

Valor pronóstico de la expresión del gen P53, del VEGF y de la angiogénesis tumoral en pacientes intervenidos por cáncer gástrico y la influencia de estos factores sobre la respuesta al tratamiento quimioterápico adyuvante

Constantino Fondevila Campo

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES QUIRÚRGICAS

Programa de doctorado: FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS DE LA CIRUGÍA

TESIS DOCTORAL:

VALOR PRONÓSTICO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN p53, DEL VEGF Y DE LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL EN PACIENTES INTERVENIDOS POR CÁNCER GÁSTRICO Y LA INFLUENCIA DE ESTOS FACTORES SOBRE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO ADYUVANTE.

Tesis presentada por D. CONSTANTINO FONDEVILA CAMPO para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Directores: Dr. Josep FUSTER OBREGÓN y Dr. Manuel PERA ROMÁN

Barcelona, 18 de Enero de 2002

RESULTADOS

RESULTADOS

1. ESTUDIO CLÍNICO.

1.1. Variables demográficas.

La serie incluye a 206 pacientes a los cuales se practicó una resección gástrica por adenocarcinoma. La distribución por sexos fue de 130 hombres y 76 mujeres con una edad media de 67 ± 12 años (r: 28 - 93). Un total de 91 pacientes (44,2 %) presentaban una edad igual o superior a 70 años (Tabla 12).

Tabla 12. Variables demográficas y localización tumoral.

	Serie global (n=206)	Resecciones curativas (n=156)
Edad (años)		
< 70 años	115 (55,8%)	88 (56,4%)
>70 años	91 (44,2%)	68 (43,6%)
Sexo		
Hombre	130 (63,1%)	101 (64,7%)
Mujer	76 (36,9%)	55 (35,3 %)
Localización tumoral		
Cardias-fundus	13 (6,3%)	11 (7,1 %)
Cuerpo	86 (41,7 %)	62 (39,7 %)
Antro-píloro	102 (49,5 %)	80 (51,3 %)
Generalizada	5 (2,4 %)	3 (1,9 %)

1.2. Sintomatología y antecedentes clínicos.

La sintomatología clínica más frecuentemente asociada a la enfermedad en el momento del diagnóstico fue, por orden de frecuencia: astenia, anorexia y pérdida de peso; dispepsia, regurgitación, vómitos y por último pirosis. La anemia crónica también fue un hallazgo frecuente pero únicamente en 9 casos la enfermedad debutó como hemorragia digestiva aguda. Ochenta y cinco pacientes presentaban o habían presentado enfermedad ulcerosa gastroduodenal. Otros

signos poco frecuentes en el momento del diagnóstico y que advertían de la extensión de la enfermedad fueron la existencia de una masa abdominal palpable en 5 casos, ascitis en 4 casos y un nódulo palpable supraclavicular en 3 casos. El tiempo medio de duración de la enfermedad fue de 2 meses.

Muchos pacientes presentaban enfermedades asociadas (54 %); con mayor frecuencia cardiovasculares, seguidas de pulmonares, diabetes y hepatopatía.

Se detectaron antecedentes de cáncer en familiares directos en 32 pacientes; tratándose en 14 de ellos de neoplasias gástricas (6,8 %). En 15 pacientes (7,3 %) existían antecedentes de cáncer. La localización del tumor había sido: próstata (3), estómago (2), pulmón (2), vejiga (2), colon sigmoide (1), colon derecho (1), melanoma tronco (1), linfoma de Hodking (1), labio (1), párpado (1).

El estado clínico de los pacientes de la serie se evaluó mediante dos escalas (Tabla 13) y fue el siguiente:

- ECOG: 0 (39 %); 1 (53 %); 2 (8 %)

- Índice de Karnofsky: 100 (11%); 90 (35%); 80 (32%); 70 (14%); 60 (8%).

Tabla 13. Escalas de puntuación del grado funcional de los pacientes.

ECOG (Zubrod)		Karnofsky	
Puntuación	Descripción	Puntuación	Descripción
0	Asintomático, actividad normal.	100	No evidencia de enfermedad.
		90	Actividad normal. Signos menores de evidencia enfermedad.
1	Ambulatorio, capaz de realizar un trabajo de naturaleza ligeramente sedentaria, ej. tareas del hogar, trabajo de oficina.	80	Actividad normal con esfuerzo, Algunos signos de enfermedad.
		70	Incapaz de realizar una actividad normal o trabajo. Se cuida por sí mismo.
2	En cama < 50% del tiempo. Capaz de realizar sus cuidados personales pero no puede trabajar.	60	Requiere asistencia ocasional. Capaz de cuidar de sus propias necesidades.
		50	Precisa considerable ayuda y frecuente asistencia médica.
3	En cama > 50% del tiempo. Capacidad limitada del cuidado personal.	40	Incapacidad importante. Precisa cuidados especiales.
		30	Incapacidad severa. Se precisa hospitalización.
4	Completamente encamado, incapaz de llevar a cabo sus cuidados personales.	20	Gravemente enfermo.
		10	Moribundo.

1.3. Tratamiento Quirúrgico.

El grado de curabilidad de la resección gástrica según los criterios de la AJCA fue: resección tipo A en 82 casos (39,8 %), resección tipo B en 82 casos (39,8 %) y resección tipo C en 42 casos (20,4 %).

La resección se consideró R0 (sin tumor residual) en 164 casos, R1 (tumor residual microscópico) en 23 casos y R2 (tumor residual macroscópico) en 19 casos. Para realizar el análisis estadístico, en el grupo de pacientes intervenidos con intención curativa, fueron excluidos 8 pacientes que fallecieron dentro de los 60 primeros días del postoperatorio.

Los resultados de las variables relacionadas con el acto quirúrgico quedan reflejadas en la tabla 14.

1.3.1. Complicaciones postoperatorias.

Las complicaciones postoperatorias de los pacientes incluidos en el estudio quedan reflejadas en la tabla 15. No se registró un aumento de complicaciones cuando la resección practicada fue con intención curativa. Las complicaciones más frecuentes fueron las respiratorias, seguidas de las dehiscencias anastomóticas. En nuestra experiencia no hubo relación entre la aparición de dehiscencia y el tipo de gastrectomía practicada.

La aparición de abscesos intraabdominales, asociados o no a dehiscencias anastomóticas, fue una complicación frecuente. La realización de un adecuado drenaje del mismo y el tratamiento antibiótico fueron casi siempre suficientes como tratamiento.

En nuestra serie destaca la elevada incidencia de infección de herida

quirúrgica postoperatoria, a pesar de haber realizado profilaxis antibiótica preoperatoria.

Tabla 14. Variables relacionadas con la intervención quirúrgica.

	Serie global (n=206)	Resecciones curativas (n=156)*
Tipo cirugía		
Gastrectomía Total	102 (49,5 %)	77 (49,4 %)
Gastrectomía subtotal	99 (48,1 %)	76 (48,7 %)
Gastrectomía de muñón	5 (2,4 %)	3 (1,9 %)
Esplenectomía	58 (28,2 %)	49 (31,4%)
Linfadenectomía		
D1	87 (42,2 %)	50 (32,1 %)
D2	119 (57,8 %)	106 (67,9 %)
Reconstrucción		
Esófagoyey. en Y de Roux	107	80
Gastroyey. en Y de Roux	90	76
Gastroyey. Billroth I	3	0
Gastroyey. Billroth II	6	0
Sutura		
Mecánica	187	141
Manual	19	15
Pérdidas hemáticas	194 ± 183 IC 95%= 159 -229	209 ± 209 IC 95%= 162-256
Transfusión (conc. Hematíes)		
0	151	116
1	2	2
2	42	29
3	5	4
4	4	3
5	2	2
Tiempo operatorio (minutos)	219 ± 49 (r=120-360) IC 95%= 210-228	227 ± 49 (r= 130-360) IC 95 %= 217-237

*Excluidos 8 pacientes que presentaron supervivencia menor a 60 días.

Tabla 15. Complicaciones postoperatorias.

RESPIRATORIAS:	22 (10,7 %); 19 en resecciones R0 (12,2 %) Neumonía 13 Derrame pleural 6 TEP 2 Empiema 1 Ventilación prolongada (>48 h): 4
INTESTINALES:	17 DEHISCENCIAS (8,2 %); 14 en resecciones R0 (9 %) Anast. Esófagoyey. 8 Muñón duodenal 6 Anast. Gastroyeyunal 3 <i>Tratamiento:</i> 7 relQ, 3 drenaje percutáneo, 7 trat.médico 4 ESTENOSIS (2 %): anastomosis esófagoyeyunal 1 OCLUSION (0,5 %)
ABSCESO INTRAABD.:	14 (6,8 %); 11 en resecciones R0 (7 %) Subfrénico izquierdo 10 Epigastrio 2 Hipogastrio 2 <i>Tratamiento:</i> 10 drenaje percutáneo, 7 trat.médico, 1 relQ
HEMORRAGIA:	6 (3 %); 5 en resecciones R0 (3,2 %)
INFECCIÓN HERIDA:	23 (11,2 %); 19 en resecciones R0 (12,2 %) 2 evisceraciones (1 en resecciones R0)
OTRAS:	31 (15 %) Infección vía central 10 Infección urinaria 5 Ascitis/edemas 3 Insuficiencia renal 3 Trombosis venosa profunda 3 Hemorragia digestiva alta 2 Infarto agudo de miocardio 1 Fístula pancreática 1 Pancreatitis 1 Isquemia mano yatrogénica 1 Toxicodermia por antibióticos 1

1.3.2. Reintervenciones.

Diecisiete pacientes (8,3%) tuvieron que ser reintervenidos por complicaciones acaecidas en el periodo postoperatorio inmediato. De ellos, 14

perteneían al grupo de pacientes intervenidos con intención curativa (9%). Los motivos de dichas reintervenciones aparecen en la tabla 16.

Tabla 16. Motivos de reintervención.

REINTERVENCIÓN QUIRÚRGICA:	17 (8,3 %); 14 en resecciones R0 (9 %)	
	Dehiscencia anastomosis	7
	Hemorragia	4
	Evisceración	2
	Absceso	1
	Coleperitoneo	1
	Colecistitis aguda	1
	Isquemia íleon	1

1.3.3. Mortalidad peroperatoria.

La mortalidad peroperatoria de la serie fue del 6,8 % (14 pacientes) dentro de los primeros 60 días del postoperatorio. En el grupo de pacientes intervenidos con intención curativa, dicha mortalidad fue del 4,9 % (8 pacientes).

Las causas finales de muerte fueron: sepsis y fallo multiorgánico (10 casos), tromboembolismo pulmonar (2 casos), insuficiencia respiratoria aguda (1 caso) y cardiogénica (1 caso).

1.4. Tratamiento quimioterápico.

El tipo de tratamiento quimioterápico postoperatorio que se administró a los pacientes de la serie se muestra en la tabla 17.

Quince pacientes presentaron toxicidad por el tratamiento quimioterápico y uno de ellos falleció por aplasia medular y shock séptico al mes de iniciar el tratamiento complementario.

Tabla 17. Tratamiento quimioterápico.

	Serie global (n=206)	Resecciones curativas (n=156)
QUIMIOTERAPIA		
NO	84 (40,8 %)	53 (34,0 %)
MMC	45 (21,8 %)	38 (24,4 %)
MMC + F-TORAFUR	77 (37,4 %)	65 (41,7 %)

2. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO.

La distribución de los tumores según la clasificación histológica propuesta por la OMS se detalla a continuación:

- Adenocarcinoma: 126 casos (51,2 %).
- Adenocarcinoma mucinoso: 16 casos (7,8 %).
- Adenocarcinoma papilar: 6 casos (2,9%).
- Adenocarcinoma tubular: 4 casos (1,9%).
- Carcinoma con células en anillo de sello: 50 casos (24,3 %)
- Carcinoma indiferenciado: 4 casos (1,9 %)

El grado histológico de diferenciación de los tumores fue:

- Tumores bien diferenciados: 10 (4,9 %).
- Tumores moderadamente diferenciados: 92 (44,7 %).
- Tumores poco diferenciados: 94 (45,6%).
- Tumores indiferenciados: 10 (4,9 %)

Algunas variables relacionadas con la afectación ganglionar, expresadas como media \pm desviación estándar, fueron:

- Ganglios extirpados: $15,9 \pm 9,8$ (rango: 1-67)
- Ganglios positivos: $4,8 \pm 6,2$ (rango: 0-30)

- Ratio ganglionar: $29,5 \pm 33,0$ (rango: 0-100)

El estudio anatomopatológico reveló la existencia de invasión linfática tumoral en 70 casos (34 %), invasión vascular en 26 (12,6 %) e invasión perineural en 35 (17%).

Otras variables relacionadas con el estudio anatomopatológico y el estadio tumoral aparecen en la tabla 18.

3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

3.1. Proteína p53.

La expresión de la p53 se detectó en 96 pacientes, lo que representa un 46,6 %. Se consideró que los tumores eran p53 positivos cuando se teñían más del 10% de las células tumorales.

3.2. Densidad microvascular (DMV).

El valor medio de las DMV máximas encontradas fue de 117,6 (IC 95 %: 111,8 - 123,5) y el valor medio de las DMV medias de 98,9 (IC 95 %: 94,7 - 103,2). A la hora de clasificar a los pacientes con el objetivo de realizar el estudio estadístico se establecieron dos grupos en función del grado de DMV tumoral media. Para ello se dividieron los pacientes de acuerdo a dos puntos de corte:

A. Grupo 1: <80 microvasos: 60 casos y Grupo 2: >80 microvasos: 146 casos.

B. Grupo 1: < 100 microvasos: 101 casos y Grupo 2: > 100 microvasos: 105 casos.

Tabla 18. Variables relacionadas con el estudio anatomopatológico y el estadio tumoral (UICC).

	Serie global (n=206)	Resecciones curativas (n=156)
Clasificación de Lauren		
Intestinal	125 (60,7 %)	97 (62,2 %)
Difuso	81 (39,3 %)	59 (37,8 %)
Tamaño tumoral (cm)	6 ± 3,1; r=1-20 IC 95%= 5,4-6,6	5,4 ± 2,7; r= 1-13 IC 95%= 4,8-6
Diferenciación tumoral		
Buena	10 (4,9 %)	6 (3,8 %)
Moderada	92 (44,7 %)	73 (46,8 %)
Pobre	94 (45,6%)	69 (44,2 %)
Indiferenciado	10 (4,9 %)	8 (5,1 %)
Categoría pT (UICC)		
T1	30 (14,6 %)	28 (17,9 %)
T2	97 (47,1 %)	75 (48,1 %)
T3	70 (34 %)	51 (32,7 %)
T4	9 (4,4 %)	2 (1,3 %)
Categoría pN (UICC)		
N0	74 (35,9 %)	66 (42,3 %)
N1	69 (33,5 %)	54 (34,6 %)
N2	46 (22,3 %)	33 (21,2 %)
N3	17 (8,3 %)	3 (1,9 %)
Ratio ganglios + / extirpados		
0	74 (35,9 %)	66 (42,3 %)
< 30 %	52 (25,2 %)	48 (30,8 %)
> 30 %	80 (38,8 %)	42 (26,9 %)
Nx (< 15 ganglios extirpados en la pieza de resección)	53 (25,7 %)	39 (25 %)
Categoría pM (UICC)		
M0	168 (81,6 %)	151 (96,8 %)
M1	38 (18,4 %)	5 (3,2 %)
Estadio Tumoral (UICC)		
IA	20 (9,7 %)	19 (12,2 %)
IB	42 (20,4 %)	39 (25 %)
II	44 (21,4%)	42 (26,9 %)
IIIA	31 (15 %)	27 (17,3 %)
IIIB	24 (11,7 %)	21 (13,5 %)
IV	45 (21,8%)	8 (5,1 %)

3.3. VEGF.

La expresión del VEGF fue negativa en 46 casos (22,3%) y positiva en 160 casos (77,7%). De estos últimos podemos diferenciar también dos grupos según la intensidad de la tinción (Tabla 19).

Tabla 19. Distribución de los pacientes en función de la expresión de la p53, del VEGF y de la DMV.

	Serie global (n=206)	Resecciones curativas (n=156)
P 53		
Positiva	96 (46,6 %)	71 (45,5 %)
Negativa	110 (53,4 %)	85 (54,5 %)
DMV		
< 80	60 (29,1 %)	43 (27,6 %)
>80	146 (70,9 %)	113 (72,4 %)
<100	101 (49,0%)	74 (47,4 %)
>100	105 (51,0 %)	82 (52,6 %)
VEGF		
Negativo	46 (22,3 %)	40 (25,6 %)
Positivo:		
+	114 (55,3 %)	83 (53,2 %)
++	46 (22,3 %)	33 (21,2 %)

4. SEGUIMIENTO Y SUPERVIVENCIA.

4.1. Supervivencia global y relacionada con la enfermedad de la serie completa de pacientes.

El seguimiento medio de la serie es de 34 meses (IC 95%= 29-39, rango= 0-191), con una mediana de seguimiento de 22 meses.

La supervivencia global a los 24 y a los 60 meses fue del 54,7 y 42,4%, respectivamente (Figura 19). La mediana de supervivencia o tiempo en el cual el 50% de los pacientes estaban vivos fue de 34 meses.

Figura 19. Supervivencia global de los pacientes de la serie.

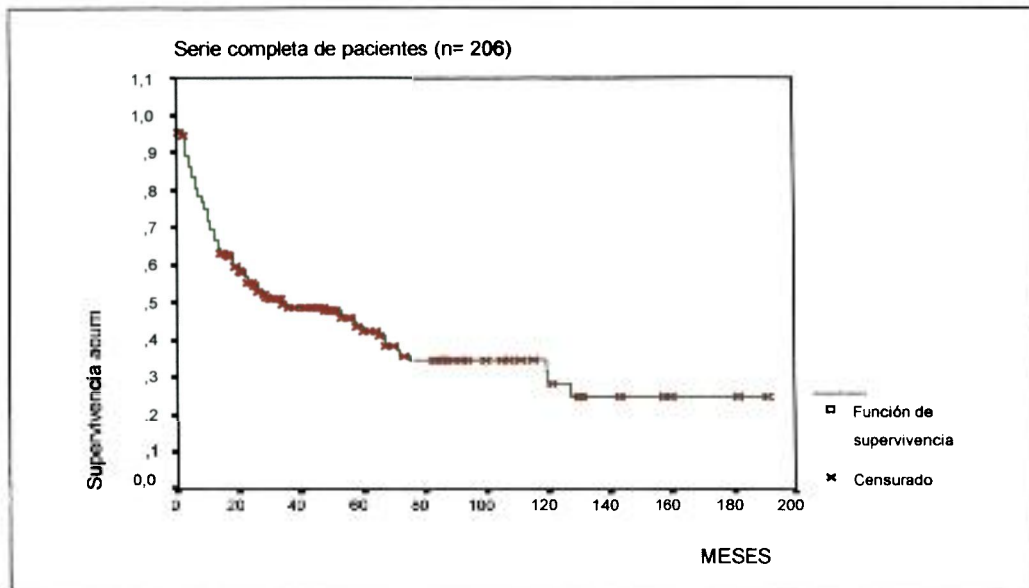
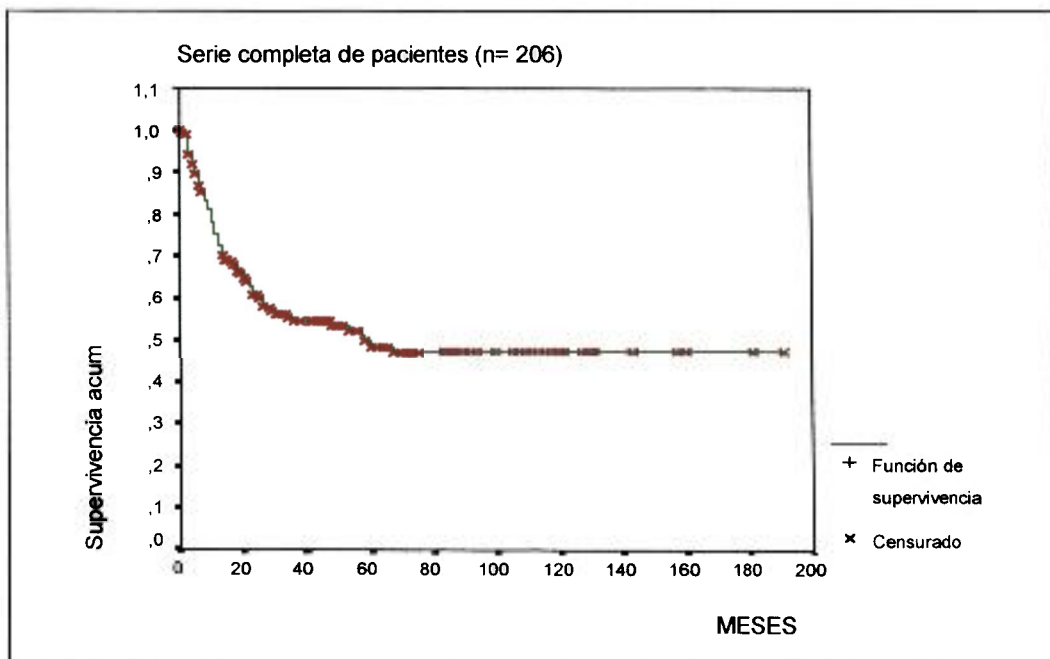


Figura 20. Supervivencia relacionada con la enfermedad de los pacientes de la serie.



La supervivencia relacionada con la enfermedad para la serie completa de pacientes a los 24 y a los 60 meses fue del 60,3 % y del 48,4 %, respectivamente con una mediana de supervivencia de 58 meses.

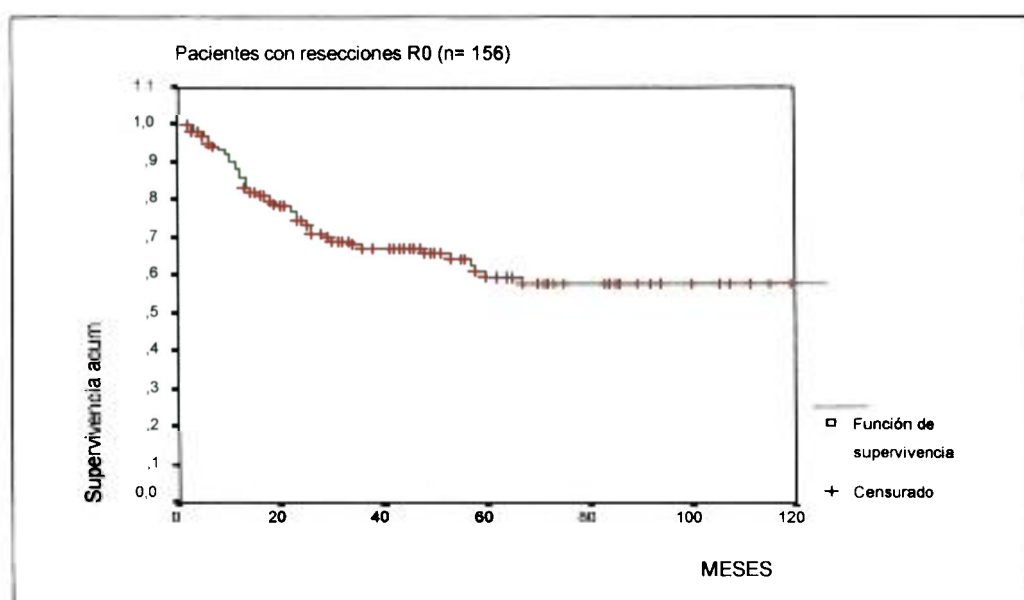
La diferencia entre ambas curvas de supervivencia se debe a que hubo 13 pacientes que fallecieron a partir de los 60 días del postoperatorio por causas no relacionadas directamente con el cáncer gástrico sin evidencia de recidiva de la enfermedad (en total 27 pacientes si sumamos los pacientes que fallecieron en el periodo postoperatorio). Es necesario señalar que muchos de estos pacientes tenían edades avanzadas y fallecieron tras largos periodos de seguimiento (8 con seguimientos superiores a cinco años). Las causas de muerte fueron: insuficiencia respiratoria aguda (3), pancreatitis (1), infarto agudo de miocardio (1), muerte súbita (1), accidente vascular cerebral (3) y otras causas (4).

4.2. Supervivencia global y relacionada con la enfermedad de los pacientes intervenidos con intención curativa.

Hemos considerado como pacientes intervenidos con intención curativa aquellos cuyo grado de curabilidad de la resección gástrica fue A ó B según los criterios de la AJCG (Tabla 10). Este grupo lo constituyen 164 pacientes. Como ya hemos comentado, 8 pacientes fueron excluidos del análisis debido a que fallecieron dentro de los 60 primeros días del postoperatorio, y aunque son muertes relacionadas con la enfermedad, no se consideran causadas por la progresión del tumor.

El seguimiento medio de este subgrupo de pacientes fue de 43 meses (IC 95%= 37-49, rango= 2-191), con una mediana de seguimiento de 29 meses.

Figura 21. Supervivencia relacionada con la enfermedad de los pacientes intervenidos con intención curativa.



La supervivencia global de los pacientes operados con intención curativa a los 24 y a los 60 meses fue del 68,8 y 53,9%, respectivamente. La mediana de supervivencia fue de 67 meses.

La supervivencia relacionada con la enfermedad para los pacientes operados con intención curativa a los 24 y a los 60 meses fue del 73,4 % y 59,6 %, respectivamente.

4.3. Pacientes con recidiva tumoral.

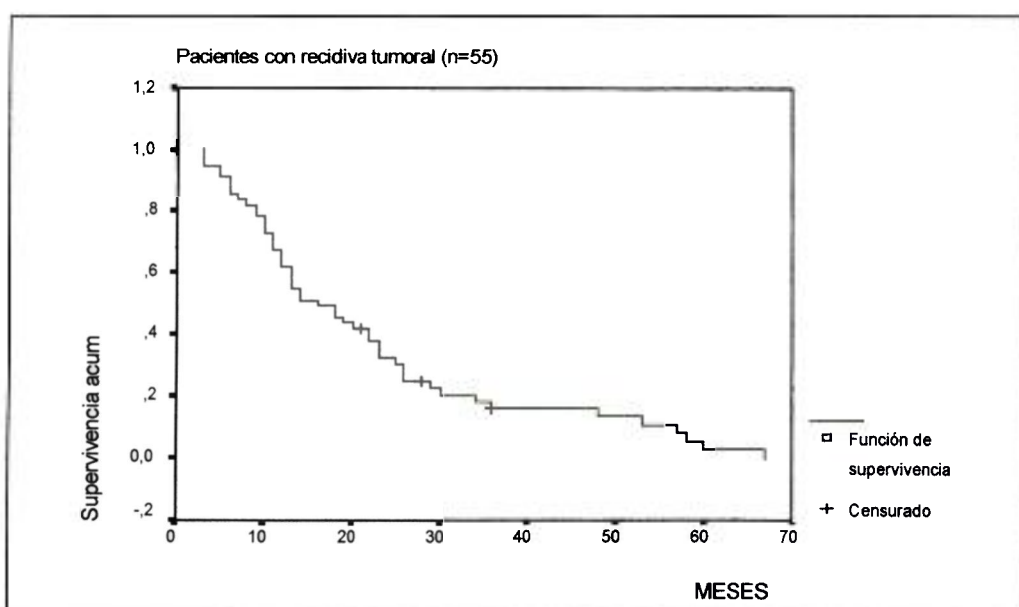
En el grupo de pacientes intervenidos con intención curativa, 55 (35%) presentaron una recidiva de la enfermedad. Es interesante analizar por separado la

supervivencia de este subgrupo de pacientes:

- Pacientes sin recidiva (n=101): seguimiento medio 55 meses (IC 95%: 46-63, rango: 2-191).

- Pacientes con recidiva (n=55): seguimiento medio 21 meses (IC 95%: 17-25, rango: 3-67). El seguimiento medio de los pacientes desde que se evidenció la recidiva fue de 4,3 meses (IC 95%: 3,3-5,4, rango: 0-17). Así pues, una vez que se detecta la recidiva, la supervivencia de estos pacientes es muy corta.

Figura 22. Supervivencia relacionada con la enfermedad de los pacientes intervenidos con intención curativa que presentaron una recidiva tumoral.



La supervivencia relacionada con la enfermedad para los pacientes operados con intención curativa que presentaron recidivas de la enfermedad fue del 30,4 % a los 24 meses y del 0% a los 67 meses.

5. ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN EXISTENTE ENTRE LA DENSIDAD MICROVASCULAR (ANGIOGÉNESIS) Y LA EXPRESIÓN DE LA P53 Y DEL VEGF.

5.1. Relación entre la p53 y la densidad microvascular.

La expresión de la p53 está relacionada con la angiogénesis de manera estadísticamente significativa como queda reflejado en la tabla R51. Se puede afirmar que la expresión de la p53 determina la aparición de una mayor DMV en el seno tumoral. El análisis se ha realizado utilizando las dos clasificaciones de la angiogénesis tumoral propuestas y en todos los casos las diferencias son significativas lo que demuestra la asociación entre ambas variables. Como queda reflejado en la tabla 20, cuando la p53 se expresa, el riesgo de presentar una DMV media superior a 100 microvasos es 2,2 veces mayor.

Tabla 20. Evaluación de la relación entre la p53 y la DMV tumoral.

DMV Media	P53		P	OR	IC 95%
	Negativa (n=110)	Positiva (n= 96)			
<80 (n=60)	39	21			
>80 (n=146)	71	75	0,032	1,96	1,05–3,65
<100 (n=101)	64	37			
>100 (n=105)	46	59	0,005	2,22	1,26-3,88

(Test Chi cuadrado y regresión logística, OR: Odds ratio, IC: intervalo de confianza)

Si consideramos la expresión de la p53 como una variable cuantitativa, su valor medio en el grupo de pacientes con DMV <100 fue del 24% y en el grupo de DMV >100, del 35 % ($p < 0,020$, U de Mann-Whitney).

5.2. Relación entre la p53 y el VEGF.

Después de analizar los resultados estadísticos obtenidos, podemos considerar que la expresión de la p53 y del VEGF son variables independientes (Tabla 21).

Tabla 21. Evaluación de la relación entre la expresión de la p53 y el VEGF.

VEGF	P53		p
	Negativa (n=110)	Positiva (n= 96)	
Negativo (n=46)	29	17	0,137
Positivo (n=160)	81	79	
Negativo (n=46)	29	17	0,329
Positivo +(n=114)	58	56	
Positivo ++ (n=46)	23	23	

(Test Chi cuadrado)

5.3. Relación entre el VEGF y la densidad microvascular.

La expresión del VEGF está relacionada de manera muy significativa con la angiogénesis tumoral, determinando, al igual que la p53, la aparición de una mayor DMV en el seno tumoral. Todos los análisis realizados con las distintas categorías utilizadas para agrupar las dos variables han mostrado diferencias estadísticamente significativas (Tabla 22). La expresión del VEGF en las células tumorales comporta 5,4 veces más probabilidades de presentar más de 80 microvasos. Parece claro, por lo tanto, que dicha expresión implica un aumento de la vascularización en el lecho tumoral.

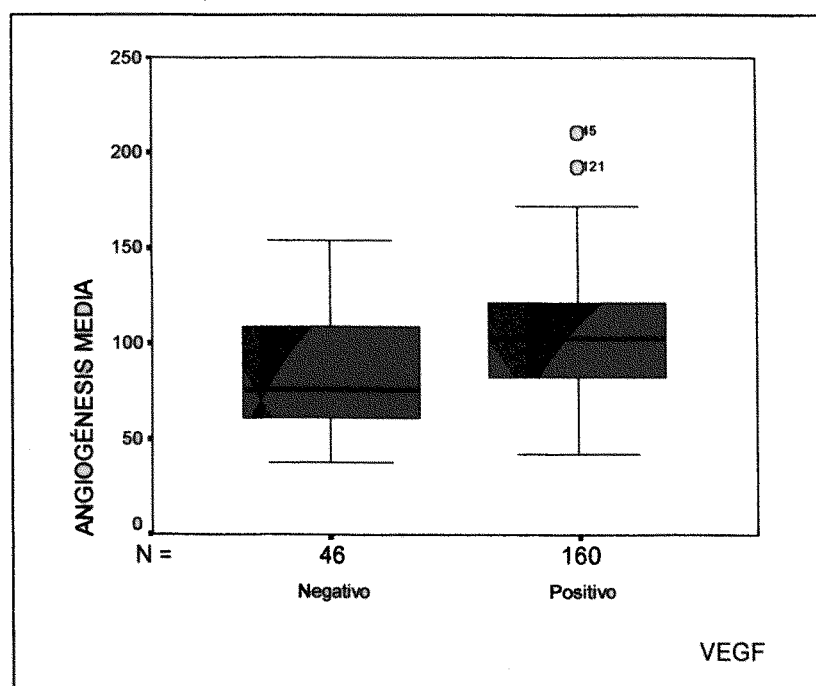
Tabla 22. Evaluación de la relación entre el VEGF y la DMV.

DMV media	VEGF		p	OR	IC 95%
	Negativo (n=46)	Positivo (n= 160)			
<80 (n=60)	27	33			
>80 (n=146)	19	127	0,0001	5,47	2,71 - 11,02
<100 (n=101)	31	70			
>100 (n=105)	15	90	0,005	2,65	1,33 - 5,29

(Test Chi cuadrado y regresión logística, OR: Odds ratio, IC: intervalo de confianza)

En la figura 23 está representada la distribución de los valores medios de la DMV dependiendo de la expresión del VEGF. En el grupo VEGF negativo, este valor es de 82,6 microvasos (IC 95% = 73,9 – 91,4) y en el grupo VEGF positivo 103,6 (IC 95% = 99,0 – 108,3), confirmándose la existencia de diferencias significativas entre ambos grupos (t-Student: $p < 0,0001$).

Figura 23 . Distribución de los valores de la DMV dependiendo de la expresión del VEGF



6. ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN EXISTENTE ENTRE LA DENSIDAD MICROVASCULAR, LA EXPRESIÓN DE LA P53 Y DEL VEGF CON PARÁMETROS CLINICOPATOLÓGICOS.

A) p53:

La expresión de la proteína p53 no se relacionaba de manera estadísticamente significativa con ninguno de los parámetros clínico-patológicos estudiados.

B) DMV:

La afectación ganglionar ha demostrado ser la única variable clínico-patológica relacionada con la DMV. El ratio ganglionar es mayor cuando la DMV es más elevada (Tabla 23), lo que conlleva también que el grado de DMV influya significativamente en el estadio pN de la UICC (Tabla 24).

Tabla 23. Evaluación de la relación entre el ratio ganglionar y la DMV.

DMV media	Ratio ganglionar			p
	0% (n=66)	< 30% (n=48)	> 30% (n=42)	
<80 (n=43)	25	10	8	
>80 (n=113)	41	38	34	0,047
<100 (n=74)	40	18	16	
>100 (n=82)	26	30	26	0,019

(Test Chi cuadrado)

Tabla 24. Evaluación de la relación entre la DMV y el estadio pN (UICC).

DMV media	Categoría N (UICC)				p
	pN0 (n=66)	pN1 (n=48)	pN2 (n=42)	pN3 (n=3)	
<100 (n=74)	40	19	13	2	
>100 (n=82)	26	35	20	1	0,027

(Test Chi cuadrado)

El ratio ganglionar medio en el grupo de DMV <100 fue de 15,2 % y en el grupo de DMV > 100, del 25,4 % ($p < 0,008$; U de Mann-Whitney).

C) VEGF:

La expresión del VEGF muestra una relación en el límite de la significación estadística con la presencia de metástasis en el momento de realizar la intervención quirúrgica (38 pacientes) pero con ninguno de los demás parámetros clínicopatológicos estudiados (Tabla 25).

Tabla 25. Evaluación de la relación entre la expresión del VEGF y la existencia de metástasis en el momento de realizar el diagnóstico.

VEGF	M1 inicial		p	RR	IC 95%
	NO (n=168)	SI (n= 38)			
Negativo (n=46)	42	4			
Positivo (n= 160)	126	34	0,053	2,83	0,95 – 8,45

(Test Chi cuadrado y regresión logística, OR: Odds ratio, IC: intervalo de confianza)

En la tabla 26 aparece la localización de las metástasis en el momento de realizar la intervención quirúrgica. Es llamativo el hecho de que el 89,5 % de estos pacientes presentaran expresión del VEGF en las células tumorales. Además, en todos los pacientes con metástasis a distancia, existía expresión del VEGF en las células tumorales.

Tabla 26. Localización de las metástasis.

	VEGF negativo	VEGF positivo
Citología +		4
Peritoneo	3	7
Epiplon		5
Ligamento redondo	1	
Intestino		1
Ovario		1
Pulmón		1
Nódulo linfático supraclavicular		3
Hueso		1
Hígado		11
TOTAL	4	34

7. ANÁLISIS DE LOS FACTORES PRONÓSTICOS DE SUPERVIVENCIA EN PACIENTES INTERVENIDOS QUIRÚRGICAMENTE POR CÁNCER GÁSTRICO (SERIE COMPLETA).

7.1. Análisis univariado de los factores clinicopatológicos.

De los factores estudiados, aquellos que afectan directamente a la supervivencia en el análisis univariado (Log-rank test), son:

- El estadio tumoral (Figura 24): Podemos apreciar como hasta el estadio II la supervivencia a largo plazo es buena, existiendo diferencias significativas entre los distintos estadios ($p < 0,00001$).

- El estadio ganglionar (N0; N1; N2; N3; $p < 0,00001$) y la ratio ganglionar (0%; <30%; >30%; $p < 0,00001$). La figura 25 representan el gran impacto de la afectación ganglionar sobre la supervivencia de los pacientes de nuestra serie.

- El grado de penetración del tumor en la pared gástrica (T1, T2, T3, T4); $p < 0,00001$.

- La existencia de metástasis en el momento del diagnóstico; $p < 0,00001$.

- Clasificación histológica: los adenocarcinomas presentan mejor pronóstico que los carcinomas; $p < 0,0249$.

- Grado histológico: los tumores bien o moderadamente diferenciados también presentan mejor pronóstico que los tumores poco diferenciados o indiferenciados; $p < 0,0042$.

- La clasificación histológica de Lauren: el tipo intestinal tiene mejor pronóstico que el tipo difuso; $p < 0,0097$.

- La existencia de linfangiosis carcinomatosa; $p < 0,00001$.

- La existencia de invasión vascular; $p < 0,0034$.
- La existencia de invasión perineural; $p < 0,054$.
- Realización de linfadenectomía D2 frente a D1; $p < 0,00001$.

Figura 24. Supervivencia acumulada para la serie completa de pacientes en función del estadio tumoral definitivo.

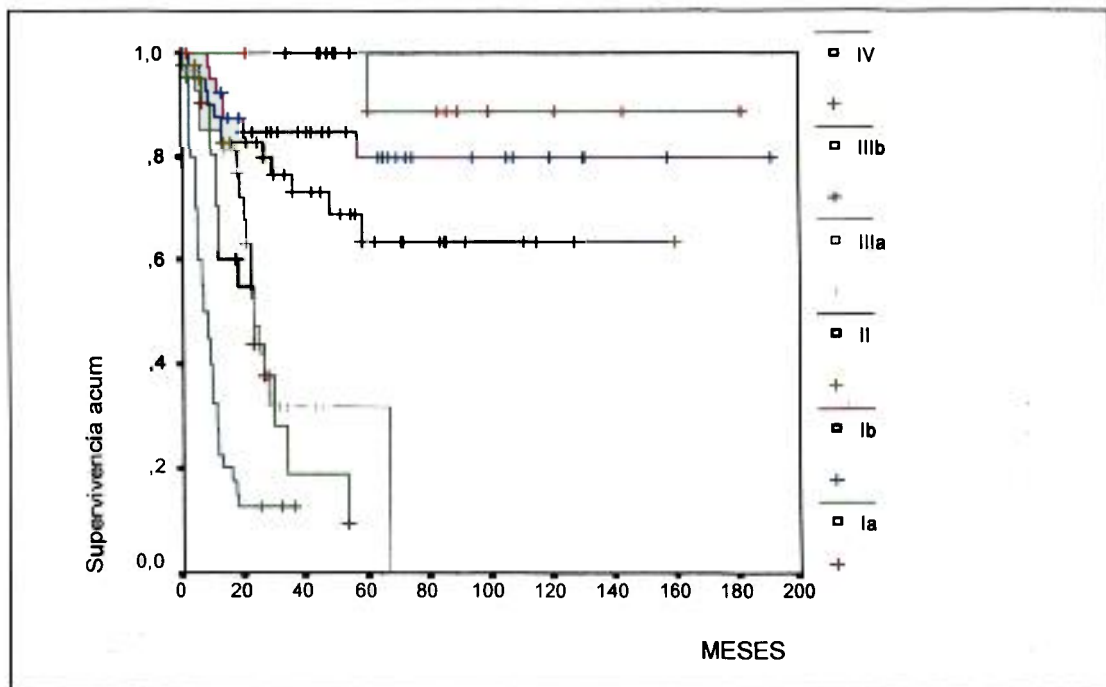
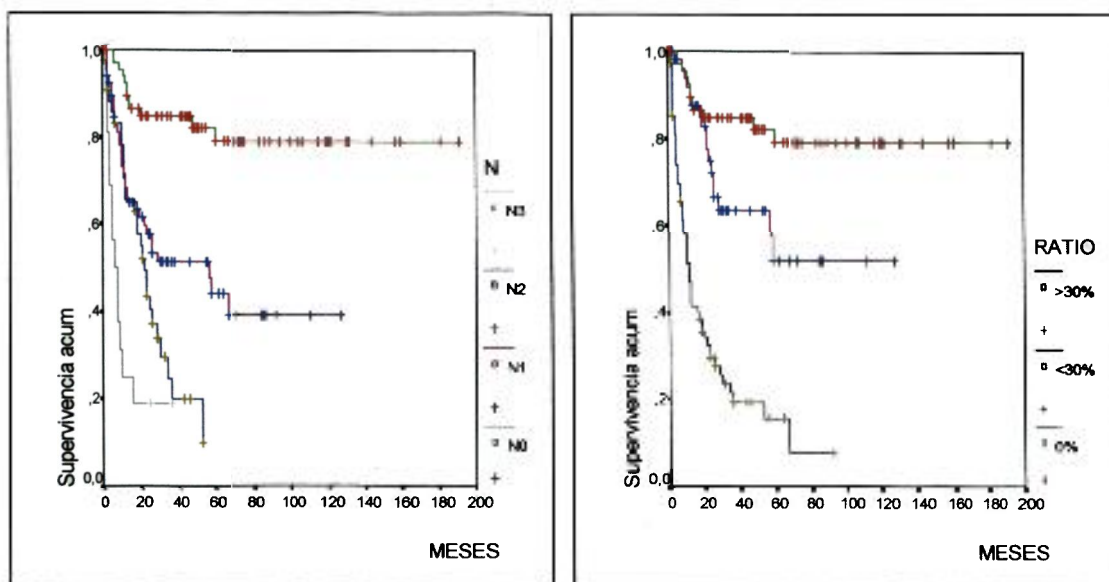
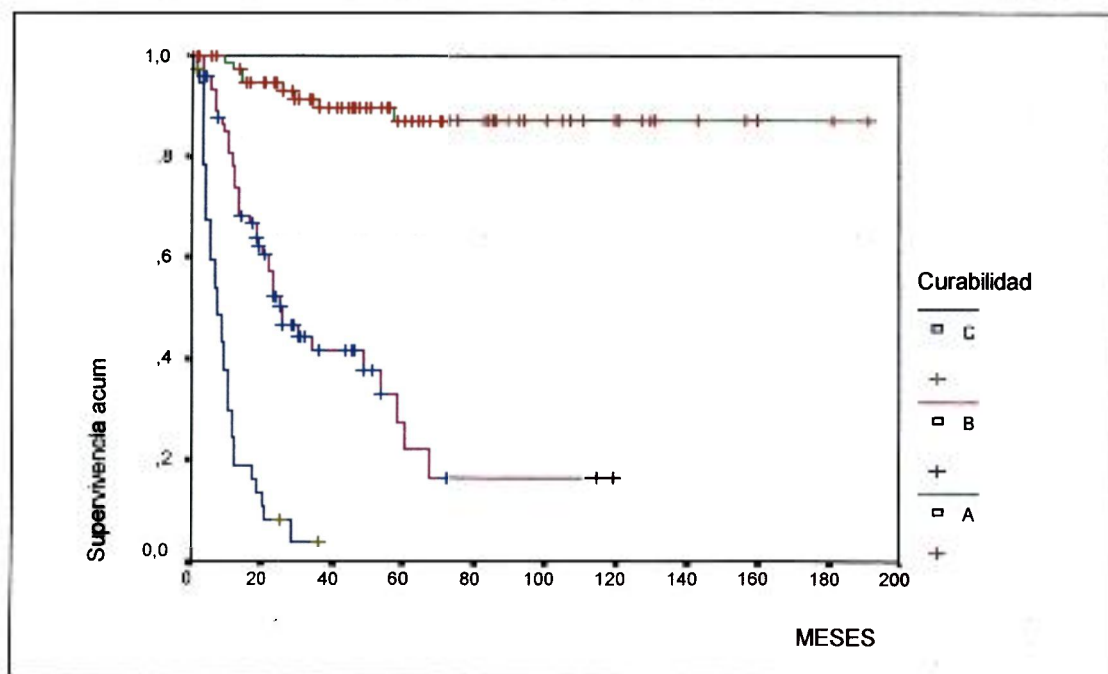


Figura 25. Supervivencia acumulada para la serie completa de pacientes en función de la afectación ganglionar.



Analizando la supervivencia en relación al grado de curabilidad de la resección gástrica de la AJCG (Tabla 10), obtenemos una excelente discriminación para cada grupo de pacientes (Figura 26). El riesgo de muerte o Hazard Ratio (HR) estimado mediante el modelo de regresión de Cox univariante, es 10 veces superior para los pacientes pertenecientes en el grupo B de curabilidad con respecto al A y de 43 veces más para los pacientes pertenecientes al grupo C con respecto al A.

Figura 26. Supervivencia acumulada para la serie completa de pacientes en función del grado de curabilidad de la Asociación Japonesa de Cáncer Gástrico.



7.2. Análisis univariado del valor pronóstico de la P53, del VEGF y de la densidad microvascular.

La única variable de las estudiadas que ha alcanzado diferencias estadísticamente significativas es la expresión del VEGF (Tabla 27). Cuando existe

expresión de VEGF la probabilidad de muerte por cancer gástrico es 2,51 veces superior. La expresión de la p53 y la DMV elevada muestran también una tendencia a ser factores de mal pronóstico pero no alcanzan significación estadística.

También hemos analizado la influencia en la supervivencia de la expresión conjunta de la p53 y del VEGF en las células tumorales, ya que ambos influyen de forma independiente en la densidad vascular tumoral, como ha sido demostrado. La no expresión de p53 ni de VEGF identifica un subgrupo de pacientes en los cuales la supervivencia es claramente mejor a la del resto (Tabla 27).

Tabla 27. Evaluación del valor pronóstico de la p53, del VEGF y de la DMV en la supervivencia relacionada con la enfermedad para la serie completa de pacientes.

		Log-rank test	Regresión de Cox	
		p	Hazard Ratio	IC 95%
P 53	Negativa			
	Positiva	0,1125	1,40	0,92 - 2,14
VEGF	Negativo			
	Positivo	0,0021	2,51	1,36 - 4,63
DMV	< 80			
	> 80	0,1141	1,49	0,90 - 2,46
P 53 y VEGF	Ambos negativos (n: 29)			
	Uno positivo (n: 98)		3,37	1,33 - 8,51
	Ambos positivos (n: 79)	0,0048	2,51	1,66 - 10,75

(IC: intervalo de confianza)

7.3. Análisis multivariado de supervivencia.

Al realizar el análisis multivariado en el grupo global de pacientes, el factor con mayor impacto sobre el riesgo de muerte (HR) es el estadio tumoral final ($p < 0,00001$), mostrando un claro aumento del riesgo a medida que el estadio avanza (Tabla 28).

Entre las otras variables relacionadas con el riesgo de muerte se encuentra el sexo masculino, la realización de una linfadenectomía D1, la expresión de la p53, la expresión del VEGF y la no utilización de quimioterapia.

Tabla 28. Análisis multivariado de supervivencia en la serie completa.

	Análisis multivariado Supervivencia		
	Grupo global de pacientes (n= 206)		
	P	Hazard Ratio	IC 95 %
Sexo (varón)	0,0068	1,98	1,20 – 3,26
Estadio tumoral (UICC)	0,00001		
IA - IB	0,1686	4,39	0,53 – 36,04
II	0,0583	7,43	0,93 – 59,27
IIIA	0,0019	25,85	3,33 – 200,63
IIIB	0,0006	37,33	4,78 – 291,11
IV	0,00001	97,77	12,64 – 756,11
Linfadenectomía (D1)	0,0006	2,42	1,46 – 4,02
P53 (+)	0,0018	2,09	1,31 – 3,32
VEGF (+)	0,0185	2,25	1,14 – 4,44
Quimioterapia (no uso)	0,0035	2,07	1,27 – 3,38

(IC: intervalo de confianza)

8. ANÁLISIS DE LOS FACTORES PRONÓSTICOS DE SUPERVIVENCIA EN PACIENTES INTERVENIDOS QUIRÚRGICAMENTE CON INTENCIÓN CURATIVA POR CÁNCER GÁSTRICO.

Para evaluar el valor pronóstico de los parámetros del estudio, parece interesante seleccionar únicamente aquellos pacientes que han sido intervenidos con intención curativa (pacientes sin enfermedad residual micro o macroscópica), ya que en los pacientes con enfermedad residual, éste es el factor negativo con mayor impacto en la supervivencia.

8.1. Análisis univariado de los factores clínico patológicos.

Los factores que influyen de forma significativa en la supervivencia son (Log-rank test):

- El grado de penetración del tumor en la pared gástrica (T1, T2, T3, T4);
p<0,00001
- La afectación ganglionar (N0, N1, N2, N3); p<0,00001
- El grado de afectación ganglionar cuantificado como 0%, <30% o >30%;
p<0,00001
- El estadio final (IA, IB, II, IIIA, IIIB, IV); p<0,00001
- Clasificación histológica: los carcinomas presentan peor pronóstico que los adenocarcinomas; p<0,0087
- Grado histológico: los tumores poco diferenciados o indiferenciados tienen peor pronóstico que los tumores bien o moderadamente diferenciados; p< 0,0036
- La clasificación histológica de Lauren: el tipo difuso tiene peor pronóstico que el tipo intestinal; p<0,0034
- La existencia de linfangiosis carcinomatosa; p< 0,00001
- Realización de linfadenectomía D1 frente a D2; p<0,00001
- El grado de curabilidad B con respecto al A; p<0,00001

8.2. Análisis univariado del valor pronóstico de la p53, del VEGF y de la densidad microvascular.

La expresión del VEGF y la existencia de una DMV elevada tumoral determinan un peor pronóstico con mayor probabilidad de muerte al final del

seguimiento. La expresión de la p53 aislada no alcanza diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0862$). La no expresión de la p53 ni del VEGF en las células tumorales identifica un subgrupo de pacientes en los cuales la supervivencia es claramente mejor a la del resto (Tabla 29).

Tabla 29. Evaluación del valor pronóstico de la p53, del VEGF y de la DMV en la supervivencia relacionada con la enfermedad en los pacientes intervenidos con intención curativa.

		Log-rank test	Regresión de Cox	
		p	HR	IC 95%
P 53 (Fig. 27)	Positiva			
	Negativa	0,0862	1,61	0,93 - 2,80
VEGF (Fig. 28)	Positivo			
	Negativo	0,0148	2,48	1,16 - 5,28
DMV (Fig.29)	< 80			
	> 80	0,0143	2,48	1,17 - 5,30
P 53 y VEGF (Fig. 30)	Ambos negativos			
	Uno positivo		3,59	1,08 - 11,92
	Ambos positivos	0,0173	4,92	1,47 - 16,42

(HR: hazard ratio, IC: intervalo de confianza)

Figura 27. Supervivencia acumulada de los pacientes intervenidos con intención curativa en función de la expresión de la p53.

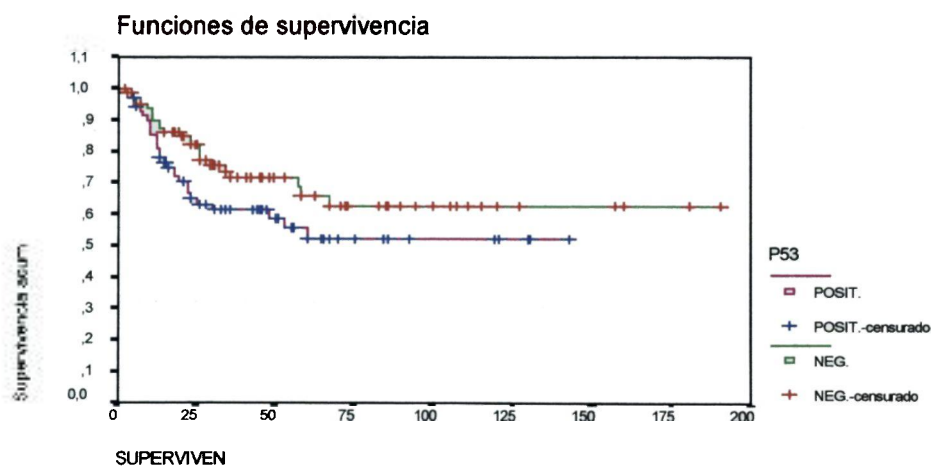


Figura 28. Supervivencia acumulada de los pacientes intervenidos con intención curativa en función de la expresión del VEGF.

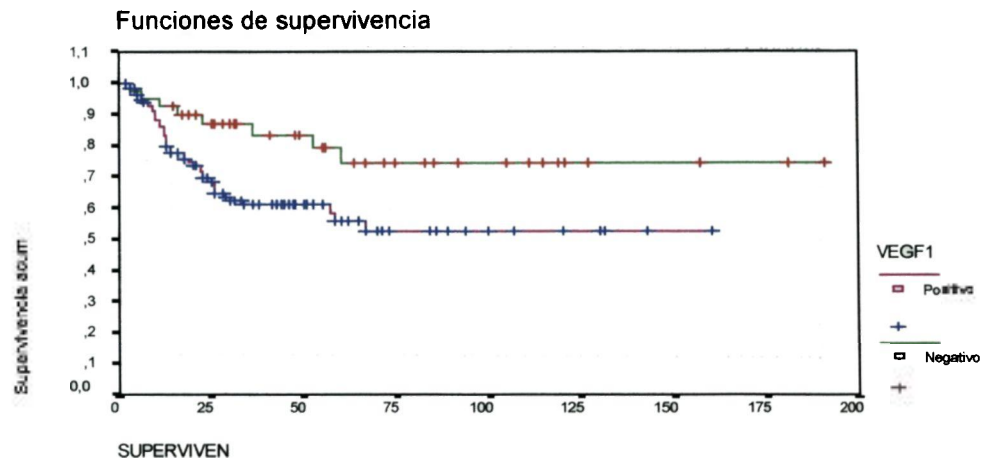


Figura 29. Supervivencia acumulada de los pacientes intervenidos con intención curativa en función de la DMV tumoral.

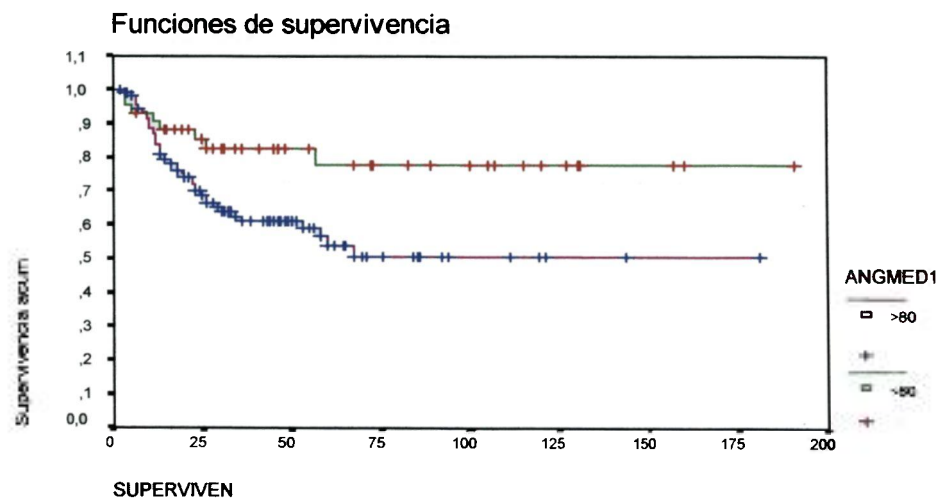
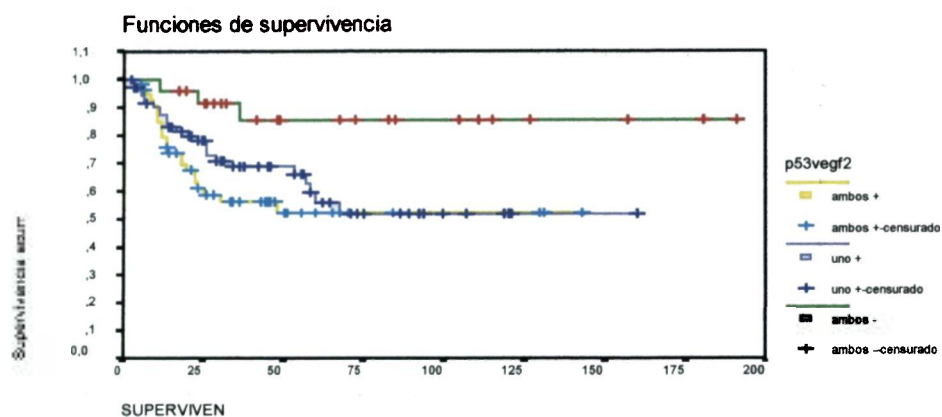


Figura 30. Supervivencia acumulada de los pacientes intervenidos con intención curativa en función de la expresión de la p53 y del VEGF conjuntamente.



8.3. RECIDIVA TUMORAL.

8.3.1. Análisis de la influencia de la p53, del VEGF y la densidad microvascular en la aparición de recidivas.

La expresión de la p53 y del VEGF y la existencia de una DMV elevada muestran una asociación estadísticamente significativa con la aparición de recidiva tumoral (Tabla 30).

8.3.2. Análisis de la influencia de la p53, del VEGF y la densidad microvascular en la supervivencia libre de recidiva.

Los pacientes con expresión de VEGF y con DMV elevada presentan más posibilidades de padecer una recidiva de la enfermedad en el tiempo. La expresión de la p53 no llega a establecer diferencias estadísticamente significativas en la

supervivencia libre de recidiva ($p < 0,089$) (Tabla 30).

Tabla 30. Evaluación del riesgo de aparición de recidivas en función de la p53, del VEGF y de la DMV tumoral.

	Recidiva*			Supervivencia Libre Recidiva**
	p	OR	IC 95%	p
P 53 (+ frente -)	0,045	1,96	1,01 - 3,83	0,0893
Angiogénesis (<80 frente >80)	0,021	2,59	1,14 - 5,92	0,0169
Angiogénesis (<100 frente >100)	0,017	2,26	1,15 - 4,47	0,0587
VEGF (+ frente -)	0,019	2,72	1,15 - 6,43	0,017

(* Test Chi cuadrado y regresión logística, OR: Odds ratio, IC: intervalo de confianza)

(** Log rank test)

8.3.3. Localización de las recidivas.

En la tabla 31 aparece la localización de las recidivas según los factores analizados y según el grado de curabilidad de la AJCG. Cuando analizamos las recidivas en función del grado de curabilidad, existen diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0,00001$, Chi square test) (RR 11,02 IC 95% 4,81-25,23). Como se puede observar, casi todas las recidivas ganglionares se produjeron en el grupo de pacientes que presentaron un grado de curabilidad tipo B.

Tabla 31. Localización de las recidivas según la expresión de la p53, del VEGF, de la DMV y del grado de curabilidad (AJCG).

LOCALIZACIÓN RECIDIVA	P 53		VEGF		Angiogénesis		Curabilidad (AJCC)	
	Negativa	Positiva	Negativo	Positivo	< 100	> 100	A	B
Desconocida (n= 3)	1	2	0	3	2	1	1	2
Muñón (n= 1)	1	0	0	1	0	1	0	1
Ganglionar (n= 30)	14	16	4	26	11	19	2	28
Carc. peritoneal (n= 9)	2	7	2	7	3	6	2	7
M1 hepáticas (n= 8)	3	5	0	8	2	6	2	6
M1 pulmonares (n= 3)	2	1	2	1	1	2	2	1
M1 óseas (n= 1)	1	0	0	1	0	1	0	1
Total (n= 55)	24	31	8	47	19	36	9	46

8.3.3.1. Recidiva ganglionar.

Los factores que han resultado estar relacionados con la recidiva ganglionar son:

- La afectación ganglionar (N0, N1, N2, N3); $p < 0,006$
- El ratio ganglionar cuantificado como 0%, $< 30\%$ o $> 30\%$; $p < 0,0001$
- El grado de penetración del tumor en la pared gástrica (T1, T2, T3, T4); $p < 0,003$
- El estadio final (Ia, Ib, II, IIIa, IIIb, IV); $p < 0,0001$
- Grado histológico: tumores bien o moderadamente diferenciados frente a tumores poco diferenciados o indiferenciados; $p < 0,035$. (OR 2,42 cuando se trataba de un tumor poco diferenciado o indiferenciado, IC 95% 1,05-5,58)
- La clasificación histológica de Lauren (intestinal o difuso); $p < 0,018$. (OR 2,61 cuando se trataba de un tumor difuso, IC 95% 1,16-5,89)
- La existencia de linfangiosis carcinomatosa (Tabla 32); $p < 0,003$. (OR 3,34, IC 95% 1,46-7,65)
- Realización de linfadenectomía D2 frente a D1 (Tabla 32); $p < 0,0001$. (OR 5,29 cuando se practicaba una linfadenectomía D1, IC 95% 2,27-12,34)

La expresión de la p53, la DMV y el VEGF no se relacionaron con el hecho de que la recidiva se produjera a nivel ganglionar.

Tabla 32. Evaluación de la relación entre la recidiva ganglionar con la existencia de linfangiosis carcinomatosa y el tipo de linfadenectomía practicado.

	RECIDIVA GANGLIONAR		p	OR	IC 95%
	NO (n=126)	SI (n= 30)			
LINFANGIOSIS					
Negativa (n= 112)	97	15			
Positiva (n= 44)	29	15	0,003	3,34	1,46 - 7,65
LINFADENECTOMIA					
D2 (n= 106)	95	11			
D1 (n=50)	31	19	0,0001	5,29	2,27 - 12,34

(Test Chi cuadrado y regresión logística, OR: Odds ratio, IC: intervalo de confianza)

8.3.3.2. Recidiva a distancia.

La aparición de metástasis, independientemente del momento en que se produzca, está relacionada con la expresión del VEGF, existiendo un riesgo 2,5 veces superior de presentar metástasis a distancia cuando éste se expresa (Tabla 33).

Tabla 33. Evaluación de la relación entre la aparición de metástasis a distancia y la expresión del VEGF (serie completa de pacientes).

	METÁSTASIS		p	OR	IC 95%
	NO (n=156)	SI (n= 50)			
VEGF					
Negativa (n= 46)	40	6			
Positiva (n= 160)	116	44	0,044	2,53	1 - 6,4

(Test Chi cuadrado y regresión logística, OR: Odds ratio, IC: intervalo de confianza)

8.3.4. Análisis multivariado de los factores de riesgo para la aparición de recidiva y de la supervivencia libre de recidiva.

Considerando la aparición de recidivas globalmente, bien sean locales o a distancia, los parámetros que determinan la aparición de las mismas en el estudio multivariado son: la realización de una linfadenectomía D1, el ratio ganglionar elevado, el grado de curabilidad B, la expresión de la p53 y la expresión del VEGF (Tabla 34).

Tabla 34. Análisis multivariado del riesgo de aparición de recidivas y de la supervivencia libre de recidiva.

	Recidiva*			Supervivencia Libre Recidiva**
	p	OR	IC 95%	p
Linfadenectomía (D1)	0,0005	6,93	2,33 - 20,55	0,0001
Ratio ganglionar:	0,0040			0,0105
0% - < 30%	0,0604	3,11	0,95 - 10,16	0,1279
0% - > 30%	0,0009	9,98	2,57 - 38,76	0,0032
Curabilidad (B)	0,0017	5,22	1,86 - 14,63	0,0002
P53 (+)	0,0130	3,36	1,29 - 8,74	0,0004
VEGF (+)	0,0049	5,88	1,71 - 20,26	0,0176

(* Test regresión logística, OR: Odds ratio, IC: intervalo de confianza)

(** Test de regresión de Cox)

Si eliminamos la clasificación de curabilidad del análisis de regresión multivariado, el factor que aparece en su lugar como factor de riesgo independiente en la aparición de recidiva es el estadio T ($p < 0,0141$). Los otros factores se mantienen en el nuevo modelo.

8.4. QUIMIOTERAPIA ADYUVANTE.

8.4.1. Efecto de la quimioterapia adyuvante en la aparición de recidivas.

Aunque no se alcanzan diferencias significativas, la utilización de quimioterapia adyuvante parece disminuir el riesgo de aparición de recidivas (Tabla 35). Sin embargo, no se ha observado ninguna relación entre el tratamiento quimioterápico y la localización de la recidiva, sea local ($p < 0,116$) o a distancia ($p < 0,288$) (Tabla 36).

Tabla 35. Evaluación de la relación entre la recidiva tumoral y la utilización de quimioterapia adyuvante en los pacientes intervenidos con intención curativa.

	RECIDIVA		p	OR	IC 95%
	NO (n=101)	SI (n= 55)			
QUIMIOTERAPIA					
SI (n= 103)	72	31			
NO (n= 53)	29	24	0,06	1,92	0,97 - 3,81
MMC+FTR (n=65)	49	16			
MMC (n=38)	23	15		1,99	0,84 - 4,72
NO (N= 53)	29	24	0,054	5,29	1,16 - 5,54

(Test Chi cuadrado y regresión logística, OR: Odds ratio, IC: intervalo de confianza)

Tabla 36. Localización de las recidivas según la administración de quimioterapia adyuvante.

LOCALIZACIÓN RECIDIVA	QUIMIOTERAPIA		
	NO	MMC	MMC + FTR
Desconocida (n= 3)	3		
Muñón (n= 1)		1	
Ganglionar (n= 30)	15	6	6
Carc. peritoneal (n= 9)	3	4	2
M1 hepáticas (n= 8)	2	3	3
M1 pulmonares (n= 3)		1	2
M1 óseas (n= 1)	1		
Total (n= 55)	24	15	16

8.4.2. Análisis del efecto de la quimioterapia adyuvante en la supervivencia.

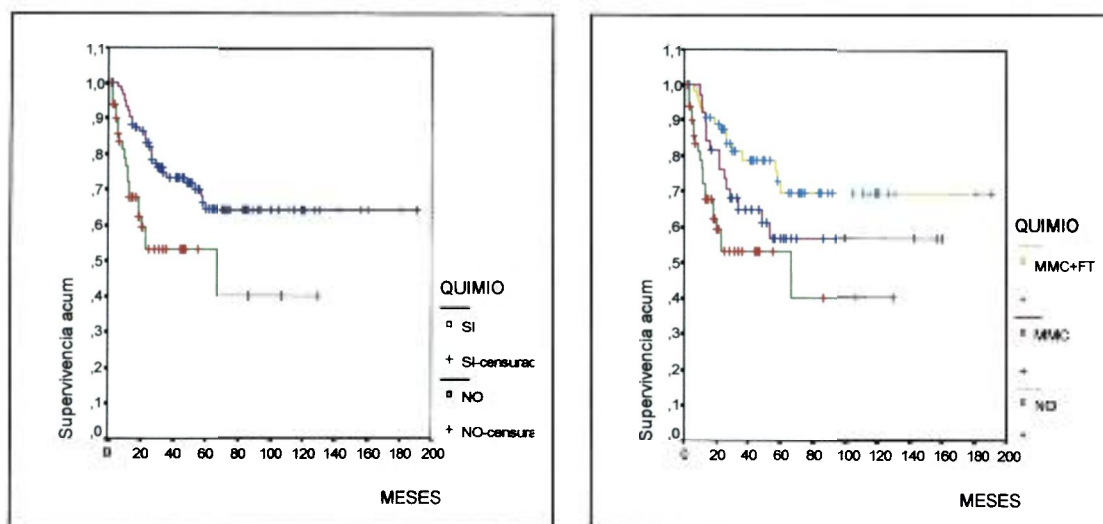
Los pacientes que recibieron tratamiento quimioterápico presentaron un mejor pronóstico. Los pacientes a los que no se administra quimioterapia tienen mayor probabilidad de morir por cáncer gástrico al final del seguimiento (HR 2,44) (Tabla 37).

Tabla 37. Evaluación del efecto de la quimioterapia adyuvante en la supervivencia relacionada con la enfermedad de los pacientes intervenidos con intención curativa.

	Log-rank test	Regresión de Cox	
	p	Hazard Ratio	IC 95%
QUIMIOTERAPIA (Fig. 31)			
SI (n= 103)			
NO (n= 53)	0,0014	2,44	1,38 - 4,29
QUIMIOTERAPIA (Fig. 31)			
MMC+FTR (n=65)			
MMC (n=38)		1,75	0,85 - 3,59
NO (N= 53)	0,0024	3,11	1,59 - 6,09

(IC: intervalo de confianza)

Figura 31. Supervivencia acumulada de los pacientes intervenidos con intención curativa en función de la administración de quimioterapia adyuvante.



8.4.3. Influencia de la p53, del VEGF y de la densidad microvascular en el efecto terapéutico de la quimioterapia adyuvante.

8.4.3.1. p 53.

La expresión de la p53 anuló el efecto beneficioso de la utilización de quimioterapia en los pacientes de nuestra serie (Tabla 38). Cuando el tumor expresaba la proteína p53, la utilización de quimioterapia complementaria no prolongó la supervivencia de los pacientes ($p < 0,1089$). La asociación de MMC-FT es la pauta de tratamiento quimioterápico con mayor utilidad en los pacientes que no expresan la p53.

Tabla 38. Evaluación de la influencia de la expresión de la p53 y del VEGF y de la DMV en el efecto de la quimioterapia adyuvante.

		Quimioterapia complementaria			
		No/Si	No/MMC-FT	No/MMC	MMC/MMC-FT
P 53	Negativa	0,0243	0,0053	ns	ns
	Positiva	0,1089	ns	ns	ns
VEGF	Negativo	0,4370	ns	ns	ns
	Positivo	0,0168	0,0085	0,0815	ns
DMV	<100	0,0155	0,0266	0,0460	ns
	>100	0,0437	0,0161	ns	ns

(Log-Rank test)

8.4.3.2. VEGF.

En los pacientes en los que se detectó expresión del VEGF en las células tumorales existieron diferencias estadísticamente significativas en la probabilidad de supervivencia al utilizar quimioterapia complementaria ($p < 0,0168$), pero no en

aquellos que no expresaban el VEGF ($p < 0,4370$).

8.4.3.3. Densidad microvascular.

El beneficio que se obtuvo con la administración de quimioterapia en los pacientes de nuestra serie fue independiente del grado de DMV del tumor. La administración de MMC-FT o de MMC aislada mejoraron el pronóstico de los pacientes con DMV < 100.

8.5. ANÁLISIS MULTIVARIADO DE SUPERVIVENCIA.

Tabla 39. Análisis multivariado de supervivencia en el grupo de pacientes intervenidos con intención curativa.

	Análisis multivariado Supervivencia*		
	Pacientes intervenidos con intención curativa (n= 156)		
	P	Hazard Ratio	95 % IC
Curabilidad (B)	0,00001	5,93	2,53 – 13,87
Ratio ganglionar	0,0008		
0% - <30%	0,0863	2,29	0,88 – 5,91
> 30 %	0,0003	4,68	2,03 – 10,75
Linfadenectomía (D1)	0,0004	3,08	1,66 – 5,74
P53 (+)	0,0512	1,81	0,99 – 3,26
VEGF (+)	0,0203	2,57	1,15 – 5,73

(IC: intervalo de confianza)

Al realizar el análisis de las distintas variables que pueden estar relacionadas con el riesgo de morir por cáncer gástrico (HR) se ha observado que el factor con mayor impacto en la supervivencia en el grupo de pacientes intervenidos con intención curativa, es el grado de curabilidad de la AJCG (A o B). El riesgo de muerte se incrementa hasta 6 veces en los pacientes incluidos en el grupo B con respecto al A (Tabla 39).

Otro factor que está relacionado con el riesgo de muerte es la afectación ganglionar, estructurada como ratio en tres grupos (0%, 0-30% y >30 %). La probabilidad de muerte se incrementa sobre todo al pasar del grupo de ratio 0% al de >30%.

La realización de una linfadenectomía D1 frente a una D2 también determina un mayor riesgo de muerte, así como la expresión de la p53 y de VEGF por las células tumorales. La angiogénesis no se encuentra entre los factores pronósticos independientes de mortalidad debido a que está directamente relacionada con la p53 y VEGF como ha sido demostrado con anterioridad.

Puesto que la clasificación de curabilidad es indirecta y se basa en parámetros relacionados con la clasificación TNM y también con el tipo de tratamiento quirúrgico practicado, es interesante realizar el análisis sin esta clasificación para ver el impacto de las variables que incluye (Tabla 40).

Tabla 40. Análisis multivariado de supervivencia en el grupo de pacientes intervenidos con intención curativa sin incluir la clasificación del grado de curabilidad (AJCG).

	Análisis multivariado Supervivencia		
	Pacientes intervenidos con intención curativa (n= 156)		
	P	Hazard Ratio	95 % IC
Categoría pT (UICC)	0,0027		
T1-T2	0,7704	1,18	0,37 – 3,78
T1-T3	0,0267	3,74	1,16 – 12,02
Ratio ganglionar	0,00001		
0% - <30%	0,0258	2,95	1,14 – 7,66
0% - > 30 %	0,00001	7,75	3,25 – 18,47
Linfadenectomía (D1)	0,00001	4,40	2,30 – 8,44
Invasión perineural (+)	0,0205	2,83	1,17 – 6,85
P53 (+)	0,0107	2,30	1,21 – 4,36
VEGF (+)	0,0076	2,99	1,34 – 6,67

(IC: intervalo de confianza)

Mediante este análisis se comprueba que no sólo se mantienen los factores pronósticos independientes anteriores sino que se hacen más significativos. La probabilidad de muerte se incrementa en tres veces al pasar de una ratio de 0% a una < 30% y en siete al pasar a una ratio ganglionar >30%.

El tipo de linfadenectomía (D1 frente a D2), la expresión de la p53 y la expresión del VEGF se mantienen en este modelo de regresión.

Además aparecen otros dos factores independientes, la clasificación de la profundidad de la invasión tumoral en la pared gástrica (T1, T2, T3, T4), ($p < 0,0027$) y la existencia de invasión perineural ($p < 0,0205$).

DISCUSIÓN

DISCUSION

A pesar del descenso de la incidencia del cáncer gástrico en todo el mundo por causas no bien establecidas, esta neoplasia representa todavía un problema sociosanitario de primer orden. La supervivencia global a largo plazo de los pacientes con cáncer gástrico en países occidentales es muy baja, como consecuencia de un diagnóstico tardío de la enfermedad. En la mayoría de las series europeas y norteamericanas, casi un 60 % de los pacientes a los que se les realiza la resección quirúrgica del tumor presentan en ese momento estadios patológicos III o IV. En nuestra serie, se puede observar que este grupo de pacientes constituye el 48,5 % del total.

Estos datos sugieren claramente que para conseguir aumentar la supervivencia de los pacientes con cáncer gástrico, se debería realizar un diagnóstico más precoz de la enfermedad. De hecho, esta es la clave fundamental que puede explicar parte de las diferencias pronósticas de esta enfermedad entre Japón y el resto de los países de nuestro entorno. El número de pacientes que se diagnostican en Japón en estadios precoces llega a ser del 40 – 50% en muchos hospitales. En dicho país, se aplican programas de cribaje poblacional ya que el cáncer gástrico es la neoplasia más frecuente en la población japonesa, y primera causa de muerte por cáncer en hombres y mujeres ¹⁰⁰. Sin embargo, los programas de cribaje poblacional de cáncer gástrico no pueden justificarse en países con incidencias como las de España, por su escasa rentabilidad y coste elevado ³³⁰.

Parece evidente que el mayor esfuerzo para mejorar el pronóstico de estos pacientes en nuestro medio debe orientarse hacia la realización de procedimientos

terapéuticos que sean cada vez más efectivos frente a la progresión tumoral; en este contexto, una técnica quirúrgica depurada y radical jugaría un papel fundamental.

La resección quirúrgica completa del tumor primario con exéresis de los ganglios linfáticos regionales es en la actualidad el único tratamiento potencialmente curativo del cáncer gástrico. La mayor parte de los pacientes que se diagnostican en estadios precoces pueden curarse mediante la cirugía. En el otro extremo se sitúan los pacientes que se intervienen quirúrgicamente pero presentan enfermedad a distancia, cuyo pronóstico se verá afectado indefectiblemente por la existencia de tumor residual después de la cirugía. La supervivencia de los demás pacientes que no se encuentran en estadios iniciales, y a los que se les realiza una gastrectomía con pretensión curativa, se verá influida por el comportamiento biológico del tumor resecado. La posibilidad de seleccionar a aquellos pacientes de este amplio grupo cuyo pronóstico es peor sería clínicamente muy útil ya que hasta la mitad de ellos mueren por recidiva de la enfermedad ³³¹.

El mal pronóstico de los pacientes con recidiva por cáncer gástrico se debe a que ésta es difícil de detectar antes de que produzca sintomatología y suele ser casi siempre intratable ³³². En nuestra serie el escaso tiempo de supervivencia después de la detección de la recidiva confirma el retraso en el diagnóstico clínico con los métodos habituales y conlleva la imposibilidad de practicar tratamientos de rescate que ofrezcan ventajas a estos pacientes. El porcentaje de pacientes con recidiva del cáncer gástrico que pueden ser intervenidos quirúrgicamente no llega al 4% en series amplias de países orientales ³³³.

La realización de una exéresis quirúrgica completa del tumor sin dejar enfermedad residual (resección tipo R0 de la UICC) constituye el factor pronóstico más importante en los pacientes intervenidos quirúrgicamente por cáncer gástrico. Es lógico pensar que para conseguir una exéresis completa del tumor habrá que realizar también una amplia extirpación del sistema de drenaje linfático del estómago. Por lo tanto, la realización de una linfadenectomía D2 constituye un aspecto técnico fundamental para determinar si la resección quirúrgica es completa. Si no se realiza una linfadenectomía D2, existe la posibilidad de que persista tumor residual microscópico en el sistema linfático regional que pasaría inadvertido y que, en consecuencia, provocaría posteriormente la recurrencia de la enfermedad.

Esta idea se confirma en nuestra serie ya que el tipo de linfadenectomía es un factor pronóstico independiente de mortalidad en el estudio multivariado, aunque en algunas series este hallazgo no se ha puesto de manifiesto. Estas diferencias pueden ser debidas a la distinta distribución por estadios de los pacientes incluidos, ya que el posible beneficio de la realización de una linfadenectomía D2 frente a una D1, viene dado por la posibilidad de que existan ganglios afectados en las estaciones ganglionares extirpadas¹⁰⁹. Analizando por estadios a nuestros pacientes (Tabla 41) se pone de manifiesto cómo la linfadenectomía D2 es especialmente útil en aquellos con estadios tumorales intermedios en los que la realización de una linfadenectomía D1 puede determinar la no extirpación de ganglios posiblemente afectados del segundo nivel ganglionar.

Tabla 41. Influencia del tipo de linfadenectomía (D1 vs D2) en la supervivencia relacionada con la enfermedad para cada estadio tumoral (UICC).

ESTADIO FINAL	LINFADENECTOMÍA		Supervivencia P (log rank test)
	D1	D2	
IA: 20	8	12	0,26
IB: 42	14	28	0,08
II: 44	13	31	0,002
IIIA: 31	12	19	0,005
IIIB: 24	9	15	0,12
IV: 45	31	14	0,33

Otros estudios europeos ¹⁰⁵ y asiáticos ³³⁴ con un gran número de pacientes incluidos ponen de manifiesto cómo la linfadenectomía D2 es un factor pronóstico independiente en los pacientes con tumores en estadios II y IIIA de la UICC.

En el momento de realizar la intervención quirúrgica es difícil conocer el estadio tumoral final por lo que creemos que siempre debería realizarse una linfadenectomía D2. Su beneficio viene determinado además por la necesidad de extirpar un mínimo de ganglios linfáticos, necesarios para poder realizar una correcta estadificación tumoral según la nueva clasificación TNM. Por otro lado, en la actualidad, el riesgo quirúrgico de su realización en grupos quirúrgicos con experiencia en tratar pacientes con cáncer gástrico, no es mayor que cuando se realiza una linfadenectomía D1. En nuestra serie la realización de una linfadenectomía D2 no ha supuesto un incremento de la tasa de morbilidad.

La afectación ganglionar en nuestra serie es uno de los factores pronósticos independientes más importantes y que mayor impacto tienen en la supervivencia. La definición del estadio N en la clasificación TNM de la UICC establece de forma

adecuada en nuestros pacientes diferentes niveles de riesgo (Figura 25), en función del número de ganglios afectados. Sin embargo, en 53 pacientes (25,7 %) no se alcanzó la cifra de 15 ganglios extirpados, considerada la cifra mínima para realizar una correcta estadificación. Esta cifra es similar a la de otras series occidentales, y depende de varios factores. En primer lugar, el tipo de linfadenectomía realizada es importante pero, en ocasiones, a pesar de realizar una linfadenectomía D2, el número de ganglios extirpados no alcanza la cifra de 15¹⁰⁶. En nuestra serie, 14 pacientes a los que se había practicado una linfadenectomía D2 presentaban menos de 15 ganglios tras el estudio anatomopatológico de la pieza quirúrgica. Por otro lado, el número de ganglios encontrados depende también de la técnica empleada durante el estudio macroscópico de la pieza quirúrgica^{335 336}.

Otra de las formas utilizadas para evaluar la afectación ganglionar consiste en determinar el ratio de ganglios afectados del total de los extirpados. En nuestra serie, el ratio ganglionar superior o inferior al 30% constituye un factor pronóstico independiente de supervivencia en pacientes operados con intención curativa. La potencia estadística del ratio ganglionar ha sido mayor que la de la clasificación N y mejora el modelo de regresión. Otros trabajos confirman también nuestros resultados^{105 334 337}, lo que demuestra que el ratio ganglionar presenta mayor valor pronóstico que el estadio N de la UICC.

A partir del estadio III de la clasificación TNM, el cáncer gástrico puede considerarse una enfermedad sistémica, dado que a pesar de realizar una linfadenectomía extensa el pronóstico de estos pacientes no mejora¹⁰⁵. En base a ésto, tratamientos complementarios a la resección quirúrgica pueden ser muy útiles

en el periodo postoperatorio para actuar frente a la existencia de micrometástasis circulantes¹¹⁸ o células tumorales residuales del lecho tumoral. En nuestra serie, la utilización de quimioterapia postoperatoria ha mostrado beneficios en la supervivencia (Figura 31) pero no es un factor pronóstico independiente en los pacientes intervenidos con intención curativa. Parece que la quimioterapia es más efectiva en el grupo global de pacientes ya que muestra beneficios en pacientes en estadio IV (p: 0,0055) pero no en estadios precoces. Autores japoneses también han señalado que el empleo de quimioterapia postoperatoria (MMC y 5-FU) prolonga la supervivencia en pacientes con estadio IV en los que se practica resección del tumor primario³³⁸.

Aparte del análisis de determinados factores clínico-patológicos ya conocidos en pacientes con cáncer gástrico, es necesario proseguir con el estudio de nuevos marcadores biológicos y de su posible influencia en la historia natural de la enfermedad para así disponer de nuevas herramientas en la lucha contra la enfermedad. Entre estos posibles marcadores biológicos del comportamiento tumoral se encuentran genes supresores de tumores como p53, factores de crecimiento como el VEGF y la angiogénesis tumoral. Su estudio puede ayudarnos en el control evolutivo de la enfermedad si demostramos que nos proporcionan información pronóstica en el momento del diagnóstico.

La inactivación del gen p53, es una de las alteraciones genéticas más comunes que pueden observarse en distintos tipos de tumores (pulmón²⁴⁹, mama²⁵⁰, ovario²⁵¹, esófago²⁵², colon²⁵³, estómago³³⁹, y está implicada en la génesis y progresión tumoral. Cuando se produce la mutación del gen p53, éste

pierde su función como gen supresor y puede actuar como oncogen dominante ³⁴⁰, acelerando el proceso de génesis tumoral y alterando el fenotipo de la células cancerosas y su respuesta a los agentes que lesionan el ADN ^{341 342}.

Una de las consecuencias bioquímicas de la transformación neoplásica celular es la aparición de antígenos oncoasociados y oncoespecíficos que pueden ser identificados mediante la utilización de anticuerpos monoclonales con métodos inmunohistoquímicos ³⁴³. En relación al gen p53, una de las formas de conocer si se ha producido su mutación es mediante la detección de la expresión de una proteína p53 anómala, producto de dicho gen mutado. Esta nueva p53 se diferencia de la original ("wild type p53") porque posee una vida media prolongada, lo que permite su detección en los tumores, utilizando métodos inmunohistoquímicos ^{246 344 340}. En nuestro estudio, hemos practicado un método estandarizado de tinción inmunohistoquímica y no hemos observado reacción o tinción positiva en el tejido sano adyacente al tumor en ningún caso, lo que sugiere que la reacción positiva en el tejido tumoral debe atribuirse a la existencia de la proteína p53 alterada y no a una tinción accidental de la proteína original. La expresión de la p53 ha sido positiva en 96 pacientes de nuestra serie (46,6 %), número similar al de otras experiencias publicadas en las que los pacientes con expresión de la p53 oscilan entre el 40-60% ^{257 258 345 346 347}.

El valor pronóstico de la expresión de la proteína p53 en las células tumorales de pacientes con cáncer gástrico se ha asociado al hecho de que en estos pacientes el tumor es más agresivo y presenta estadios más evolucionados. En este sentido algunos trabajos publicados señalan que la expresión de la p53 se relaciona con la actividad proliferativa del tumor y con su agresividad ³⁴⁸, determinando una invasión serosa más frecuente y mayor afectación ganglionar ³²⁸.

³⁴⁹ ³⁴⁵. En estos trabajos, la expresión de la p53 también determina una mayor invasión vascular y linfática y por lo tanto, una mayor tendencia a la aparición de metástasis. Otro trabajo, en el que se evalúan 427 pacientes japoneses con cáncer gástrico, confirma la influencia de la expresión de la p53 con parámetros clinicopatológicos. En esta serie de pacientes la expresión de la p53 se relaciona de forma directa con la aparición de tumores de mayor tamaño, con una mayor profundidad de invasión, con la invasión linfática o vascular y con la afectación ganglionar. Todo ello determina que la prevalencia de la expresión de la p53 sea mayor en el grupo de pacientes con grado de curabilidad C dado que presentaban un estadio tumoral más avanzado ³²⁹.

En contraposición a lo anterior, existen trabajos en los que no se demuestra la posible influencia de la expresión de la p53 sobre la existencia de metástasis ganglionares y sobre la profundidad de la invasión tumoral ³⁴⁶ ³⁵⁰, lo que coincide con los resultados obtenidos en nuestra serie (Tabla 42). Por lo tanto, la expresión de la p53 en nuestra serie no determina que el tumor se halle en estadios tumorales más evolucionados (Tabla 42).

Tabla 42. Relación entre la expresión de la p53 y el estadio T, N y final.

P53	T (UICC)					
	T1	T2	T3	T4		
Negativa	14	52	38	6		
Positiva	16	45	32	3		
	N (UICC)					
	N0	N1	N2	N3		
Negativa	40	34	26	10		
Positiva	34	35	20	7		
	Estadio (UICC)					
	IA	IB	II	IIIA	IIIB	IV
Negativa	9	22	25	18	11	25
Positiva	11	20	19	13	13	20

La ausencia de una correlación entre la sobreexpresión de la p53 y el estadio tumoral en pacientes con cáncer gástrico ha sido confirmada en otros trabajos ^{351 352 353}. En base a este hecho, parece interesante evaluar la expresión de la p53 en pacientes con tumores poco evolucionados para ver si en este subgrupo la p53 ya determina modificaciones en las características del tumor. Fonseca y cols., en 129 pacientes con cáncer gástrico precoz, encontraron una incidencia de expresión de la p53 del 22,5 % y no evidenciaron una asociación con parámetros clínico patológicos ³⁵⁴. Otros autores han confirmado la existencia de mutaciones en el gen p53 hasta en un 37% de los pacientes con cáncer gástrico precoz ³⁵⁵ e incluso se ha detectado inmunoreactividad con la proteína p53 en mucosa gástrica no tumoral pero con intensa metaplasia intestinal ³⁵⁶. Todo esto parece indicar que la mutación del gen p53 ocurre en una fase temprana de la carcinogénesis gástrica. Además, algunos autores sugieren que la mutación de la p53 tiene una considerable importancia en la iniciación de los tumores pero mucho menor una vez que el tumor se ha desarrollado ³⁵⁷. Esta argumentación es utilizada por Gabbert y cols. para explicar los resultados de su trabajo en el que no puede establecerse el valor pronóstico de la expresión de la p53 en pacientes con cáncer gástrico intervenidos con intención curativa, a pesar de que las tasas de supervivencia a cinco años son del 40,6 % cuando la p53 se expresa frente al 49,2 % cuando no lo hace ²⁵⁸.

A pesar de que en nuestra serie, la expresión de la p53 no se relaciona con ninguno de los factores clinicopatológicos estudiados, sí que determina un peor pronóstico para los pacientes que la expresan. En el análisis univariado, no se llegan a alcanzar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,086$, Log-Rank

test) pero en el estudio multivariado, la expresión de la p53 determina el pronóstico de la enfermedad de forma independiente a otros parámetros como la afectación ganglionar o la invasión del tumor en la pared gástrica en pacientes intervenidos con intención curativa. Este hecho otorga mayor valor a la expresión de la p53 puesto que no influye en el estadio tumoral, que vendría determinado en mayor medida por el momento de la evolución de la enfermedad en el que se realiza el diagnóstico. Además, nos proporciona información predictiva de la evolución de pacientes con estadios bajos (Ia, IB, II).

En series como la de Maehara y cols.³²⁹ los pacientes que expresan la p53 también tienen peor pronóstico, siendo la supervivencia acumulada a los cinco años de 62,5 % en aquellos pacientes con p53 negativa y de 43,3 % en los que presentan p53 positiva (54,5 % y 41,5 % respectivamente en nuestro caso). La diferencia entre ambas series es que en nuestro caso la expresión de la p53 no es mayor en el grupo de pacientes con grado curabilidad tipo C (Tabla 43).

Tabla 43. Relación entre la expresión de la p53 y el grado de curabilidad.

P 53	Grado de Curabilidad (AJCG)		
	A	B	C
Negativa	44	43	23
Positiva	38	39	19

Los trabajos realizados en pacientes con cáncer gástrico precoz también han puesto de manifiesto que hay diferencias significativas en la probabilidad de sobrevivir en función de la expresión de la p53 y que en este subgrupo de pacientes es un factor pronóstico independiente junto con la afectación ganglionar

Si la expresión de la p53 es un factor pronóstico negativo en la supervivencia de los pacientes intervenidos con intención curativa de nuestra serie, esto puede ser debido a su influencia en la aparición de recidivas, puesto que es el hecho más importante que determina la mortalidad en estos pacientes. En nuestra serie la tasa de recidiva de la enfermedad es del 35%, siendo del 28 % en pacientes con p53 negativa y del 44% en pacientes con p53 positiva ($p < 0,045$, Chi cuadrado). Las tasas de recidiva son inferiores en algunas series japonesas representando alrededor de un 25 %^{329 324} y también dependen de la expresión de la p53 (19 % en pacientes con p53 negativa y del 28% en pacientes con p53 positiva)³²⁹. Se puede afirmar por tanto que el peor pronóstico de los tumores gástricos que expresan la p53 viene determinado por la mayor frecuencia de aparición de recidivas. Así pues, sería necesario realizar un seguimiento más estrecho en estos pacientes, de manera que podamos detectar precozmente dichas recidivas.

Uno de los objetivos concretos del estudio era realizar el análisis de la posible correlación entre la densidad microvascular y la expresión de la p53. El análisis de los resultados revela que en nuestra serie existe una importante correlación entre la expresión de la p53 y la angiogénesis tumoral y que éstas no son variables independientes. Cuando las células tumorales expresan la p53 el grado de DMV es mayor en ese tumor. La explicación de la relación encontrada entre la p53 y la angiogénesis tumoral puede deberse a la acción de la trombospondina-1 (TSP-1), que es un potente inhibidor de la angiogénesis y parece estar regulado por la p53. En cultivos de fibroblastos humanos se ha observado que el gen p53 estimula la producción de TSP-1 y por tanto inhibe el

desarrollo angiogénico ²⁹⁹. Este estudio experimental señala uno de los posibles mecanismos por los que la mutación del p53 puede provocar el aumento de la angiogénesis tumoral. El balance entre factores inhibitorios, como la TSP-1, y factores estimuladores determina la aparición de nuevos vasos sanguíneos. En tejidos normales predominan los factores inhibidores, pero en los tumores existe un descenso en la producción de inhibidores y un aumento de los inductores.

Actualmente, existen evidencias experimentales que indican que el crecimiento de tumores sólidos depende de la angiogénesis, que proporciona el aporte de nutrientes y oxígeno al tumor, y además, facilita la invasión vascular de las células tumorales porque los nuevos capilares presentan membranas basales fragmentadas. En los últimos años, la evaluación de la angiogénesis ha sido propuesta como un marcador pronóstico en pacientes con tumores de distintas localizaciones: mama ²⁷⁰, pulmón ²⁸³, ovario ³⁵⁸, colon ³⁵⁹, próstata ²⁷¹, riñón ³⁶⁰, melanoma ³⁶¹, tumores de cabeza y cuello ³⁶² y tumores de esófago ³⁶³. En el caso del cáncer gástrico, han sido autores japoneses los que por primera vez han evaluado la importancia de la angiogénesis tumoral como factor pronóstico ^{286 287}.

Con nuestro estudio hemos querido evaluar la implicación que tenía la angiogénesis tumoral en una serie amplia de pacientes diagnosticados con cáncer gástrico en el mundo occidental. La metodología realizada para cuantificar la DMV ha seguido los criterios aceptados internacionalmente ²⁸². Hemos utilizado un anticuerpo monoclonal frente a la molécula de adhesión CD34 para realizar la tinción del endotelio vascular porque en varios estudios, algunos en pacientes con cáncer gástrico ^{287 364}, se ha observado que tiñe el endotelio de forma más uniforme y consistente que otros marcadores. Para llevar a cabo el estudio

estadístico, es necesario categorizar el resultado de la cuantificación de la DMV. Una de las formas de realizar la división de los pacientes es utilizando la media de dicha medida, en nuestro caso 98,9. De esta forma aparecen dos categorías, una con menos de 100 microvasos y la otra con más, que incluyen a un número similar de pacientes (101 y 105). Para realizar el análisis estadístico hemos utilizado este sistema de categorizar la DMV para obtener dos grupos homogéneos en cuanto al número de pacientes, pero asimismo hemos categorizado la variable estableciendo el punto de corte en 80 microvasos porque de esta forma logramos una agrupación más adecuada de los pacientes con bajo grado de DMV en nuestra serie.

Al evaluar la influencia de la DMV en los parámetros clinicopatológicos de los pacientes de nuestra serie, hemos observado cómo la existencia de una angiogénesis elevada se correlaciona con una mayor afectación ganglionar cuantificada como ratio (ganglios afectados/ganglios extirpados) ($p < 0,019$) o como estadío ganglionar ($p < 0,027$) (Tablas 23 y 24). Esta asociación entre la DMV y la existencia de metástasis en ganglios linfáticos se ha observado también en tumores de otras localizaciones como mama, riñón, pulmón y esófago ³⁶⁵. En el caso del cáncer gástrico, dicha correlación es controvertida, con resultados a favor ²⁸⁶, incluso en el subgrupo de pacientes con cáncer gástrico precoz ³⁶⁶ y en contra ²⁸⁷ Araya y cols. ²⁸¹ encontraron una asociación significativa entre la densidad vascular tumoral con las metástasis ganglionares pero también con la invasión linfática y la invasión de órganos adyacentes, por lo que sugerían que los tumores hipervasculares poseían unas propiedades más agresivas que los demás ya que se manifestaban con una mayor invasión en profundidad y mayor invasión linfática. En nuestra serie, sin embargo, hemos evidenciado la correlación existente entre

una DMV elevada y una mayor afectación ganglionar pero no con los demás parámetros clínico patológicos. Parece evidente que el mayor grado de angiogénesis aparece en los tumores más evolucionados y que por tanto pueden presentar un mayor número de metástasis ganglionares. Por tanto existe una tendencia a que los tumores de mayor estadio presenten mayor vascularización. Como hemos podido observar con nuestros resultados, esto no ocurre con la p53 y el VEGF, cuya expresión puede detectarse en las células tumorales desde etapas tempranas, siendo independiente esta expresión del tiempo de evolución tumoral.

Independientemente de su relación con otros factores relacionados con el tumor, la mayor vascularización tumoral se asocia a una disminución de la supervivencia de los pacientes con cáncer gástrico en análisis univariados y multivariados ^{286 281}. En una serie de pacientes con cáncer gástrico intervenidos con intención curativa, Tanigawa y cols. ²⁸⁷ han demostrado que la peor supervivencia de los pacientes con elevada DMV es debida a que desarrollan mayor número de metástasis por vía hematológica. En este sentido, se ha demostrado que pacientes con cáncer gástrico en los que existían micrometástasis en médula ósea en el momento del diagnóstico, presentaban una vascularización tumoral mucho mayor ³⁶⁷. Dicho hallazgo parece confirmar la relación entre el potencial metastásico del cáncer gástrico y la angiogénesis del tumor primario.

En nuestro caso, no podemos atribuir un mayor riesgo de diseminación hematológica a los pacientes con DMV elevada pero sí un mayor riesgo de presentar una recidiva de la enfermedad, sea local o a distancia (Tabla 30). Por lo tanto, al igual que ocurría con la expresión de la proteína p53, la información

acerca de la angiogénesis tumoral, permite identificar los pacientes con alto riesgo de desarrollar una recidiva.

La posibilidad de inhibir el desarrollo de la neovascularización tumoral puede ser de gran utilidad como tratamiento antineoplásico y podría constituir un nuevo enfoque en el tratamiento del cáncer gástrico en el futuro. Algunos estudios experimentales han utilizado agentes antiangiogénicos como el TNP-470, que ha mostrado su actividad para inhibir de forma significativa la actividad proliferativa de los tumores gástricos y el desarrollo de metástasis hepáticas y diseminación peritoneal ^{368 369}. También se ha sugerido que en caso de que haya células tumorales que hayan pasado a la circulación general, la inhibición de la angiogénesis mediante estas terapias, puede mantenerlas "dormidas" impidiendo la progresión del tumor ³⁷⁰.

Como hemos señalado anteriormente, la angiogénesis tumoral es un proceso dinámico, altamente dependiente del equilibrio entre factores activadores e inhibidores. El VEGF es uno de los factores activadores de la angiogénesis segregados por los tumores, que facilita, mediante la aparición de neovascularización, el crecimiento y desarrollo tumoral. Su expresión ha sido detectada en tumores de distintas localizaciones como cáncer de mama ³¹⁶, de colon ³⁷¹ o de vejiga ³¹⁴ y también cáncer gástrico y parece promover la progresión tumoral y la aparición de metástasis por lo que se asocia a mal pronóstico.

En nuestro estudio, hemos cuantificado el VEGF de acuerdo a un método estandarizado, realizando una gradación en la intensidad de la tinción en tres categorías, que posteriormente reagrupamos en dos para realizar el análisis

estadístico. Hemos decidido agrupar a los pacientes en función de si existía tinción en las células tumorales o no, porque la intensidad de la tinción puede ser más difícil de cuantificar por su variabilidad. Esto ha hecho que los pacientes con VEGF negativo representen únicamente un 22,3 % de los pacientes de nuestra serie. Esta cifra es algo inferior a la de otras series porque en algunos trabajos los pacientes con tinción débilmente positiva se consideran como VEGF negativos ³⁷².

Los resultados de nuestro estudio confirman que la vascularización tumoral en el cáncer gástrico es altamente dependiente de la expresión del VEGF (Tabla 22). El riesgo de presentar una DMV elevada cuando detectamos la expresión del VEGF en las células tumorales, es mucho mayor para todas las categorías analizadas. Otros trabajos publicados confirman nuestros resultados ³⁷².

Al igual que con la expresión de la p53, algunos autores han relacionado la expresión del VEGF en pacientes con cáncer gástrico con algunos parámetros clinicopatológicos. En uno de los trabajos publicados, parece existir una asociación entre el VEGF y la diferenciación tumoral, siendo los tumores bien diferenciados los que con más frecuencia expresan el VEGF ³⁷². En otro estudio, sin embargo, se relaciona la expresión del VEGF con los tumores de tipo intestinal ³²³, y en un tercero, se asocia con la invasión linfática y vascular del tumor ³²⁴. Esta última asociación es fácilmente comprensible debido a la estrecha relación del VEGF con la angiogénesis tumoral. El VEGF estimula la formación de nuevos capilares que, como ya se ha comentado, al ser más inmaduros y presentar fragmentaciones en su membrana basal, son más susceptibles a la invasión por las células tumorales. Autores japoneses han demostrado que la expresión de VEGF en pacientes con

cáncer gástrico es un factor de riesgo independiente para la existencia de invasión vascular ³²². Ésta sería también la causa de que pudieran aparecer más metástasis a distancia. De hecho, la presencia de metástasis a distancia en el momento del diagnóstico, ha sido el único parámetro que hemos podido relacionar en nuestro estudio con la existencia de expresión del VEGF en las células tumorales. De los 38 pacientes que presentaban metástasis, únicamente 4 no expresaban el VEGF (Tabla 26).

Al evaluar la relación entre la expresión del VEGF con otros factores de mal pronóstico como la afectación ganglionar o la invasión linfática, no hemos podido establecer ningún tipo de relación. Una de las posibles causas de estos resultados es que el crecimiento del sistema vascular linfático es estimulado específicamente por el VEGF-C, uno de los subtipos de factores de crecimiento vascular. En un trabajo publicado sobre cáncer gástrico, en el que se estudia de forma específica la expresión del VEGF-C en las células tumorales ³⁷³, se demuestra que este subtipo de VEGF sí que parece relacionarse de forma importante con una mayor afectación ganglionar y una mayor invasión tumoral linfática, por lo que determina una peor supervivencia. Pero, al igual de lo que ocurre en nuestra serie, otro trabajo ³⁵⁰ concluye que la expresión del VEGF no parece relacionarse con las características clinicopatológicas del cáncer gástrico ni con el estadio tumoral. Por tanto, la expresión de VEGF puede considerarse como una característica independiente del propio tumor, cuya expresión determina una peor supervivencia.

En nuestros pacientes, hemos podido confirmar que la expresión del VEGF por el tumor es un factor pronóstico independiente de supervivencia. Dicho valor pronóstico radica en que su expresión es positiva en tumores que presentan

metástasis en el momento del diagnóstico y también en aquellos que son resecados con intención curativa pero que presentan metástasis durante el seguimiento (de los 12 pacientes que recidivan con metástasis a distancia, en 10 casos existe expresión del VEGF). Si analizamos conjuntamente ambos grupos de pacientes de nuestra serie, podemos establecer una asociación entre la expresión del VEGF y la capacidad de metastatizar del cáncer gástrico.

Además de la relación entre la expresión del VEGF con la existencia de metástasis a distancia, también se ha señalado su influencia en la aparición de metástasis peritoneales³⁷². Existen algunas hipótesis acerca de la posible relación del VEGF con una familia de proteínas (beta-integrinas) que aumentan la adhesión de las células tumorales al peritoneo lo que favorecería la aparición de metástasis peritoneales en pacientes con expresión del VEGF³⁵⁰. En nuestra serie, de los 19 pacientes que presentaron carcinomatosis peritoneal, en 13 casos (68 %) existía una expresión del VEGF en las células tumorales, lo que parece indicar que el VEGF determina una mayor agresividad en la biología tumoral afectando de igual manera a la diseminación peritoneal o a distancia. Sin embargo, la expresión del VEGF es por lo general mayor en pacientes con metástasis por vía hematológica, fundamentalmente hepáticas, que en pacientes con diseminación peritoneal³²³.

Entre los objetivos de nuestro estudio se encontraba también la evaluación de la correlación entre la expresión de la p53 y del VEGF. Tras el análisis de los resultados podemos concluir que en nuestra serie son factores independientes entre sí. Sin embargo, como ya se ha indicado, algunos estudios experimentales han mostrado cómo la mutación del gen p53 podría estimular la angiogénesis tumoral por su capacidad de regular la expresión del VEGF^{298 374} y la TSP-1²⁹⁹.

Con nuestros resultados, podemos afirmar que tanto la p53 como el VEGF regulan la angiogénesis tumoral pero no podemos establecer que el efecto de la mutación de la p53 sobre la angiogénesis tumoral se deba a que provoque una estimulación en la expresión del VEGF, principal factor angiogénico, porque probablemente actúa a través de diferentes mecanismos.

En nuestra serie hemos encontrado una concordancia entre la expresión de la p53 y del VEGF en 79 pacientes (38,3 % del total), lo que contrasta con los resultados de otras series de pacientes con cáncer gástrico en las que dicha concordancia llega a ser del 72 %³⁴⁶. Otros trabajos confirman, al igual que el nuestro, que la p53 induce la aparición de una angiogénesis elevada de forma independiente al VEGF²⁶⁰. Por tanto, la p53 y el VEGF se correlacionan con la vascularización tumoral y con el pronóstico de los pacientes con cáncer gástrico. Aquellos que expresan conjuntamente el VEGF y la p53, tienen peor pronóstico que los que presentan solamente uno de los dos factores o ninguno, mejorando la significación en el modelo de regresión y aumentando el riesgo de muerte (Tabla 29). Una de las aplicaciones clínicas de estos hallazgos es la posibilidad de realizar una determinación preoperatoria, mediante tinciones inmunohistoquímicas, del estatus de expresión de la p53 y del VEGF utilizando material extirpado endoscópicamente. De este modo podría decidirse la estrategia terapéutica más adecuada en cada caso. Además, al considerar la expresión de la p53 y del VEGF como factores pronósticos en la aparición de recidivas, una vez extirpado el tumor con intención curativa, su determinación podría ser útil a la hora de valorar el tratamiento complementario y el seguimiento de estos pacientes.

Otro de los objetivos del presente estudio es evaluar la influencia de los factores analizados (p53, VEGF y DMV) en la respuesta a la quimioterapia utilizada habitualmente en el Hospital Clínic. Si pudiéramos definir el subgrupo de pacientes que no van a responder al tratamiento complementario, podríamos entonces intentar mejorar el pronóstico de los mismos instaurando otras terapéuticas.

Lowe y cols. han señalado que debido a las funciones del gen p53 en los mecanismos que regulan la reparación del ADN y en la apoptosis, la inactivación de este gen producida por mutaciones o deleciones determina la aparición de resistencias a agentes quimioterápicos en dichas poblaciones celulares³⁷⁵. En experimentos "in vitro" con células tumorales que provienen de neoplasias de estómago y esófago se han confirmado dichas observaciones³⁷⁶. Las células tumorales que expresaban la p53, eran resistentes a los efectos inhibitorios del crecimiento de varios quimioterápicos entre los que se encuentran el 5-fluorouracilo, la mitomicina C y el cisplatino. La mitomicina C y el f-torafur, derivado del fluorouracilo, son utilizados habitualmente en los pacientes de nuestra serie. Al realizar el análisis del efecto del tratamiento quimioterápico, hemos podido confirmar los resultados experimentales ya que en aquellos pacientes que expresan la p53 la quimioterapia pierde su efectividad. Bergh y cols.³⁷⁷ también observan la pérdida de la eficacia del tratamiento quimioterápico adyuvante en pacientes con tumores de mama cuando existían mutaciones del gen p53.

Existen únicamente dos estudios de pacientes con cáncer gástrico localmente avanzado en los que se ha evaluado la influencia de la p53 en la respuesta al tratamiento quimioterápico neoadyuvante. En el primero de ellos, se administró un régimen de quimioterapia que incluía fluorouracilo y se evaluó la respuesta tumoral al tratamiento mediante tomografía abdominal y endoscopia. Los

pacientes que no expresaban la p53, presentaban una respuesta a los agentes quimioterápicos muy superior (tasa de respuesta del 72% frente a 12%, $p < 0,004$)³⁷⁸. En el otro estudio se ha evaluado la respuesta tumoral al tratamiento con 5-fluorouracilo y cisplatino, confirmándose que los pacientes que no expresaban la p53 respondían mejor a la quimioterapia. En este trabajo, los autores han evaluado también la expresión del VEGF y han señalado por primera vez que este factor angiogénico es un buen marcador para predecir la respuesta a la quimioterapia ya que los pacientes que lo expresan responden mejor a la quimioterapia que los que no lo hacen³⁷⁹. Este hecho se confirma en nuestro estudio, sin que conozcamos los motivos a los que se puede atribuir dicha relación. Podría pensarse que el VEGF al provocar una mayor vascularización tumoral, favorecería la llegada de los agentes quimioterápicos al tumor. Sin embargo, al evaluar la influencia de la DMV en la respuesta a la quimioterapia no existen diferencias entre aquellos pacientes que presentan mayor o menor DMV en el tumor primario.

En definitiva, nuestro estudio parece confirmar que la p53 determina la quimiosensibilidad en pacientes con cáncer gástrico y que por tanto sería una guía muy útil a la hora de seleccionar el tipo de tratamiento a aplicar. En nuestro caso, en los pacientes cuyo tumor exprese la p53 deberíamos cambiar nuestra estrategia terapéutica actual por otra diferente (oxaliplatino, irinitecán, etc) y evitar el tratamiento con MMC y FT en aquellos pacientes en los que el efecto será escaso. El mejor conocimiento de la biología de cada tumor permitirá individualizar las pautas de quimioterapia con el fin de obtener el máximo beneficio.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La expresión de la proteína p53 y del VEGF en las células tumorales de pacientes con cáncer gástrico determinan la aparición de una mayor DMV tumoral y dicho efecto es independiente entre sí, ya que no se puede confirmar la influencia de la p53 en la expresión del VEGF.
2. La expresión del VEGF en las células tumorales se relaciona con la aparición de metástasis a distancia en pacientes con cáncer gástrico.
3. La existencia de una DMV tumoral elevada en pacientes con cáncer gástrico determina la aparición de un mayor número de metástasis ganglionares.
4. La expresión de la proteína p53 y del VEGF y la existencia de una DMV tumoral elevada se relacionan con la aparición de recidivas tumorales en pacientes con cáncer gástrico intervenidos con intención curativa.
5. La expresión de la p53 y del VEGF son factores pronósticos independientes de supervivencia libre de recidiva y de supervivencia relacionada con la enfermedad en pacientes con cáncer gástrico. El estadio pT de la UICC, la afectación ganglionar y el tipo de linfadenectomía practicado (D2 frente a D1) son también factores pronósticos independientes de ambos tipos de supervivencia en pacientes intervenidos con intención curativa.

6. La utilización de quimioterapia postoperatoria (MMC ó MMC+FT) determina un aumento en la supervivencia relacionada con la enfermedad en pacientes con cáncer gástrico. La expresión del VEGF identifica el grupo de pacientes en los que se obtiene mayor beneficio con la quimioterapia. Sin embargo, cuando existe expresión de la p53 en las células tumorales, la quimioterapia pierde su efectividad.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 80:827-841.
2. Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 83:18-29.
3. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001; 51:15-36.
4. Parrilla P, García-Marcilla JA. Tumores del estómago y duodeno. In Rodés J, Guardia J (eds). *Medicina Interna*. Barcelona: Ediciones Masson, SA; 1997:1306-1311.
5. Sáinz R, Saperas E, Piqué JM. Enfermedades del estómago y duodeno. In Farreras P, Rozman C (eds). *Medicina Interna*. Madrid: Ediciones Harcourt, S.A.; 2000:108-117.
6. 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; 88:921-932.
7. Allgayer H, Heiss MM, Schildberg FW. Prognostic factors in gastric cancer. *Br J Surg* 1997; 84:1651-1664.
8. Staszewski J. Migrant studies in alimentary tract cancer. *Recent Results Cancer Res* 1972; 39:85-97.
9. Haenszel W, Kurihara M, Segi M, Lee RK. Stomach cancer among Japanese in Hawaii. *J Natl Cancer Inst* 1972; 49:969-988.
10. Smans M, Muir CS, Boyle P. Atlas of cancer mortality in the European Economic Community. IARC Scientific Publication 1992; nº 107. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
11. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64:31-49.
12. Fortner JG, Lauwers GY, Thaler HT, Concepcion R, Friedlander-Klar H, Kher U, Maclean BJ. Nativity, complications, and pathology are determinants of surgical results for gastric cancer. *Cancer* 1994; 73:8-14.
13. Ohno S, Tomisaki S, Oiwa H, Sakaguchi Y, Ichiyoshi Y, Maehara Y, Sugimachi K. Clinicopathologic characteristics and outcome of adenocarcinoma of the human gastric cardia in comparison with carcinoma of other regions of the stomach. *J Am Coll Surg* 1995; 180:577-582.
14. Harrison LE, Karpeh MS, Brennan MF. Proximal gastric cancers resected via a transabdominal-only approach. Results and comparisons to distal adenocarcinoma of the stomach. *Ann Surg* 1997; 225:678-683.
15. Pera M, Cameron AJ, Trastek VF, Carpenter HA, Zinsmeister AR. Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Gastroenterology* 1993; 104:510-513.

16. Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998; 83:2049-2053.
17. Howson CP, Hiyama T, Wynder EL. The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiol Rev* 1986; 8:1-27.
18. Correa P, Cuello C, Duque E. Carcinoma and intestinal metaplasia of the stomach in Colombian migrants. *J Natl Cancer Inst* 1970; 44:297-306.
19. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988; 48:3554-3560.
20. Ming SC. Cellular and molecular pathology of gastric carcinoma and precursor lesions: A critical review. *Gastric Cancer* 1998; 1:31-50.
21. Ming SC, Hirota T. Malignant epithelial tumors of the stomach. In Ming SC, Goldman H (eds). *Pathology of the gastrointestinal tract*. Baltimore: Williams and Wilkins.; 1998:607-647.
22. Antonioli DA. Precursors of gastric carcinoma: a critical review with a brief description of early (curable) gastric cancer. *Hum Pathol* 1994; 25:994-1005.
23. Gonzalez CA, Sanz JM, Agudo A. [Risk factors for gastric cancer]. *Gastroenterol Hepatol* 1997; 20:239-247.
24. Kono S, Ikeda M, Tokudome S, Kuratsune M. A case-control study of gastric cancer and diet in northern Kyushu, Japan. *Jpn J Cancer Res* 1988; 79:1067-1074.
25. Kneller RW, Guo WD, Hsing AW, Chen JS, Blot WJ, Li JY, Forman D, Fraumeni JF, Jr. Risk factors for stomach cancer in sixty-five Chinese counties. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1992; 1:113-118.
26. Tatematsu M, Takahashi M, Fukushima S, Hananouchi M, Shirai T. Effects in rats of sodium chloride on experimental gastric cancers induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine or 4-nitroquinoline-1-oxide. *J Natl Cancer Inst* 1975; 55:101-106.
27. Lee HH, Wu HY, Chuang YC, Chang AS, Chao HH, Chen KY, Chen HK, Lai GM, Huang HH, Chen CJ. Epidemiologic characteristics and multiple risk factors of stomach cancer in Taiwan. *Anticancer Res* 1990; 10:875-881.
28. Kato I, Tominaga S, Ito Y, Kobayashi S, Yoshii Y, Matsuura A, Kameya A, Kano T. A comparative case-control analysis of stomach cancer and atrophic gastritis. *Cancer Res* 1990; 50:6559-6564.
29. Xu G, Song P, Reed PI. The relationship between gastric mucosal changes and nitrate intake via drinking water in a high-risk population for gastric cancer in Moping county, China. *Eur J Cancer Prev* 1992; 1:437-443.
30. Sugimura T, Fujimura S, Baba T. Tumor production in the glandular stomach and alimentary tract of the rat by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Res* 1970; 30:455-465.
31. Sasajima K, Kawachi T, Matsukura N, Sano T, Sugimura T. Intestinal metaplasia and adenocarcinoma induced in the stomach of rats by N-propyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J Cancer Res Clin Oncol* 1979; 94:201-206.

32. Tannenbaum SR, Correa P. Nitrate and gastric cancer risks. *Nature* 1985; 317:675-676.
33. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. *Cancer Causes Control* 1991; 2:427-442.
34. Hoshiyama Y, Sasaba T. A case-control study of stomach cancer and its relation to diet, cigarettes, and alcohol consumption in Saitama Prefecture, Japan. *Cancer Causes Control* 1992; 3:441-448.
35. Yu GP, Hsieh CC. Risk factors for stomach cancer: a population-based case-control study in Shanghai. *Cancer Causes Control* 1991; 2:169-174.
36. 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.
37. Tsugane S, Kabuto M, Imai H, Gey F, Tei Y, Hanaoka T, Sugano K, Watanabe S. *Helicobacter pylori*, dietary factors, and atrophic gastritis in five Japanese populations with different gastric cancer mortality. *Cancer Causes Control* 1993; 4:297-305.
38. Gonzalez CA, Sanz JM, Marcos G, Pita S, Brullet E, Saigi E, Badia A, Agudo A, Riboli E. Borage consumption as a possible gastric cancer protective factor. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993; 2:157-158.
39. Terry P, Lagergren J, Hansen H, Wolk A, Nyren O. Fruit and vegetable consumption in the prevention of oesophageal and cardia cancers. *Eur J Cancer Prev* 2001; 10:365-369.
40. Rios-Castellanos E, Sitas F, Shepherd NA, Jewell DP. Changing pattern of gastric cancer in Oxfordshire. *Gut* 1992; 33:1312-1317.
41. Kabat GC, Ng SK, Wynder EL. Tobacco, alcohol intake, and diet in relation to adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Cancer Causes Control* 1993; 4:123-132.
42. Gonzalez CA, Agudo A, Montes J, Riboli E, Sanz JM. Tobacco and alcohol intake in relation to adenocarcinoma of the gastric cardia in Spain. *Cancer Causes Control* 1994; 5:88-89.
43. Gammon MD, Schoenberg JB, Ahsan H, Risch HA, Vaughan TL, Chow WH, Rotterdam H, West AB, Dubrow R, Stanford JL, Mayne ST, Farrow DC, Niwa S, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Tobacco, alcohol, and socioeconomic status and adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1277-1284.
44. Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N, Sitas F. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ* 1991; 302:1302-1305.
45. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelmann JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325:1127-1131.
46. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in

- Hawaii. *N Engl J Med* 1991; 325:1132-1136.
47. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; 345:784-789.
 48. McColl KE, El Omar E. *Helicobacter pylori* and disturbance of gastric function associated with duodenal ulcer disease and gastric cancer. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996; 215:32-37.
 49. Jerris RC. *Helicobacter*. In Murray PR (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: 1995.
 50. Lee A, Dixon MF, Danon SJ, Kuipers E, Megraud F, Larsson H, Mellgard B. Local acid production and *Helicobacter pylori*: a unifying hypothesis of gastroduodenal disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7:461-465.
 51. Kuipers EJ, Lundell L, Klinkenberg-Knol EC, Havu N, Festen HP, Liedman B, Lamers CB, Jansen JB, Dalenback J, Snel P, Nelis GF, Meuwissen SG. Atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux esophagitis treated with omeprazole or fundoplication. *N Engl J Med* 1996; 334:1018-1022.
 52. Sanduleanu S, Jonkers D, De Bruine A, Hameeteman W, Stockbrugger RW. Non-*Helicobacter pylori* bacterial flora during acid-suppressive therapy: differential findings in gastric juice and gastric mucosa. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15:379-388.
 53. Sanduleanu S, Jonkers D, De Bruine A, Hameeteman W, Stockbrugger RW. Double gastric infection with *Helicobacter pylori* and non-*Helicobacter pylori* bacteria during acid-suppressive therapy: increase of pro-inflammatory cytokines and development of atrophic gastritis. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15:1163-1175.
 54. Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 1995; 19 Suppl 1:S37-S43.
 55. El Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF, Jr., Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404:398-402.
 56. El Omar EM. The importance of interleukin 1beta in *Helicobacter pylori* associated disease. *Gut* 2001; 48:743-747.
 57. Machado JC, Pharoah P, Sousa S, Carvalho R, Oliveira C, Figueiredo C, Amorim A, Seruca R, Caldas C, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M. Interleukin 1b and interleukin 1rn polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2001; 121:823-829.
 58. El Omar EM, Chow WH, Rabkin CS. Gastric Cancer and *H. pylori*: Host Genetics Open the Way. *Gastroenterology* 2001; 121:1002-1005.
 59. Selves J, Bibeau F, Brousset P, Meggetto F, Mazerolles C, Voigt JJ, Pradere B, Chiotasso P, Delsol G. Epstein-Barr virus latent and replicative gene expression in gastric carcinoma. *Histopathology* 1996; 28:121-127.
 60. Adachi Y, Yoh R, Konishi J, Iso Y, Matsumata T, Kasai T, Hashimoto H. Epstein-Barr

virus-associated gastric carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 1996; 23:207-210.

61. Baas IO, van Rees BP, Musler A, Craanen ME, Tytgat GN, van den Berg FM, Offerhaus GJ. *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus infection and the p53 tumour suppressor pathway in gastric stump cancer compared with carcinoma in the non-operated stomach. *J Clin Pathol* 1998; 51:662-666.
62. Tokunaga M, Land CE, Uemura Y, Tokudome T, Tanaka S, Sato E. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143:1250-1254.
63. Greenlee HB, Vivit R, Paez J, Dietz A. Bacterial flora of the jejunum following peptic ulcer surgery. *Arch Surg* 1971; 102:260-265.
64. Fischer AB, Graem N, Jensen OM. Risk of gastric cancer after Billroth II resection for duodenal ulcer. *Br J Surg* 1983; 70:552-554.
65. Stalnikowicz R, Benbassat J. Risk of gastric cancer after gastric surgery for benign disorders. *Arch Intern Med* 1990; 150:2022-2026.
66. Tersmette AC, Offerhaus GJ, Tersmette KW, Giardiello FM, Moore GW, Tytgat GN, Vandenbroucke JP. Meta-analysis of the risk of gastric stump cancer: detection of high risk patient subsets for stomach cancer after remote partial gastrectomy for benign conditions. *Cancer Res* 1990; 50:6486-6489.
67. Tanigawa H, Uesugi H, Mitomi H, Saigenji K, Okayasu I. Possible association of active gastritis, featuring accelerated cell turnover and p53 overexpression, with cancer development at anastomoses after gastrojejunostomy. Comparison with gastroduodenostomy. *Am J Clin Pathol* 2000; 114:354-363.
68. Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, Yokota J, Wiesner GL, Powell SM, Lewis FR, Huntsman DG, Pharoah PD, Jankowski JA, MacLeod P, Vogelsang H, Keller G, Park KG, Richards FM, Maher ER, Gayther SA, Oliveira C, Grehan N, Wight D, Seruca R, Roviello F, Ponder BA, Jackson CE. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *J Med Genet* 1999; 36:873-880.
69. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, Taite H, Scoular R, Miller A, Reeve AE. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 1998; 392:402-405.
70. Richards FM, McKee SA, Rajpar MH, Cole TR, Evans DG, Jankowski JA, McKeown C, Sanders DS, Maher ER. Germline E-cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 1999; 8:607-610.
71. Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR, MacLeod PM, Hayashi A, Monaghan KG, Maung R, Seruca R, Jackson CE, Caldas C. Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations. *N Engl J Med* 2001; 344:1904-1909.
72. Lewis FR, Mellinger JD, Hayashi A, Lorelli D, Monaghan KG, Carneiro F, Huntsman DG, Jackson CE, Caldas C. Prophylactic total gastrectomy for familial gastric cancer. *Surgery* 2001; 130:612-619.
73. Hsing AW, Hansson LE, McLaughlin JK, Nyren O, Blot WJ, Ekobom A, Fraumeni JF, Jr. Pernicious anemia and subsequent cancer. A population-based cohort study. *Cancer* 1993; 71:745-750.

74. Dewys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennett JM, Bertino JR, Cohen MH, Douglass HO, Jr., Engstrom PF, Ezdinli EZ, Horton J, Johnson GJ, Moertel CG, Oken MM, Perlia C, Rosenbaum C, Silverstein MN, Skeel RT, Sponzo RW, Tormey DC. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Med* 1980; 69:491-497.
75. Oliveira FJ, Ferrao H, Furtado E, Batista H, Conceicao L. Early gastric cancer: Report of 58 cases. *Gastric Cancer* 1998; 1:51-56.
76. Maruyama K, Okabayashi K, Kinoshita T. Progress in gastric cancer surgery in Japan and its limits of radicality. *World J Surg* 1987; 11:418-425.
77. Murakami R, Tsukuma H, Ubukata T, Nakanishi K, Fujimoto I, Kawashima T, Yamazaki H, Oshima A. Estimation of validity of mass screening program for gastric cancer in Osaka, Japan. *Cancer* 1990; 65:1255-1260.
78. Mori Y, Arita T, Shimoda K, Yasuda K, Yoshida T, Kitano S. Effect of periodic endoscopy for gastric cancer on early detection and improvement of survival. *Gastric Cancer* 2001; 4:132-136.
79. Yoshihara M, Sumii K, Haruma K, Kiyohira K, Hattori N, Kitadai Y, Komoto K, Tanaka S, Kajiyama G. Correlation of ratio of serum pepsinogen I and II with prevalence of gastric cancer and adenoma in Japanese subjects. *Am J Gastroenterol* 1998; 93:1090-1096.
80. Nakane Y, Okamura S, Akehira K, Boku T, Okusa T, Tanaka K, Hioki K. Correlation of preoperative carcinoembryonic antigen levels and prognosis of gastric cancer patients. *Cancer* 1994; 73:2703-2708.
81. Filella X, Fuster J, Molina R, Grau JJ, Garcia-Valdecasas JC, Grande L, Estape J, Ballesta AM. TAG-72, CA 19.9 and CEA as tumor markers in gastric cancer. *Acta Oncol* 1994; 33:747-751.
82. Kodera Y, Yamamura Y, Torii A, Uesaka K, Hirai T, Yasui K, Morimoto T, Kato T, Kito T. The prognostic value of preoperative serum levels of CEA and CA19-9 in patients with gastric cancer. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:49-53.
83. Pectasides D, Mylonakis A, Kostopoulou M, Papadopoulou M, Triantafyllis D, Varthalitis J, Dimitriades M, Athanassiou A. CEA, CA 19-9, and CA-50 in monitoring gastric carcinoma. *Am J Clin Oncol* 1997; 20:348-353.
84. Kochi M, Fujii M, Kanamori N, Kaiga T, Kawakami T, Aizaki K, Kasahara M, Mochizuki F, Kasakura Y, Yamagata M. Evaluation of serum CEA and CA19-9 levels as prognostic factors in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 2000; 3:177-186.
85. Grimm H, Binmoeller KF, Hamper K, Koch J, Henne-Bruns D, Soehendra N. Endosonography for preoperative locoregional staging of esophageal and gastric cancer. *Endoscopy* 1993; 25:224-230.
86. Yanai H, Matsumoto Y, Harada T, Nishiaki M, Tokiyama H, Shigemitsu T, Tada M, Okita K. Endoscopic ultrasonography and endoscopy for staging depth of invasion in early gastric cancer: a pilot study. *Gastrointest Endosc* 1997; 46:212-216.
87. Takao M, Fukuda T, Iwanaga S, Hayashi K, Kusano H, Okudaira S. Gastric cancer: evaluation of triphasic spiral CT and radiologic- pathologic correlation. *J Comput*

- Assist Tomogr 1998; 22:288-294.
88. Gupta N, Bradfield H. Role of positron emission tomography scanning in evaluating gastrointestinal neoplasms. *Semin Nucl Med* 1996; 26:65-73.
 89. Luketich JD, Schauer PR, Meltzer CC, Landreneau RJ, Urso GK, Townsend DW, Ferson PF, Keenan RJ, Belani CP. Role of positron emission tomography in staging esophageal cancer. *Ann Thorac Surg* 1997; 64:765-769.
 90. Brucher BL, Weber W, Bauer M, Fink U, Avril N, Stein HJ, Werner M, Zimmerman F, Siewert JR, Schwaiger M. Neoadjuvant therapy of esophageal squamous cell carcinoma: response evaluation by positron emission tomography. *Ann Surg* 2001; 233:300-309.
 91. Asencio F, Aguilo J, Salvador JL, Villar A, De la ME, Ahamad M, Escrig J, Puche J, Viciano V, Sanmiguel G, Ruiz J. Video-laparoscopic staging of gastric cancer. A prospective multicenter comparison with noninvasive techniques. *Surg Endosc* 1997; 11:1153-1158.
 92. Burke EC, Karpeh MS, Conlon KC, Brennan MF. Laparoscopy in the management of gastric adenocarcinoma. *Ann Surg* 1997; 225:262-267.
 93. Stell DA, Carter CR, Stewart I, Anderson JR. Prospective comparison of laparoscopy, ultrasonography and computed tomography in the staging of gastric cancer. *Br J Surg* 1996; 83:1260-1262.
 94. Lowy AM, Mansfield PF, Leach SD, Ajani J. Laparoscopic staging for gastric cancer. *Surgery* 1996; 119:611-614.
 95. Feussner H, Omote K, Fink U, Walker SJ, Siewert JR. Pretherapeutic laparoscopic staging in advanced gastric carcinoma. *Endoscopy* 1999; 31:342-347.
 96. Bartlett DL, Conlon KC, Gerdes H, Karpeh MS, Jr. Laparoscopic ultrasonography: the best pretreatment staging modality in gastric adenocarcinoma? Case report. *Surgery* 1995; 118:562-566.
 97. Hermanek P, Wittekind C. News of TNM and its use for classification of gastric cancer. *World J Surg* 1995; 19:491-495.
 98. Fleming ID, Cooper JS, Henson DE. *Manual for Staging of Cancer*. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven; 1997.
 99. Aiko T, Sasako M. The new Japanese Classification of Gastric Carcinoma: points to be revised. *Gastric Cancer* 1998; 1:25-30.
 100. Maruyama M, Takeshita K, Endo M, Deakin M, Moosa AR. Clinicopathological study of gastric carcinoma in high and low-mortality countries: Comparison between Japan and the United States. *Gastric Cancer* 1998; 1:64-70.
 101. Maruyama K, Okabayashi K, Kinoshita T. Progress in gastric cancer surgery in Japan and its limits of radicality. *World J Surg* 1987; 11:418-425.
 102. Baba H, Korenaga D, Okamura T, Saito A, Sugimachi K. Prognostic factors in gastric cancer with serosal invasion. Univariate and multivariate analyses. *Arch Surg* 1989; 124:1061-1064.

103. Shiu MH, Perrotti M, Brennan MF. Adenocarcinoma of the stomach: a multivariate analysis of clinical, pathologic and treatment factors. *Hepatogastroenterology* 1989; 36:7-12.
104. Boku T, Nakane Y, Minoura T, Takada H, Yamamura M, Hioki K, Yamamoto M. Prognostic significance of serosal invasion and free intraperitoneal cancer cells in gastric cancer. *Br J Surg* 1990; 77:436-439.
105. Siewert JR, Bottcher K, Stein HJ, Roder JD. Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Ann Surg* 1998; 228:449-461.
106. Karpeh MS, Leon L, Klimstra D, Brennan MF. Lymph node staging in gastric cancer: is location more important than Number? An analysis of 1,038 patients. *Ann Surg* 2000; 232:362-371.
107. Shiraishi N, Adachi Y, Kitano S, Bandoh T, Inomata M, Yasuda K, Tsuchihashi J, Kinukawa N. Gastric cancer with extragastric lymph node metastasis: multivariate prognostic study. *Gastric Cancer* 2000; 3:211-218.
108. Bonenkamp JJ, van de Velde CJ, Kampschoer GH, Hermans J, Hermanek P, Bemelmans M, Gouma DJ, Sasako M, Maruyama K. Comparison of factors influencing the prognosis of Japanese, German, and Dutch gastric cancer patients. *World J Surg* 1993; 17:410-414.
109. Sasako M, McCulloch P, Kinoshita T, Maruyama K. New method to evaluate the therapeutic value of lymph node dissection for gastric cancer. *Br J Surg* 1995; 82:346-351.
110. Roder JD, Bottcher K, Busch R, Wittekind C, Hermanek P, Siewert JR. Classification of regional lymph node metastasis from gastric carcinoma. German Gastric Cancer Study Group. *Cancer* 1998; 82:621-631.
111. Hayashi H, Ochiai T, Suzuki T, Shimada H, Hori S, Takeda A, Miyazawa Y. Superiority of a new UICC-TNM staging system for gastric carcinoma. *Surgery* 2000; 127:129-135.
112. Suzuki T, Ochiai T, Hayashi H, Nakajima K, Yasumoto A, Hishikaga E, Shimada H, Horiuchi F, Ohki S, Isono K. Importance of positive peritoneal lavage cytology findings in the stage grouping of gastric cancer. *Surg Today* 1999; 29:111-115.
113. Nekarda H, Gess C, Stark M, Mueller JD, Fink U, Schenck U, Siewert JR. Immunocytochemically detected free peritoneal tumour cells (FPTC) are a strong prognostic factor in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 79:611-619.
114. Ribeiro U, Jr., Gama-Rodrigues JJ, Safatle-Ribeiro AV, Bitelman B, Ibrahim RE, Ferreira MB, Laudanna AA, Pinotti HW. Prognostic significance of intraperitoneal free cancer cells obtained by laparoscopic peritoneal lavage in patients with gastric cancer. *J Gastrointest Surg* 1998; 2:244-249.
115. Burke EC, Karpeh MS, Jr., Conlon KC, Brennan MF. Peritoneal lavage cytology in gastric cancer: an independent predictor of outcome. *Ann Surg Oncol* 1998; 5:411-415.
116. Jauch KW, Heiss MM, Gruetzner U, Funke I, Pantel K, Babic R, Eissner HJ,

- Riethmueller G, Schildberg FW. Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14:1810-1817.
117. Schlimok G, Funke I, Pantel K, Strobel F, Lindemann F, Witte J, Riethmuller G. Micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with gastric cancer: methodological aspects of detection and prognostic significance. *Eur J Cancer* 1991; 27:1461-1465.
118. Heiss MM, Allgayer H, Gruetzner KU, Babic R, Jauch KW, Schildberg FW. Clinical value of extended biologic staging by bone marrow micrometastases and tumor-associated proteases in gastric cancer. *Ann Surg* 1997; 226:736-744.
119. Ikeguchi M, Oka A, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N. Relationship between area of serosal invasion and intraperitoneal free cancer cells in patients with gastric cancer. *Anticancer Res* 1994; 14:2131-2134.
120. Landry J, Tepper JE, Wood WC, Moulton EO, Koerner F, Sullinger J. Patterns of failure following curative resection of gastric carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 19:1357-1362.
121. Gunderson LL, Sosin H. Adenocarcinoma of the stomach: areas of failure in a re-operation series (second or symptomatic look) clinicopathologic correlation and implications for adjuvant therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982; 8:1-11.
122. Warwick M. Analysis of one hundred and seventy-six cases of carcinoma of the stomach submitted to autopsy. *Ann Surg* 1928; 88:216.
123. Clarke JS, Cruze K, El Farra S. The natural history and results of surgical therapy for carcinoma of the stomach: an analysis of 250 cases. *Am J Surg* 1961; 102:143.
124. Dupont JB, Jr., Lee JR, Burton GR, Cohn I, Jr. Adenocarcinoma of the stomach: review of 1,497 cases. *Cancer* 1978; 41:941-947.
125. Ajani JA, Ota DM, Jessup JM, Ames FC, McBride C, Boddie A, Levin B, Jackson DE, Roh M, Hohn D. Resectable gastric carcinoma. An evaluation of preoperative and postoperative chemotherapy. *Cancer* 1991; 68:1501-1506.
126. Estape J, Grau JJ, Lcobendas F, Curto J, Daniels M, Vinolas N, Pera C. Mitomycin C as an adjuvant treatment to resected gastric cancer. A 10- year follow-up. *Ann Surg* 1991; 213:219-221.
127. Grau JJ, Estape J, Fuster J, Filella X, Visa J, Teres J, Soler G, Albiol S, Garcia-Valdecasas JC, Grande L, Bombi J, Bordas J, Alcobendas F. Randomized trial of adjuvant chemotherapy with mitomycin plus ftorafur versus mitomycin alone in resected locally advanced gastric cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16:1036-1039.
128. Yamao T, Shirao K, Ono H, Kondo H, Saito D, Yamaguchi H, Sasako M, Sano T, Ochiai A, Yoshida S. Risk factors for lymph node metastasis from intramucosal gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 77:602-606.
129. Cai J, Ikeguchi M, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N. Micrometastasis in lymph nodes of mucosal gastric cancer. *Gastric Cancer* 2000; 3:91-96.
130. Takekoshi T, Baba Y, Ota H, Kato Y, Yanagisawa A, Takagi K, Noguchi Y. Endoscopic resection of early gastric carcinoma: results of a retrospective analysis of 308 cases.

Endoscopy 1994; 26:352-358.

131. Tani M, Takeshita K, Inoue H, Iwai T. Adequate endoscopic mucosal resection for early gastric cancer obtained from the dissecting microscopic features of the resected specimens. *Gastric Cancer* 2001; 4:122-131.
132. Ishigami S, Hokita S, Natsugoe S, Tokushige M, Saihara T, Iwashige H, Aridome K, Aikou T. Carcinomatous infiltration into the submucosa as a predictor of lymph node involvement in early gastric cancer. *World J Surg* 1998; 22:1056-1059.
133. Fidler IJ, Balch CM. The biology of cancer metastasis and implications for therapy. *Curr Probl Surg* 1987; 24:129-209.
134. Isozaki H, Okajima K, Hu X, Fujii K, Sako S. Multiple early gastric carcinomas. Clinicopathologic features and histogenesis. *Cancer* 1996; 78:2078-2086.
135. Robertson CS, Chung SC, Woods SD, Griffin SM, Raimes SA, Lau JT, Li AK. A prospective randomized trial comparing R1 subtotal gastrectomy with R3 total gastrectomy for antral cancer. *Ann Surg* 1994; 220:176-182.
136. Gouzi JL, Huguier M, Fagniez PL, Launois B, Flamant Y, Lacaine F, Paquet JC, Hay JM. Total versus subtotal gastrectomy for adenocarcinoma of the gastric antrum. A French prospective controlled study. *Ann Surg* 1989; 209:162-166.
137. Bozzetti F, Marubini E, Bonfanti G, Miceli R, Piano C, Gennari L. Subtotal versus total gastrectomy for gastric cancer: five-year survival rates in a multicenter randomized Italian trial. Italian Gastrointestinal Tumor Study Group. *Ann Surg* 1999; 230:170-178.
138. Harrison LE, Karpeh MS, Brennan MF. Total gastrectomy is not necessary for proximal gastric cancer. *Surgery* 1998; 123:127-130.
139. Siewert JR, Bottcher K, Stein HJ. Operative Strategies. In Wanebo H (ed). *Surgery for gastrointestinal Cancer. A multidisciplinary approach*. Philadelphia - New York: Lippincott - Raven; 1997:305-318.
140. Isozaki H, Tanaka N, Tanigawa N, Okajima K. Prognostic factors in patients with advanced gastric cancer with macroscopic invasion to adjacent organs treated with radical surgery. *Gastric Cancer* 2000; 3:202-210.
141. Yano H, Monden T, Kinuta M, Nakano Y, Tono T, Matsui S, Iwazawa T, Kanoh T, Katsushima S. The usefulness of laparoscopy-assisted distal gastrectomy in comparison with that of open distal gastrectomy for early gastric cancer. *Gastric Cancer* 2001; 4:93-97.
142. Uyama I, Sugioka A, Matsui H, Fujita J, Komori Y, Hasumi A. Laparoscopic D2 lymph node dissection for advanced gastric cancer located in the middle or lower third portion of the stomach. *Gastric Cancer* 2000; 3:50-55.
143. Hallissey MT. Laparoscopically assisted gastric resections: a word of caution. *Gastric Cancer* 2001; 4:53.
144. Takeda J, Koufuji K, Kodama I, Tsuji Y, Yokoyama T, Kawabata S, Suematsu T, Kakegawa T. Total gastrectomy for gastric cancer: 12-year data and review of the effect of performing lymphadenectomy. *Kurume Med J* 1994; 41:15-21.

145. Boku T, Nakane Y, Okusa T, Hirozane N, Imabayashi N, Hioki K, Yamamoto M. Strategy for lymphadenectomy of gastric cancer. *Surgery* 1989; 105:585-592.
146. Sowa M, Kato Y, Nishimura M, Kubo T, Maekawa H, Umeyama K. Surgical approach to early gastric cancer with lymph node metastasis. *World J Surg* 1989; 13:630-635.
147. Gotoda T, Yanagisawa A, Sasako M, Ono H, Nakanishi Y, Shimoda T, Kato Y. Incidence of lymph node metastasis from early gastric cancer: estimation with a large number of cases at two large centers. *Gastric Cancer* 2000; 3:219-225.
148. Cai J, Ikeguchi M, Tsujitani S, Maeta M, Liu J, Kaibara N. Significant correlation between micrometastasis in the lymph nodes and reduced expression of E-cadherin in early gastric cancer. *Gastric Cancer* 2001; 4:66-74.
149. Maruyama K, Gunven P, Okabayashi K, Sasako M, Kinoshita T. Lymph node metastases of gastric cancer. General pattern in 1931 patients. *Ann Surg* 1989; 210:596-602.
150. Jatzko G, Lisborg PH, Klimpfinger M, Denk H. Extended radical surgery against gastric cancer: low complication and high survival rates. *Jpn J Clin Oncol* 1992; 22:102-106.
151. Keller E, Stutzer H, Heitmann K, Bauer P, Gebbensleben B, Rohde H. Lymph node staging in 872 patients with carcinoma of the stomach and the presumed benefit of lymphadenectomy. German Stomach Cancer TNM Study Group. *J Am Coll Surg* 1994; 178:38-46.
152. Dent DM, Madden MV, Price SK. Randomized comparison of R1 and R2 gastrectomy for gastric carcinoma. *Br J Surg* 1988; 75:110-112.
153. Cuschieri A, Weeden S, Fielding J, Bancewicz J, Craven J, Joypaul V, Sydes M, Fayers P. Patient survival after D1 and D2 resections for gastric cancer: long-term results of the MRC randomized surgical trial. Surgical Co-operative Group. *Br J Cancer* 1999; 79:1522-1530.
154. Bonenkamp JJ, Songun I, Hermans J, Sasako M, Welvaart K, Plukker JT, van Elk P, Obertop H, Gouma DJ, Taat CW, . Randomised comparison of morbidity after D1 and D2 dissection for gastric cancer in 996 Dutch patients. *Lancet* 1995; 345:745-748.
155. Adachi Y, Kamakura T, Mori M, Maehara Y, Sugimachi K. Role of lymph node dissection and splenectomy in node-positive gastric carcinoma. *Surgery* 1994; 116:837-841.
156. Griffith JP, Sue-Ling HM, Martin I, Dixon MF, McMahon MJ, Axon AT, Johnston D. Preservation of the spleen improves survival after radical surgery for gastric cancer. *Gut* 1995; 36:684-690.
157. Otsuji E, Yamaguchi T, Sawai K, Ohara M, Takahashi T. End results of simultaneous splenectomy in patients undergoing total gastrectomy for gastric carcinoma. *Surgery* 1996; 120:40-44.
158. Wanebo HJ, Kennedy BJ, Winchester DP, Stewart AK, Fremgen AM. Role of splenectomy in gastric cancer surgery: adverse effect of elective splenectomy on longterm survival. *J Am Coll Surg* 1997; 185:177-184.

159. Roder JD, Bottcher K, Siewert JR, Busch R, Hermanek P, Meyer HJ. Prognostic factors in gastric carcinoma. Results of the German Gastric Carcinoma Study 1992. *Cancer* 1993; 72:2089-2097.
160. Hermans J, Bonenkamp JJ, Boon MC, Bunt AM, Ohyama S, Sasako M, van de Velde CJ. Adjuvant therapy after curative resection for gastric cancer: meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol* 1993; 11:1441-1447.
161. Earle CC, Maroun JA. Adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer in non-Asian patients: revisiting a meta-analysis of randomised trials. *Eur J Cancer* 1999; 35:1059-1064.
162. Alcobendas F, Milla A, Estape J, Curto J, Pera C. Mitomycin C as an adjuvant in resected gastric cancer. *Ann Surg* 1983; 198:13-17.
163. Grau JJ, Estape J, Alcobendas F, Pera C, Daniels M, Teres J. Positive results of adjuvant mitomycin-C in resected gastric cancer: a randomised trial on 134 patients. *Eur J Cancer* 1993; 29A:340-342.
164. Nakazato H, Koike A, Saji S, Ogawa N, Sakamoto J. Efficacy of immunochemotherapy as adjuvant treatment after curative resection of gastric cancer. Study Group of Immunochemotherapy with PSK for Gastric Cancer. *Lancet* 1994; 343:1122-1126.
165. Fukushima M. Adjuvant therapy of gastric cancer: the Japanese experience. *Semin Oncol* 1996; 23:369-378.
166. Cirera L, Balil A, Batiste-Alentorn E, Tusquets I, Cardona T, Arcusa A, Jolis L, Saigi E, Guasch I, Badia A, Boleda M. Randomized clinical trial of adjuvant mitomycin plus tegafur in patients with resected stage III gastric cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17:3810-3815.
167. Fink U, Stein HJ, Schuhmacher C, Wilke HJ. Neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer: update. *World J Surg* 1995; 19:509-516.
168. Crookes P, Leichman CG, Leichman L, Tan M, Laine L, Stain S, Baranda J, Casagrande Y, Groshen S, Silberman H. Systemic chemotherapy for gastric carcinoma followed by postoperative intraperitoneal therapy: a final report. *Cancer* 1997; 79:1767-1775.
169. Ajani JA, Mayer RJ, Ota DM, Steele GD, Evans D, Roh M, Sugarbaker DJ, Dumas P, Gray C, Vena DA, . Preoperative and postoperative combination chemotherapy for potentially resectable gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:1839-1844.
170. Kelsen D, Karpeh M, Schwartz G, Gerdes H, Lightdale C, Botet J, Lauers G, Klimstra D, Huang Y, Saltz L, Quan V, Brennan M. Neoadjuvant therapy of high-risk gastric cancer: a phase II trial of preoperative FAMTX and postoperative intraperitoneal fluorouracil- cisplatin plus intravenous fluorouracil. *J Clin Oncol* 1996; 14:1818-1828.
171. Lowy AM, Mansfield PF, Leach SD, Pazdur R, Dumas P, Ajani JA. Response to neoadjuvant chemotherapy best predicts survival after curative resection of gastric cancer. *Ann Surg* 1999; 229:303-308.
172. Yonemura Y, Sawa T, Kinoshita K, Matsuki N, Fushida S, Tanaka S, Ohoyama S, Takashima T, Kimura H, Kamata T, . Neoadjuvant chemotherapy for high-grade

- advanced gastric cancer. *World J Surg* 1993; 17:256-261.
173. Kang YK, Choi DW, Im YH. A phase III randomized comparison of neoadjuvant chemotherapy followed by surgery versus surgery for locally advanced stomach cancer. *Proc ASCO* 1996; 15:215.
174. Keizer I, Songun I, Hermans J, Klemetschitsch P, van de Velde CJ. Preoperative chemotherapy (CT) for operable gastric cancer: results of the Dutch randomized trial. *Proc ASCO* 1997; 16:277.
175. Lowy AM, Feig BW, Janjan N, Rich TA, Pisters PW, Ajani JA, Mansfield PF. A pilot study of preoperative chemoradiotherapy for resectable gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8:519-524.
176. Hagiwara A, Takahashi T, Kojima O, Sawai K, Yamaguchi T, Yamane T, Taniguchi H, Kitamura K, Noguchi A, Seiki K, . Prophylaxis with carbon-adsorbed mitomycin against peritoneal recurrence of gastric cancer. *Lancet* 1992; 339:629-631.
177. Rosen HR, Jatzko G, Repse S, Potrc S, Neudorfer H, Sandbichler P, Zacherl J, Rabl H, Holzberger P, Lisborg P, Czejka M. Adjuvant intraperitoneal chemotherapy with carbon-adsorbed mitomycin in patients with gastric cancer: results of a randomized multicenter trial of the Austrian Working Group for Surgical Oncology. *J Clin Oncol* 1998; 16:2733-2738.
178. Schiessel R, Funovics J, Schick B, Bohmig HJ, Depisch D, Hofbauer F, Jakesz R. Adjuvant intraperitoneal cisplatin therapy in patients with operated gastric carcinoma: results of a randomized trial. *Acta Med Austriaca* 1989; 16:68-69.
179. Sautner T, Hofbauer F, Depisch D, Schiessel R, Jakesz R. Adjuvant intraperitoneal cisplatin chemotherapy does not improve long- term survival after surgery for advanced gastric cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12:970-974.
180. Yu W, Whang I, Suh I, Averbach A, Chang D, Sugarbaker PH. Prospective randomized trial of early postoperative intraperitoneal chemotherapy as an adjuvant to resectable gastric cancer. *Ann Surg* 1998; 228:347-354.
181. Fujimura T, Yonemura Y, Muraoka K, Takamura H, Hirono Y, Sahara H, Ninomiya I, Matsumoto H, Tsugawa K, Nishimura G, . Continuous hyperthermic peritoneal perfusion for the prevention of peritoneal recurrence of gastric cancer: randomized controlled study. *World J Surg* 1994; 18:150-155.
182. Kim JP. The concept of immunochemosurgery in gastric cancer. *World J Surg* 1987; 11:465-472.
183. Kim JP, Kwon OJ, Oh ST, Yang HK. Results of surgery on 6589 gastric cancer patients and immunochemosurgery as the best treatment of advanced gastric cancer. *Ann Surg* 1992; 216:269-278.
184. Kim SY, Park HC, Yoon C, Yoon HJ, Choi YM, Cho KS. OK-432 and 5-fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin C (FAM-P) versus FAM chemotherapy in patients with curatively resected gastric carcinoma: a randomized Phase III trial. *Cancer* 1998; 83:2054-2059.
185. Gunderson LL, Willett CG, Harrison LB, Petersen IA, Haddock MG. Intraoperative irradiation: current and future status. *Semin Oncol* 1997; 24:715-731.

186. Hallissey MT, Dunn JA, Ward LC, Allum WH. The second British Stomach Cancer Group trial of adjuvant radiotherapy or chemotherapy in resectable gastric cancer: five-year follow-up. *Lancet* 1994; 343:1309-1312.
187. Martinez-Monge R, Calvo FA, Azinovic I, Aristu JJ, Hernandez JL, Pardo F, Fernandez P, Garcia-Foncillas J, Alvarez-Cienfuegos J. Patterns of failure and long-term results in high-risk resected gastric cancer treated with postoperative radiotherapy with or without intraoperative electron boost. *J Surg Oncol* 1997; 66:24-29.
188. Calvo FA, Gomez-Espi M, Diaz-Gonzalez JA, Cantalapiedra R, Marcos P, Alvarado A, Garcia AP, Herranz R, Alvarez E. Pathologic downstaging of T(3-4)N(x) rectal cancer after chemoradiation: 5-fluorouracil vs. Tegafur. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 51:1264-1270.
189. Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann GN, Haller DG, Ajani JA, Gunderson LL, Jessup JM, Martenson JA. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med* 2001; 345:725-730.
190. Sindelar WF, Kinsella TJ, Tepper JE, DeLaney TF, Maher MM, Smith R, Rosenberg SA, Glatstein E. Randomized trial of intraoperative radiotherapy in carcinoma of the stomach. *Am J Surg* 1993; 165:178-186.
191. Abe M, Nishimura Y, Shibamoto Y. Intraoperative radiation therapy for gastric cancer. *World J Surg* 1995; 19:544-547.
192. Calvo FA, Aristu JJ, Azinovic I, Abuchaibe O, Escude L, Martinez R, Tango E, Hernandez JL, Pardo F, Alvarez-Cienfuegos J. Intraoperative and external radiotherapy in resected gastric cancer: updated report of a phase II trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 24:729-736.
193. Bozzetti F, Bonfanti G, Audisio RA, Doci R, Dossena G, Gennari L, Andreola S. Prognosis of patients after palliative surgical procedures for carcinoma of the stomach. *Surg Gynecol Obstet* 1987; 164:151-154.
194. Butler JA, Dubrow TJ, Trezona T, Klassen M, Nejdil RJ. Total gastrectomy in the treatment of advanced gastric cancer. *Am J Surg* 1989; 158:602-604.
195. Meijer S, De Bakker OJ, Hoitsma HF. Palliative resection in gastric cancer. *J Surg Oncol* 1983; 23:77-80.
196. Kim YJ, Ghu HD, Kim DY, Kim HJ, Kim SK, Park CS. Expression of cellular oncogenes in human gastric carcinoma: c-myc, c-erb B2, and c-Ha-ras. *J Surg Oncol* 1993; 54:167-170.
197. Waters JS, Norman A, Cunningham D, Scarffe JH, Webb A, Harper P, Joffe JK, Mackean M, Mansi J, Leahy M, Hill A, Oates J, Rao S, Nicolson M, Hickish T. Long-term survival after epirubicin, cisplatin and fluorouracil for gastric cancer: results of a randomized trial. *Br J Cancer* 1999; 80:269-272.
198. Vanhoefler U, Rougier P, Wilke H, Ducreux MP, Lacave AJ, Van Cutsem E, Planker M, Santos JG, Piedbois P, Paillot B, Bodenstern H, Schmoll HJ, Bleiberg H, Nordlinger B, Couvreur ML, Baron B, Wils JA. Final results of a randomized phase III trial of sequential high-dose methotrexate, fluorouracil, and doxorubicin versus etoposide,

- leucovorin, and fluorouracil versus infusional fluorouracil and cisplatin in advanced gastric cancer: A trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Tract Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol* 2000; 18:2648-2657.
199. Cocconi G, Bella M, Zironi S, Algeri R, Di Costanzo F, De L, V, Luppi G, Mazzocchi B, Rodino C, Soldani M, . Fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin combination versus PELF chemotherapy in advanced gastric cancer: a prospective randomized trial of the Italian Oncology Group for Clinical Research. *J Clin Oncol* 1994; 12:2687-2693.
 200. Wils JA, Klein HO, Wagener DJ, Bleiberg H, Reis H, Korsten F, Conroy T, Fickers M, Leyvraz S, Buyse M, . Sequential high-dose methotrexate and fluorouracil combined with doxorubicin—a step ahead in the treatment of advanced gastric cancer: a trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Tract Cooperative Group. *J Clin Oncol* 1991; 9:827-831.
 201. Kelsen D, Atiq OT, Saltz L, Niedzwiecki D, Ginn D, Chapman D, Heelan R, Lightdale C, Vinciguerra V, Brennan M. FAMTX versus etoposide, doxorubicin, and cisplatin: a random assignment trial in gastric cancer. *J Clin Oncol* 1992; 10:541-548.
 202. Webb A, Cunningham D, Scarffe JH, Harper P, Norman A, Joffe JK, Hughes M, Mansi J, Findlay M, Hill A, Oates J, Nicolson M, Hickish T, O'Brien M, Iveson T, Watson M, Underhill C, Wardley A, Meehan M. Randomized trial comparing epirubicin, cisplatin, and fluorouracil versus fluorouracil, doxorubicin, and methotrexate in advanced esophagogastric cancer. *J Clin Oncol* 1997; 15:261-267.
 203. Yoshida M, Boku N, Ohtsu A, Muto M, Nagashima F, Yoshida S. Combination chemotherapy of irinotecan plus cisplatin for advanced gastric cancer: efficacy and feasibility in clinical practice. *Gastric Cancer* 2001; 4:144-149.
 204. Sulkes A, Smyth J, Sessa C, Dirix LY, Vermorken JB, Kaye S, Wanders J, Franklin H, LeBail N, Verweij J. Docetaxel (Taxotere) in advanced gastric cancer: results of a phase II clinical trial. EORTC Early Clinical Trials Group. *Br J Cancer* 1994; 70:380-383.
 205. Rinaldi DA, Lormand NA, Brierre JE, Cole JL, Stagg MP, Fontenot MF, Buller EJ, Rainey JM. A phase I trial of gemcitabine and infusional 5-fluorouracil (5-FU) in patients with refractory solid tumors: Louisiana Oncology Associates protocol no. 1 (LOA-1). *Am J Clin Oncol* 2000; 23:78-82.
 206. Kastan MB, Skapek SX. Molecular Biology of Cancer. The Cell Cycle. In *Cancer. Principles and Practice of Oncology*. Lippincott Williams and Wilkins.; 2001:91-110.
 207. Enoch T, Nurse P. Coupling M phase and S phase: controls maintaining the dependence of mitosis on chromosome replication. *Cell* 1991; 65:921-923.
 208. Weinert TA, Kiser GL, Hartwell LH. Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes Dev* 1994; 8:652-665.
 209. Murray AW. Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* 1992; 359:599-604.
 210. Gottesman MM. Report of a meeting: molecular basis of cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86:1277-1285.

211. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science* 1991; 254:1138-1146.
212. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13:1899-1911.
213. Meikrantz W, Schlegel R. Apoptosis and the cell cycle. *J Cell Biochem* 1995; 58:160-174.
214. Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM. Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res* 1994; 54:2095-2097.
215. Selvakumaran M, Lin HK, Miyashita T, Wang HG, Krajewski S, Reed JC, Hoffman B, Liebermann D. Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* 1994; 9:1791-1798.
216. Selivanova G, Wiman KG. p53: a cell cycle regulator activated by DNA damage. *Adv Cancer Res* 1995; 66:143-180.
217. Meikrantz W, Gisselbrecht S, Tam SW, Schlegel R. Activation of cyclin A-dependent protein kinases during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:3754-3758.
218. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997; 389:300-305.
219. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266:1821-1828.
220. Comings DE. A general theory of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973; 70:3324-3328.
221. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68:820-823.
222. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235:442-447.
223. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66:1191-1308.
224. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:4-6.
225. Thompson TC, Southgate J, Kitchener G, Land H. Multistage carcinogenesis induced by ras and myc oncogenes in a reconstituted organ. *Cell* 1989; 56:917-930.
226. Moroco JR, Solt DB, Polverini PJ. Sequential loss of suppressor genes for three specific functions during in vivo carcinogenesis. *Lab Invest* 1990; 63:298-306.
227. Schwartz GK, Wang H, Lampen N, Altorki N, Kelsen D, Albino AP. Defining the invasive phenotype of proximal gastric cancer cells. *Cancer* 1994; 73:22-27.
228. Heiss MM, Babic R, Allgayer H, Gruetzner KU, Jauch KW, Loehrs U, Schildberg FW. Tumor-associated proteolysis and prognosis: new functional risk factors in gastric cancer defined by the urokinase-type plasminogen activator system. *J Clin Oncol* 1995; 13:2084-2093.
229. Nekarda H, Schmitt M, Ulm K, Wenninger A, Vogelsang H, Becker K, Roder JD, Fink

- U, Siewert JR. Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res* 1994; 54:2900-2907.
230. Torii A, Kodera Y, Ito M, Shimizu Y, Hirai T, Yasui K, Morimoto T, Yamamura Y, Kato T, Hayakawa T, Fujimoto N, Kito T. Matrix metalloproteinase 9 in mucosally invasive gastric cancer. *Gastric Cancer* 1998; 1:142-145.
231. Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, Fushida S, Bandou E, Taniguchi H, Miwa K, Sugiyama K, Sasaki T. Role of MMP-7 in the formation of peritoneal dissemination in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2000; 3:63-70.
232. Hirohashi S, Sugimura T. Genetic alterations in human gastric cancer. *Cancer Cells* 1991; 3:49-52.
233. Tamura G, Sakata K, Maesawa C, Suzuki Y, Terashima M, Satoh K, Sekiyama S, Suzuki A, Eda Y, Satodate R. Microsatellite alterations in adenoma and differentiated adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55:1933-1936.
234. Ochiai A, Hirohashi S. Multiple genetic alterations in gastric cancer. In Sugimura T, Sasako M (eds). *Gastric Cancer*. New York: Oxford University Press Inc.; 1997:87-99.
235. Yasui W, Oue N, Kuniyasu H, Ito R, Tahara E, Yokozaki H. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. *Gastric Cancer* 2001; 4:113-121.
236. Bartek J, Iggo R, Gannon J, Lane DP. Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 1990; 5:893-899.
237. Bargonetti J, Manfredi JJ, Chen X, Marshak DR, Prives C. A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev* 1993; 7:2565-2574.
238. Bakalkin G, Selivanova G, Yakovleva T, Kiseleva E, Kashuba E, Magnusson KP, Szekely L, Klein G, Terenius L, Wiman KG. p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain. *Nucleic Acids Res* 1995; 23:362-369.
239. Leonard CJ, Canman CE, Kastan MB. The role of p53 in cell-cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Important Adv Oncol* 1995;33-42.
240. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253:49-53.
241. Dutta A, Ruppert JM, Aster JC, Winchester E. Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature* 1993; 365:79-82.
242. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994; 369:574-578.
243. Culotta E, Koshland DE, Jr. p53 sweeps through cancer research. *Science* 1993; 262:1958-1961.
244. Triantafyllou NG, Grosman IM, Verma RS. Genomania of p53 protein in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 1996; 22:170-173.

245. Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 1991; 252:1708-1711.
246. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 1988; 8:531-539.
247. Baas IO, Mulder JW, Offerhaus GJ, Vogelstein B, Hamilton SR. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *J Pathol* 1994; 172:5-12.
248. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993; 329:1318-1327.
249. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990; 335:675-679.
250. Eyfjord JE, Thorlacius S, Steinarsdottir M, Valgardsdottir R, Ogmundsdottir HM, Anamthawat-Jonsson K. p53 abnormalities and genomic instability in primary human breast carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55:646-651.
251. Marks JR, Davidoff AM, Kerns BJ, Humphrey PA, Pence JC, Dodge RK, Clarke-Pearson DL, Iglehart JD, Bast RC, Jr., Berchuck A. Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1991; 51:2979-2984.
252. Imazeki F, Omata M, Nose H, Ohto M, Isono K. p53 gene mutations in gastric and esophageal cancers. *Gastroenterology* 1992; 103:892-896.
253. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, . Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244:217-221.
254. Lim BH, Soong R, Grieu F, Robbins PD, House AK, Iacopetta BJ. p53 accumulation and mutation are prognostic indicators of poor survival in human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1996; 69:200-204.
255. Shiao YH, Palli D, Caporaso NE, Alvord WG, Amorosi A, Nesi G, Saieva C, Masala G, Fraumeni JF, Rice JM. Genetic and immunohistochemical analyses of p53 independently predict regional metastasis of gastric cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9:631-633.
256. Matozaki T, Sakamoto C, Matsuda K, Suzuki T, Konda Y, Nakano O, Wada K, Uchida T, Nishisaki H, Nagao M, . Missense mutations and a deletion of the p53 gene in human gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 182:215-223.
257. Joypaul BV, Hopwood D, Newman EL, Qureshi S, Grant A, Ogston SA, Lane DP, Cuschieri A. The prognostic significance of the accumulation of p53 tumour-suppressor gene protein in gastric adenocarcinoma. *Br J Cancer* 1994; 69:943-946.
258. Gabbert HE, Muller W, Schneiders A, Meier S, Hommel G. The relationship of p53 expression to the prognosis of 418 patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1995; 76:720-726.
259. Maehara Y, Oki E, Abe T, Tokunaga E, Shibahara K, Kakeji Y, Sugimachi K.

- Overexpression of the heat shock protein HSP70 family and p53 protein and prognosis for patients with gastric cancer. *Oncology* 2000; 58:144-151.
260. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Stathopoulos GP, Kapsoritakis A, Paspatis G, Kakolyris S, Sivridis E, Georgoulas V, Harris AL, Gatter KC. Angiogenic interactions of vascular endothelial growth factor, of thymidine phosphorylase, and of p53 protein expression in locally advanced gastric cancer. *Oncol Res* 2000; 12:33-41.
 261. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74:957-967.
 262. Zhang ZW, Patchett SE, Farthing MJ. Topoisomerase I inhibitor (camptothecin)-induced apoptosis in human gastric cancer cells and the role of wild-type p53 in the enhancement of its cytotoxicity. *Anticancer Drugs* 2000; 11:757-764.
 263. Chin KV, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* 1992; 255:459-462.
 264. Hamada M, Fujiwara T, Hizuta A, Gochi A, Naomoto Y, Takakura N, Takahashi K, Roth JA, Tanaka N, Orita K. The p53 gene is a potent determinant of chemosensitivity and radiosensitivity in gastric and colorectal cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122:360-365.
 265. Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, Oliver J, Martini N, Gralla R, Kris M, Dmitrovsky E. Aberrant p53 expression predicts clinical resistance to cisplatin-based chemotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1995; 55:5038-5042.
 266. Righetti SC, Della TG, Pilotti S, Menard S, Ottone F, Colnaghi MI, Pierotti MA, Lavarino C, Cornarotti M, Oriana S, Bohm S, Bresciani GL, Spatti G, Zunino F. A comparative study of p53 gene mutations, protein accumulation, and response to cisplatin-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56:689-693.
 267. Jekunen AP, Kairemo KJ. Inhibition of malignant angiogenesis. *Cancer Treat Rev* 1997; 23:263-286.
 268. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000; 21:505-515.
 269. Goldman E. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* 1907; 2:1236-1240.
 270. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324:1-8.
 271. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143:401-409.
 272. Folkman J. Toward an understanding of angiogenesis: search and discovery. *Perspect Biol Med* 1985; 29:10-36.
 273. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel

- leakiness. *Am J Pathol* 2000; 156:1363-1380.
274. Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 1997; 3:177-182.
275. Giaccia AJ. Hypoxic Stress Proteins: Survival of the Fittest. *Semin Radiat Oncol* 1996; 6:46-58.
276. Gasparini G, Harris AL. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol* 1995; 13:765-782.
277. Weidner N, Folkman J. Tumor vascularity as a prognostic factor in cancer. *PPO Updates* 1997; 11:1-24.
278. Wang JM, Kumar S, Pye D, Haboubi N, al Nakib L. Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86:386-388.
279. Ramani P, Bradley NJ, Fletcher CD. QBEND/10, a new monoclonal antibody to endothelium: assessment of its diagnostic utility in paraffin sections. *Histopathology* 1990; 17:237-242.
280. Nickoloff BJ. The human progenitor cell antigen (CD34) is localized on endothelial cells, dermal dendritic cells, and perifollicular cells in formalin-fixed normal skin, and on proliferating endothelial cells and stromal spindle-shaped cells in Kaposi's sarcoma. *Arch Dermatol* 1991; 127:523-529.
281. Araya M, Terashima M, Takagane A, Abe K, Nishizuka S, Yonezawa H, Irinoda T, Nakaya T, Saito K. Microvessel count predicts metastasis and prognosis in patients with gastric cancer. *J Surg Oncol* 1997; 65:232-236.
282. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32A:2474-2484.
283. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 1992; 340:145-146.
284. Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study. *Am J Pathol* 1988; 133:419-423.
285. Heimann R, Ferguson D, Powers C, Recant WM, Weichselbaum RR, Hellman S. Angiogenesis as a predictor of long-term survival for patients with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:1764-1769.
286. Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Sawada T, Yamashita Y, Onoda N, Kato Y, Nitta A, Arimoto Y, . Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1995; 13:477-481.
287. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Shimomatsuya T, Horiuchi T, Muraoka R, Iki M.

- Extent of tumor vascularization correlates with prognosis and hematogenous metastasis in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1996; 56:2671-2676.
288. Gleich LL, Biddinger PW, Duperier FD, Gluckman JL. Tumor angiogenesis as a prognostic indicator in T2-T4 oral cavity squamous cell carcinoma: a clinical-pathologic correlation. *Head Neck* 1997; 19:276-280.
289. Axelsson K, Ljung BM, Moore DH, Thor AD, Chew KL, Edgerton SM, Smith HS, Mayall BH. Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:997-1008.
290. Erenoglu C, Akin ML, Uluotku H, Tezcan L, Yildirim S, Batkin A. Angiogenesis Predicts Poor Prognosis in Gastric Carcinoma. *Dig Surg* 2000; 17:581-586.
291. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.
292. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, Seed B. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 1998; 94:715-725.
293. Stratmann A, Risau W, Plate KH. Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am J Pathol* 1998; 153:1459-1466.
294. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999; 18:5356-5362.
295. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999; 284:1994-1998.
296. Etoh T, Inoue H, Tanaka S, Barnard GF, Kitano S, Mori M. Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma: possible in vivo regulation via induction of proteases. *Cancer Res* 2001; 61:2145-2153.
297. Harris AL. Antiangiogenesis for cancer therapy. *Lancet* 1997; 349 Suppl 2:SII13-SII15.
298. Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marme D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994; 9:963-969.
299. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265:1582-1584.
300. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999; 77:527-543.
301. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992; 267:26031-26037.
302. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993; 4:1317-1326.

303. Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J, Jin H. Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27:838-844.
304. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995; 1:1024-1028.
305. Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, Harris AL. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* 1997; 57:963-969.
306. Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, Kerbel RS. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 1997; 151:1523-1530.
307. Shibuya M, Ito N, Claesson-Welsh L. Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237:59-83.
308. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13:9-22.
309. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997; 276:1423-1425.
310. Koch AE, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong WL, Pope RM, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1994; 152:4149-4156.
311. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 1998; 4:336-340.
312. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992; 359:845-848.
313. Berse B, Brown LF, Van de WL, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 1992; 3:211-220.
314. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 1993; 143:1255-1262.
315. Olson TA, Mohanraj D, Carson LF, Ramakrishnan S. Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries. *Cancer Res* 1994; 54:276-280.

316. Zhang HT, Craft P, Scott PA, Ziche M, Weich HA, Harris AL, Bicknell R. Enhancement of tumor growth and vascular density by transfection of vascular endothelial cell growth factor into MCF-7 human breast carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:213-219.
317. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995; 55:3964-3968.
318. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 1993; 53:4727-4735.
319. Witte L, Hicklin DJ, Zhu Z, Pytowski B, Kotanides H, Rockwell P, Bohlen P. Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2 (Flk1/KDR) as an anti-angiogenic therapeutic strategy. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17:155-161.
320. Lin P, Sankar S, Shan S, Dewhirst MW, Polverini PJ, Quinn TQ, Peters KG. Inhibition of tumor growth by targeting tumor endothelium using a soluble vascular endothelial growth factor receptor. *Cell Growth Differ* 1998; 9:49-58.
321. Wang G, Dong Z, Xu G, Yang Z, Shou C, Wang N, Liu T. The effect of antibody against vascular endothelial growth factor on tumor growth and metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998; 124:615-620.
322. Maehara Y, Kabashima A, Koga T, Tokunaga E, Takeuchi H, Kakeji Y, Sugimachi K. Vascular invasion and potential for tumor angiogenesis and metastasis in gastric carcinoma. *Surgery* 2000; 128:408-416.
323. Takahashi Y, Cleary KR, Mai M, Kitadai Y, Bucana CD, Ellis LM. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2:1679-1684.
324. Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, Sawada T, Sowa M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 77:858-863.
325. Compton C, Sobin LH. Protocol for the examination of specimens removed from patients with gastric carcinoma: a basis for checklists. Members of the Cancer Committee, College of American Pathologists, and the Task Force for Protocols on the Examination of Specimens From Patients With Gastric Cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122:9-14.
326. Stomach. In Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, Hutter RVP, Kennedy BJ, Murphy GP, O'Sullivan B, Sobin LH, Yarbro JW (eds). *American Joint Committee on Cancer. Cancer staging manual*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1997:71-76.
327. Japanese Gastric Cancer Association. *Japanese Classification of Gastric Carcinoma - 2nd English Edition-*. *Gastric Cancer* 1998; 1:10-24.
328. Kakeji Y, Korenaga D, Tsujitani S, Baba H, Anai H, Maehara Y, Sugimachi K. Gastric cancer with p53 overexpression has high potential for metastasising to lymph nodes. *Br J Cancer* 1993; 67:589-593.

329. Maehara Y, Tomoda M, Hasuda S, Kabashima A, Tokunaga E, Kakeji Y, Sugimachi K. Prognostic value of p53 protein expression for patients with gastric cancer—a multivariate analysis. *Br J Cancer* 1999; 79:1255-1261.
330. Lacueva FJ, Calpena R. Gastric cancer recurrence: clues for future approaches to avoiding an old problem. *J Clin Gastroenterol* 2001; 32:3-4.
331. Averbach AM, Jacquet P. Strategies to decrease the incidence of intra-abdominal recurrence in resectable gastric cancer. *Br J Surg* 1996; 83:726-733.
332. Lacueva FJ, Calpena R, Medrano J, Compan AF, Andrada E, Molto M, Ferrer R, Diego M. Follow-up of patients resected for gastric cancer. *J Surg Oncol* 1995; 60:174-179.
333. Yoo CH, Noh SH, Shin DW, Choi SH, Min JS. Recurrence following curative resection for gastric carcinoma. *Br J Surg* 2000; 87:236-242.
334. Kim JP, Lee JH, Kim SJ, Yu HJ, Yang HK. Clinicopathologic characteristics and prognostic factors in 10783 patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 1998; 1:125-133.
335. Bunt AM, Hermans J, van de Velde CJ, Sasako M, Hoefsloot FA, Fleuren G, Bruijn JA. Lymph node retrieval in a randomized trial on western-type versus Japanese-type surgery in gastric cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14:2289-2294.
336. Candela FC, Urmacher C, Brennan MF. Comparison of the conventional method of lymph node staging with a comprehensive fat-clearing method for gastric adenocarcinoma. *Cancer* 1990; 66:1828-1832.
337. Takagane A, Terashima M, Abe K, Araya M, Irinoda T, Yonezawa H, Nakaya T, Inada T, Oyama K, Fujiwara H, Saito K. Evaluation of the ratio of lymph node metastasis as a prognostic factor in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 1999; 2:122-128.
338. Yagi Y, Seshimo A, Kameoka S. Prognostic factors in stage IV gastric cancer: univariate and multivariate analyses. *Gastric Cancer* 2000; 3:71-80.
339. Matozaki T, Sakamoto C, Suzuki T, Matsuda K, Uchida T, Nakano O, Wada K, Nishisaki H, Konda Y, Nagao M, . p53 gene mutations in human gastric cancer: wild-type p53 but not mutant p53 suppresses growth of human gastric cancer cells. *Cancer Res* 1992; 52:4335-4341.
340. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351:453-456.
341. Carson DA, Lois A. Cancer progression and p53. *Lancet* 1995; 346:1009-1011.
342. Chang F, Syrjanen S, Syrjanen K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 1995; 13:1009-1022.
343. Julil H. New approaches in gastric cancer. Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Hepatogastroenterology* 1989; 36:27-32.
344. Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 1990; 9:1595-1602.

345. Kim JH, Uhm HD, Gong SJ, Shin DH, Choi JH, Lee HR, Noh SH, Kim BS, Cho JY, Rha SY, Yoo NC, Chung HC, Roh JK, Min JS, Lee KS, Kim BS. Relationship between p53 overexpression and gastric cancer progression. *Oncology* 1997; 54:166-170.
346. Maeda K, Kang SM, Onoda N, Ogawa M, Sawada T, Nakata B, Kato Y, Chung YS, Sowa M. Expression of p53 and vascular endothelial growth factor associated with tumor angiogenesis and prognosis in gastric cancer. *Oncology* 1998; 55:594-599.
347. Victorzon M, Nordling S, Haglund C, Lundin J, Roberts PJ. Expression of p53 protein as a prognostic factor in patients with gastric cancer. *Eur J Cancer* 1996; 32A:215-220.
348. Ikeguchi M, Saito H, Kondo A, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N. Mutated p53 protein expression and proliferative activity in advanced gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 1999; 46:2648-2653.
349. Monig SP, Eidt S, Zirbes TK, Stippel D, Baldus SE, Pichlmaier H. p53 expression in gastric cancer: clinicopathological correlation and prognostic significance. *Dig Dis Sci* 1997; 42:2463-2467.
350. Baba M, Konno H, Maruo Y, Tanaka T, Kanai T, Matsumoto K, Matsuura M, Nishino N, Maruyama K, Nakamura S, Baba S. Relationship of p53 and vascular endothelial growth factor expression of clinicopathological factors in human scirrhous gastric cancer. *Eur Surg Res* 1998; 30:130-137.
351. Maeda K, Ogawa M, Chung YS, Kang SM, Sawada T, Onoda N, Nakata B, Kato Y, Sowa M. Overexpression of p53 associated with tumor angiogenesis, tumor cell proliferation, and prognosis in gastric carcinoma. *Oncol Rep* 1997; 4:765-768.
352. Martin H, Filipe M, Morris R, Lane D, Silvestre F. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 50:859-862.
353. Starzynska T, Bromley M, Ghosh A, Stern PL. Prognosis significance of p53 overexpression in gastric and colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 1992; 66:558-562.
354. Fonseca L, Yonemura Y, De A, X, Yamaguchi A, Miwa K, Miyazaki I. p53 detection as a prognostic factor in early gastric cancer. *Oncology* 1994; 51:485-490.
355. Uchino S, Noguchi M, Ochiai A, Saito T, Kobayashi M, Hirohashi S. p53 mutation in gastric cancer: a genetic model for carcinogenesis is common to gastric and colorectal cancer. *Int J Cancer* 1993; 54:759-764.
356. Ochiai A, Yamauchi Y, Hirohashi S. p53 mutations in the non-neoplastic mucosa of the human stomach showing intestinal metaplasia. *Int J Cancer* 1996; 69:28-33.
357. McLaren R, Kuzu I, Dunnill M, Harris A, Lane D, Gatter KC. The relationship of p53 immunostaining to survival in carcinoma of the lung. *Br J Cancer* 1992; 66:735-738.
358. Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML, Merino MJ. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 1995; 147:33-41.
359. Frank RE, Saclarides TJ, Leurgans S, Speziale NJ, Drab EA, Rubin DB. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Ann Surg* 1995; 222:695-699.
360. Yoshino S, Kato M, Okada K. Prognostic significance of microvessel count in low

- stage renal cell carcinoma. *Int J Urol* 1995; 2:156-160.
361. Graham CH, Rivers J, Kerbel RS, Stankiewicz KS, White WL. Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin (< 0.76 mm) malignant melanomas. *Am J Pathol* 1994; 145:510-514.
362. Gasparini G, Weidner N, Maluta S, Pozza F, Boracchi P, Mezzetti M, Testolin A, Bevilacqua P. Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 55:739-744.
363. Nakagawa S, Nishimaki T, Suzuki T, Kanda T, Kuwabara S, Hatakeyama K. Tumor angiogenesis as an independent prognostic factor after extended radical esophagectomy for invasive squamous cell carcinoma of the esophagus. *Surgery* 2001; 129:302-308.
364. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Lu C, Iki M. Association between tumor angiogenesis and Borrmann type 4 carcinomas of the stomach. *Oncology* 1998; 55:461-467.
365. Igarashi M, Dhar DK, Kubota H, Yamamoto A, El Assal O, Nagasue N. The prognostic significance of microvessel density and thymidine phosphorylase expression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1998; 82:1225-1232.
366. Xiangming C, Hokita S, Natsugoe S, Tanabe G, Baba M, Takao S, Kuroshima K, Aikou T. Angiogenesis as an unfavorable factor related to lymph node metastasis in early gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 1998; 5:585-589.
367. Maehara Y, Hasuda S, Abe T, Oki E, Kakeji Y, Ohno S, Sugimachi K. Tumor angiogenesis and micrometastasis in bone marrow of patients with early gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4:2129-2134.
368. Kanai T, Konno H, Tanaka T, Matsumoto K, Baba M, Nakamura S, Baba S. Effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 on the progression of human gastric cancer xenotransplanted into nude mice. *Int J Cancer* 1997; 71:838-841.
369. Yoshikawa T, Yanoma S, Tsuburaya A, Kobayashi O, Sairenji M, Motohashi H, Noguchi Y. Angiogenesis inhibitor, TNP-470, suppresses growth of peritoneal disseminating foci. *Hepatogastroenterology* 2000; 47:298-302.
370. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1985; 43:175-203.
371. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 1995; 95:1789-1797.
372. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Shimomatsuya T. Correlation between expression of vascular endothelial growth factor and tumor vascularity, and patient outcome in human gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1997; 15:826-832.
373. Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, Fushida S, Ninomiya I, Bandou E, Taniguchi K, Miwa K, Ohoyama S, Sugiyama K, Sasaki T. Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5:1823-1829.

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Factores asociados con un riesgo incrementado de padecer cáncer gástrico.-----	5
TABLA 2. Estadificación del Cáncer Gástrico (UICC).-----	23
TABLA 3. Supervivencia acumulada de pacientes con cáncer gástrico tratados mediante gastrectomía, diagnosticados entre 1985-1996 en Estados.-----	23
TABLA 4. Localización de las metástasis ganglionares de cáncer gástrico en función de la localización tumoral.-----	30
TABLA 5. Localización de las metástasis a distancia de cáncer gástrico.-----	31
TABLA 6. Estudios prospectivos randomizados multicéntricos que comparan la linfadenectomía D1 frente a la D2 en carcinoma gástrico intervenido con intención curativa.-----	38
TABLA 7. Estudios randomizados del tratamiento quimioterápico en cáncer gástrico avanzado.-----	46
TABLA 8. Alteraciones genéticas evidenciadas en el cáncer gástrico.-----	60
TABLA 9. Activadores e inhibidores de la angiogénesis.-----	68
TABLA 10. Grados de Curabilidad de la resección gástrica según los criterios de la Asociación Japonesa del Cáncer Gástrico (AJCG).-----	82
TABLA 11. Tipos de anticuerpos utilizados en el estudio.-----	86
TABLA 12. Variables demográficas y localización tumoral.-----	93
TABLA 13. Escalas de puntuación del grado funcional de los pacientes.-----	94
TABLA 14. Variables relacionadas con la intervención quirúrgica.-----	96
TABLA 15. Complicaciones postoperatorias.-----	97
TABLA 16. Motivos de reintervención.-----	98

TABLA 17. Tratamiento quimioterápico. -----	99
TABLA 18. Variables relacionadas con el estudio anatomopatológico y el estadio tumoral (UICC). -----	101
TABLA 19. Distribución de los pacientes en función de la expresión de la p53, del VEGF y de la DMV. -----	102
TABLA 20. Evaluación de la relación entre la p53 y la DMV tumoral. -----	107
TABLA 21. Evaluación de la relación entre la expresión de la p53 y el VEGF. ---	108
TABLA 22. Evaluación de la relación entre el VEGF y la DMV. -----	109
TABLA 23. Evaluación de la relación entre el ratio ganglionar y la DMV. -----	110
TABLA 24. Evaluación de la relación entre la DMV y el estadio pN (UICC).-----	110
TABLA 25. Evaluación de la relación entre la expresión del VEGF y la existencia de metástasis en el momento de realizar el diagnóstico. -----	111
TABLA 26. Localización de las metástasis.-----	111
TABLA 27. Evaluación del valor pronóstico de la p53, del VEGF y de la DMV en la supervivencia relacionada con la enfermedad para la serie completa de pacientes.-----	115
TABLA 28. Análisis multivariado de supervivencia en la serie completa. -----	116
TABLA 29. Evaluación del valor pronóstico de la p53, del VEGF y de la DMV en la supervivencia relacionada con la enfermedad en los pacientes intervenidos con intención curativa. -----	118
TABLA 30. Evaluación del riesgo de aparición de recidivas en función de la p53, del VEGF y de la DMV tumoral.-----	121
TABLA 31. Localización de las recidivas según la expresión de la p53, del VEGF, de la DMV y del grado de curabilidad (AJCC).-----	121
TABLA 32. Evaluación de la relación entre la recidiva ganglionar con la existencia de	

linfangiosis carcinomatosa y el tipo de linfadenectomía practicado.-----	123
TABLA 33. Evaluación de la relación entre la aparición de metástasis a distancia y la expresión del VEGF (serie completa de pacientes).-----	123
TABLA 34. Análisis multivariado del riesgo de aparición de recidivas y de la supervivencia libre de recidiva. -----	124
TABLA 35. Evaluación de la relación entre la recidiva tumoral y la utilización de quimioterapia adyuvante en los pacientes intervenidos con intención curativa.-----	125
TABLA 36. Localización de las recidivas según la administración de quimioterapia adyuvante. -----	125
TABLA 37. Evaluación del efecto de la quimioterapia adyuvante en la supervivencia relacionada con la enfermedad de los pacientes intervenidos con intención curativa.-----	126
TABLA 38. Evaluación de la influencia de la expresión de la p53, del VEGF y de la DMV en el efecto de la quimioterapia adyuvante.-----	127
TABLA 39. Análisis multivariado de supervivencia en el grupo de pacientes intervenidos con intención curativa. -----	128
TABLA 40. Análisis multivariado de supervivencia en el grupo de pacientes intervenidos con intención curativa sin incluir la clasificación del grado de curabilidad (AJCG).-----	129
TABLA 41. Influencia del tipo de linfadenectomía (D1 frente a D2) en la supervivencia relacionada con la enfermedad para cada estadio tumoral (UICC). -----	134
TABLA 42. Relación entre la expresión de la p53 y el estadio T, N y final. -----	138
TABLA 43. Relación entre la expresión de la p53 y el grado de curabilidad.-----	140

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Desarrollo de cáncer gástrico. Factores protectores y fact. de riesgo.---	7
FIGURA 2. Supervivencia acumulada por estadios (UICC) en Japón (8338 pacientes, Cancer Institute Hospital, Tokio, entre 1946 y 1997). -----	24
FIGURA 3. Localización de las estaciones ganglionares. -----	26
FIGURA 4. Extensión de la resección en una gastrectomíasubtotal distal.-----	33
FIGURA 5. Gastrectomía total extendida oralmente y reconstrucción mediante esofago-yeyunostomía en Y de Roux. -----	33
FIGURA 6. Gastrectomía total. Ascensión de asa yeyunal transmesocólica y anastomosis esófago-yeyunal por encima de los pilares diafragmáticos.----	34
FIGURA 7. Inicio de la disección ganglionar a lo largo de la arteria hepática.-----	35
FIGURA 8. Disección ganglionar a lo largo de la curvatura menor gástrica. -----	35
FIGURA 9. Linfadenectomía D2. Se aprecian las estructuras del ligamento hepatoduodenal, la art. gástrica izquierda ligada en su raíz, a la salida del tronco celíaco, y la parte proximal de la arteria esplénica, sobre el cuerpo pancreático.-----	37
FIGURA 10. El número de células de un tejido está determinado por el balance entre proliferación y muerte celular. -----	50
FIGURA 11. Angiogénesis tumoral. -----	58
FIGURA 12. Supervivencia acumulada en función del grado de curabilidad de la AJCG (serie de Maruyama, 1996).-----	83
FIGURA 13. Procedimiento inmunohistoquímico utilizado en el estudio. -----	86
FIGURA 14. A, B: adenocarcinoma gástrico con células en anillo de sello que no expresan la p53; C, D: adenocarcinoma gástrico tipo difuso con marcada	

expresión de la p53.-----	87
FIGURA 15. Adenocarcinoma gástrico tipo intestinal con expresión de la p53.-----	88
FIGURA 16. Distinto grado de tinción del citoplasma de células tumorales que expresan el VEGF: A (+), B (++)-----	89
FIGURA 17. Identificación de borde externo de crecimiento tumoral a 40 aumentos (A) y a 100 aumentos (B): I (estroma desmoplásico), II (zona de infiltración), III (tumor).-----	90
FIGURA 18. Angiogénesis tumoral evaluada a 250 aumentos. Se aprecia que el grado de DMV en el caso B es muy superior al A.-----	91
FIGURA 19. Supervivencia global de los pacientes de la serie.-----	103
FIGURA 20. Supervivencia relacionada con la enfermedad de los pacientes de la serie.-----	103
FIGURA 21. Supervivencia relacionada con la enfermedad de los pacientes intervenidos con intención curativa.-----	105
FIGURA 22. Supervivencia relacionada con la enfermedad de los pacientes intervenidos con intención curativa que presentaron una recidiva tumoral.-----	106
FIGURA 23. Distribución de los valores de la DMV dependiendo de la expresión del VEGF.-----	109
FIGURA 24. Supervivencia acumulada para la serie completa de pacientes en función del estadio tumoral definitivo.-----	113
FIGURA 25. Supervivencia acumulada para la serie completa de pacientes en función de la afectación ganglionar.-----	113
FIGURA 26. Supervivencia acumulada para la serie completa de pacientes en función del grado de curabilidad de la Asociación Japonesa de Cáncer Gástrico.-----	114

FIGURA 27. Supervivencia acumulada de los pacientes intervenidos con intención curativa en función de la expresión de la p53. -----	118
FIGURA 28. Supervivencia acumulada de los pacientes intervenidos con intención curativa en función de la expresión del VEGF.-----	119
FIGURA 29. Supervivencia acumulada de los pacientes intervenidos con intención curativa en función de la expresión de la DMV tumoral.-----	119
FIGURA 30. Supervivencia acumulada de los pacientes intervenidos con intención curativa en función de la expresión de la p53 y del VEGF conjuntamente.	120
FIGURA 31. Supervivencia acumulada de los pacientes intervenidos con intención curativa en función de la administración de quimioterapia adyuvante. -----	126