

# Etiopatogenia y biología molecular del cáncer gástrico

A. DÍAZ-SERRANO, A. MÉRIDA-GARCÍA, Y. LÓPEZ, T. DE PORTUGAL

*Servicio de Oncología Médica. Complejo Hospitalario de Zamora. Zamora*

## RESUMEN

La mayoría de los cánceres gástricos son esporádicos y solo el 1-3 % son hereditarios, aunque existe agregación familiar en el 10 % de los casos. En la etiopatogenia del cáncer gástrico desempeña un papel importante la interacción entre factores ambientales, genéticos y epigenéticos. Entre los factores ambientales destacan la infección por *Helicobacter pylori*, la dieta y el tabaco, entre otros. En los últimos años se han publicado diversas clasificaciones moleculares del cáncer gástrico, destaca la clasificación de *The Cancer Genome Atlas* en la que se diferencian cuatro subtipos moleculares (inestabilidad de microsatélites, virus de Epstein-Barr, inestabilidad cromosómica, genómicamente estable). Actualmente ninguna clasificación molecular presenta aplicabilidad directa en la práctica clínica. Sin embargo, el mayor conocimiento de la etiopatogenia y la biología molecular del cáncer gástrico establecen las bases para la estratificación de los pacientes y el desarrollo racional de terapias dirigidas en distintos grupos de pacientes.

**PALABRAS CLAVE:** Cáncer gástrico. Etiopatogenia. *Helicobacter pylori*. Clasificación molecular. TCGA.

## ETIOPATOGENIA DEL CÁNCER GÁSTRICO

En la etiopatogenia del cáncer gástrico (CG) desempeña un papel importante la interacción entre factores ambientales, genéticos y epigenéticos. La mayoría de cánceres gástricos son esporádicos. Solo el 1-3 % son verdaderos cánceres hereditarios o familiares, agregados principalmente en torno a tres síndromes con he-

## ABSTRACT

*Most gastric cancers are sporadic and only 1-3 % are hereditary, although there is family aggregation in 10 % of cases. The interaction between environmental, genetic and epigenetic factors plays an important role in the etiopathogenesis of gastric cancer. Environmental factors include Helicobacter pylori infection, diet and tobacco, among others. In recent years, several molecular classifications of gastric cancer have been published, highlighting the classification of The Cancer Genome Atlas, in which four molecular subtypes are differentiated (microsatellite instability, Epstein-Barr virus, chromosomal instability, genomically stable). To date molecular classification of gastric cancer does not have direct applicability in clinical practice. However, the better knowledge of the pathogenesis and molecular biology of gastric cancer establishes the basis for stratification of patients and the rational development of targeted therapies in different groups of patients.*

**KEYWORDS:** Gastric cancer. Etiopathogenesis. *Helicobacter pylori*. Molecular classification. TCGA.

rencia autosómica dominante: el síndrome de CG hereditario difuso, el síndrome de CG intestinal familiar y el síndrome de adenocarcinoma gástrico y poliposis gástrica proximal. Sin embargo, se describe agregación familiar en aproximadamente el 10 % de los casos de CG. En algunas familias esta agregación podría ser explicada por la existencia de factores de riesgo exógenos compartidos, y en otras, por la existencia de una

predisposición genética según un patrón de transmisión autosómico recesivo y/o por la existencia de polimorfismos genéticos y factores epigenéticos asociados a un aumento en la susceptibilidad al CG.

Se ha reconocido que los factores de riesgo, la distribución geográfica y la edad de aparición del adenocarcinoma gástrico difieren según el tipo histológico de acuerdo con la clasificación de Lauren (intestinal frente a difuso) y según la localización anatómica del tumor (unión gastroesofágica, estómago proximal o cardias frente a estómago distal). El adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal es el tipo histológico más frecuente. Estos tumores se caracterizan por formar estructuras glandulares de diferente grado de diferenciación, y aparecen de manera habitual en el seno de mucosas con metaplasia intestinal. Los carcinomas difusos se caracterizan por la pérdida de adhesiones intercelulares y están constituidos por células neoplásicas pobremente cohesionadas que infiltran la pared gástrica de manera difusa con escasa o nula formación de glándulas. En el caso del subtipo intestinal, Correa y cols. han postulado un modelo de progresión desde tejido normal hacia gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia, y eventualmente a adenocarcinoma, en relación con la exposición a diversos factores de riesgo (1) (Tabla I). Asociadas a esta cascada de lesiones precursoras se han descrito distintas alteraciones en oncogenes, genes supresores de tumores, reguladores del ciclo celular y alteraciones epigenéticas, como las alteraciones en *K-RAS*, *c-MET*, *TP53*, *APC*, *CDKN1B* y alteraciones en la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina, entre otras. En el caso del subtipo histológico difuso, no se describen claramente lesiones precancerosas precursoras, y desempeña un papel primordial la pérdida de expresión del gen de adhesión celular E-cadherina (*CDH1*) (2).

TABLA I  
FACTORES DE RIESGO ADQUIRIDOS ASOCIADOS  
A CÁNCER GÁSTRICO

<i>Nutricionales</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dieta rica en sal</li> <li>• Dieta rica en nitratos</li> <li>• Baja ingesta de vitaminas A y C</li> <li>• Alimentos en salazón o curados</li> <li>• Escasa refrigeración de los alimentos</li> </ul>
<i>Consumo de tabaco</i>
<i>Obesidad</i>
<i>Infección por Helicobacter pylori</i>
<i>Infección por virus de Epstein-Barr</i>
<i>Exposición a radiación ionizante</i>
<i>Cirugía previa por úlcera gástrica benigna</i>

#### SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA NO ASOCIADA A SÍNDROMES HEREDITARIOS

Se han identificado algunos polimorfismos genéticos asociados a CG, como los de interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), implicados en el efecto proinflamatorio y virulencia de la infección por *H. pylori*, así como en el gen de la metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (3-5). La asociación del grupo sanguíneo A con el cáncer gástrico también sugiere la existencia de factores genéticos ligados no identificados (6). La predisposición familiar a gastritis crónica atrófica, como precursor del adenocarcinoma gástrico, se ha asociado al CG, con un patrón de herencia autosómica recesiva con una penetrancia incompleta según la edad y la expresión en la madre (7).

#### INFECCIÓN POR *H. PYLORI*

El *H. pylori* fue reconocido por la International Agency for Research on Cancer (IARC) como un carcinógeno en humanos en 1994. También se reconoció la infección por esta bacteria como un factor necesario pero no suficiente para el desarrollo del adenocarcinoma gástrico. Es una infección común que afecta al 74 % de los individuos de edad media en los países desarrollados y al 58 % en los países en vías de desarrollo. La evidencia que soporta la relación causal entre la infección por *H. pylori* y el CG la encontramos en diversos estudios ecológicos, estudios de casos y controles y estudios de cohortes prospectivos (8-10). Forman y cols. realizaron el análisis conjunto de tres estudios prospectivos, en el que se objetiva que el riesgo de CG tras la infección por *H. pylori* aumenta significativamente con la duración del seguimiento, con un incremento del riesgo de casi 9 veces tras 15 años o más (11). En el metaanálisis publicado por el Helicobacter and Cancer Collaborative Group, en el que se incluyeron 12 estudios prospectivos que sumaban 1228 cánceres y 3406 controles, la infección por *H. pylori* aumenta el riesgo de adenocarcinoma gástrico en 2,36 veces (IC 95 % 1,98-2,81). Este aumento de riesgo se produce solo en tumores no cardiales y es mayor cuanto mayor es el tiempo de infección, que se incrementa en 5,9 veces en los casos en los que la infección fue documentada más de 10 años antes del diagnóstico de CG (12).

Epidemiológicamente los países con mayor incidencia de CG son también los de mayor incidencia de infección por *H. pylori*, y se ha documentado cómo en los países desarrollados el descenso en la incidencia de infección por *H. pylori* va seguido por una caída en la incidencia de CG (13,14). Estudios recientes de la IARC indican que el 90 % de los CG no cardiales son causados por la infección por *H. pylori* (15). Múltiples ensayos han investigado el papel de la erradicación del *H. pylori*

en la incidencia de cáncer gástrico. En un metaanálisis que incluye 6 ensayos clínicos aleatorizados, se estima un riesgo relativo de 0,66 (IC 95 %, 0,46-0,95) cuando se compara la incidencia de CG entre 3294 individuos sanos asintomáticos con infección documentada por *H. pylori* que recibieron terapia con inhibidores de la bomba de protones y antibióticos frente a 3203 individuos que recibieron placebo o no tomaron ningún tratamiento. Ello implica una reducción relativa del riesgo de cáncer gástrico del 34 % (16).

El adenocarcinoma esporádico de tipo intestinal se desarrolla a través de una secuencia conocida de lesiones precursoras que son inducidas por la infección por *H. pylori*. Esta infección provoca la aparición de gastritis atrófica y posteriormente metaplasia intestinal, lo que conlleva un aumento en el riesgo relativo de desarrollar adenocarcinoma gástrico, que es 1,7 veces mayor en los casos de atrofia moderada, 4,9 veces superior en los de atrofia severa y 6,4 veces en los de metaplasia intestinal (siempre referidos a la población no infectada) (17).

Se ha secuenciado el genoma completo del *H. pylori* y se ha demostrado la existencia de secuencias específicas comunes a distintas cepas del germen, aunque no todas las cepas tienen el mismo potencial carcinogénico. Por ejemplo, en humanos la infección por cepas Cag-A (+) está relacionada con una mayor prevalencia de gastritis atrófica y unos mayores niveles de inmunoglobulina (Ig) G anti-*H. pylori* que la infección por cepas Cag-A (-) (18). Asimismo, el *H. pylori* produce una citotoxina vacuolizante denominada Vac-A (19). Teóricamente todas las cepas de *H. pylori* producen Vac-A, sin embargo, hay diferentes variantes con diversa capacidad vacuolizante debido a la existencia de polimorfismos. Dentro de los genotipos identificados, las cepas de *H. pylori* Vac-A s1 y m1 son las que mayormente se han observado en CG (20-22). De esta forma, en algunos países se ha comprobado que las áreas con mayor riesgo de cáncer gástrico son también las de mayor frecuencia de genotipos Cag-A (+) y Vac-A s1 y m1 en las cepas de *H. pylori* aisladas (21).

El efecto carcinogénico viene determinado por el estrés oxidativo que provoca la infección por *H. pylori* en la mucosa gástrica y, dado que este microorganismo se localiza en el moco que recubre el epitelio gástrico normal y no en el de las zonas con metaplasia intestinal donde se origina habitualmente la neoplasia, es necesaria asimismo la presencia de carcinógenos solubles en la luz gástrica para el desarrollo de la neoplasia. En las células inflamatorias y de la lámina propia en los casos de gastritis es posible detectar la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS). El óxido nítrico es necesario para la renovación de las células más profundas del epitelio foveolar y de los folículos linfoides. En la mucosa precancerosa, iNOS migra hacia zonas más superficiales del epitelio foveolar donde se puede producir daño en el ADN celular. El aumento del pH gástrico en los casos de gastritis atrófica producido

por *H. pylori* puede modificar aún más los carcinógenos externos o internos a este nivel. La transformación de nitritos en óxido nítrico (NO) produce trióxido de dinitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), que forma nitrosotioles y nitrosaminas, compuestos ambos que están reconocidos como carcinógenos gástricos en modelos experimentales. Esta transformación es inhibida por la presencia de antioxidantes como el ácido ascórbico, lo que explicaría su papel preventivo del cáncer gástrico. De cualquier manera, el *H. pylori* interfiere con esta acción antioxidante del ácido ascórbico al disminuir su concentración gástrica (23,24). De esta forma, la inflamación inducida por *H. pylori* conduce a un estado de estrés oxidativo que aumenta las posibilidades de daño del ADN y de mutaciones somáticas (25).

Por otro lado, independientemente de los efectos de la inflamación, *H. pylori* causa inestabilidad genómica, directamente mediante daño genético e indirectamente mediante una serie de alteraciones epigenéticas. En relación con el daño genético, *H. pylori* produce la rotura de la doble cadena del ADN, lo cual se ha visto que puede ser independiente de la respuesta inflamatoria generada y de la expresión o no de factores de virulencia como Vac-A y Cag-A (26). Además, conduce a una alta expresión de citidina deaminasa, enzima que en condiciones fisiológicas solo se encuentra activada en cierta etapa del desarrollo del linfocito, y que se ha implicado en la carcinogénesis de tumores digestivos asociados a procesos inflamatorios mediante la activación del factor de transcripción nuclear NF-κB (27). Sumado a ello, *H. pylori* induce una serie de alteraciones epigenéticas mediante tres mecanismos principales: la modificación de histonas, la hipermetilación de múltiples islotes de CpG, especialmente en sitios de codificación de genes supresores de tumores como *CDH1*, *APC* y *p16*, y la modificación en la expresión de micro-ARN (25,28,29). Muchos de estos eventos con potencial carcinogénico son reversibles tras la erradicación de *H. pylori*, sin embargo, otros de ellos podrían no serlo (30,31).

#### INFECCIÓN POR EL VIRUS DE EPSTEIN-BARR

Se estima que aproximadamente el 5-10 % de los CG en el mundo se encuentran asociados a la infección por el virus de Epstein-Barr (VEB) (32). Los CG asociados al VEB se caracterizan por la metilación en el promotor de varios genes relacionados con el cáncer, lo que conlleva al silenciamiento de la expresión de dichos genes. Los CG asociados al VEB se caracterizan por localizarse preferentemente en el cardias, presentar infiltración linfocítica, menor prevalencia de metástasis ganglionares y mayor frecuencia de histología difusa (33,34).

#### DIETA

El consumo elevado y mantenido de irritantes de la mucosa gástrica, como la sal y los nitratos, provoca su

inflamación crónica y gastritis superficial, y podría conducir al desarrollo de una gastritis atrófica (35). En esta situación de atrofia se produce un incremento en el pH gástrico, lo que favorece el crecimiento de bacterias anaerobias que reducen los nitratos a nitritos y, ocasionalmente, pueden formar derivados N-nitroso mutagénicos. Un estudio de cohortes de gran tamaño muestral evidenció que el riesgo de desarrollar un CG es 2,2 veces mayor en los individuos con gastritis atrófica. Además, el riesgo se eleva 1,8 veces si se mantiene un consumo elevado de comidas picantes, y disminuye 0,6 veces si se reduce la ingesta de alimentos salados (35,36).

Por el contrario, una ingesta elevada de frutas y vegetales en la dieta diaria se ha asociado con una reducción en el riesgo de desarrollar adenocarcinoma gástrico. Los antioxidantes como los  $\beta$ -carotenos, el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y el ácido ascórbico (vitamina C) podrían actuar evitando la formación de mutágenos y carcinógenos en el estómago (37), aunque no se conoce con exactitud su papel en la etiología del CG. La dieta rica en fibra parece ejercer un papel protector en el CG. Sin embargo, existen datos contradictorios sobre si este efecto protector se relaciona con todos los tipos de fibra ingeridos y en todos los subtipos histológicos de cáncer gástrico (38).

#### TABACO Y ALCOHOL

El consumo de tabaco está considerado un agente causal de CG tanto en hombres como en mujeres por la IARC. El riesgo aumenta proporcionalmente con el número de cigarrillos fumados y con la duración del consumo y se reduce de manera progresiva tras su abandono (39). Aproximadamente un 18 % de los casos de adenocarcinoma gástrico pueden atribuirse al consumo de tabaco (40).

La misma IARC descartaba en 1988 el consumo de alcohol como un factor etiológico definitivo para el desarrollo de adenocarcinoma gástrico. Datos procedentes de un metaanálisis sugieren la ausencia de asociación entre el consumo moderado de alcohol y el CG. Tan solo establecen una leve asociación positiva con el consumo alto de alcohol ( $> 50$  g/día), especialmente en adenocarcinoma gástrico no localizado en el cardias (41). Sin embargo, en la actualidad, no se reconoce claramente el consumo de alcohol como factor de riesgo aislado de CG, aunque sí parece tener un papel potenciador del efecto carcinogénico del tabaco sobre la mucosa gástrica, con un aumento del riesgo relativo de CG de hasta 8,05 en fumadores con alta ingesta alcohólica (IC 95 %, 3,89-16,6) (42).

#### OBESIDAD

En un metaanálisis de estudios de cohortes, que incluye 9492 casos de CG, la presencia de un índice de masa

corporal (IMC) elevado (definido como  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>) se asocia con un aumento del riesgo de CG de 1,2 veces, y la fuerza de dicha asociación se incrementa a medida que aumenta el IMC (43). Específicamente la obesidad se asocia con un incremento del riesgo de cáncer de cardias, pero no del CG no localizado en el cardias. Esta asociación se confirma en un segundo metaanálisis publicado posteriormente, en el que se incluyen 22 estudios en total (estudios de cohortes y estudios de casos y controles), encontrándose en esta ocasión una mayor fuerza en la asociación con un incremento de al menos el 70 % para CG en la población con sobrepeso/obesidad, explicable por incluir casos de adenocarcinoma de esófago y de cardias (43).

#### OTROS FACTORES DE RIESGO

Se describe un incremento en el riesgo de CG en el remanente gástrico tras una cirugía gástrica previa, especialmente en pacientes con reconstrucciones Billroth II (gastroeyunostomía) frente a Billroth I (gastroduodenostomía) (44), y en pacientes con mayor intervalo de tiempo desde la cirugía gástrica inicial.

Se ha descrito un incremento del riesgo de CG en supervivientes de tumores germinales, linfoma de Hodgkin y tumores infantiles, tratados con radioterapia subdiafragmática (45).

El consumo regular de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) se ha asociado inversamente con el riesgo de adenocarcinoma gástrico distal en estudios retrospectivos, y este efecto protector es mayor en pacientes con infección por *H. pylori*.

#### BASES MOLECULARES DEL CÁNCER GÁSTRICO

Desde un punto de vista histológico la mayoría de los CG son adenocarcinomas, que pueden subdividirse en difusos o intestinales según la clasificación de Lauren, basada exclusivamente en el estudio mediante microscopía óptica convencional. Por su localización, el CG se divide en proximal o distal. Sin embargo, existe una gran variabilidad en lo referente a características epidemiológicas, etiopatogenia, comportamiento clínico y respuesta al tratamiento entre los diferentes subtipos histológicos y topográficos de CG, lo que pone de manifiesto la gran complejidad biológica de esta patología. Los avances en tecnologías de alto rendimiento como análisis de microarrays y métodos de secuenciación genómica han permitido una mejor caracterización del CG desde el punto de vista etiopatogénico y molecular, que pone de relieve el alto nivel de heterogeneidad intertumoral e intratumoral del CG, en el que cada paciente presenta un perfil genético y molecular particular.

Para mejorar la evolución de los pacientes con CG resulta esencial la búsqueda de marcadores predictivos



de respuesta que guíen el tratamiento sistémico. Los esfuerzos para identificar biomarcadores moleculares en CG han tenido resultados irregulares. Diversas terapias dirigidas frente a dianas moleculares que han demostrado eficacia en otros tipos tumorales, han sido evaluadas o están actualmente bajo investigación para el tratamiento del CG, incluyendo inhibidores de EGFR, MET, VEGF, FGFR y PI3K (46-48). Sin embargo, hasta la fecha, el único biomarcador predictivo de respuesta para una terapia dirigida es la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2*, que predice el beneficio del tratamiento con trastuzumab en enfermedad avanzada (49,50). Aunque la aprobación del anticuerpo anti-VEGFR2 ramucirumab ha aumentado el arsenal terapéutico en CG, no existen marcadores predictivos validados que identifiquen qué pacientes pueden beneficiarse de las terapias dirigidas frente a VEGFR (51,52).

Algunos autores han publicado cómo los subtipos histológicos clásicos de CG se corresponden con perfiles de expresión génica diferentes, lo que está permitiendo no solo una mejor caracterización de las neoplasias gástricas y la descripción de nuevos subtipos tumorales, sino también un mejor conocimiento de las alteraciones moleculares principales de cada uno de ellos.

#### CLASIFICACIONES MOLECULARES

Uno de los primeros grupos que trató de realizar una clasificación del CG en subtipos moleculares fue el Singapore-Duke Group (53,54). Inicialmente dividieron los casos en dos subtipos intrínsecos que diferenciaron por patrones de expresión génica: G-INT (*genomic intestinal*) y G-DIF (*genomic diffuse*). La concordancia con los subtipos histológicos correspondientes fue solo del 64 %. La clasificación genómica demostró valor pronóstico en análisis multivariante, a diferencia de la clasificación histológica. Además, desde el punto de vista predictivo, el subtipo G-INT presenta peor respuesta a cisplatino y mayor sensibilidad a 5-fluoruracilo y oxaliplatino respecto al subtipo G-DIF. Posteriormente este mismo grupo propuso una nueva clasificación en 3 subtipos: proliferativo, metabólico y mesenquimal. El subtipo proliferativo, asociado a la histología intestinal, se caracteriza por la presencia de mutaciones en *TP53* y alteraciones en el número de copias génicas. El subtipo mesenquimal se asocia al CG difuso, alteraciones en procesos de transición epitelio-mesénquima y respuesta a inhibidores de la vía fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)-AKT-mTOR (estudios *in vitro*). El subtipo metabólico, que surge como nueva entidad se caracteriza por mayor actividad en la vía relacionada con la metaplasia de tipo SPEM (*spasmolytic-polypeptide-expressing metaplasia*) y mayor sensibilidad a fluoropirimidinas.

El grupo del Memorial Sloan Kettering Cancer Center trató de definir el perfil genómico clasificando el CG

en tres subtipos: proximal no difuso, difuso y distal no difuso (55). Uno de los genes con expresión diferencial en cada subtipo fue *PLA2G2A*. *PLA2G2A* es una fosfolipasa identificada como factor pronóstico en CG, de manera que los tumores que expresan altos niveles de este gen presentan mayor supervivencia y menor frecuencia de metástasis. Asimismo, *PLA2G2A* ha sido descrito como diana de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina en carcinogénesis gástrica, asociada con la regulación negativa de genes asociados a invasión y metástasis (56).

Posteriormente se publicó un estudio prospectivo que analiza mediante NGS 116 muestras de CG localmente avanzado o metastásico y ha identificado alteraciones genómicas que son potencialmente tratables mediante terapias dirigidas (57). El 78 % de los casos albergaban al menos una alteración genómica clínicamente relevante potencialmente tratable con terapias aprobadas en Estados Unidos por la Food and Drug Administration o dentro de ensayo clínico. Las alteraciones más comunes fueron *TP53* (50 %), *ARID1A* (24 %) y *CDHI* (15 %). Otras alteraciones clínicamente relevantes fueron las encontradas en los genes *KRAS*, *CDKN2A*, *CCND1*, *ERBB2*, *PIK3CA*, *MLL2*, *MET*, *PTEN*, *ATM*, *DNMT3A*, *NF1*, *NRAS* y *MDM2*. Se confirman los datos de estudios previos, los tumores con pérdida de función de *ARID1A* presentaron una menor prevalencia de mutaciones de *TP53*, y sin embargo, un aumento de las variantes en *PIK3CA*, *CREBBP* y *MLL2*. Hay que destacar de este estudio la presencia de alteraciones en receptores de tirosina quinasa en el 20,6 % de los casos. Dentro de estas se incluyen las amplificaciones de *ERBB2*, *EGFR*, *MET* y *FGFR2* como alteraciones predominantes, aunque también se describen mutaciones y deleciones. El 8,6 % de las alteraciones corresponden al gen *ERBB2*. A diferencia de lo descrito hasta ahora, las alteraciones en *ERBB2* fueron sustituciones de bases en la mitad de los casos, hallazgo mutuamente excluyente con la presencia de amplificaciones de *ERBB2*. Las sustituciones de bases en *ERBB2* no pueden ser identificadas mediante inmunohistoquímica (IHQ) o hibridación *in situ*, por lo que su detección identificaría a un subgrupo de pacientes que podría potencialmente beneficiarse del tratamiento dirigido anti-HER2, tal como se ha descrito en cáncer de mama. Los datos presentados sugieren que los CG con sustituciones en *ERBB2* podrían presentar características clínico-patológicas diferentes respecto a los tumores con amplificación de *ERBB2*, pero esto necesita ser confirmado en series más amplias (57).

En 2014 se publica la clasificación molecular más importante en CG hasta la fecha, propuesta por el grupo The Cancer Genome Atlas (TCGA) (58). Se analizan muestras de tejido fresco de 295 pacientes con adenocarcinoma gástrico no previamente tratados con quimioterapia ni radioterapia, tomando como referencia para la detección de mutaciones somáticas ADN de línea germinal proveniente de muestras de sangre periférica

o mucosa gástrica sana. Caracterizan las muestras usando seis plataformas moleculares: análisis del número de copias somáticas, secuenciación masiva de exomas, perfil de metilación del ADN, secuenciación de ARN mensajero (ARNm), secuenciación de micro-ARN (mi-ARN) y arrays de proteínas en fase reversa (RPPA), habiendo analizado el 77 % de los tumores mediante las 6 plataformas. Basándose en los resultados del análisis de estas seis plataformas, crearon un algoritmo para clasificar las 295 muestras de CG en cuatro subtipos moleculares, usando una aproximación que pudiera ser aplicada fácilmente en la práctica clínica. En primer lugar, se identificaron los tumores con positividad para VEB (subtipo VEB), los cuales representan un 9 % de los CG. Posteriormente se clasificaron según la presencia de alta inestabilidad de microsatélites (subtipo MSI), agrupando al 22 % de los CG. Los restantes se diferenciaron por el grado de aneuploidía en genómicamente estables (subtipo GS, 20 %) y en aquellos con inestabilidad cromosómica (subtipo CIN, 50 %). Las principales características clínicas y moleculares de cada uno de los subtipos se resumen en la tabla II. Los resultados preliminares sobre la supervivencia no revelaron diferencias significativas entre los cuatro subtipos.

En el estudio del TCGA el estado de VEB fue determinado por secuenciación de ARNm, mi-ARN, exoma y genoma completo, y se obtuvieron resultados altamente concordantes. El análisis de las muestras VEB positivas mostró una intensa asociación con el fenotipo metilador de islotes de CpG (CIMP), a diferencia del subtipo MSI. Se han identificado diferencias en el espectro

de mutaciones y en el perfil de expresión génica entre los subtipos VEB y MSI asociados a CIMP. El subtipo VEB tuvo una mayor prevalencia de hipermetilación de ADN. Todos los tumores VEB positivos mostraron hipermetilación del promotor *CDKN2A* (*p16INK4A*) y ausencia de hipermetilación de *MLH1*, característico de los tumores MSI asociados a CIMP.

Por otro lado, se observa una fuerte asociación entre mutaciones en *PIK3CA* y el subtipo VEB positivo, con una prevalencia del 80 % de mutaciones no silentes de *PIK3CA*. Por el contrario, se identifican mutaciones de *PIK3CA* en el 3-42 % de los otros subtipos de CG. En los tumores VEB negativos las mutaciones de *PIK3CA* se suelen localizar en el dominio quinasa (exón 20), mientras que en los tumores VEB positivos las mutaciones se distribuyen de manera dispersa.

En el proyecto del TCGA se analizaron 63 tumores hipermutados y se identificaron 10 genes que presentaban mutaciones de tipo sustitución de bases, incluyendo *TP53*, *KRAS*, *ARID1A*, *PIK3CA*, *ERBB3*, *PTEN* y *HLA-B*. Añadiendo al análisis las inserciones y deleciones, la lista de genes con mutaciones significativas se amplió hasta 37, incluyendo *RNF43*, *B2M* y *NF1*. El análisis de tumores MSI detectó alteraciones frecuentes en los genes del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I, como *B2M* y *HLA-B*, lo que se ha asociado a la evasión del sistema inmune reduciendo la presentación de antígenos (59).

El análisis de 215 tumores no hipermutados identificó 25 genes con mutaciones significativas, entre los que se encuentran *TP53*, *ARID1A*, *KRAS*, *PIK3CA*

TABLA II  
CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER GÁSTRICO SEGÚN *THE CANCER GENOME ATLAS*

<i>Subtipo (incidencia)</i>	<i>Características clínicas</i>	<i>Alteraciones moleculares</i>
VEB (9 %)	Hombres Cuerpo o <i>fundus</i>	CIMP-patrón VEB Silenciamiento de <i>CDKN2A</i> Mutaciones <i>PIK3CA</i> , <i>ARID1A</i> y <i>BCOR</i> Sobreexpresión de <i>JAK2</i> , <i>PD-L1</i> , <i>PD-L2</i> e <i>IL-12</i>
MSI (22 %)	Mujer Edad avanzada	CIMP-patrón MSI Silenciamiento de <i>MLH1</i> Estado de hipermutación Alteraciones en genes del CMH tipo I Alteraciones en vías mitóticas
CIN (50 %)	UGE/cardias Histología intestinal	Mutaciones en <i>TP53</i> Amplificación RTK, incluyendo <i>EGFR</i> y <i>VEGFR</i> Amplificación genes del ciclo celular Aneuploidía
GS (20 %)	Edad temprana Histología difusa	Mutaciones <i>ARID1A</i> , <i>CDH1</i> y <i>RHOA</i> Fusiones <i>CLDN18-ARHGAP</i> Sobreexpresión de genes relacionados con adhesión celular y angiogénesis

*CIMP*: fenotipo metilador de islotes de CpG; *UGE*: unión gastroesofágica; *RTK*: receptores de tirosina quinasa.

y *RNF43*, pero también genes relacionados con la vía de  $\beta$ -catenina (*APC* y *CTNNB1*), la vía de TGF- $\beta$  (*SMAD4* y *SMAD2*) y *RASA1*, un regulador negativo de *RAS*. *ERBB2* estaba mutado de manera significativa; 10 de las 15 mutaciones identificadas se encontraban en puntos conocidos, cuatro casos tenían la mutación S310F, que es activadora y sensible a los fármacos anti-*ERBB2*.

Los tumores VEB positivos, además de mutaciones en *PIK3CA*, presentaron mutaciones en *ARID1A* (55 %) y *BCOR* (23 %), siendo raras las mutaciones en *TP53*. En el subtipo CIN de CG con inestabilidad cromosómica se observaron mutaciones de *TP53* en el 71 % de los casos. Las mutaciones somáticas de *CDH1* se describieron en el 37 % de los tumores estables genómicamente (subtipo GS), los cuales comparten las alteraciones en *ARID1A* con el subtipo VEB. Las mutaciones en *RHOA* aparecen de manera casi exclusiva en el subtipo GS, con una prevalencia del 15 %. *RHOA* actúa sobre la contractilidad y motilidad celular dependiente de actina y miosina y promueve la tumorigénesis a través de la activación de *STAT3*.

Analizando las transversiones o sustituciones de bases de una purina por una pirimidina o viceversa en las muestras de CG, se observa una alta tasa de transversiones de citosina a timidina en dinucleótidos CpG y de adenina a citosina en dinucleótidos AA. Las transversiones de adenina a citosina son especialmente frecuentes en los subtipos VEB, CIN y GS; no están presentes en el subtipo MSI, tal como se había descrito previamente (60).

El análisis de reordenamientos cromosómicos reveló translocaciones y fusiones entre *CLDN18* y *ARHGAP26*, implicados en la adhesión y motilidad celular. Las fusiones *CLDN18-ARHGAP* fueron mutuamente excluyentes con las mutaciones en *RHOA* y son especialmente frecuentes en el subtipo GS. En el subtipo GS, el 30 % de los casos presentaron alteraciones en *RHOA* o en *CLDN18-ARHGAP*. Las alteraciones genómicas de la ruta de *RHOA* parecen tener un papel en la capacidad invasiva de los GC fenotipo difuso.

Entre los resultados del análisis del número de copias somáticas destaca la identificación de amplificaciones focales en oncogenes como *ERBB2*, *CCNE1*, *KRAS*, *MYC*, *EGFR*, *CDK6*, *GATA4*, *GATA6* y *ZNF217*, así como la amplificación de *CD44*, marcador de la célula madre gástrica, y amplificaciones del locus 9p, donde se localizan los genes que codifican *JAK2*, *PD-L1* y *PD-L2*, potenciales dianas terapéuticas. Las amplificaciones del locus 9p se encuentran especialmente en el subtipo VEB, lo que es coherente con los estudios que muestran una alta expresión de *PD-L1* en tumores linfoides VEB positivos. Los casos amplificados mostraron altos niveles de ARNm y de expresión proteica de *JAK2*, *PD-L1* y *PD-L2* en el subtipo VEB positivo, lo que pone de manifiesto la necesidad de testar los antagonistas de *JAK2* y *PD-L1/2* en este subgrupo de pacientes con CG. Además, se detectaron deleciones focales en genes supresores de tumores como *PTEN*, *SMAD4*, *CDKN2A* y *ARID1A*.

El estudio del TCGA determina diferentes *clusters* o grupos de expresión génica para ARNm, mi-ARN y RPPA, sin embargo, no existe una correspondencia absoluta entre los grupos de expresión génica y los subtipos moleculares.

En el análisis de ARNm destaca el hallazgo de la omisión del exón 2 de *MET* en el 30 % de los CG analizados, asociado con un incremento en la expresión de *MET*, así como la presencia de nuevas variantes de *MET* en las que están implicados los exones 18 y/o 19. Curiosamente los exones omitidos son áreas codificantes de dominios tirosina quinasa.

En la revisión de los datos de RPPA observaron 45 proteínas cuya expresión o fosforilación se asoció con los cuatro subtipos moleculares. La fosforilación de *EGFR* (pY1068) estaba significativamente elevada en el subtipo CIN, lo que es concordante con la amplificación de *EGFR* en este subtipo. También encontraron una alta expresión de p53, lo que es congruente con la alta prevalencia de la mutación de *TP53* y aneuploidía en el subtipo CIN.

La comparación del perfil de expresión de cada subtipo con los restantes grupos y con tejido gástrico normal reveló algunos patrones a destacar, incluyendo la elevada expresión de componentes de la mitosis como *AURKA/B*, *E2F* (diana de activación de *MYC*), de la vía *FOXM1/PLK1* y componentes de la respuesta al daño del ADN en todos los subtipos moleculares, que es menor en tumores GS. Por el contrario, el subtipo GS presentaba elevada expresión de componentes de la vía de adhesión celular, incluyendo integrinas *B1/B3*, vías mediadas por *syndecan-1* y vías relacionadas con la angiogénesis. Estos resultados sugieren nuevas dianas terapéuticas candidatas para el desarrollo de fármacos, como las quinasas Aurora (*AURKA/B*) y Polo-like (*PLK*). En los tumores VEB positivos se evidenció una alta expresión de la vía de la *IL-12*, lo que sugiere una fuerte implicación de la respuesta inmune en este subtipo molecular de CG que, unido a la evidencia de la alta sobreexpresión de *PD-L1/2*, apoya fuertemente el desarrollo de fármacos inhibidores del sistema inmune en el CG VEB positivo.

El análisis integrado de las vías moleculares, incluyendo las alteraciones en el número de copias y las mutaciones, centrado en los receptores de tirosina quinasa y en las vías de *RAS* y *PI3K* condujo a las siguientes conclusiones:

- Los tumores VEB positivos presentaban mutaciones en *PIK3CA* y amplificaciones de *JAK2* y *ERBB2*.
- Los tumores MSI presentaban mutaciones en *PIK3CA*, *ERBB3*, *ERBB2* y *EGFR*, muchas de ellas en puntos críticos identificados en otros tumores. Destaca la ausencia de mutaciones de *BRAF* V600E, frecuentemente observada en cáncer colorrectal con MSI.
- El subtipo GS exhibe alteraciones en *RHOA* y *CDLN18*.

- En el subtipo CIN es frecuente la amplificación de receptores de tirosina quinasa, diana de agentes terapéuticos actualmente en uso o en desarrollo, como ramucirumab o inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (61).

Otro estudio importante publicado en los últimos años es el análisis génico y de expresión proteica de 300 tumores primarios gástricos realizado por The Asian Cancer Research Group (ACRG) (62), en el que se divide a los pacientes en cuatro subtipos con diferente pronóstico: mesenquimal (MSS/EMT), con inestabilidad de microsatélites (MSI), sin mutación de *TP53* (MSS/*TP53*-) y con mutación de *TP53* (MSS/*TP53*+), de peor a mejor pronóstico, respectivamente. La comparación del estudio del TCGA con el estudio del ACRG muestra algunas similitudes, como la presencia de un grupo con inestabilidad de microsatélites y la correspondencia entre los subtipos GS y MSS/EMT, VEB y MSS/*TP53*+, y CIN y MSS/*TP53*-. Sin embargo, los subtipos CIN y GS del estudio del TCGA se encuentran representados en todos los subtipos del ACRG y el porcentaje de adenocarcinoma gástrico difuso en cada uno de los estudios difiere de forma significativa en los subtipos GS y MSS/EMT respectivamente (57 % vs. 27 %). Además, cuando se aplica la clasificación molecular empleada por el TCGA sobre las muestras del estudio asiático no se evidencia la asociación pronóstica. Por lo tanto, ambas clasificaciones pueden considerarse complementarias y, actualmente, no existe una clasificación molecular con aplicabilidad práctica para el CG.

Respecto al valor predictivo de dichas clasificaciones, estudios retrospectivos que han aplicado la clasificación del TCGA han mostrado que los pacientes con subtipo CIN presentan el mayor beneficio con el tratamiento adyuvante, mientras que los pacientes con subtipo GS son los que menos se benefician (63). Sin embargo, la interpretación de los resultados está limitada por el carácter retrospectivo y la ausencia de aleatorización en la asignación del tratamiento. Recientemente se han publicado resultados exploratorios de los pacientes incluidos en los estudios MAGIC y CLASSIC, se muestra mejor supervivencia con quimioterapia perioperatoria asociada a cirugía en los pacientes con MSI baja o ausente frente a tumores con MSI alta, lo que sugiere ausencia de beneficio con el tratamiento perioperatorio en este último grupo (64,65). En el estadio avanzado, se han descrito respuestas significativas con fármacos anti-PD1 en pacientes con tumores con inestabilidad de microsatélites y VEB positivos (66). Estos resultados que apuntan al valor predictivo de la clasificación molecular deben validarse de forma prospectiva dentro de ensayos clínicos aleatorizados diseñados teniendo en cuenta los diferentes subgrupos moleculares de CG.

## CONCLUSIÓN

En la etiopatogenia del CG desempeña un papel importante la interacción entre factores ambientales (destacan la infección por *H. pylori*, la dieta y el tabaco, entre otros), genéticos y epigenéticos. Actualmente no existe una clasificación molecular del CG con aplicabilidad directa en la práctica clínica. No obstante, los diferentes estudios publicados en los últimos años sobre la caracterización molecular del CG y el mayor conocimiento de su etiopatogenia asientan las bases para la estratificación de los pacientes y el desarrollo racional de terapias dirigidas en distintos grupos de pacientes.

### CORRESPONDENCIA:

Asunción Díaz Serrano  
Servicio de Oncología Médica  
Complejo Asistencial de Zamora  
Av. de Requejo, 35  
49022 Zamora  
e-mail: asundiazserrano@gmail.com

## BIBLIOGRAFÍA

1. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992;52(24):6735-40.
2. Graziano F, Humar B, Guilford P. The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice. *Ann Oncol* 2003;14:1705.
3. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000;404(6776):398-402.
4. Thye T, Burchard GD, Nilius M, et al. Genomewide linkage analysis identifies polymorphism in the human interferon-gamma receptor affecting *Helicobacter pylori* infection. *Am J Hum Genet* 2003;72(2):448-53.
5. Zintzaras E. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms with genetic susceptibility to gastric cancer: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2006;51(7):618-24.
6. Edgren G, Hjalgrim H, Rostgaard K, et al. Risk of gastric cancer and peptic ulcers in relation to ABO blood type: a cohort study. *Am J Epidemiol* 2010;172(11):1280-5.
7. Bonney GE, Elston RC, Correa P, et al. Genetic etiology of gastric carcinoma: I. Chronic atrophic gastritis. *Genet Epidemiol* 1986;3:213.
8. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991;325(16):1127-31.
9. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 1991;325(16):1132-6.
10. Forman D, Newell DG, Fullerton F, et al. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ* 1991;302(6788):1302-5.
11. Forman D, Webb P, Parsonnet J. *H. pylori* and gastric cancer. *Lancet*. 1994;343(8891):243-4.
12. Group HaCC. Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut* 2001;49(3):347-53.
13. Parsonnet J. The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 1995;9(Suppl 2):45-51.



14. Kikuchi S, Ohgihara A, Hasegawa A, et al. Seroconversion and seroreversion of *Helicobacter pylori* antibodies over a 9-year period and related factors in Japanese adults. *Helicobacter* 2004;9(4):335-41.
15. Forman D, Sierra M. The current and projected global burden of gastric cancer (IARC Working Group Reports, No. 8). IARC *Helicobacter pylori* Working Group *Helicobacter pylori* eradication as a strategy for preventing gastric cancer. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2014.
16. Ford AC, Forman D, Hunt RH, et al. *Helicobacter pylori* eradication therapy to prevent gastric cancer in healthy asymptomatic infected individuals: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2014;348:3174.
17. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001;345(11):784-9.
18. Kuipers EJ, Pérez-Pérez GI, Meuwissen SG, et al. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(23):1777-80.
19. Franco AT, Johnston E, Krishna U, et al. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. *Cancer Res* 2008;68(2):379-87.
20. Ferreira RM, Machado JC, Figueiredo C. Clinical relevance of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in gastric carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28(6):1003-15.
21. González CA, Figueiredo C, Lic CB, et al. *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* genotypes as predictors of progression of gastric preneoplastic lesions: a long-term follow-up in a high-risk area in Spain. *Am J Gastroenterol* 2011;106(5):867-74.
22. Matos JI, de Sousa HA, Marcos-Pinto R, et al. *Helicobacter pylori CagA* and *VacA* genotypes and gastric phenotype: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013; 25(12):1431-41.
23. Mannick EE, Bravo LE, Zarama G, et al. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Res* 1996;56(14):3238-43.
24. Felley CP, Pignatelli B, van Melle GD, et al. Oxidative stress in gastric mucosa of asymptomatic humans infected with *Helicobacter pylori*: effect of bacterial eradication. *Helicobacter* 2002;7(6):342-8.
25. Hanada K, Graham DY. *Helicobacter pylori* and the molecular pathogenesis of intestinal-type gastric carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2014;14(8):947-54.
26. Toller IM, Neelsen KJ, Steger M, et al. Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(36):14944-9.
27. Shimizu T, Marusawa H, Endo Y, Chiba T. Inflammation-mediated genomic instability: roles of activation-induced cytidine deaminase in carcinogenesis. *Cancer Sci* 2012;103(7):1201-6.
28. Kurdistani SK. Histone modifications as markers of cancer prognosis: a cellular view. *Br J Cancer* 2007;97(1):1-5.
29. Nardone G, Compare D, De Colibus P, et al. *Helicobacter pylori* and epigenetic mechanisms underlying gastric carcinogenesis. *Dig Dis* 2007;25(3):225-9.
30. Graham DY. *Helicobacter pylori* update: gastric cancer, reliable therapy, and possible benefits. *Gastroenterology* 2015;148(4):719-31.e3.
31. Choi JJ, Kim CG, Lee JY, et al. Family history of Gastric Cancer and *Helicobacter pylori* treatment. *N Engl J Med* 2020; 382:427-36.
32. Takada K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Mol Pathol* 2000;53:255.
33. Murphy G, Pfeiffer R, Camargo MC, et al. Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differ base don sex and anatomic location. *Gastroenterology* 2009;137:824.
34. Van Beek J, zur Hausen A, Klein Kranenbargg E, et al. EBV-positive gastric adenocarcinoma: a distinct clinicopathological entity with low frequency of lymph node involvement. *J Clin Oncol* 2004;22:664.
35. Tsugane S, Sasazuki S. Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. *Gastric Cancer* 2007;10(2): 75-83.
36. Inoue M, Tajima K, Kobayashi S, et al. Protective factor against progression from atrophic gastritis to gastric cancer-data from a cohort study in Japan. *Int J Cancer* 1996;66(3):309-14.
37. Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol* 2003;56(1):1-9.
38. M A M, Pera G, Agudo A, et al. Cereal fiber intake may reduce risk of gastric adenocarcinomas: the EPIC-EURGAST study. *Int J Cancer* 2007;121:1618.
39. Ladeiras-Lopes R, Pereira AK, Nogueira A, et al. Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Cancer Causes Control* 2008;19(7):689-701.
40. Sjødahl K, Lu Y, Nilsen TI, et al. Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study. *Int J Cancer* 2007;120(1):128-32.
41. Tramacere I, Negri E, Pelucchi C, et al. A meta-analysis on alcohol drinking and gastric cancer risk. *Ann Oncol* 2012;23(1): 28-36.
42. Steevens J, Schouten LJ, Goldbohm RA, et al. Alcohol consumption, cigarette smoking and risk of subtypes of oesophageal and gastric cancer: a prospective cohort study. *Gut* 2010;59(1):39-48.
43. Turati F, Tramacere I, La Vecchia C, et al. A meta-analysis of body mass index and esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Ann Oncol* 2013;24(3):609-17.
44. Takeno S, Hashimoto T, Maki K, et al. Gastric cancer arising from the remnant stomach after distal gastrectomy: a review. *World J Gastroenterol* 2014;20:13734.
45. Henderson TO, OeffingerKC, Whitton J, et al. Secondary gastrointestinal cancer in childhood cancer survivors: a cohort study. *Ann Intern Med* 2012;156:757.
46. Ku GY, Ison DH. Esophagogastric cancer: targeted agents. *Cancer Treat Rev* 2010;36(3):235-48.
47. Cappetta A, Lonardi S, Pastorelli D, et al. Advanced gastric cancer (GC) and cancer of the gastro-oesophageal junction (GEJ): focus on targeted therapies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2012;81(1):38-48.
48. Marano L, Chiari R, Fabozzi A, et al. c-Met targeting in advanced gastric cancer: An open challenge. *Cancer Lett* 2015; 365(1):30-6.
49. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010;376(9742):687-97.
50. Gomez-Martin C, Plaza JC, Pazo-Cid R, et al. Level of HER2 gene amplification predicts response and overall survival in HER2-positive advanced gastric cancer treated with trastuzumab. *J Clin Oncol* 2013;31(35):4445-52.
51. Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ, et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2014;383(9911):31-9.
52. Wilke H, Muro K, Van Cutsem E, et al. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15(11):1224-35.
53. Tan IB, Ivanova T, Lim KH, et al. Intrinsic subtypes of gastric cancer, based on gene expression pattern, predict survival and respond differently to chemotherapy. *Gastroenterology* 2011;141(2):476-85, 485.e1-11.
54. Lei Z, Tan IB, Das K, et al. Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to PI3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil. *Gastroenterology* 2013;145(3): 554-65.

55. Shah MA, Khanin R, Tang L, et al. Molecular classification of gastric cancer: a new paradigm. *Clin Cancer Res* 2011;17(9):2693-701.
56. Ganesan K, Ivanova T, Wu Y, et al. Inhibition of gastric cancer invasion and metastasis by PLA2G2A, a novel beta-catenin/TCF target gene. *Cancer Res* 2008;68(11):4277-86.
57. Ali SM, Sanford EM, Klemperer SJ, et al. Prospective comprehensive genomic profiling of advanced gastric carcinoma cases reveals frequent clinically relevant genomic alterations and new routes for targeted therapies. *Oncologist* 2015;20(5):499-507.
58. Network CGAR. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014;513(7517):202-9.
59. Bernal M, Ruiz-Cabello F, Concha A, et al. Implication of the  $\beta$ 2-microglobulin gene in the generation of tumor escape phenotypes. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61(9):1359-71.
60. Dulak AM, Stojanov P, Peng S, et al. Exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity. *Nat Genet* 2013;45(5):478-86.
61. Schwartz GK, Ilson D, Saltz L, et al. Phase II study of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol administered to patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 2001;19(7):1985-92.
62. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med* 2015;21(5):449-56.
63. Sohn BH, Hwang JE, Jang HJ, et al. Clinical Significance of Four Molecular Subtypes of Gastric Cancer Identified by The Cancer Genome Atlas Project. *Clin Cancer Res* 2017; Jul 26 [Epub ahead of print].
64. Smyth EC, Wotherspoon A, Peckitt C, et al. Mismatch Repair Deficiency, Microsatellite Instability, and Survival: An Exploratory Analysis of the Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy (MAGIC) Trial. *JAMA Oncol* 2017;3(9):1197-203.
65. Choi YY, Kim H, Shin SJ, et al. Microsatellite Instability and Programmed Cell Death-Ligand 1 Expression in Stage II/III Gastric Cancer: Post Hoc Analysis of the CLASSIC Randomized Controlled study. *Ann Surg* 2019;270(2):309-16.
66. Kim ST, Cristescu R, Bass AJ, et al. Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer. *Nat Med* 2018;24(9):1449-58.