesto de células discohesivas que no forman glándulas, frecuentemente compuestos por “células en anillo de sello”. Tiene un patrón de crecimiento infiltrativo sin llegar a formar masas, generalmente con una reacción desmoplástica intensa. Se llega a encontrar rigidez en la pared gástrica conocida como “*linitis plástica*” [40,41]
- Mixto
Tumores que exhiben ambos componentes tanto de tipo intestinal como difuso.
- Otras características
 - Metaplasia intestinal.
Se define como la sustitución total o parcial del epitelio gástrico normal por un epitelio con células de Paneth, células caliciformes que secretan sialomucinas y un epitelio de absorción, que puede estar bien definido y tener borde en cepillo [36].
 - Ulceración.
Definida como lesiones en la mucosa gástrica que se encuentran en un espectro desde erosiones superficiales con daño al epitelio superficial, hasta lesiones que penetran en todo el espesor de la mucosa [40].
 - Perforación.
Ulceración o erosión que atraviesa todas las capas de la pared gástrica (mucosa, submucosa, muscular y serosa).
 - Células en anillo de sello.
Células que tienden a formar grandes vacuolas de mucina que desplazan al núcleo y citoplasma hacia un polo de la célula, dando una apariencia característica [40].
- Diferenciación de acuerdo a observación cualitativa
 - Poco diferenciado
 - Moderadamente diferenciado
 - Bien diferenciado
- Localización
 - Unión esófago-gástrica
 - Fondo
 - Curvatura mayor
 - Curvatura menor
 - Antro
 - Píloro
 - Anastomosis gastroduodenal (si fue operado previamente)
- Invasión tumoral de acuerdo al grado de T del sistema TNM

- Invasión vascular
 - Invasión a la adventicia solamente
 - Permeación vascular
- Invasión perineural
- Presencia de implantes peritoneales
- Presencia de infección por *H. pylori*
- Tipo de cirugía realizada
 - Gastrectomía total
 - Gastrectomía radical
 - Gastrectomía subtotal radical
 - Resección esófago-gástrica
 - Esófago-gastrectomía radical
 - Hemigastrectomía
 - Antrectomía
- Antecedente de tabaquismo y alcoholismo

Asimismo, se realizó inmunohistoquímica en tejido de las biopsias recabadas para determinar:

- Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL)
- Metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9)

TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Se obtuvieron los bloques en parafina de las biopsias encontradas y se realizaron cortes de 4 micras de espesor. Se colocaron en laminillas electro-cargadas, las cuales se calentaron en la estufa de secado a una temperatura de 60°C por 35 minutos. Posteriormente se desparafinaron y rehidrataron con baños en el orden siguiente; xilol, etanol absoluto, alcohol al 96% y agua destilada. Se colocaron las laminillas con los cortes mencionados en solución amortiguadora (buffer) de citratos, se calentaron a presión durante dos minutos y una vez enfriados a temperatura ambiente se lavaron con agua destilada y se colocaron en el *rack* para añadir solución buffer de fosfatos (PBS) para realizar lavados. Se añadió peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% para inactivar los sitios inespecíficos de unión a anticuerpos durante 6 minutos y se lavó posteriormente tres veces con PBS con secado con papel absorbente. Se añadieron, entonces, los anticuerpos diluidos en solución especial para este efecto (BSB 0105, BioSB Inc.). Se usaron anticuerpos anti lipocalina-2 (GTX63306, GeneTex Inc.) y anti metaloproteinasa 9 (GTX100458, GeneTex Inc.) Se dejó incubar el anticuerpo por 55 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se retiró con papel absorbente, se lavaron tres veces las laminillas con PBS y se aplicó un sistema de detención de marca (BSB 0007, BioSB Inc.). Se incubaron con biotina por 10 minutos y se lavaron tres veces con OBS. Seguido de esto se incubaron con estreptoavidina por otros 10 minutos y se lavaron de nuevo con PBS. Para el revelado de las tinciones con el anticuerpo se añadió diaminobenzidina de manera manual, observando al microscopio óptico para evitar la sobreexposición de la tinción. Se sumergieron en agua las laminillas para posteriormente añadir hematoxilina por 15 segundos. Se lavaron de nuevo las laminillas con agua y se sumergieron en solución de carbonato de litio para “virar” la

hematoxilina. Se deshidrataron con baños consecutivos en el siguiente orden: alcohol al 96 %, etanol absoluto y xilol por dos minutos cada uno. Se montaron en resina permanente para microscopía y se colocaron cubreobjetos para su valoración por un patólogo experto.

Para determinar la tinción se usó un sistema cualitativo de positividad de la tinción determinado por la observación directa. Se utilizó una escala de 1+ para una tinción débil hasta 4+ para una tinción muy intensa, para ambos anticuerpos aplicados.

Se determinó una positividad para expresión aumentada de NGAL en aquellas laminillas calificadas con 3+ y 4+ por el patólogo. En el caso de la expresión de MMP-9 se determinó positividad para expresión aumentada en aquellas laminillas calificadas con 2+, 3+ o 4+.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se correlacionaron las variables descritas, todas cualitativas, con la determinación de la expresión aumentada de NGAL y MMP-9 tisular mediante prueba exacta de Fisher a dos colas, mediante el software QuickCals de GraphPad Software, determinando significancia estadística con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS GENERALES

Se obtuvieron 61 pacientes quienes fueron diagnosticados de adenocarcinoma gástrico con criterios de reseccabilidad que fueron operados en el periodo de 1996 a 2000. No se observó predominancia de algún género, con 32 pacientes masculinos y 29 femeninos. La edad promedio en años fue de 62 años con un rango de 29 a 89 años.

En cuanto a las características del tumor, el tipo más frecuente fue el difuso con 31 tumores, seguido del tipo intestinal con 20 y el mixto con 6. Además se observaron células en anillo de sello en 31 pacientes, entre tumores de tipo difuso e intestinal, con predominio en los de tipo difuso. Por otro lado, se observó metaplasia intestinal en 7 casos solamente. En cuanto al grado de diferenciación predominaron los tumores poco diferenciados con 37 de ellos, en contraste con 15 de moderada diferenciación y solamente uno bien diferenciado. El sitio de presentación del primario fue más frecuente en el estómago distal (cuerpo y antro) que en el estómago proximal (unión gastroesofágica y cardias), de los cuales se obtuvieron 19 pacientes.

Hablando propiamente de la progresión del tumor al momento de la resección, la mitad de los pacientes se presentó en una invasión local de T4 (24 pacientes). Fue frecuente que estos tumores tuvieran invasión perineural (28 pacientes) y permeación intravascular (31 pacientes). Por otro lado, en cuanto a la invasión ganglionar por territorios, menos de la mitad de los tumores presentaron invasión en dos o más territorios (17 pacientes). Finalmente se encontraron implantes peritoneales en 6 pacientes, a pesar de haberse incluido sólo los pacientes que tuvieran enfermedad con criterios de reseccabilidad.

Como dato adicional, se obtuvo el número de pacientes que presentó datos confirmatorios por biopsia de infección previa por *Helicobacter pylori*, conformando un total de 12 pacientes. Las características generales se resumen en la Tabla 1.

Cabe destacar que, de los 61 pacientes obtenidos, sólo se obtuvieron los tejidos incluidos en parafina de las biopsias de 55 pacientes, en quienes se realizó la inmunohistoquímica.

Tabla 1. Características generales		
	No. (n = 61)	% (excepto otro indicado)
Mediana de edad (rango)	62 (29-69)	DE = 14.44
Género		
Masculino	32	52.46
Femenino	29	47.54
Tipo		
Intestinal	20	32.79
Difuso	31	50.82
Mixto	6	9.84
Características adicionales		

Células en anillo de sello	31	50.82
Metaplasia intestinal	7	11.48
Grado de diferenciación		
Poco	37	68.52 (n = 54)
Moderado	15	27.78 (n = 54)
Alto	1	1.85 (n = 54)
Invasión tumoral		
T1	8	14.55 (n = 55)
T2	7	12.73 (n = 55)
T3	9	16.36 (n = 55)
T4	29	52.73 (n = 55)
Invasión a estructuras específicas		
Adventicia	4	6.90 (n = 58)
Perineuro	28	45.90
Permeación vascular	31	50.82
Metástasis ganglionar		
Ganglios en ≥ 2 territorios	21	34.43
Metástasis		
Implantes peritoneales	6	9.84
Localización		
Estómago proximal	19	31.67 (n = 60)
Infección por <i>H. pylori</i>	12	19.67

Resumen de las características de los pacientes incluidos. Se indica el número específico de pacientes (n) cuando no se tuvo la información completa en todos los expedientes obtenidos. DE, desviación estándar.

EXPRESIÓN DE NGAL MEDIDA POR INMUNOHISTOQUÍMICA

De los 55 especímenes de tejido disponibles para la inmunohistoquímica, se obtuvo una tinción positiva en 38 de ellos, representando el 69.1% de los pacientes. Se observó una mayor expresión de NGAL en los tumores de tipo difuso (36.36%) que en los de tipo intestinal (21.82%) o mixto (10.91%). Por otro lado también se observó una mayor expresión en los tumores con presencia de células con anillo de sello (36.36%) y en los de poca diferenciación (48.94%). Es notable, también, que la expresión fue mayor en los tumores en estadio T4 (33.33%), aunque ya se había mencionado una mayor proporción de tumores en este estadio de invasión. Se observó una mayor expresión en los tumores con invasión a estructuras específicas, como la invasión perineural (34.55%) y la permeación vascular (38.18%). Se correlacionó la expresión de NGAL con la localización del tumor primario, notándose aumentada en aquellos con localización proximal, esto es, unión gastroesofágica y fondo (24.07%), en comparación de aquellos localizados en cuerpo, antro o píloro.

Al contrario de lo esperado, se observó una expresión aumentada de NGAL en aquellos tumores en los que no se observó invasión ganglionar (38.18%), y no se observó un aumento notable en la expresión en los pacientes en los que se encontraron implantes peritoneales al momento del diagnóstico (7.27%). Finalmente se buscó la expresión de NGAL en aquellos en los que existía una infección documentada de *H. pylori*,

encontrándose una expresión levemente aumentada (16.36%)

Es importante mencionar que en todos estos hallazgos en cuanto a la expresión aumentada de NGAL en tejidos y su relación con las variables mencionada, no se encontró una significancia estadística, como se puede observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Correlación de la expresión de NGAL con características de 55 tumores					
	NGAL (+)	%	NGAL (-)	%	p
Género					
Masculino	22	40.00	9	16.36	0.7751
Tipo					
Intestinal	12	21.82	5	9.09	1
Difuso	20	36.36	10	18.18	0.7733
Mixto	6	10.91	2	3.64	1
Características adicionales					
Células en anillo de sello	20	36.36	9	16.36	1
Metaplasia intestinal	5	9.09	2	3.64	0.4376
Grado de diferenciación					
Poco	23	48.94	11	23.40	0.7256
Moderado	9	19.15	3	6.38	1
Alto	1	2.13	0	0.00	1
Invasión tumoral					
T1	4	8.33	4	8.33	0.4130
T2	6	12.50	1	2.08	0.3983
T3	6	12.50	2	4.17	0.7012
T4	16	33.33	9	18.75	0.7658
Invasión a estructuras específicas					
Adventicia	4	7.69	0	0.00	0.5420
Perineuro	19	34.55	4	7.27	0.1332
Permeación vascular	21	38.18	6	10.91	0.2448
Metástasis ganglionar					
Ganglios en \geq 2 territorios	9	16.36	6	10.91	0.3235
Metástasis					
Implantes peritoneales	4	7.27	2	3.64	1
Localización					
Estómago proximal	13	24.07	5	9.26	1
Infección por <i>H. pylori</i>	9	13.36	2	3.64	0.4711

EXPRESIÓN DE MMP-9 MEDIDA POR INMUNOHISTOQUÍMICA

En el caso de los 55 tumores a los que se les realizó inmunohistoquímica para determinar la expresión de MMP-9, se obtuvo positividad únicamente en 3 de las biopsias, representando el 5.45% de los pacientes. A pesar de este bajo porcentaje, se lograron evidenciar tendencias entre los tumores con el aumento de expresión de MMP-9, encontrando las siguientes características las predominantes en las muestras con dio aumento de expresión: tipo intestinal, poco diferenciados, con invasión a estructuras específicas como adventicia, perineuro y con permeación vascular, así como localización proximal.

De manera similar a la expresión de NGAL descrita arriba, no se obtuvo significancia estadística en la mayoría de las características mencionadas, a excepción de la invasión a la adventicia, (3.85%) la cual se correlacionó con la expresión aumentada de MMP-9 con significancia estadística ($p = 0.0132$). Además, en cuanto al adenocarcinoma de tipo difuso, predominó la baja expresión de MMP-9, tendencia fuerte, sin llegar a tener significancia ($p = 0.0877$). En la tabla 3 podemos observar la correlación de la expresión de MMP-9 y las características analizadas de los 55 tumores.

Tabla 3. Correlación de la expresión de MMP-9 con características de 55 tumores					
	MMP-9 (+)	%	MMP-9 (-)	%	p
Género					
Masculino	1	1.82	30	54.55	0.5700
Tipo					
Intestinal	2	3.64	15	27.27	0.2229
Difuso	0	0.00	30	54.55	0.0877
Mixto	1	1.82	7	12.73	0.3819
Características adicionales					
Células en anillo de sello	1	1.82	28	50.91	0.5976
Metaplasia intestinal	1	1.82	6	10.91	0.3407
Grado de diferenciación					
Poco	2	4.26	32	68.09	1
Moderado	1	2.13	11	23.40	1
Alto	0	0.00	1	2.13	1
Invasión tumoral					
T1	0	0.00	8	16.67	1
T2	0	0.00	7	14.58	1
T3	0	0.00	8	16.67	1
T4	1	2.08	24	50.00	1
Invasión a estructuras específicas					
Adventicia	2	3.85	2	3.85	0.0132
Perineuro	2	3.64	21	38.18	0.5619
Permeación	2	3.64	25	45.45	0.6110

vascular					
Metástasis ganglionar					
Ganglios en ≥ 2 territorios	0	0.00	14	25.45	0.5624
Metástasis					
Implantes peritoneales	0	0.00	6	10.91	1
Localización					
Estómago proximal	2	3.70%	16	29.63	0.255
Infección por <i>H. pylori</i>	1	1.82	10	18.18	0.4952

Por último, es importante destacar que en la totalidad de los tumores en los que se determinó una expresión aumentada de MMP-9, se detectó concomitantemente una expresión aumentada de NGAL, sin que llegara a tener significancia estadística, pero de acuerdo a lo esperado según la literatura.

DISCUSIÓN

En nuestro estudio, se identificaron ciertas características de los tumores en concordancia con las series descritas. Comenzando con las características demográficas, la mediana de edad corresponde a lo encontrado en series anteriores, lo que refleja un poco la transición epidemiológica lenta descrita en artículos previos en cuanto a la disminución de la incidencia de adenocarcinoma gástrico con permanencia de la incidencia en los pacientes jóvenes descrita en series entre 1977 y 2006 [8,62]. Por otro lado, no se encontró una predominancia clara en algún género, teniendo una distribución casi equitativa entre hombres y mujeres con una relación H:M de 1.1:1. Esto difiere de las estadísticas descritas de manera global [1,2,63] muy probablemente debido a las características particulares de la población en nuestro hospital.

Entrando en detalle en cuanto a las variables patológicas de los tumores analizados, se describió un predominio de tumores de tipo difuso, representando apenas poco más del 50% de los tumores analizados. Esto también va de acuerdo a la descripción en el cambio epidemiológico de la histología del adenocarcinoma gástrico [5]. El grado de diferenciación fue predominantemente bajo (68%) como en la mayoría de las series reportadas. En nuestro estudio encontramos una expresión de NGAL aumentada en los tumores de tipo difuso, así como en los de bajo grado de diferenciación, lo que asocia a la expresión aumentada de este marcador con un peor pronóstico, sin que demos demos que sea estadísticamente significativo. En el caso de la expresión aumentada de MMP-9, encontramos un predominio de tumores de tipo intestinal, aunque sin significancia demostrada. De manera sorprendente, la expresión de MMP-9 tuvo una relación inversa con la histología de tipo difuso, contrario a lo que se esperaría debido a la expresión aumentada de NGAL en éstos, tomando en cuenta que sólo encontramos una tendencia sin significancia estadística ($p = 0.0877$).

Los tumores reportados en nuestro estudio tuvieron características invasivas locales mayoritariamente en estadios T4 (>50%) y con presencia frecuente de invasión a estructuras vasculares y neurales dentro del tumor, así como de invasión ganglionar

extensa e incluso con casi un 10% de metástasis peritoneales a pesar de tratarse de pacientes candidatos a resección absolutamente o relativamente curativa. Esto refleja la predominancia del diagnóstico en estadios tardíos en nuestro hospital, como es reportado en la literatura [36,45,46]. Asimismo, observamos en nuestro estudio, un aumento no significativo de la expresión de NGAL en el estadio de invasión T4, en invasión neural y vascular, sin un aumento en los tumores que presentaron invasión ganglionar extensa. En contraste, al analizar la expresión aumentada de MMP-9 en nuestras biopsias, encontramos una relación débil pero presente entre los tumores poco diferenciados y en aquellos con invasión T4, nuevamente sin significancia estadística. Se encontró una relación significativa en la invasión a la adventicia vascular, lo que relacionaría un aumento de la expresión de MMP-9 con una mayor frecuencia de invasión local, lo que conllevaría a un peor pronóstico.

Finalmente, se relacionó la localización del tumor primario con la expresión de NGAL donde se encontró un aumento de la expresión no significativo en los tumores proximales, en comparación con los tumores del cuerpo y antro. Esto nos lleva a plantear una relación con el pronóstico, ya que la frecuencia de tumores de tipo difuso es mayor en los adenocarcinomas detectados en el estómago proximal, asociándolos con un peor pronóstico y mayor probabilidad de desarrollar *linitis plastica* [40].

La relación entre la infección concomitante con *H. pylori* y la expresión de NGAL y su papel aún no comprendido en la carcinogénesis gástrica ha sido descrita ya en otros estudios [64,65]. En nuestro estudio, encontramos una relación no significativa entre la expresión aumentada de NGAL y la infección con *H. pylori*, lo que concuerda con la relación mencionada.

Nuestro estudio tiene varias limitaciones. La primera de ellas es el tamaño de la muestra, el cual limita el poder estadístico de los hallazgos encontrados, a pesar de coincidir con los reportados en la literatura y en otros estudios. Otra limitación importante es el tipo particular de pacientes que se atienden en nuestro hospital, el cual no corresponde del todo con la epidemiología de la población general. Finalmente en nuestro estudio no se pudieron correlacionar los hallazgos y la expresión tisular con la mortalidad ya que en la gran mayoría de los expedientes de los pacientes identificados no existía un seguimiento adecuado y los índices de pérdida del paciente fueron muy grandes.

Con ello, a pesar de encontrar relaciones positivas entre las variables y la expresión de nuestros marcadores, no podemos asegurar dicha relación con un nivel de significancia estadístico. Para ello haría falta incluir una muestra mayor de pacientes, e incluir estudios moleculares que correlacionen de manera más eficaz la expresión de estos marcadores moleculares. En un estudio con 333 biopsias se encontró una relación significativa de la expresión aumentada de NGAL con el tamaño de tumor > 4 cm, con adenocarcinoma de tipo difuso, con metástasis ganglionares, a distancia, invasión vascular y con un estadio clínico más avanzado (III +IV). Asimismo, en este estudio se encontró una correlación con un menor tiempo de supervivencia para aquellos pacientes con tumores con mayor expresión de NGAL [66]. En otro estudio, se encontró una expresión aumentada de MMP-9 en tejidos de 28 pacientes con adenocarcinoma gástrico en comparación con tejidos gástricos sanos, aunque no se encontró una correlación clínica o pronóstica específica [67]. Existe un estudio que compara no sólo la expresión de NGAL, sino la expresión de los complejos NGAL:MMP-9 y su relación con la supervivencia en 81 pacientes con adenocarcinoma gástrico resecable,

demostrando una disminución significativa del tiempo de supervivencia en los pacientes con expresión aumentada de estos complejos [68]. Finalmente, cabe mencionar un metanálisis en el que se incluyeron 11 estudios con más de 1700 pacientes en el que se encontró una asociación débil pero significativa entre la expresión aumentada de MMP-9 y peor pronóstico clínico [69].

CONCLUSIONES

La expresión tisular aumentada de NGAL en adenocarcinoma gástrico se correlacionó de manera no significativa con un tipo histológico difuso, poca diferenciación, mayor invasión tumoral local, vascular y ganglionar.

La expresión tisular aumentada de MMP-9 en adenocarcinoma gástrico se correlacionó de manera no significativa con un tipo histológico intestinal, poca diferenciación; y de manera significativa con invasión a la adventicia vascular.

Hacen falta más estudios para determinar la significancia pronóstica de estos resultados.

REFERENCIAS

1. Ahmedin Jemal, Freddie Bray, et al. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90
2. Rebecca Siegel, Deepa Naishadham, Ahmedin Jemal. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 2013;63:11-30
3. Stomach cancer among Japanese in Hawaii. *J Natl Cancer Inst* 1972;49:969.
4. GLOBOCAN 2008 (International Agency for Research on Cancer 2008)
5. Paola Bertuccio, Liliane Chatenoud, et al. Recent patterns in gastric cancer: A global overview. *Int J Cancer*. 2009;125:666–673
6. Cristina Bosetti, Teresa Rodríguez, et al. Trends in cancer mortality in Mexico, 1981–2007. *Eur J Cancer Prev* 2011;20:355–363
7. Morteza Bashash, Amil Shah, et al. Incidence and survival for gastric and esophageal cancer diagnosed in British Columbia, 1990 to 1999. *Can J Gastroenterol*. 2008;22(2):143-148
8. Correa P. Gastric cancer: two epidemics? *Dig Dis Sci* 2011; 56:1585
9. Lauren P. The two histologic main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma. An attempt at a histological classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;64:31
10. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994; 61: 1-241
11. Kim SS, Ruiz VE, Carroll JD, Moss SF. *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma. *Cancer Lett* 2011; 305: 228-238
12. Siddavaram Nagini. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World J Gastrointest Oncol* 2012;4(7):156-169
13. Eaton KA, Mefford M, Thevenot T: The role of T cell subsets and cytokines in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* gastritis in mice. *J Immunol* 2001; 166:7456-7461.
14. Roth KA, Kapadia SB, Martin SM, Lorenz RG: Cellular immune responses are essential for the development of *Helicobacter felis*-associated gastric pathology. *J Immunol* 1999; 163:1490-1497.
15. Fock KM, Ang TL. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Asia. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 479-486
16. D'Elia L, Rossi G, et al. Habitual salt intake and risk of gastric cancer: A meta-analysis of prospective studies. *Clin Nutr* 2012;31(4):489-498

17. Wang XQ, Terry PD, Yan H. Review of salt consumption and stomach cancer risk: epidemiological and biological evidence. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2204-2213
18. Ramon JM, Serra L, Cerdo C, Oromi J. Dietary factors and gastric cancer risk. A case-control study in Spain. *Cancer* 1993; 71:1731-1735.
19. Kim DJ, Ahn B, Han BS, Tsuda H. Potential preventive effects of *Chelidonium majis* L. (Papaveraceae) herb extract on glandular stomach tumor development in rats treated with N-methyl-N'-nitro-N nitrosoguanidine (MNNG) and hypertonic sodium chloride. *Cancer Lett* 1997; 112: 203-208
20. Oldreive C, Rice-Evans C: The mechanisms for nitration and nitrotyrosine formation in vitro and in vivo: Impact of diet. *Free Radic Res* 2001; 35:215-231.
21. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2004; 14: 473-486
22. Kobayashi M, Tsubono Y, Sasazuki S, et al. Vegetables, fruit and risk of gastric cancer in Japan: A 10-year follow-up of the JPHC Study Cohort I. *Int J Cancer* 2002; 102:39-44
23. Freedman ND, Subar AF, Hollenbeck AR, et al. Fruit and vegetable intake and gastric cancer risk in a large United States prospective cohort study. *Cancer Causes Control* 2008; 19:459-467
24. Correa P, Haenszel W, Cuello C, et al: Gastric precancerous process in a high risk population: Cohort follow-up. *Cancer Res* 1990; 50:4737-4740.
25. Yang P, Zhou Y, Chen B, et al. Overweight, obesity and gastric cancer risk: results from a meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer* 2009; 45:2867.
26. Abnet CC, Freedman ND, Hollenbeck AR, et al. A prospective study of BMI and risk of oesophageal and gastric adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 2008; 44:465-471.
27. Barker DJ, Coggon D, Osmond C, Wickham C. Poor housing in childhood and high rates of stomach cancer in England and Wales. *Br J Cancer* 1990; 61:575.
28. Powell J, McConkey CC. Increasing incidence of adenocarcinoma of the gastric cardia and adjacent sites. *Br J Cancer* 1990; 62:440.
29. Ladeiras-Lopes R, Pereira AK, Nogueira A, et al. Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Cancer Causes Control* 2008; 19:689.
30. González CA, Pera G, Agudo A, et al. Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer* 2003; 107: 629-634
31. Barstad B, Sørensen TI, Tjønneland A, et al. Intake of wine, beer and spirits and

- risk of gastric cancer. *Eur J Cancer Prev* 2005; 14:239.
32. Lynch HT, Kaurah P, Wirtzfeld D, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: Diagnosis, genetic counseling, and prophylactic total gastrectomy. *Cancer* 2008; 112:2655-2663
 33. Zwick A, Munir M, Ryan CK, et al. Gastric adenocarcinoma and dysplasia in fundic gland polyps of a patient with attenuated adenomatous polyposis coli. *Gastroenterology* 1997; 113:659-663.
 34. Chang YW, Han YS, Lee DK, et al. Role of *Helicobacter pylori* infection among offspring or siblings of gastric cancer patients. *Int J Cancer* 2002; 101:469-474.
 35. El-Omar EM, Oien K, Murray LS, et al. Increased prevalence of precancerous changes in relatives of gastric cancer patients: critical role of *H. pylori*. *Gastroenterology* 2000; 118:22-30.
 36. Abrahams JA, Wang TC. Adenocarcinoma and other tumors of the stomach. In: Feldman: Sleisenger and Fordtran's *Gastrointestinal and Liver Disease*, 9th ed. 2010 Saunders, pp 892-893
 37. Kuipers EJ, Uytterlinde AM, Pena AS, et al. Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. *Lancet* 1995; 345:1525-1528.
 38. Leung WK, Sung JJ. Review article: Intestinal metaplasia and gastric carcinogenesis. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16:1209-1216.
 39. Yakirevich E. Pathology of Gastric Cancer and Its Precursor Lesions. *Gastroenterol Clin North Am.* 2013; 42(2): 261-284
 40. Turner JR. The Gastrointestinal Tract. In: Kumar: *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition*, 8th ed. 2009, Saunders.
 41. Ismail Gomceli, Baris Demiriz, Mesut Tez. Gastric Carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 2012; 18(37): 5164-5170
 42. Lauwers GY, Carneiro F, Graham DY, et al. Gastric carcinoma. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, et al, editors. *WHO classification of tumours of the digestive system*. 4th edition. Lyon (France): IARC Press; 2010. p. 48–58
 43. Corso G, Pedrazzani C, Pinheiro H, et al. E-cadherin genetic screening and clinico-pathologic characteristics of early onset gastric cancer. *Eur J Cancer.* 2011;47:631–9.
 44. Wanebo HJ, Kennedy BJ, Chmiel J, et al. Cancer of the stomach. A patient care study by the American College of Surgeons. *Ann Surg.* 1993; 218:583-592.
 45. Tobias J, Hochhauser D. Cancer of the oesophagus and stomach. In: *Cancer and its Management*. 6th edition. 2010, Wiley, pp 254-268.
 46. Leonard L. Gunderson, John H. Donohue, Steven R. Alberts. Cancer of the stomach. In: *Abeloff's Clinical Oncology*. 4th edition, 2008. Churchill

Livingstone. pp. 1431-1464

47. Fernandez-Fernandez L, Tejero E, Tieso A, et al. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis of the tumor markers CEA, CA 19-9 and CA 72-4 in gastric cancer. *Int Surg*. 1996; 81:400-402.
48. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. Stomach. In: *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th edition. 2010. Springer.
49. Hundahl SA, Phillips JL, Menck HR. The National Cancer Data Base Report on poor survival of U.S. gastric carcinoma patients treated with gastrectomy: Fifth Edition American Joint Committee on Cancer staging, proximal disease, and the "different disease" hypothesis. *Cancer*. 2000;88(4):921-32.
50. Pietrantonio F, De Braud F, Da Prat V, et al. A Review on Biomarkers for Prediction of Treatment Outcome in Gastric Cancer. *Anticancer Res* 2013; 33:1257-1266
51. Chau I, Norman AR, Cunningham D, et al. Multivariate prognostic factor analysis in locally advanced and metastatic esophago-gastric cancer – pooled analysis from three multicenter, randomized, controlled trials using individual patient data. *J Clin Oncol*. 2004;22: 2395-2403.
52. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010; 376: 687–97
53. Bolignano D, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human neoplasias: A new protein enters the scene. *Cancer Lett*. 2010; 288: 10–16
54. Leng X, Wu Y, Arlinghaus RB. Relationships of Lipocalin 2 With Breast Tumorigenesis and Metastasis. *J Cell Physiol*. 2011; 226: 309–314
55. Wenners AS, Mehta K, Loibl S, Park H, Mueller B, et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) Predicts Response to Neoadjuvant Chemotherapy and Clinical Outcome in Primary Human Breast Cancer. *PLoS ONE* 2012; 7(10): e45826. doi:10.1371/journal.pone.0045826
56. Kaur S, Chakraborty S, Baine MJ, Mallya K, Smith LM, et al. Potentials of Plasma NGAL and MIC-1 as Biomarker(s) in the Diagnosis of Lethal Pancreatic Cancer. *PLoS ONE* 2013; 8(2): e55171. doi:10.1371/journal.pone.0055171
57. Barresi V, Reggiani-Bonetti L, Di Gregorio C, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) prognostic value in stage I colorectal carcinoma. *Pathol Res Prac*. 2011; 207: 479–486
58. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, et al. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1826: 129–169

59. Groblewska M, Siewko M, Mroczko B, Szmitkowski M. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer. *Fol Histochem Cytobiol.* 2012; 50(1): 12-19
60. Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1825: 29-36
61. Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix Metalloproteinases As Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 5287-5297
62. Anderson WF, Camargo MC, Fraumeni JF, et al. Age-specific trends in incidence of noncardia gastric cancer in US adults. *JAMA.* 2010; 303(17):1723
63. Guggenheim DE, Shah, MA. Gastric Cancer Epidemiology and Risk Factors. *J Surg Oncol.* 2013;107:230–236
64. Chakraborty S. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2013; 1826:129–169
65. Alpízar-Alpízar W, Laerum OD, Illemann M, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL/Lcn2) is upregulated in gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori*. *Virchows Arch.* 2009; 455:225–233
66. Hui-Ju Wang, Xu-Jun He, Ying-Yu Ma, et al. Expressions of Neutrophil Gelatinase- Associated Lipocalin in Gastric Cancer: A Potential Biomarker for Prognosis and an Ancillary Diagnostic Test. *The Anat Rec.* 2010; 293:1855–1863
67. Sampieri CL, de la Peña S, Ochoa-Lara M, et al. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human gastric cancer and superficial gastritis. *World J Gastroenterol* 2010; 16(12):1500-1505
68. Kubben FJGM, Sier CFM, Hawinkels L. Clinical evidence for a protective role of lipocalin-2 against MMP-9 autodegradation and the impact for gastric cancer. *Eur J Cancer.* 2007; 43:1869–1876
69. Qiong-Wen Zhang, Lei Liu, Ru Chen. Matrix Metalloproteinase-9 as a Prognostic Factor in Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *Asian Pacific J Cancer Prev,* 2012; 13:2903-2908