

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



ANÁLISIS DE CUATRO VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN MUESTRAS DE
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO POR MEDIO DE LA TECNOLOGÍA DE PCR
ARRAY

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

EDUARDO ALBERTO SAGREDO CAMPOS
PROFESOR GUÍA: ANA GUTIERREZ MORAGA
TEMUCO – CHILE

2011

“ANÁLISIS DE CUATRO VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN MUESTRAS DE
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO POR MEDIO DE LA TECNOLOGÍA DE PCR
ARRAY”

PROFESOR GUÍA

: _____

Ana Gutiérrez Moraga
Profesor en Biología y Cs Naturales
Dra. En Ciencias mención en Biotecnología de Plantas
Departamento de Producción Agropecuaria
Universidad de La Frontera

PROFESORES CONSEJEROS

: _____

Carolina del Carmen Bizama Soto
Tecnólogo Médico
Doctora en Ciencias Mención Biología Celular y Molecular,
Universidad de La Frontera
VentureLab, Escuela de Negocios
Universidad Adolfo Ibáñez

CALIFICACIÓN PROMEDIO TESIS

: _____

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos hacia todas las personas que contribuyeron en la realización de este trabajo, que con su apoyo, amistad y compañía permitieron el buen término de este.

A mis tutores, Dra. Carolina Bizama y Dr(c). Jaime Espinoza que diariamente me brindaron su apoyo, amistad y simpatía en este proceso. En particular a la Dra. Bizama por brindarme la guía y orientación en este trabajo, la cual fue fundamental para que este trabajo llegara a buen puerto. La paciencia y empatía que mostró conmigo a lo largo de este año fue una constante, muchas gracias. Jaime por su parte, representó el más cercano de mis compañeros en este proceso: su amistad y guía profesional me hacen reconocerle como un muy buen amigo en estos momentos.

A la Dra. Ana Gutiérrez y el Dr. Manuel Gidekel por brindarme su apoyo y confianza al permitirme trabajar y colaborar en sus laboratorios, durante ya 5 años, lo que me ha permitido crecer y formarme como profesional.

A todo el equipo y personas con quienes compartí en el laboratorio VentureLab: Mónica Ramírez, Dr(c) Graciela Berríos, Dr. Gustavo Cabrera, Dra. Yamilé Bernardo, Dr. Felipe Benavente, Dra. Jennifer Osorio, Ismael Riquelme, Daniel Weinacker, Hernán García, Mg. Priscilla González y Francisco Gamín, por sus gestos, apoyo y buenos momentos compartidos. Gracias por incluirme en este gran grupo humano.

De manera especial quiero agradecer a toda mi familia, que siempre me ha apoyado de manera incondicional, con los cuales celebramos nuestros triunfos y compartimos todas nuestras derrotas. A mi madre, Patricia, y mi padre, Flavio, que me han inculcado la necesidad e inquietud de continuar estudiando y que en particular, han sido fundamentales en este proceso. A mi hermano por ser mi amigo y compañero, el cual siempre ha estado conmigo.

Finalmente, agradecer a todas aquellas personas que me han acompañado a lo largo de todo este proceso, crean de verdad que les estoy muy agradecido y que han sido aportes reales a mi formación personal y profesional.

ÍNDICE

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Epidemiología y problemática general	3
2.2	Desarrollo y características del cáncer	5
2.3	Carcinogénesis gástrica	8
2.4	Vías de señalización y su relación con el cáncer	11
2.4.1	Vía de Wingless	13
2.4.2	Vías no Canónicas de Wnt	14
2.4.3	Vía de señalización Fosfoinositol trifosfato Quinasa y proteína quinasas	15
2.4.4	Angiogénesis y progresión del cáncer	18
2.4.5	Vía de <i>Hedgehog</i> y cáncer	20
2.5	PCR en tiempo real y uso para la detección de anomalías	22
3	MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1	Obtención y selección de muestras	26
3.1.1	Obtención de muestras	26
3.1.2	Conservación de los tejidos	26
3.1.3	Diseño y selección de muestras	27
3.2	Tratamiento de las muestras	27
3.2.1	Protocolo de Trizol	27
3.2.2	Purificación del ARN	28
3.2.3	Cuantificación del ARN	28
3.2.4	Determinación de la integridad del ARN	29
3.2.5	Síntesis del ADNc	29
3.2.6	Reacción de PCR en tiempo real y PCR Array	29
3.3	Análisis de los Resultados	30

3.3.1	Análisis para la búsqueda de genes normalizadores y cálculo de valores de expresión	30
3.3.2	Presentación de genes diferenciales	31
3.3.3	Relación de marcajes inmunohistoquímicos derivados del análisis de genes	31
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1	Elección de muestras, análisis de enriquecimiento de vías de señalización	32
4.2	Extracción de ARN y calidad de las muestras	34
4.3	Control de calidad de las PCR Array	35
4.3.1	Análisis de eficiencia de la reacción de PCR	35
4.3.2	Curvas de disociación	37
4.3.3	Ciclado promedio por vía de señalización utilizada	40
4.3.4	Selección y pruebas de estabilidad de normalizadores	42
4.4	PI3K Pathway Array y genes desregulados	45
4.5	Angiogénesis Pathway Array y genes desregulados	51
4.6	WNT/Hedgehog Pathway Array y genes desregulados	56
4.7	Activación linfocitaria Pathway Array y genes desregulados	62
4.8	Relación entre la expresión de ARNm y marcaje de proteínas por medio del uso del Human Atlas Protein.	65
5	CONCLUSIONES	71
6	RESUMEN	72
7	SUMMARY	73
8	LITERATURA CITADA	74
9	ANEXOS	96

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico representa la tercera causa de muerte en hombres y la quinta causa de muerte en mujeres mediadas por la totalidad de los cánceres en el mundo, siendo países en desarrollo donde la enfermedad presenta los mayores índices de persistencia. Chile se cuenta como uno de los países con mayores tasas de la enfermedad, siendo la primera causa de muerte mediada por tumores malignos en ambos sexos. Esta enfermedad se caracteriza por tener una variada etiología, lo que ha dificultado su entendimiento y tratamientos efectivos, siendo la gastrectomía total la única medida que ha elevado la sobrevida de pacientes en estadios avanzados de la enfermedad. Si bien, se reconocen factores de riesgo poblacionales como el tabaquismo y las lesiones provocadas por el patógeno *Helicobacter pylori*, los eventos genéticos característicos de este cáncer y el conocimiento de marcadores pronósticos en esta enfermedad son precarios.

Es por esto, que un mejor entendimiento molecular de los factores genéticos involucrados en la enfermedad podría contribuir en la identificación de nuevos biomarcadores, como también en la formulación de terapias más efectivas y menos invasivas. Por otra parte, no existe claridad sobre la participación y desregulación de vías de señalización específicas en la enfermedad, lo que contrasta con otros tipos de cánceres, que presentan marcadas desregulaciones genéticas y vías de señalización particulares.

Basados en estos antecedentes y dada la importancia que representa el estudio de esta enfermedad, con motivo a comprender los cambios de expresión y el comportamiento de las vías de señalización relacionadas al cáncer gástrico, la hipótesis en esta investigación postula lo siguiente: Las vías de señalización de fosfoinositol 3-quinasa (PI3K/AKT), wnt (WNT), angiogénesis y activación linfocitarias se encuentran desreguladas en tejidos gástricos cancerosos, pudiendo encontrarse nuevos genes para el estudio de la enfermedad.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la expresión génica de las vías de señalización de fosfoinositol 3-quinasa (PI3K/AKT), Wnt, angiogénesis e inflamación en tejidos tumorales gástricos y sus respectivos controles.

Objetivos específicos

Analizar los cambios de expresión de genes pertenecientes a las vías de señalización de fosfoinositol 3-quinasa (PI3K/AKT), Wnt, angiogénesis e inflamación mediante la técnica de PCR Array.

Identificar la relación de los análisis derivados del PCR Array con la base de datos del Human Atlas Protein (HAP).

Determinar la asociación existente entre los genes desregulados y la enfermedad con bases de datos y revisión bibliográfica.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. Epidemiología y problemática general.

El cáncer gástrico representa el 10% de las muertes mundiales derivadas de los diferentes tipos de cáncer, con una estimación de 1.000.000 de nuevos casos reportados y 735.000 muertes para el año 2008. Presenta una incidencia promedio de 16.7 casos por cada 100.000 hombres y 7.3 casos reportados por cada 100.000 mujeres (Jemal *et al.*, 2011). En Chile, fallecen alrededor de 3000 personas al año por esta enfermedad (Heise *et al.*, 2009) siendo Latinoamérica, donde se presenta una de las mayores tasas de prevalencia masculina de la enfermedad (Riva *et al.*, 2004). Países como Chile, Costa Rica y Ecuador presentan tasas de prevalencia masculina cercanas a los 17 casos masculinos por cada 100.000 habitantes, comparado con países como Canadá y Estados Unidos donde la prevalencia masculina no supera los 4 casos masculinos por cada 100.000 habitantes (Bosetti *et al.*, 2005). Por otro lado, la incidencia mundial y regional en mujeres es siempre menor, mientras que en América del Sur la incidencia en mujeres bordea los 9.7 nuevos casos por cada 100.000 mujeres, América del Norte presenta ratios cercanos a 2.5 nuevos casos por cada 100.000 mujeres (Jemal *et al.*, 2011).

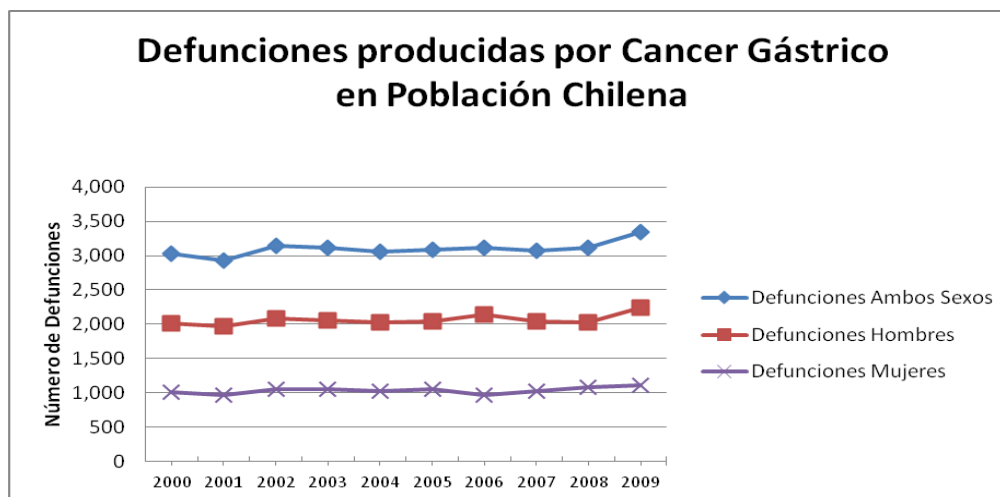


Figura 1. Mortalidad por tumores malignos de estómago según sexo (2000-2009). Fuente: Departamento de Estadísticas e Información en Salud (DEIS). Ministerio de Salud, Chile.

Por sus características el cáncer gástrico es una enfermedad silente (Catalano *et al.*, 2009), donde la mayoría de los pacientes logran ser diagnosticados en estadios avanzados o metastásicos de la enfermedad (Saif *et al.*, 2010). Una de las razones del diagnóstico tardío se debe a la sintomatología poco específica de los pacientes, vinculada a procesos de dispepsia tales como reflujo, flatulencia, dolor abdominal y en raras ocasiones vómitos dolorosos (Axon, 2006).

Así, cerca del 30% de los pacientes diagnosticados con cáncer gástrico presentan historial de dispepsia en distintos grados, incluyendo pacientes con úlceras gástricas (Tsugane and Sasazuki, 2007). La supervivencia de los pacientes con fases avanzadas de la enfermedad no supera los 6 a 8 meses de vida, siendo muy raro encontrar pacientes metastásicos con supervivencia superior a los 2 años con terapias coadyuvantes (Valentini *et al.*, 2009).

El cáncer de estómago se encuentra frecuentemente en pacientes de avanzada edad, con un promedio de edad cercano a los 60 años (Mineur *et al.*, 2010), vinculándose su malignidad con el aumento etario de los pacientes, que dificulta el diagnóstico y tratamiento ya que las primeras lesiones preneoplásicas pueden desarrollarse con mucha anterioridad y estar vinculadas a cuadros infecciosos e ulcerosos (Peng and Wang, 2010).

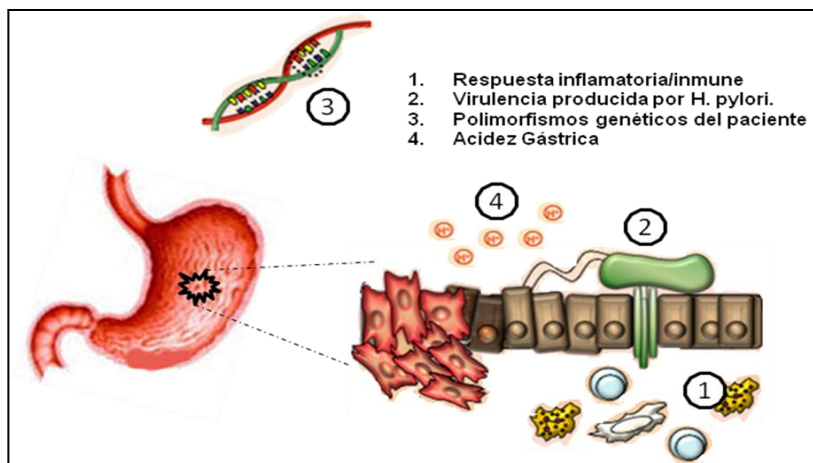


Figura 2. Esquema de factores involucrados de la enfermedad, destacando la incidencia de *H. pylori*, polimorfismos asociados a la enfermedad, como también acidez y cuadros ulcerosos. Modificado de (Kim *et al.*, 2011).

Aproximadamente el 18% de los cánceres gástricos podrían ser atribuidos al hábito de fumar (Tsugane and Sasazuki, 2007). Otro factor de riesgo importante es el mediado por la infección de *Helicobacter pylori* (Kim et al., 2011), la cual puede generar e intervenir, mediante distintos mecanismos, la transformación y generación de lesiones gástricas malignas (Polk and Peek, 2010), se estima que aproximadamente el 70% de todos los cánceres gástricos presentan relación con la infección de la bacteria *Helicobacter pylori* (Brenner et al., 2009) siendo esta declarada como un agente etiológico de la enfermedad en el año 1994 por la Organización Mundial de la Salud (Kusters et al., 2006), correlacionado de forma positiva con la desregulación de distintas vías de señalización y los fenotipos cancerosos (Wu et al., 2010).

2.2. Desarrollo y características del cáncer.

El cáncer primario es una definición histopatológica que refiere al tumor *in situ* dentro de un tejido, toda vez que su desarrollo está mediado por diversidad de aberraciones genéticas. Vogelstein (2004), describe que estas mutaciones involucran grupos de genes que median la iniciación del cáncer y su progresión, los cuales incluyen genes supresores de tumores, pro-oncogenes y genes que median la estabilidad celular (Nguyen *et al.*, 2009).

Los genes supresores de tumores desempeñan la función de inhibir la proliferación o producir la apoptosis de la célula en presencia de anomalías ambientales, metabólicas o genéticas (Duensing and Duensing, 2005). La desregulación de estos genes y las distintas mutaciones presentes en ellos son características en la diversidad de cánceres primarios y secundarios. Entre los genes supresores de tumores más importantes se encuentran los genes p56, p21, p16 y la familia de genes SMAD (APC4), encargados de modular el ciclo celular, produciendo su arresto por medio del secuestro o inhibición de las ciclinas. Alteraciones a estos genes producen como resultante un descontrol de este proceso por parte de la célula. (Garcea *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008).

Los pro-oncogenes, son genes heredables de forma mendeliana cuyas características *per se* promueven la aparición del cáncer en los portadores. En el cáncer gástrico se han identificado un grupo de pro-oncogenes que se ha relacionado con el cáncer gástrico familiar, cuya desregulación conduce a una menor actividad de E-Cadherina, proteína de unión a matriz celular, que se ha reportado mutada en sobre un 90% de los pacientes. (Oliveira *et al.*, 2009a; Oliveira *et al.*, 2009b).

Por último, en los genes responsables del metabolismo celular y sobrevivencia normal en la célula, denominados genes mediadores de la estabilidad celular, se ha descrito que mutaciones o modificaciones de su función son los responsables de las primeras evidencias proliferativas y los desórdenes que llevan a la progresión y invasión del cáncer.

Weinberg (2000) describió el conjunto de alteraciones fisiológicas y genéticas que adquieren las células tumorales, siendo estas: la autosuficiencia de factores de crecimiento, evasión de la apoptosis, crecimiento ilimitado, angiogénesis, invasión y metástasis tumoral.

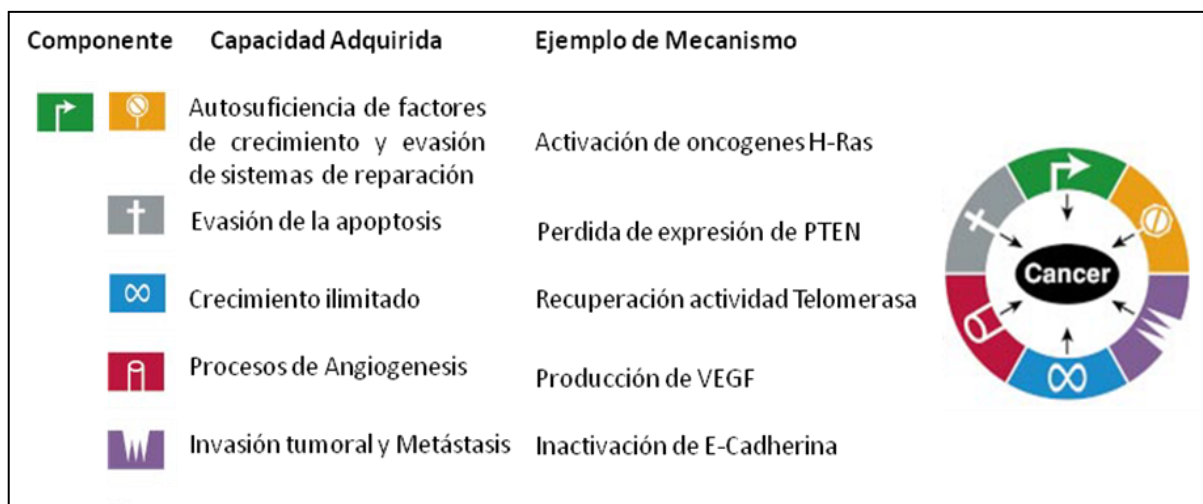


Figura 3. Procesos relacionados al cáncer. Se presentan las cinco características propias de la enfermedad, con énfasis en algunos de los mecanismos moleculares característicos para cada uno de ellos. Adaptado desde Weinberg 2000.

En condiciones normales las células requieren de agentes mitógenos para poder crecer y proliferar, estas señales pueden ser propias de la célula o producidas en otras células aledañas las cuales pasan desde un estado inactivo o quiescente a un estado proliferativo, no existiendo evidencia que algún tipo celular pueda proliferar en ausencia de este tipo de señales (Getzenberg and Coffey, 2011). En el cáncer, se ha identificado que estas señales dejan de ser dependientes del organismo y las células cancerosas son capaces de generar sus propias señales de crecimiento, reduciendo de forma drástica su dependencia a estímulos ambientales y al entorno celular (Houghton *et al.*, 2007) además, son capaces de evadir los sistemas de arresto celular, como también pueden evadir la muerte celular programada, fundamental en la homeostasis de un organismo sano (Greaves, 2010), siendo insensibles a las señales inhibitorias orgánicas o sistémicas (Gontero *et al.*, 2004).

Un fenómeno característico de las células tumores y el cáncer como enfermedad es la angiogénesis aumentada, proceso natural en tejidos normales y dañados por el cual se genera nueva vascularización a partir de vasos ya existentes, que en el cáncer está mediado por la necesidad del tumor de obtener nutrientes y oxígeno de manera tal que pueda seguir su desarrollo descontrolado. Siendo la angiogénesis un evento recurrente en tumores avanzados (Carmeliet and Jain, 2011). Así también, el desprendimiento celular y colonización desde espacios confinados hacia otros sectores del organismo, denominado como metástasis, es común para múltiples tipos avanzados de la enfermedad (Brooks *et al.*, 2010). Este proceso, caracterizado por la pérdida de expresión de proteínas de sujeción a la matriz celular, como integras y cadherinas, permite la invasión a tejidos adyacentes y el viaje de células malignas, por medio del torrente sanguíneo, a distintas partes del cuerpo, siendo esta la causa de muerte en más del 90% de los cánceres humanos (Weber, 2008; Hanahan and Weinberg, 2011).

2.3. Carcinogénesis gástrica.

Si bien existen variadas clasificaciones para los cánceres gástricos, la clasificación mayormente aceptada es la clasificación de Lauren (Lauren, 1965), la cual corresponde a una clasificación histológica que divide las muestras cancerosas en dos tipos: el tipo intestinal y el tipo difuso (Saif *et al.*, 2010). El tipo intestinal, presenta diferenciación clara y compacta, caracterizada por células neoplásicas que tienden a la formación de estructuras tubulares, con pobre diferenciación comparado a los túbulos normales (Yasui *et al.*, 1999), mientras que el segundo modelo, denominado cáncer de tipo difuso, está representado por células con alto contenido de infiltración y células no cohesivas entre sí, formando una masa tumoral poco discreta (Wright *et al.*, 1992; Ming, 1998). La proporción de cánceres gástricos existentes señala que aproximadamente el 50% de los cánceres gástricos son del tipo intestinal, siendo un 35% de clasificación difusa y un 15% restante de clasificación mixta o sin clasificar (Catalano *et al.*, 2009).

Debido a las marcadas diferencias entre la clasificación histopatológica de este tipo de cáncer se ha postulado la existencia de dos formas que modulan la progresión del cáncer gástrico, este modelo propuesto por Yasui *et al.* (2001) describe que a lo largo de la progresión tumoral existen alteraciones genéticas comunes a otros tipos de cáncer, como la pérdida de actividad génica de genes supresores de tumores, activación de oncogenes, pérdida de actividad reparadora del DNA, apoptosis y arresto celular, sumado a un aumento de proteínas y expresión de genes de ciclo celular, mediado además por procesos epigenéticos y pérdida de estabilidad cromosómica (Huiping *et al.*, 2002), describiendo la desregulación de vías de señalización tales como E2F, K-RAS, P53 y WNT/B-Catenina en distinta frecuencia en este tipo de cáncer (Ooi *et al.*, 2009) que en contraposición a otros tipos de cáncer, como el cáncer pancreático y de colon, no se han descrito vías de señalización particulares para el cáncer gástrico. (Fearon and Vogelstein, 1990; Maitra and Hruban, 2008).

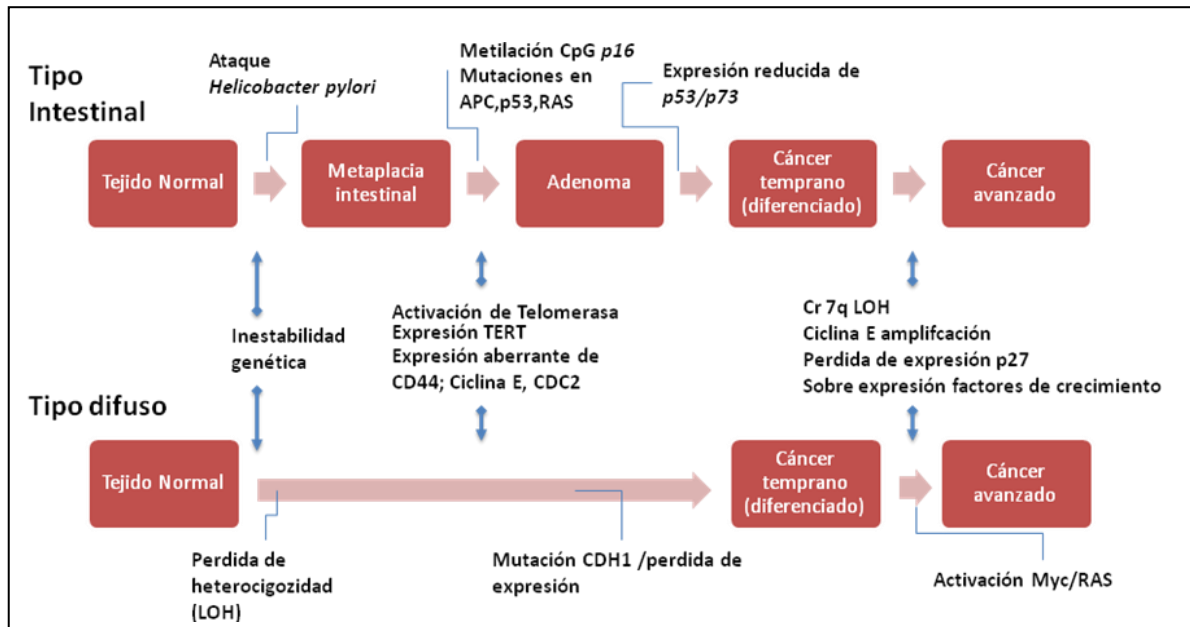


Figura 4. Modelo de progreso del cáncer gástrico. El modelo contempla los dos tipos histológicos de Lauren y las distintas modificaciones genómicas que se presentan en ellos con el tiempo. Adaptado de Yasui *et al.* (1999).

Ambos modelos consideran desregulaciones vinculadas a la pérdida de estabilidad cromosómica, pérdida de la proteína supresora de tumores p56 y APC, ligado a la activación de distintas ciclinas, íntimamente relacionada con el aumento de la proliferación y la reactivación de la telomerasa. Sin embargo, el tipo difuso se caracteriza por la pérdida de expresión de E-Cadherina (CDH1) e inestabilidad cromosómica (Kaurah *et al.*, 2007; Corso *et al.*, 2011). Múltiples estudios enfocados a la citogenética de diferentes cánceres han dado cuenta que los principales cambios citogenéticos del cáncer gástrico responden a aneuploidias, polisomias y translocaciones cromosómicas (Ferti-Passantonopoulou *et al.*, 1987; Panani, 2008), las cuales pueden conducir a cambios de la expresión génica y a la producción de proteínas aberrantes o quiméricas. Las aberraciones numéricas más observadas en el cáncer gástrico son las trisomias de los cromosomas 8, 9 y 19, sumado a la aparición del isocromosoma i(8q), descrito en gran cantidad de trabajos. Además, se han reportado rearrreglos y ganancias cromosómicas para los cromosomas 1, 6, 7, 8, 11, 13, 14 y 17 (van Dekken *et al.*, 1990; Beuzen *et al.*, 2000; Chun *et al.*,

2000). Algunos estudios señalan que no existe correlación entre los cambios genéticos presentes en la enfermedad con el tipo histológico del cáncer gástrico, aun cuando se ha descrito que la existencia de rearrreglos o cariotipos específicos se correlacionan con peores pronósticos de la enfermedad (Panani, 2008).

En conjunto con las anomalías numéricas, se ha descrito que en el cáncer gástrico existe un fenómeno denominado pérdida de heterocigosidad, que afecta a los segmentos cromosómicos 1p, 3p, 4p, 5q, 7p, 8p, 8q, 9p, 12p, 13q, 17p, 18q, 20q y 22q, asociándose estos cambios a la pérdida de función de importantes genes regulatorios de los procesos de arresto y control del crecimiento celular como p53, PTEN, DDC, DPC4, SMAD4 y APC. Muchas de las aberraciones genéticas como amplificaciones, deleciones y mutaciones puntuales pueden conducir a alteraciones génicas en regiones regulatorias o codificantes de algunos genes, describiéndose en el cáncer gástrico la sobreexpresión y amplificación de los genes *c-met*, *K-sam*, *c-erbB2*, *Kras*, *Bcl-2*, *c-myc* y *ciclina E*, importantes genes vinculados a la progresión y agresividad del cáncer, por otro lado, se ha descrito la inhibición de la expresión génica de proteínas de reparación y arresto celular, como *E-Cadherina*, *p27*, *p16* y *RAR β* (Stock and Otto, 2005).

Finalmente, existe un componente epigenético importante en la enfermedad, vinculado a los cambios de la expresión génica sin la alteración de la estructura del DNA, relacionado a la influencia de la metilación de las islas CpG en las regiones promotoras múltiples genes donde se ha descrito la existencia de la hipermetilación de los genes *CDH1*, *DKK3*, *PTEN* y *MGMT* (Nobili *et al.*, 2011).

2.4. Vías de señalización y su relación con el cáncer.

Múltiples autores han caracterizado las vías de señalización involucradas en la progresión y desarrollo del cáncer, siendo su desregulación fundamental para la producción de este fenotipo. Entre las vías de señalización oncogénicas, se ha descrito aquellas vinculadas a la regulación del ciclo celular, factores de crecimiento, así como vías de señalización relacionadas a la biología del desarrollo (Weinberg, 2000; Vogelstein, 2004; Baudot *et al.*, 2010; Hanahan and Weinberg, 2011). En la figura 5, se observan las vías de señalización alteradas en los distintos tipos de cáncer, siendo algunas de ellas factores comunes para la enfermedad.

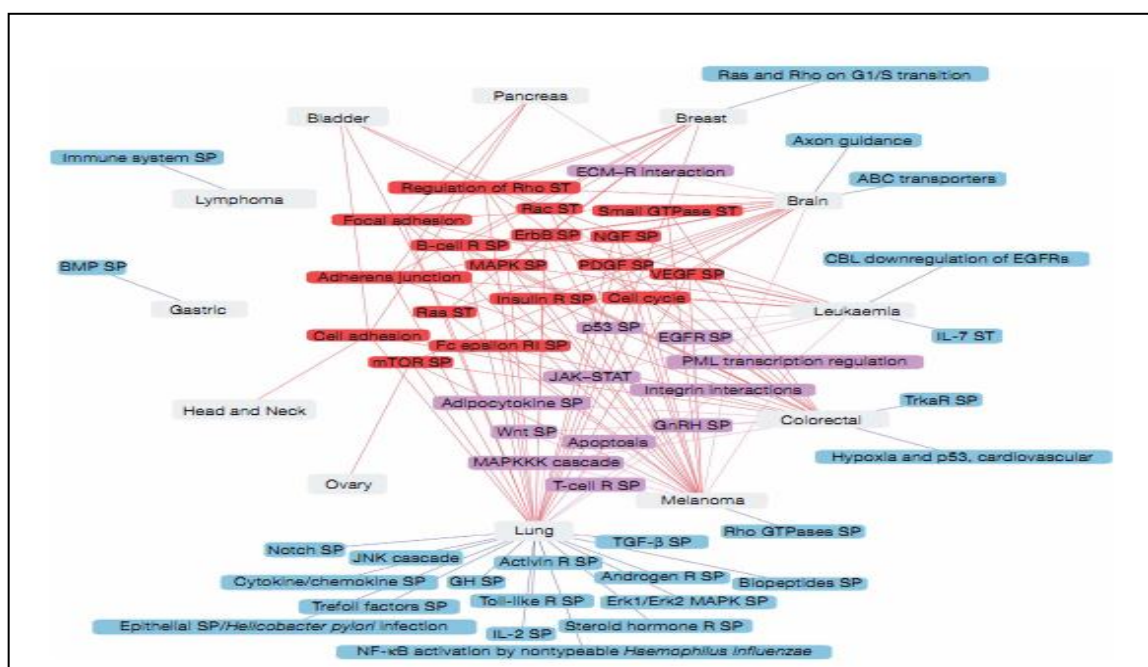


Figura 5. Relación de las distintas vías de señalización en distintos tipo de cáncer. En rojo se resaltan las vías de señalización comunes en más de 5 tipos cancerosos y en color púrpura se destacan las vías de señalización involucradas en el desarrollo de al menos 3 tipos cancerosos. Por otro lado en celeste, se resaltan las vías particulares para un tipo de cáncer. Adaptado desde Baudot *et al.* (2010).

Múltiples vías metabólicas se encuentran relacionadas con las distintas etapas y procesos de transformación tumoral, así también genes claves de estas vías se encuentran habitualmente mutados en diversidad de tumores (Ding *et al.*, 2008). En el cuadro 1 se desglosan algunos de estos genes mutados, con las respectivas vías de señalización a las que pertenecen.

Nombre del Gen	Cáncer(es) involucrado(s)	Vías de señalización relacionadas
<i>CTNNB1</i>	Colon, hígado	APC/WNT
<i>BCL2</i>	Linfomas	APOP
<i>BAX</i>	Colon, gástrico	APOP
<i>GLI</i>	Cerebro, sarcomas	GLI/HG
<i>HPVE6</i>	Cuello	P53/HG
<i>NOTCH1</i>	Leucemias	HG
<i>AKT2</i>	Ovario, mama	PI3K
<i>PI3KCA</i>	Colon, gástrico, cerebro,	PI3K
<i>CCND1</i> (cyclin D1)	Leucemias, mama	RB/CC
<i>HPVE7</i>	Cuello	RB/CC
<i>TAL1</i>	Leucemia	RB/CC
<i>TFE3</i>	Hígado, sarcomas	RB/CC
<i>ABL1</i> (<i>ABL</i>)	Leucemia	RTK
<i>BRAF</i>	Melanoma, colon rectal,	RTK
<i>EGFR</i>	Glioblastomas	RTK
<i>EPHB2</i>	Próstata	RTK
<i>ERBB2</i>	Mama, ovario	RTK
<i>MYC, MYCN,</i>	Neuroblastoma, pulmón	WNT
<i>JAK2</i>	Leucemias	RTK
<i>KRAS2, N-RAS</i>	Colon rectal, pancreático	RTK
<i>PDGFB</i>	Dérmico, fibroblastoma	ANG
<i>RUNX1</i>	Leucemias	SMAD
<i>TGFBR1, TGFBR2</i>	Colon, gástrico, ovario	ANG
<i>HOXA9, 11, 13;</i>	Leucemias	HG
<i>MAP2K4</i> (<i>MKK4</i>)	Páncreas, mama, colon	HG

Cuadro 1. Genes y su relación a vías de señalización. APC/WNT: Refiere a la activación de la vía WNT. GLI/HG: Stem cell y Hedgehog. PI3K: Refiere a la vía de proteínas quinasas. RB/CC: activación de retinoblastoma y ciclo celular. RTK: señalización de Tirosina quinasas, incluyen vías de señalización de RAS y ligandos. ANG: angiogénesis. HG: Stem cell y Hedgehog. Adaptado de Vogelstein (2004).

2.4.1. Vía de Wingless. Las proteínas Wnt son un conjunto de proteínas con actividad pleiotrópica, vinculadas a eventos del desarrollo en la embriogénesis y homeostasis de múltiples tejidos en adultos (Bowerman, 2008). Esta familia de proteínas fue descubierta en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, presentando una alta homología con un grupo de proteínas humanas. En *Drosophila*, su inhibición produce fenotipos aberrantes carentes de alas y por lo mismo se les denominó *wingless* y Wnt en humanos (Camilli and Weeraratna, 2010). En distintos estadios celulares, las proteínas Wnt son secretadas uniéndose de forma directa con sus ligandos Frizzled o Fz, proteínas transmembrana que actúan como receptores de Wnt y los antagonistas competitivos WIF y FRLP. Por otro lado Fz y la unión de ligando a Wnt necesita de un correceptor denominado LRP, el cual presenta sitios de interacción con WIF, de forma que la inhibición de la vía pasa por su interacción con el correceptor (Logan and Nusse, 2004).

Al unirse Wnt, o cualquiera de sus isoformas, a los receptores de membrana Frizzled se media una respuesta intracelular. Tanto Fz como LRP modifican su estructura interna de la membrana, capturando proteínas particulares, que permiten la activación de β -catenina y el desencadenamiento de distintas respuestas celulares (Klaus and Birchmeier, 2008; Komiya and Habas, 2008). β -catenina está constitutivamente unida a la proteína APC y a Axina, las cuales permiten la continua fosforilación de esta, mediada por CKI y GSK3 β , siendo esta ubiquitinada y degradada. Al estar presente WNT, LRP es capaz de interaccionar con Axina desacoplándose el conjunto APC/GSK3B/Axina, cuyo resultado será la difusión y activación de β -catenina, activando distintas respuestas celulares, todas ellas involucradas al aumento de la transcripción, metabolismo y ciclo celular (Angers and Moon, 2009). Una vez que β -catenina se presenta de manera estable en el citoplasma, esta pueda difundir al núcleo e interaccionar con los factores de transcripción TCF/LEF, factores de transcripción que promueven la expresión de múltiples genes, muchos de ellos de importancia en el cáncer, incluyéndose c-Myc, múltiples ciclinas, y ciclooxigenasa 2 (COX2) (You *et al.*, 2002; Araki *et al.*, 2003).

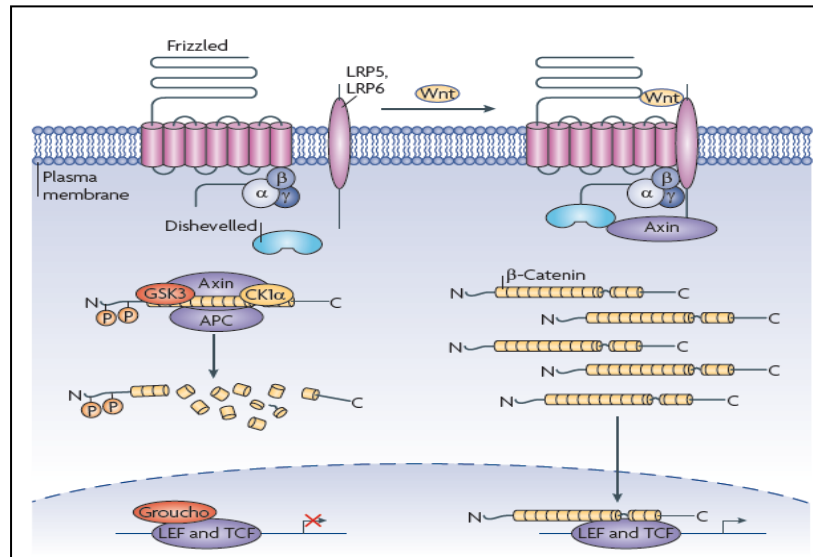


Figura 6. Activación de la vía Wnt Canónica. Se presenta el complejo AXIN/APC/GSK3 β inhibiendo y promoviendo la degradación de β -catenina, al estar WNT este produce el secuestro de Axina desacoplando el complejo y permitiendo la actividad de β -catenina. Fuente: Angers and Moon (2009).

Se ha demostrado que la activación de esta vía de señalización está relacionada con distintos tipos de cánceres, incluyendo el cáncer de hígado, colon, pulmón, piel y mama. Así también, la acumulación de β -catenina y su detección, por medio de técnicas inmunohistoquímicas, presenta una alta correlación con pobres pronósticos para estos tipos de cánceres (Ng et al., 2005).

2.4.2. Vías no canónicas de Wnt. Se ha demostrado que WNT puede activar distintos procesos bajo distintos mecanismos, los cuales son denominados vías Wnt no canónicas o heréticas (Camilli and Weeraratna, 2010). Existen al menos dos mecanismos en la literatura que diferencian de la vía explicada con anterioridad, la vía PCP y una vía de señalización mediada por Calcio (Ca^{+2}). La primera, relacionada con polaridad celular en el desarrollo, es capaz de activar la cascada de señalización JAK/STAT, como también otras quinasas implicadas en la polaridad y capacidad del tumor en expandirse, tales como Rho y Rac. La vía Wnt/ Ca^{+2} , por su parte, está modulada por la isoforma WNT5a, la cual al interactuar con su ligando Fz es capaz de movilizar fosfoinositol trifosfato (PIP3), posibilitando la liberación de Ca^{+2} desde el retículo

endoplasmático. Como resultado de la movilización de PIP3 es activada la proteína quinasa C (PKC), la cual es capaz de mediar múltiples vías relacionadas con el cáncer y ciclo celular, modulando la polaridad celular y la liberación de Ca^{+2} (Widelitz, 2005; Cheng *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2010) .

2.4.3. Vía de señalización Fosfoinositol trifosfato Quinasa y proteína quinasas. La vía de señalización fosfoinositol trifosfato quinasa o PI3K, es una vía clásica de estudio en multiplicidad de enfermedades, parte de ella está involucrada procesos de crecimiento, metabolismo y muerte celular (Fresno Vara *et al.*, 2004; Carnero *et al.*, 2008). Componentes claves de esta vía se relacionan a la disponibilidad de PIP3, un lípido que es capaz de activar a esta quinasa y interactuar con AKT y PTEN, esta última, una fosfatasa cuya actividad responde a un gen supresor de tumores inactivando a AKT, actuando como *feedback* negativo de esta proteína. (Jiang and Liu, 2009).

Las prostaglandinas son lípidos capaces de ser fosforilados, sirviendo de segundos mensajeros para la activación de proteínas río abajo. Las PI3K de clase I son capaces de convertir las prostaglandinas difosfato (PIP2) en PIP3 prostaglandina trifosfato, presente solo en estados activados de la célula (Hirsch *et al.*, 2008). Se ha identificado que un gran número de receptores tirosina quinasa son capaces de activar a PI3K. Entre ellos factores de crecimiento y *Insulin Grow Factor* (IGF) (Zhang *et al.*, 2011), una vez activado el receptor de membrana, PI3K es reclutada y fosforila a PIP2, convirtiéndolo a PIP3, activando las proteínas dependientes de este sustrato, que finalmente activaran a AKT, la cual es uno de los reguladores más importantes de diferentes funciones celulares, pues es capaz tanto de inhibir como facilitar procesos metabólicos (Johnson *et al.*, 2010). Como PI3K puede ser activado por múltiples receptores, se ha demostrado que es capaz de interactuar con receptores de proteína G y otras moléculas vinculantes al cáncer como RAS (Bradley *et al.*, 2008).

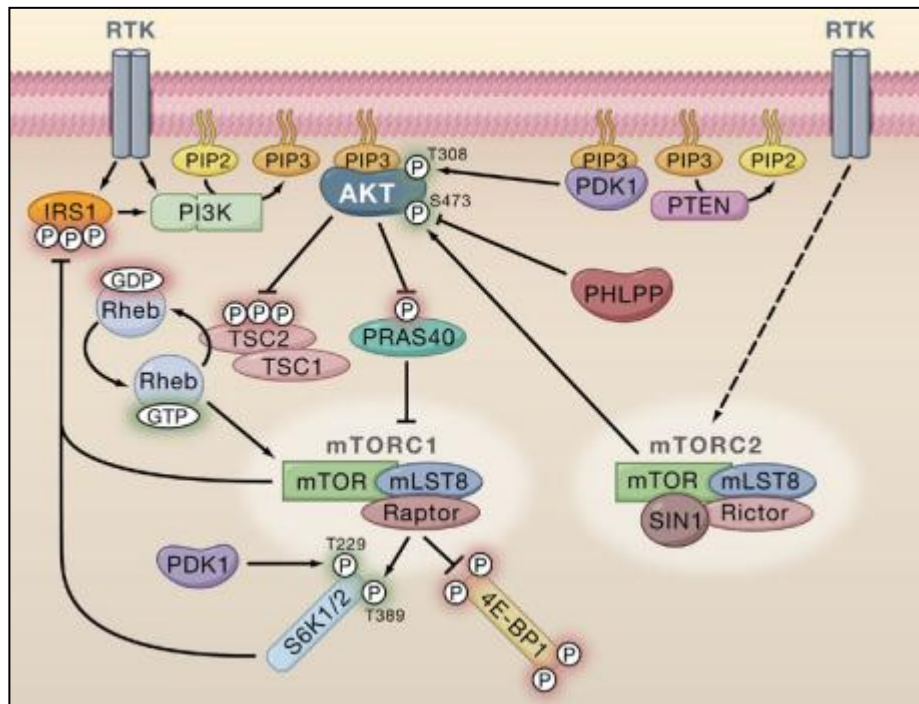


Figura 7. Vía de señalización PI3K y algunos de los distintos efectores. Énfasis de la activación de mTOR y PI3K, componente principal en activación de la síntesis de proteínas. RTK: receptor de tirosina quinasa, (p) indica la fosforilación de proteínas. Fuente: Manning and Cantley (2007).

AKT o proteína quinasa B (PKB) es una serina/treonina quinasa que presenta al menos tres isoformas con altísima homología a PKA, PKG y PKC, una vez fosforilada es capaz de inhibir los procesos de apoptosis, metabolismo y promover el crecimiento celular, la proliferación y angiogénesis, todo esto pues múltiples genes presentan sitios de reconocimiento a AKT (Song *et al.*, 2005). AKT es capaz de inhibir de forma directa, por medio de fosforilación a la proteína procaspasa-9, al factor pro apoptótico BAD y es capaz de activar a AMP cíclico. En respuesta de ello, múltiples genes aumentan el metabolismo celular inactivando los factores apoptóticos. Se ha descrito que GSK3 β puede ser inactivada por AKT al ser fosforilada, liberando a β -catenina e induciendo una mayor actividad celular (Manning and Cantley, 2007) esta proteína, importante moduladora del metabolismo celular, puede fosforilar a p27 y otros factores reguladores de la mitosis, inactivándolos para aumentar el metabolismo celular. Se ha identificado que AKT presenta un rol importante en el censo de ATP citoplasmático, la regulación de la glucosa y el

metabolismo, para ello AKT es capaz de activar al complejo mTOR e inhibir la síntesis de glicógeno inactivando a GSK3 β (Manning and Cantley, 2007).

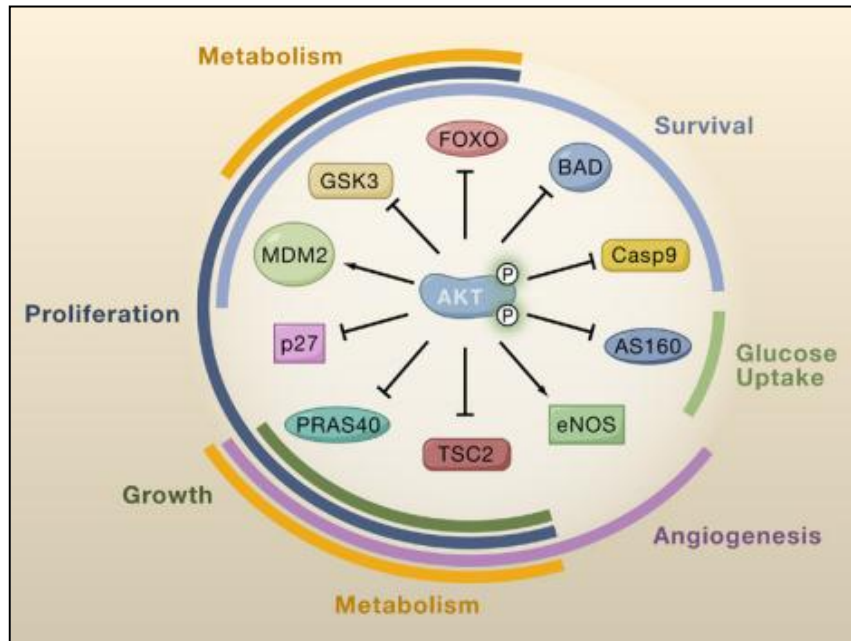


Figura 8. Distintos blancos de AKT y las vías de desarrollo involucradas en estas interacciones. Con flechas la activación de los distintos genes, en flechas romas la inactivación producida por medio de AKT. Fuente: Manning and Cantley (2007).

Existe evidencia que tanto PI3K y sus distintas isoformas, se encuentran frecuentemente amplificadas y mutadas en diversidad de cánceres y se relaciona a diversos fenotipos metastásicos (Kolasa *et al.*, 2009; Fedele *et al.*, 2010). PTEN, una fosfatasa capaz de convertir PIP3 a PIP2 e inhibir la actividad de AKT, es uno de los genes que mayormente se encuentra mutado o inactivado por la inestabilidad cromosómica de tumores y cánceres avanzados. Por último, AKT y sus isoformas AKT1 y AKT2, están involucrados en muchos de los cánceres existentes, entre los cuales destacan gástrico, ovario y mama (Testa and Tsiichlis, 2005; Weigelt *et al.*, 2011).

2.4.4. Angiogénesis y progresión del cáncer. La Angiogénesis es el proceso natural por el cual se genera nueva vascularización a partir de vasos ya existentes (Carmeliet, 2005), la cual es llevada a cabo durante todo el desarrollo del organismo (Urbich *et al.*, 2008). Es un proceso crucial en la progresión tumoral por la búsqueda y mantenimiento de nutrientes para las células malignas (Fayette *et al.*, 2005), cumpliendo un rol fundamental la activación de VEGF, factor de crecimiento vascular, el cual promueve la transformación y crecimiento endotelial (Xie *et al.*, 2006). Se ha reportado que este factor es fundamental en la respuesta linfoangiogénica en variados cánceres (Chaudary *et al.*, 2011), evitando procesos de hipoxia y confinación del tumor y promoviendo fenotipos muy agresivos, existiendo una alta correlación entre la expresión de este gen y la agresividad tumoral en cáncer de mama y tubo digestivo (Zwaans and Bielenberg, 2007). Las etapas tempranas de la angiogénesis se desarrolla a través de la degradación de las bases endoteliales de vasos existentes y también alrededor de la matriz extracelular, produciéndose una migración dirigida de células endoteliales al estroma de los tubos sanguíneos, seguido de la proliferación de células endoteliales las cuales forman una columna de migración que dará lugar al nuevo vaso sanguíneo. Así, una región de diferenciación posterior, altera su morfología y se adhiere al primer grupo de células movilizadas para formar el lumen del nuevo capilar. Este fenómeno asociado a la expresión de múltiples reguladores, tanto positivos y negativos de la neo vascularización, es el que permite la diseminación orgánica de la enfermedad (Carmeliet, 2005).

Uno de los reguladores positivos de la angiogénesis es el factor de crecimiento de fibroblasto (bFGF). Este está codificado por un gen simple el cual da origen a múltiples isoformas. Induce la proliferación, producción de proteasas, quimiotaxis y tubulogénesis en células endoteliales a través de la estimulación de receptores tirosina quinasa FGF. Altos niveles de bFGF en el suero y en la orina están correlacionados con la angiogénesis tumoral (Furuya *et al.*, 2009).

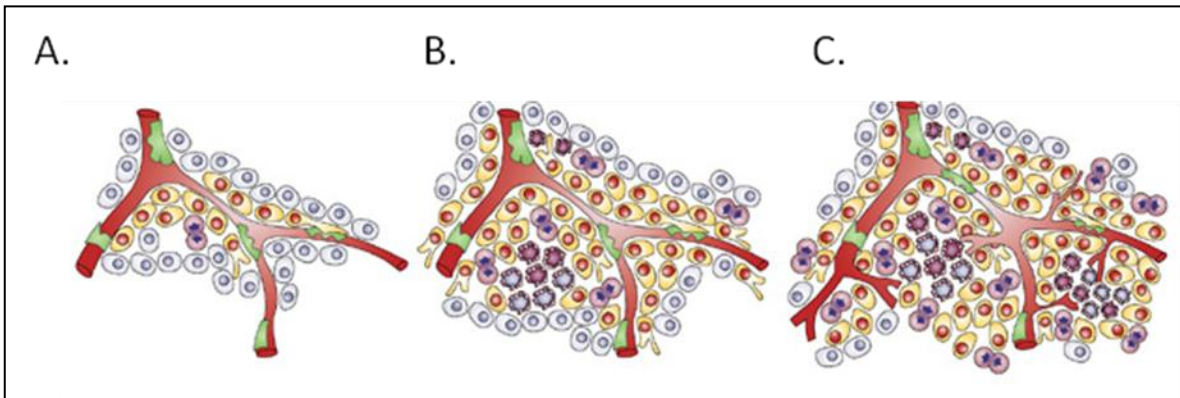


Figura 9. Vascularización producida por las células tumorales. Al presentarse hipoxia en el tumor (B), las células tumorales producen un conjunto de factores que permiten la movilización de pericitos y la formación de nuevos vasos sanguíneos para así obtener nutrientes y oxígeno. Fuente: Bergers and Benjamin (2003)

Sin embargo, es el factor de permeabilidad vascular/factor de crecimiento endotelial (VPF/VEGF) resulta uno de los actores más relevantes (Ng *et al.*, 2006). Esta proteína favorece la permeabilidad vascular, siendo, además, un potente mitógeno de las células endoteliales e inductor de los procesos angiogénicos anteriormente descritos. Este factor interactúa estimulando los receptores VEGF tirosina quinasa de las células endoteliales teniendo gran importancia, ya que muchas de los sistemas regulatorios existentes en la angiogénesis están condicionadas directa o indirectamente por VEGF y/o VPF. Por otro lado, VEGF también actúa en la angiogénesis inducida por hipoxia, fenómeno producido cuando el sistema vascular del tumor colapsa debido a la presión intersticial o cuando la oxigenación del mismo es limitada (Verheul and Pinedo, 2000), en estos casos actúa el factor de hipoxia inducible 1 (HF1), el cual está regulado por la concentración de oxígeno, el cual a su vez regula positivamente tanto a VEGF como a sus receptores. VEGF también es regulado en condiciones de hipoxia por mutaciones en genes supresores de tumores como p53 y p16, la pérdida de funcionalidad de los genes supresores de tumores favorece la activación de oncogenes como RAS, RAF, NEU y SRC, lo cual repercute en un aumento de la expresión de VEGF. Este tipo de interacciones sirven de modelo para explicar como la pérdida de la funcionalidad de genes supresores de tumores inciden la generación de la metástasis a través de aberraciones en la angiogénesis (Dvorak, 2005; Fayette *et al.*, 2005).

Uno de los primeros pasos para brindar capacidad invasiva y metastásica a las células es la disrupción de la integridad de la matriz de unión compuesta por aproximadamente por unos 50 componentes (Weber, 2008). Las uniones célula-célula y célula sustrato son de vital importancia en la modelación de la angiogénesis, ya que la separación de estas uniones es necesaria para el desplazamiento de células endoteliales y luego para la formación del nuevo vaso, la extensión y maduración de este (Nguyen *et al.*, 2009). Uno de los factores fundamentales tanto en la proliferación celular, invasión tumoral, la angiogénesis y la metástasis es la producción de enzimas proteolíticas envueltas en la degradación y remodelación de la matriz extracelular (Webb and Vande Woude, 2000; Psaila and Lyden, 2009). La familia de enzimas denominadas metaloproteinasas de matriz (MMPs), consideradas endopeptidasas dependientes de Zinc, cumplen un rol preponderante en la remodelación de la matriz celular. Las MMPs son secretadas al medio de forma inactiva y necesitan de la remoción proteolítica de uno de sus dominios para ser funcionales. Aunque existen algunos tipos de tumores que producen MMPs, la principal fuente de las mismas está dada por células estromales y fibroblastos (Curran and Murray, 2000). La producción del inductor de metaloproteinasas de matriz extracelular (EMMPRIN), por parte de las células tumorales activa la producción de MMPs-1, 2 y 3 en fibroblastos (Polette *et al.*, 2004). Como ya se ha mencionado antes, la pérdida o redistribución de moléculas de adhesión celular está directamente relacionada con expansión tumoral pues se facilita la diseminación y migración de células tumorales. A través de múltiples estudios se ha demostrado que existe un vínculo funcional entre E-Cadherina y la expresión de MMPs, donde las primeras regulan negativamente la expresión de β -catenina y múltiples MMPs. (Bauvois, 2011).

2.4.5. Vía de *Hedgehog* y cáncer. La vía de señalización de *Hedgehog* (Hh), al igual que Wnt, fue descubierta y analizada en la mosca de la fruta, caracterizándola como mediadora de procesos de desarrollo embrionario, regulador de la proliferación, migración y diferenciación (Ingham and McMahon, 2001). Esta vía de señalización está altamente conservada en mamíferos y está especialmente activa en las primeras fases embrionarias, en la formación y diferenciación del tubo neural, perdiendo casi en su totalidad su actividad luego de la diferenciación celular, salvo en algunos tejidos donde regula la reparación de tejidos (Scales and de Sauvage, 2009).

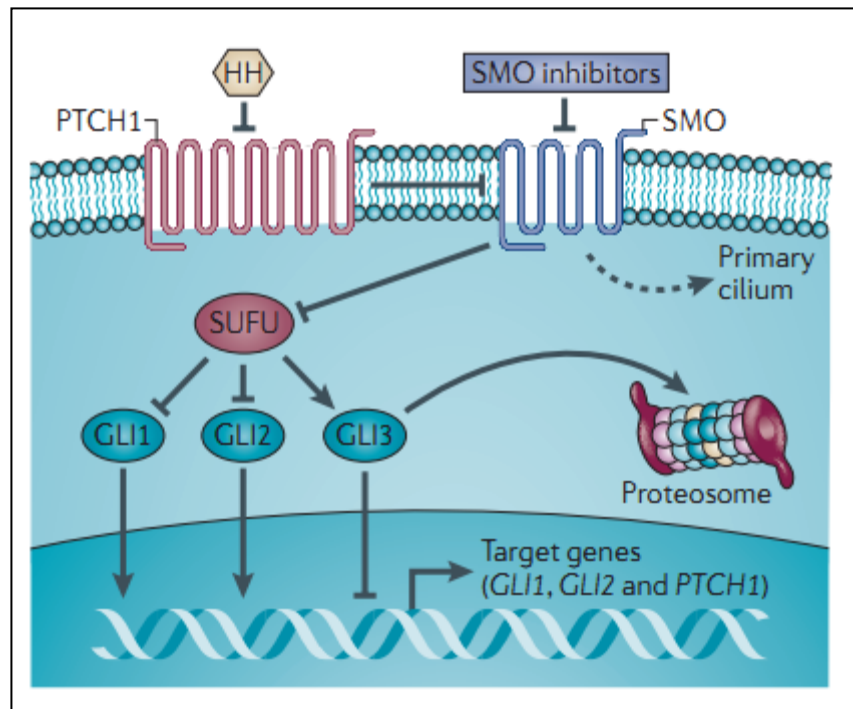


Figura 10. Vía de señalización de Hedgehog. En la figura se identifican los ligandos y genes más importantes de ella. Fuente: Ng and Curran (2011).

La señalización y mecanismo de activación está dado por la unión del ligando *Hedgehog* y sus distintas isoformas a un receptor de membrana denominado Ptch1. Ptch1 constitutivamente, y en ausencia de sus ligandos, reprime a SMO, gen que modula la expresión del factor de transcripción Gli que desencadena distintas respuestas y fenotipos. SMO, al ser inactivado por Ptch1 activado, unido a Hedgehog, es capaz de movilizar a SUFU, proteína que modula y reprime a las isoformas de Gli e impide su translocación nuclear (Ng and Curran, 2011).

La activación de esta vía de señalización está comprometida por la expresión de las distintas isoformas de Gli, las cuales tienen la capacidad de activar distintos genes, entre los que se incluyen distintos tipos de ciclinas, Bcl-2, gen anti apoptótico, como también promover la angiogénesis al inducir la expresión de VEGF, imprescindible para la formación de neovascularización (Rubin and de Sauvage, 2006). Esta vía de señalización es responsable de la

mantención de distintos tejidos pluripotentes en múltiples tejidos adultos, los que incluyen al tubo digestivo y tejidos neuronales, así también se ha descrito que esta vía es fundamental para la mantención del tejido pulmonar adulto y páncreas (Merchant and Matsui, 2010).

La presencia y expresión de esta vía de señalización en algunos tejidos está relacionada con la tumorigénesis. Mutaciones en *Ptch1* y *SMO* están relacionadas a cánceres de médula y células basales de tejido epitelial. Demostrándose, además, que la activación de esta vía de señalización es independiente de los ligandos Hedgehog con un aumento de expresión de *Ptch1*, *SMO* y *Gli* en muestras de cáncer gastrointestinal, próstata y gliomas (Jiang and Hui, 2008). Trabajos recientes han postulado que existe una comunicación importante entre esta vía de señalización y la vía de WNT ya que *Gli* sería capaz de activar, por medio de un factor de transcripción, a *Wnt5a*, una proteína moduladora de la vía Wnt no canónica (Ohta *et al.*, 2009).

El cáncer de células madres, refiere a una pequeña población celular dentro de un tumor sólido con la habilidad de reactivar vías de señalización del desarrollo, capaz de iniciar el crecimiento tumoral, así como presentar potencial metastásico, sobreviviendo los distintos recursos del organismo para combatir al tumor en desarrollo (Zou, 2007). Se ha descrito este tipo de células en tejidos cerebrales, ovario, próstata, páncreas, pulmón y estómago, entre otros tejidos, liderando algunos de estos tipos cancerosos (Jiang and Hui, 2008). Este tipo de cáncer está mediado molecularmente por la coordinación y regresión de tres vías del desarrollo: Notch, Hedgehog y WNT, las que coordinadamente producen la resistencia y plasticidad tumoral, particular de múltiples cánceres (Katoh, 2007).

2.5. PCR en tiempo real y uso para la detección de anomalías.

La reacción en cadena de la polimerasa consiste en una técnica que permite la extensión y replicación del DNA *in vitro*, la cual tiene como fin amplificar un templado en el orden de millones de copias para que este sea detectado (Kubista *et al.*, 2006). La reacción en si se basa en

la biología de la replicación realizada por medio de una enzima, denominada DNA polimerasa III, la cual extiende y replica las hebras de DNA con fines mitóticos. La *Polymerase Chain Reaction* o PCR, fue descubierta y dada a conocer en el año 1986 por el científico estadounidense Karry Mullis, la cual ha trascendido de manera significativa e importante ya que esta técnica, junto a un conjunto muy acotado de herramientas, han permitido la expansión de diversas áreas del conocimiento (Mullis *et al.*, 1992).

El programa de PCR presenta tres fases repetitivas durante un número determinado de ciclos. Un primer segmento de denaturación a alta temperatura, donde las hebras de ADN de doble cadena se separan por la rotura de las interacciones de puente de hidrógeno que las mantienen unidas. Una segunda fase o segmento del ciclo, cuya temperatura varía entre los 40°C a 65°C, donde se unen al templado los fragmentos diseñados para la extensión de la polimerasa, los *primers* o partidores, sirven de guía y flanqueadores de la reacción enzimática (Kubista *et al.*, 2006). Finalmente, en un tercera parte de este ciclo se encuentra la fase de extensión enzimática, donde la reacción de polimerización del segmento a amplificar sucede. En la PCR de tiempo real, estos conceptos se acompañan de la presencia de un fluorocromo, que en el caso de fluoróforos intercalantes emiten una señal que es detectada, analizada e interpretada por un equipo a medida que la extensión de los productos de PCR incrementa (Gudnason *et al.*, 2007). Sin embargo, los programas de PCR entre ambas metodologías son distintos, para la PCR convencional los ciclos son más largos (en tiempo) y la metodología logra ser cualitativa, mientras que el tiempo real tiene la capacidad de ser cuantitativo, siendo una tecnología cada vez más habitual en laboratorios de expresión genética, por sus capacidades de detección y precisión (Schmittgen and Livak, 2008).

La PCR convencional, también llamada PCR de tiempo final, se analiza por la presencia/ausencia de productos de DNA de tamaño particular por medio de corrida electroforética, mientras que en la PCR de tiempo real el análisis es por medio de la determinación de un ciclo de corte o Ct, donde la fluorescencia del reportero es significativamente superior a un *background* definido (Kubista *et al.*, 2006). Este valor,

comparado entre las diferentes muestras, coincide con la fase exponencial de la reacción donde existe suficiencia de reactivos así como la reacción ocurre en su máxima eficiencia, lo que no ocurre en la PCR convencional que es obtenida al final de la reacción cuando la reacción no presenta una cinética distinguible y donde la reacción se ha saturado por completo (Bar *et al.*, 2011). El valor del Ct está inversamente relacionado con la cantidad del templado, a medida que el Ct es menor, mayor es la proporción del templado en la muestra. Así, se pueden comparar dos muestras de tal forma, que se pueden atribuir disminución o aumento en la relación del templado para las muestras comparadas (Pfaffl, 2010).

La aplicación del PCR en tiempo real para el análisis de la expresión de genes en combinación con otras tecnologías, como el microarreglo, han sido adoptadas de forma rutinaria para el estudio en distintas áreas del conocimiento, como por ejemplo en la biomedicina (Tichopad *et al.*, 2003), siendo para el caso del tiempo real un método estándar para la cuantificación, comparación y validación de experimentos de expresión génica (Hellemans *et al.*, 2007). Todo esto debido a sus amplias ventajas, como son su sensibilidad, precisión, rapidez de resultados y su cada vez más bajo costo (Derveaux *et al.*, 2010).

Trabajos anteriores, como el trabajo Bizama (2010), identificó genes y vías de señalización particulares involucradas en el desarrollo del cáncer gástrico por medio de la tecnología de microarreglos, dando una primera aproximación a la sensibilización y desregulación de algunas vías de señalización del cáncer gástrico. No obstante a ello, muchas de las plataformas para el estudio de información transcripcional no presentan la suficiente sensibilidad para la determinación de cambios individuales en los genes (Woo *et al.*, 2004).

Sin embargo, el uso de tecnologías basadas en el PCR en tiempo real es capaz de identificar mínimos cambios en la expresión de los genes y así, el PCR-array, una variante del PCR en tiempo real que presenta al menos 80 genes distintos, todos ellos con una relación muy intrínseca, permite identificar los cambios particulares de los genes involucrados en una vía de señalización específica (Svensson *et al.*, 2009; Lamoureux *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011).

Esta tecnología tiene por finalidad comparar al menos dos muestras, cuyas reacciones son ejecutadas de forma separada y posteriormente son comparadas bajo distintos algoritmos, para finalmente exportar y analizar los resultados que se expresan en veces de cambio, respecto a una de las dos condiciones, siendo normalmente, una condición control.

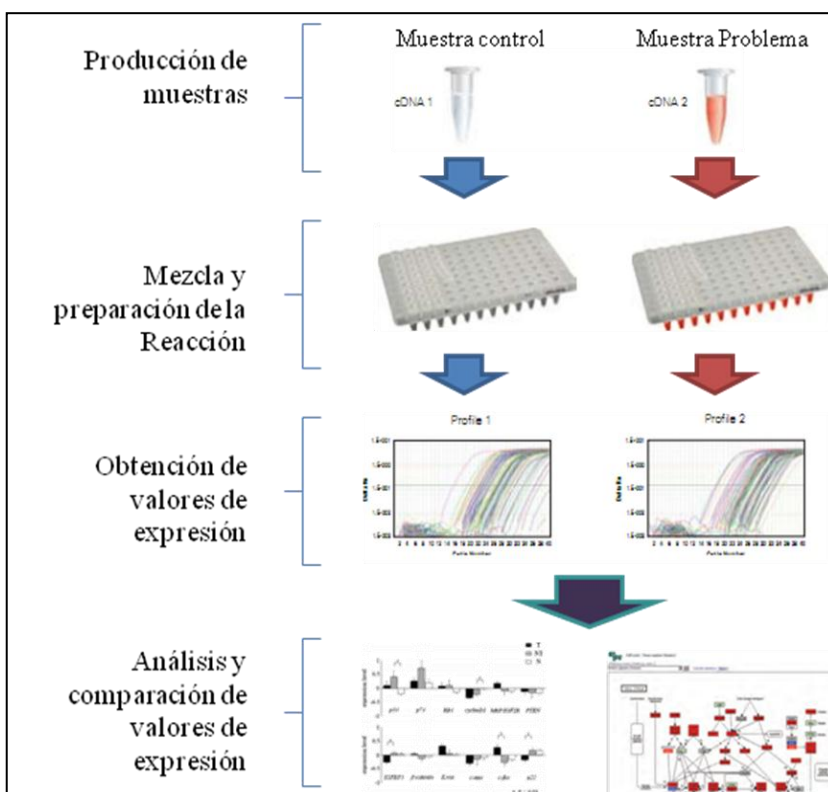


Figura 11. Experimento de PCR-array y flujo de trabajo. Típico experimento de PCR-array, donde existen al menos dos muestras las cuales se preparan de forma separada, para finalmente ser comparadas y analizadas. Adaptado desde http://www.sabiosciences.com/manuals/PCRHYBOOK_VER4.pdf

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención y selección de muestras.

3.1.1. Obtención de muestras. Las muestras estudiadas formaban parte de la colección del Banco de Tumores de Chile y del Biobanco de la Universidad de La Frontera. El tejido gástrico tumoral y su correspondiente tejido adyacente no canceroso fueron colectados de 4 pacientes diagnosticados de adenocarcinoma gástrico avanzado, sometidos a resección quirúrgica (gastrectomía total o parcial), quienes no recibieron terapia adyuvante previa a la cirugía y que firmaron un consentimiento informado. Todos los tejidos estudiados fueron sometidos a un estudio histológico para confirmar la presencia o ausencia de tumor y el porcentaje de celularidad.

Id	Estadio	Tipo Lauren	Subtipo Histológico	Diferenciación	Bordes quirúrgicos	Sexo	Edad
38	Avanzado	Intestinal	Adenocarcinoma Tubular	Pobre	Lesión alejada de bordes quirúrgicos	M	70
54	Avanzado	Intestinal	Adenocarcinoma Tubular	Moderado	Lesión a 4mm borde proximal.	F	73
90	Avanzado	Intestinal	Adenocarcinoma Tubular	Moderado	Pared duodenal y gastroesofágica con infiltración.	F	85
89	Avanzado	Difuso	Adenocarcinoma células en anillo de sello	Pobre	Lesión a 2mm borde esofágico.	M	67

Cuadro 2. Clasificación histopatológica de las muestras incluidas en el estudio. Todas las muestras presentan tejido control correspondiente a tejido adyacente al tumor.

3.1.2. Conservación de los tejidos. Luego de la intervención quirúrgica los tejidos fueron trasladados a la Unidad de Anatomía Patológica, donde el tejido fresco obtenido de cada paciente fue seccionado en pequeños trozos de 5 mm². Luego, se incubó 150 mg de tejido con 1 ml de

RNAlater (Ambion Inc, Austin Tx, USA) durante 12 horas a 4 °C. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en criotubos identificados, sometidas a congelación en isopentano a -50 °C por 2 min y sumergidas en nitrógeno líquido (196 °C) por un período de dos semanas. Finalmente, las muestras fueron almacenadas en congeladores de -80 °C hasta su utilización. Como tiempo máximo aceptable desde la extracción del tejido hasta congelación se consideró 30 min.

3.1.3. Diseño y selección de muestras. Las muestras en analizadas provenían de un estudio anterior realizado en dependencias del laboratorio VentureL@b (Bizama,C 2010). De un total de 12 muestras fueron seleccionadas cuatro de ellas, en orden a la mayor cantidad de genes representados en un análisis de enriquecimiento de vías de señalización, realizado en aquel estudio. Además, como criterio de inclusión fueron seleccionadas aquellas muestras con ARN suficiente para el desarrollo de este trabajo. Las cuatro muestras seleccionadas obtuvieron los mayores puntajes/score de enriquecimiento para las cuatro vías de señalización incluidas en este estudio. Así, cada muestra tumoral fue comparada con su respectivo control adyacente al tumor, de tal forma de obtener las veces de cambio en la expresión de los genes con respecto al control.

3.2 Tratamiento de las muestras.

3.2.1. Protocolo de Trizol. Para la extracción de ARN total de tejidos se utilizó el reactivo de Trizol, siguiendo las instrucciones del proveedor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Luego, los ARNs fueron sometidos a digestión enzimática con DNAsa I (Ambion Inc, Austin Tx, USA) y a purificación con el kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany). Los tejidos (100-150 mg) fueron pulverizados con ayuda de nitrógeno líquido y homogenizados con 1 ml de reactivo Trizol. La suspensión fue incubada por 5 min a temperatura ambiente (TA) y centrifugada a 12.000 g durante 10 min a 4 °C. Luego de la separación, la fase acuosa fue recuperada en un tubo nuevo al cual se adicionaron 200 µl de cloroformo. El tubo fue agitado vigorosamente e incubado en hielo durante 3 min y centrifugado a 12000 g por 10 min. A continuación se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se precipitó el ARN con 500 µl de isopropanol. El tubo fue incubado por 10

min en hielo y centrifugado a 12000 g por 10 min. El ARN precipitado fue lavado una vez con 500 μ l etanol 75% y centrifugado a 7500 g por 5 min. Luego, el precipitado fue secado por 5 minutos a temperatura ambiente (TA) y resuspendido en 30- 50 μ l de agua desionizada estéril tratada con DEPC 0,1 %. La concentración y pureza del ARN extraído fue determinada por espectrofotometría UV (NanoDrop Technologies, USA) y se chequeo la integridad del ARN por electroforesis en gel de agarosa. Finalmente, las muestras de ARN fueron almacenadas a -70 °C hasta su utilización.

3.2.2. Purificación del ARN. Una vez aislado el ARN, las trazas de ADN genómico fueron removidas mediante tratamiento con ADNasa I. En un volumen total de 50 μ l fueron incubados 10 μ g de ARN, 1X de buffer de ADNasa, 40 U de inhibidor de ARNasa (RNaseOUT, Invitrogen USA), 2 U de ADNasa (DNase I, Ambion USA). La mezcla fue incubada a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, las muestras fueron purificadas utilizando el kit RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). Para la purificación la muestra de ARN fue llevada a volumen total de 100 μ l con agua desionizada estéril y se adicionaron 350 μ l de Buffer RLT y 250 μ l de etanol 100 %. La solución fue mezclada, transferida a una columna RNeasy y centrifugada a 12.000 rpm por 15 seg. Luego de la centrifugación el eluido fue eliminado y la columna fue lavada dos veces con 500 μ l de Buffer RPE centrifugando a 12.000 rpm por 15 seg y 2 min respectivamente. La solución de buffer RPE residual fue eliminada de la columna por centrifugación a 13.000 g por 2 min. Finalmente, para eluir el ARN se adicionó 30 – 50 μ l de agua libre de nucleasas al centro de la columna y se centrifugó a 12.000 rpm por 1 min. Las muestras de ARN fueron nuevamente cuantificadas y chequeadas por electroforesis en gel de agarosa 1,5 %.

3.2.3. Cuantificación del ARN. Para la determinación de la concentración de ARN se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA). El equipo calcula de forma automática la concentración a partir de la absorbancia a 260 nm, aplicándose la siguiente ecuación: Concentración de ARN (μ g / μ l) = Absorbancia a 260 nm x 40 / 1000. Teniendo en cuenta que 1 densidad óptica a 260 nm (1 OD₂₆₀) es igual a 40 μ g de ARN. Además, se calculó

la relación de absorbancia 260/280 que indica pureza del ARN (la relación entre 1,7 y 2,0 fue considerada como óptima).

3.2.4. Determinación de la integridad del ARN. Para determinar la integridad del ARN, se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio (0,5 µg / ml) con cada una de las muestras extraídas. Durante este procedimiento, 400 ng de cada muestra de ARN fue llevada a un volumen total de 5 µl y mezclada con 1ul de buffer azul celeste 6X (Winkler, Santiago, Chile). Luego, las muestras fueron cargadas en el gel y la electroforesis se realizó en buffer TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) a 50 voltios durante 30 min. Finalmente, para visualizar el ARN, el gel fue expuesto luz ultravioleta en un transluminador (Alpha Innotech Corporation, CA, USA).

3.2.5. Síntesis de ADNc. Para la síntesis de ADNc se utilizó el kit comercial AffinityScript qRT-PCR (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante. La transcripción reversa se realizó a partir de 1 µg de ARN y como iniciadores se usó una mezcla de oligo dT (170 ng) y *random primers* (30 ng) en un volumen total de 20 µl. La mezcla fue incubada durante 5 min a 25°C, 45 min a 42 °C y 5 min a 95°C.

3.2.6. Reacción de PCR en tiempo real y PCR Array. La reacción de PCR fue realizada en un volumen total de 20 µl, utilizando como templado 2 µl de cDNA previamente diluido 1/10 veces y una mezcla de 0.1µM de cada partidor, 10 ul Brilliant II SYBR Green (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA) y 7,5 ul de agua desionizada. La cuantificación de la PCR se llevó a cabo en un Stratagene Mx3000p (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA), utilizando el siguiente ciclo termal: 10 min a 95 °C y 50 ciclos de 10 seg a 95 °C, 45 seg a 58 °C y 15seg a 72 °C.

Para las PCR Array se adquirieron las bibliotecas de partidores para las vías de señalización PI3K-AKT y Angiogénesis con los genes que propone la empresa Real Time Primers (Real Time Primers, Elkins Park, PA, USA). Para las vías de señalización de Wnt/Hedhehog y activación de células B y T se adquirieron bibliotecas personalizadas construidas a partir de partidores

previamente validados por la misma empresa. Cada placa de PCR contenía 87 genes asociados a cada vía de señalización y 9 genes normalizadores. En el Anexo 1 se resumen los genes incluidos en el estudio.

3.3 Análisis de los Resultados.

3.3.1. Análisis para la búsqueda de genes normalizadores y cálculo de valores de expresión.

Los normalizadores escogidos, así como el cálculo para expresar las diferencias de expresión de los genes para cada muestra, fue realizado en el software geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>), siendo elegidos los mejores 9 normalizadores: BACT, G3PDH, B2M, HPRT, RPL13A, PGK1, PPIA, QARS y POL2RL. Además fue calculada la eficiencia de cada reacción de PCR mediante el uso del software LinReg PCR v11 como parámetro de control de calidad y especificidad de la reacción.

3.3.1.

El análisis de expresión diferencial fue realizado mediante la metodología propuesta por Vandesompele *et al.* (2002), utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad relativa (gen } a) = 2^{Ct \text{ muestra adyacente} - Ct \text{ muestra tumoral}}$$

$$\text{Fac de normalización} = (C_{\text{relativa nom1}} * C_{\text{relativa norm2}} * \dots * C_{\text{relativa normN}})^{\frac{1}{N}}$$

$$\text{Cambio de expresión (gen } a) = \frac{\text{Cantidad relativa (gen } a)}{\text{Factor de normalización}}$$

Adicionalmente, los valores de cambio por debajo de 1 recibieron el factor de conversión recomendado por Schmittgen and Livak (2008); siguiendo el siguiente patrón:

$$\begin{aligned} \text{Cantidad relativa (gen } a) &= \frac{-1}{0.287} \\ &= -3,484 \text{ fold} \\ &\text{cambio respecto a muestra normal} \end{aligned}$$

3.3.2. Presentación de genes diferenciales. El cambio de expresión relativo para cada muestra tumoral fue expresado en relación a su respectivo tejido adyacente como referencia. Posteriormente, se calculó la mediana del cambio para las cuatro muestras estudiadas y se consideraron genes de expresión diferencial aquellos con valor de cambio $> 2,0$. Los resultados fueron graficados en orden descendente utilizando el Software GraphPad Prism version 5,00 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Finalmente fue utilizada la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) para visualizar la vía de señalización, Ver Anexo 2.

3.3.3. Relación de marcajes inmunohistoquímicos derivados del análisis de genes. Los genes que presentaron valores de cambio mayor a 10,0 fueron comparados con la base de datos del Human Atlas Protein (HAP), con motivo a evaluar las tendencias de expresión de entre las PCR Array y la tinción inmunohistoquímica presente en la base de datos del HAP.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Elección de muestras, análisis de enriquecimiento de vías de señalización.

Las muestras, provenientes de un estudio anterior (Bizama, 2010), fueron seleccionadas luego de los resultados obtenidos desde un experimento de microarreglos, seguido de un análisis de enriquecimiento, utilizando el software Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships (PHANTER), siendo seleccionadas las muestras que presentaban mayor cantidad de genes diferenciales (valor de cambio $> 1,2$) para las vías de señalización integradas en este estudio (PI3K, Wnt/Hedgehog, Activación linfocitaria y Angiogénesis).

Un segundo parámetro de selección fue la cantidad (ug/ul) de ARN que se tenía de las muestras, ya que la metodología utilizada requiere del uso de amplios volúmenes de muestra (200 ul de ADNc diluido por experimento individual).

El análisis realizado en el trabajo de Bizama (2010) consideró 1421 genes diferenciales (nivel de cambio $> 1,2$) de la estrategia de hibridación sustractiva, los cuales fueron introducidos en PHANTER contra la referencia de transcritos del genoma humano, donde se seleccionó todas aquellas vías enriquecidas con significancia estadística $> 0,05$. La significancia estadística se calculó en relación a que el porcentaje de genes con determinada actividad biológica sea significativamente mayor o menor al porcentaje esperado por el azar dentro del genoma humano (Bizama, 2010). PHANTER es un software que permite comparar de forma sistemática la información e evidencia científica actualizada de los genes, relacionándola con funciones biológicas y procesos celulares, de forma que permite clasificar genes y proteínas en tres distintas categorías funcionales (componente celular, función molecular, proceso biológico) para así vincularle a distintas vías de señalización, familias proteicas, etc (Mi *et al.*, 2005).

Vía de Señalización	Genes Sobre expresados	Genes reprimidos	Número	P-value
Hedgehog signaling pathway	STK36, PROZ	EDD1, SAP18, OCLM, FBXW1, LAMA2, WDR63	8	5.24E-05
B cell activation	PTPRC, PIK3CD, FCRL3, PLCG2, LARP2, NFKB2, PRKCB1, CHUK	NFATC1, IGSF1, CD79A, CD5L, SLC4A5	13	3.73E-04
Angiogenesis	FGFR4, PIK3CD, PCDHA4, NOS2A, FGFR2, PLCG2, MAPKAPK3, LARP2, PLA2G4A, PRKCB1, NOS1, KRT25A, PROZ	ANGPT2, OR5AP2, OCLM, LAMA2, PRDM1, ANGPT2, GPR68	20	2.27E-03
T cell activation	PTPRC, PIK3CD, TPR3, HLA-DOA, NFKB2, PRKCB1, CHUK	NFATC1, IGSF1, LARP2, PRDM1, CD5L, SLC4A5	13	2.57E-03
VEGF signalling pathway	PIK3CD, NOS2A, PLCG2, MAPKAPK3, LARP2, PLA2G4A, PRKCB1, NOS1	PRDM1, GPR68, WDR63	10	5.67E-03
PDGF signalling pathway	PIK3CD, ITPR3, PLCG2, MAPKAPK3, LARP2, RPS6KA5, PRKCB1, PROZ	MKLN1, SOX14, JAK3, OCLM, LAMA2, PRDM1, RPS6KB1, WDR63	16	8.43E-03
FGF signaling pathway	FGFR4, PIK3CD, PCDHA4, FGFR2, PLCG2, LARP2, PRKCB1	MKLN1, PPP2R5D, PPP2R2B, PRDM1, CD5L	12	2.67E-02
PI3 kinase pathway	PROZ, NOS2A, FOXK2, NOS1	MKLN1, FOXO3A, OCLM, LAMA2, FOXA1, RPS6KB, WDR63, PROZ	11	3.53E-02
EGF receptor signaling pathway	PIP3CD, PLCG2, LARP2, PRKCB1	MKLN1, SOX14, CCM2, PPP2R5D, PRDM1, CD5L, UBE2V1	11	8.65E-02
cytokine signaling pathway	TMPRSS4, PIP3CD, FCRL3, MYO3A, ITPR3, PLCG2, PTGS1, LARP2, NFKB2, PLA2G4A, PRKCB1, OL12A1	SOX14, NFATC1, ARPC2, PRDM1, CCL4, PRKACA, CD5L, CCRL2	11	8.91 E-02
Notch signaling pathway	TACR1, KRT25A	WDR71, TADA2L, OR5AP2	5	9.31E-02
Wnt signaling pathway	MYL4, PCDHA4, PROZ, ITPR3, LARP2, PRKCB1	CDH7, CDH19, CDH23, HOXB6, SMARCD1, NFATC1, PPP2R5D, WNT4, WNT9B, OCML, LAMA2, WDR63, LRP12, FBXW11, IGSF1	21	1.33E-01

Cuadro 3. Vías enriquecidas por medio del uso de PHANTER en muestras hibridadas por microarreglo. Modificado de Bizama, C. 2010.

Las vías de señalización enriquecidas en ese análisis corresponden a vías vinculadas en multiplicidad de trabajos (Fresno Vara *et al.*, 2004; Camilli and Weeraratna, 2010; Ailles and Siu, 2011) a la desregulación y progresión del cáncer. Encontrando que los procesos inflamatorios y respuesta inmunológica de las muestras, la vía de señalización PI3K y Angiogenesis estaban desreguladas, como también componentes de la progresión y sobrevida tumoral de la vía de señalización de Wnt y Hedgehog. Vías de señalización previamente descritas en el estudio del cáncer (Kato, 2007), que además podrían involucrar diferentes tipos celulares que responden a la heterogeneidad de las muestras como señala Iakovlev *et al.* (2007).

De un total de 24 muestras, 12 muestras tumorales (T) con sus correspondientes 12 muestras fenotípicas normales adyacentes (A). Fueron seleccionadas 8, las cuales presentaron la mayor cantidad de genes enriquecidos según la estrategia explicitada anteriormente. Las muestras elegidas corresponden a las muestras: 38T, 38A, 54T, 54A, 89T, 89A, 90T y 90A.

4.2. Extracción de ARN y calidad de las muestras.

Teniendo en cuenta que la evaluación de la calidad del ARN es crucial para los estudios de expresión génica (Macgregor and Squire, 2002). Se evaluó la calidad del ARN proveniente de los distintos tejidos y líneas celulares, para lo cual se analizaron dos parámetros: integridad por electroforesis en gel de agarosa y pureza por espectrofotometría UV. Como se observa en la Figura 12 y el Cuadro 4 las muestras presentaron las bandas características del ARNr 18S y 28S y los valores de absorbencia 260/280 nm se mantuvieron dentro del rango óptimo (1,8-2,1). Con este resultado asegura que la calidad de ARN proveniente de las muestras es aceptable para proceder con los análisis posteriores.

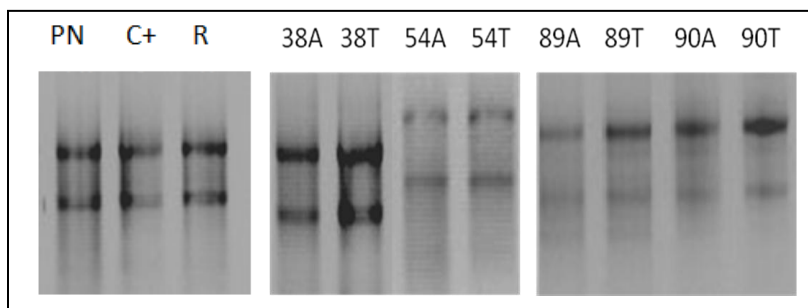


Figura 12. Integridad de las muestras de ARN analizada mediante electroforesis en gel de agarosa. A: tejido adyacente al tumor; T: tejido tumoral; PN: pool gástrico normal; C+: control placenta; R: ARN de referencia universal.

Identificación	Tipo tejido	(A_{260/280nm})
38A	Adyacente	2,08
38T	Tumoral	2,04
54A	Adyacente	2,13
54T	Tumoral	2,12
90A	Adyacente	2,11
90T	Tumoral	2,12
89A	Adyacente	2,13
89T	Tumoral	2,10
Pool Normal	Pool tejido normal	2,08
ARN Referencia	Referencia Universal	2,00

Cuadro 4. Comprobación de la calidad del ARN total por espectrofotometría. A: tejido adyacente al tumor; T: tejido tumoral; PN: pool gástrico normal; C+: control placenta; R: ARN de referencia universal.

4.3. Control de calidad de las PCR Array.

4.3.1. Análisis de la eficiencia de la reacción de PCR. Una de las dificultades del uso de la tecnología de PCR Array es la inexistencia de información relevante sobre el diseño y características de los partidores. En particular, todas las soluciones existentes de las distintas empresas, como SabioScience, Takara o Real Time Primer no explicitan las distintas características de sus reactivos, tales como partidores, sus secuencias, ni tampoco los productos de las reacciones, limitándose a entregar la concentración de estos como un programa de ciclado recomendado. Por otro lado, las distintas soluciones consideran un pool de genes distintos como parte de una vía de señalización, lo que hace dificultoso comparar las distintas soluciones ofrecidas en el mercado, imposibilitando el uso de las tres metodologías a la par.

Dentro de los parámetros a considerar para la PCR en tiempo real se encuentra la eficiencia de la reacción (Bustin *et al.*, 2009), toda vez que las reacciones en la PCR de tiempo real presentan un ciclo mucho más corto que una PCR convencional de punto final. Productos de PCR más extensos y bajas temperaturas de unión al templado (melting) pueden dar como resultado

amplificaciones inespecíficas que distorsionan la cantidad de fluorescencia registrada, alterando e invalidando los resultados del experimento. Una de las formas para identificar la especificidad de la reacción es por medio de una curva de regresión lineal e interpolación de fluorescencia de cada reacción, lo que permite calcular la eficiencia de la reacción en relación a la cinética teórica del tiempo real. Eficiencias menores al 90% implican curvas muy alejadas de la cinética esperada para la reacción ya que los partidores de la reacción presentan baja especificidad a la unión de su templado objetivo, amplificando productos inespecíficos (Cikos *et al.*, 2007).

Con motivo a evaluar las diferencias en la eficiencia de cada reacción presentes en la PCR Array, fue utilizado el software LinReg PCR v11, el cual realiza una regresión lineal con al menos cuatro puntos de las curvas de amplificación para cada muestra, desde los datos de fluorescencia recolectados por la máquina de PCR (Mx3000 de Stratagene®). Con ello el software intenta comparar la eficiencia de la reacción en relación a una eficiencia teórica, donde el valor 2 representa la eficiencia máxima (teórica).

Vía de señalización	Eficiencia promedio	Porcentaje de eficiencia
PI3K (HAKT-1)	1,945	97,25%
WNT/Hedgehog (Custom 1)	1,930	96,5%
Angiogénesis (HAKT-2)	1,923	96,15%
Activación linfocitaria (Custom 2)	1,968	98.4%

Cuadro 5. Porcentaje promedio de eficiencia de las placas de PCR Array.

En el cuadro 5 se muestran las eficiencias promedio de cada vía de señalización incluidas en el estudio, comprobándose que todas ellas presentan eficiencias promedio cercanas al máximo teórico y por lo tanto, amplifican productos específicos que siguen la cinética esperada. Los promedios de eficiencia de cada una vías de señalización indican que estas PCR y la tecnología utilizada resulta ser robusta, siendo las vía de señalización de angiogénesis y Wnt/Hedgehog las

con menor eficiencia, del orden del 96%, mientras que la vía de señalización de activación linfocitaria presenta un porcentaje de eficiencia teórico de un 98.4%.

El análisis de regresión lineal, para el cálculo de la eficiencia de la reacción de PCR, es un parámetro obligatorio según las consideraciones del compendio de información mínima para la publicación de resultados de PCR en tiempo real presentes en la publicación de referencia Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (Bustin *et al.*, 2009), la cual intenta homologar y entregar la mayor cantidad de información relevante para la validación de este tipo de experimentos, desplazándose en la actualidad, informar cualquier tipo de corrida electroforética para corroborar la calidad de los amplicones resultantes de la PCR.

4.3.2. Curvas de disociación. Otro parámetro a comparar en la calidad y eficiencia de una reacción de PCR en tiempo real, es lo que se refiere a la eficiencia de los partidores para amplificar un producto específico, ya que al amplificar productos inespecíficos incrementa la fluorescencia total de la muestra disminuyendo la sensibilidad de las mediciones.

Para identificar la presencia de productos de PCR inespecíficos se realiza un procedimiento denominado “curva de disociación” la cual consiste en un ciclo térmico que comienza a baja temperatura para aumentar la temperatura hasta llegar un máximo, midiendo constantemente la fluorescencia total de la muestra y su disminución a medida que aumenta la temperatura, para finalmente realizar una derivada de la gráfica resultante que identifica las temperaturas de unión al templado (melting) o productos generados en la PCR (Thornton and Basu, 2011).

Idealmente el pico de disociación debe ser uno para cada muestra, ya que picos anteriores a la temperatura de melting teórica del producto de PCR corresponderán a productos inespecíficos y productos de PCR con mayores temperaturas de melting que la calculada para la muestra, responden a contaminaciones de la muestra (Bustin, 2010). Por lo mismo, todas las PCR Array realizadas en este trabajo fueron acopladas a un ciclo de disociación con motivo a diferenciar las distintas reacciones.

Cada placa contenía 96 pocillos, representando cada uno de ellos a un gen distinto, al haber cuatro distintas placas de PCR Array se tenían 384 genes en total, de todos ellos solo 18 presentaron 2 o más picos en sus curvas de disociación, representando un 4.6% del total de todos los genes evaluados, por otro lado, solo 2 genes no amplificaron en ninguna muestra lo cual indica que esta metodología resulta ser fiable, aun cuando no se tienen las secuencias de los partidores y referencia alguna de los amplicones producidos. Los sets de placas de Wnt/Hedgehog y activación linfocitaria fueron los con menor cantidad de productos dimerizados con un total de 2 para cada placa, siendo las placas de PI3K y angiogénesis las con mayor cantidad de productos inespecíficos, cada una de ellas con 7 productos dimerizados. Los cuadros 6a y 6b resumen el porcentaje de genes, así como la lista de los genes que presentaban producto inespecífico.

Vía de señalización	Validos	Presencia dímeros + Nulos (blancos)
PI3K (HAKT-1)	88 genes validos	7+1
WNT/Hedgehog (Custom 1)	96 genes validos	---
Angiogénesis (HAKT-2)	89 genes validos	6+1
Activación linfocitaria (Custom 2)	94 genes validos	2+0

Cuadro 6a. Número de genes excluidos del análisis por placa de PCR.

Vía de señalización	Genes con presencia con productos dimerizados o inespecíficos
PI3K (HAKT-1)	ANG,CDKN2A,CREB1,GRB2,HRAS,INS,LEP,MAPK14
WNT/Hedgehog (Custom 1)	----
Angiogénesis (HAKT-2)	CXCL11,EFNA5,EGF,FLT1,PEF4,TEK,VEGFA
Activación linfocitaria (Custom 2)	PI3K3CD

Cuadro 6b. Genes (símbolos) excluidos del análisis por placa de PCR.

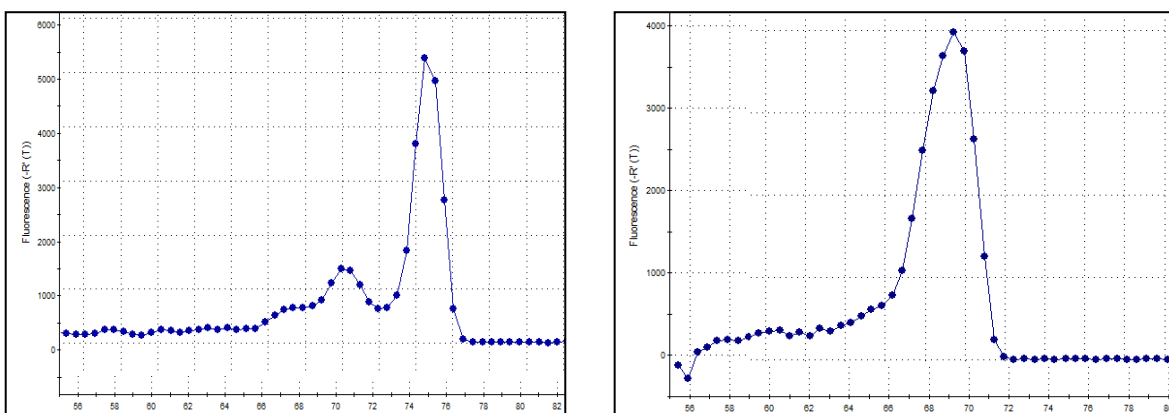


Figura 13. Comparación de curvas de disociación. Dos curvas de disociación particulares de los genes evaluados, a la derecha una curva con producto inespecífico, a la izquierda un pico de disociación específico.

Los resultados de este análisis (cuadros 6a y 6b) señalan que el 95,57% de los partidores y productos de PCR resultantes presentan un amplicón específico, indicando que las reacciones y el programa predeterminado utilizado resultó ser adecuado para los experimentos. Los genes y casos donde se presentaron dímeros de partidores o amplificaciones inespecíficas fueron descartados de todo análisis. En la figura 13 se presenta el gráfico de disociación de dos de los genes analizados, a la izquierda el gen PI3K3CD en cuya gráfica se presentan dos picos con distintas temperaturas de melting, lo que indica que existen al menos dos productos de PCR distintos. Al no poder discernir la naturaleza de ambos amplicones, este gen fue descartado del análisis, el chequeo de esta amplificación y su análisis requeriría de una corrida electroforética de esta muestra, así como la secuenciación de ambos segmentos previamente aislados. La curva de disociación presente a la derecha de la figura 16, corresponde a la grafica de disociación del gen AKT1, donde solo existe un pico específico, indicando que la amplificación presenta un solo producto particular que presenta una temperatura de melting asociada, su verificación así como la secuencia amplificada del gen podría ser analizada por una corrida electroforética, seguida de la aislación y secuenciación posterior del segmento amplificado, lo cual podría informarnos distintos parámetros incluyendo el tamaño del amplicón, su secuencia y la secuencia de los partidores de la muestra.

4.3.3. Ciclado promedio por vía de señalización utilizada. El PCR en tiempo real calcula un ciclo óptimo donde la fluorescencia es mayor a un ruido de fondo propio de la muestra, denominado Ct (*threshold cycle*), siendo este el parámetro que es comparado entre las distintas muestras, el cual es medido cuando la cinética es exponencial y presenta máxima eficiencia. A medida que una reacción de PCR incrementa en número de ciclos esta se hace más ineficiente, ya que la cinética pierde la actividad exponencial característica ya que los reactantes disminuyen, entre otras dificultades (Chandelier *et al.*, 2010). A medida que los Ct avanzan en el tiempo, existe menor cantidad de templado, lo cual es asociado en muestras de expresión a una menor expresión relativa de un gen, sin embargo existe la posibilidad que esa amplificación corresponda, en ciclos muy tardíos a amplificaciones inespecíficas. Por el contrario, ciclos tempranos podrían corresponder a contaminación del templado y defectos de carga, defectos propios de una tecnología tan sensible como el PCR en tiempo real (Hayden *et al.*, 2006).

Por esto, se analizó y desglosó los valores de Ct de todos genes y muestras analizadas, para categorizar los Ct de las muestras e identificar si existe una predominancia de estos para ciclos tardíos o tempranos, los resultados se presentan en los cuadros 7a, 7b, 7c y 7d.

Angiogénesis (HAPL-1) Pathway Cts								
Rango	Muestra							
	90T	90A	38T	38A	89T	89A	54T	54A
Cts 0-10	0	0	0	0	0	0	0	0
Cts 10-20	3	1	3	0	4	2	2	1
Cts 30-40	55	23	56	27	35	35	51	39
Cts 40-50	30	55	29	55	39	45	37	47

Cuadro 7a. Rango de ciclado para cada gen de la placa de angiogénesis.

WNT/Hedgehog (Custom 1) Pathway Cts								
Rango	Muestra							
	90T	90A	38T	38A	89T	89A	54T	54A
Cts 0-10	0	0	0	0	0	0	0	0
Cts 10-20	3	1	3	0	3	2	2	1
Cts 30-40	29	11	58	18	32	33	49	31
Cts 40-50	54	71	33	68	58	62	44	58

Cuadro 7b. Rango de ciclado para cada gen de la placa de Wnt/Hedgehog.

PI3K(HAKT-1) Pathway Cts								
Rango	Muestra							
	90T	90A	38T	38A	89T	89A	54T	54A
Cts 0-10	0	0	0	0	0	0	0	0
Cts 10-20	6	2	7	3	5	3	6	1
Cts 30-40	78	68	74	82	59	68	83	53
Cts 40-50	10	31	20	18	33	29	11	42

Cuadro 7c. Rango de ciclado para cada gen de la placa de PI3K.

Activación linfocitaria (Custom 2)								
Rango	Muestra							
	90T	90A	38T	38A	89T	89A	54T	54A
Cts 0-10	0	0	0	0	0	0	0	0
Cts 10-20	3	1	6	0	3	2	4	1
Cts 30-40	36	47	52	52	57	36	60	46
Cts 40-50	44	41	35	38	29	46	30	38

Cuadro 7d. Rango de ciclado para cada gen de la placa de activación linfocitaria.

En la figura 14 se identifican los rangos de Ct de los genes agrupados por vía de señalización analizada, donde se puede concluir que no existen muestras que amplifiquen bajo el ciclo 10, indicando que no existen contaminaciones de templado ni excesos de carga. Así también, se observa la tendencia de los genes a amplificar entre los ciclos 20 y 40 lo cual está dentro de los rangos esperados para una PCR de tiempo real como lo señala Chandelier *et al.* (2010), siendo Cts más tardíos excluidos de análisis posteriores.

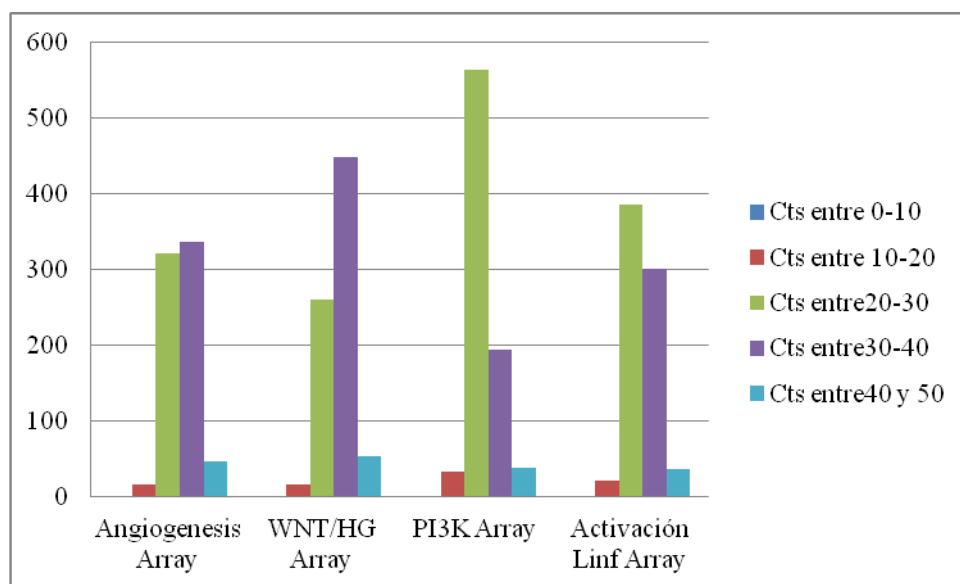


Figura 14. Proporción y distribución de rangos de los Cts de los genes para las distintas placas de PCR Array analizadas.

4.3.4. Selección y pruebas de estabilidad de normalizadores. Los genes normalizadores son genes cuya expresión es estable entre las diferentes muestras, permitiendo comparar genes de interés contra estos de forma directa. Para este trabajo se utilizaron los normalizadores internos contenidos en las placas de PCR Array sumado a los partidores recomendados por la publicación de Rubie *et al.* (2005) sobre muestras de cáncer gástrico,. En esa publicación se destaca que normalizadores universalmente utilizados, como GAPDH, presentan ratios de variación importantes frente a otros genes normalizadores testeados, lo que supone que cada normalizador debe ser analizado para cada tipo de muestra a utilizar, pues distintos tejidos presentan niveles de ARNm muy diferentes.

Para ello, se identificó los valores de Ct de los normalizadores en las cuatro muestras y se analizaron mediante geNorm, cuya finalidad es analizar la media geométrica de los normalizadores en las muestras, dando un puntaje de normalización, siendo elegidos los mejores 9 normalizadores: BACT, G3PDH, B2M, HPRT, RPL13A, PGK1, PPIA, QARS y POLR2L. En la figura 15, se observan los valores de correlación de los distintos normalizadores, todos ellos con valores bajo el rango máximo aceptado por este software, así también en la figura 16, se identifican las dispersiones que se obtienen al sumar, paulatinamente, un nuevo normalizador. Así, se escogieron los 9 normalizadores anteriormente nombrados, ya que en su conjunto presentaban una varianza de 0.02.

Change Data	ACTB	B2M	GAPD	HPRT1	PGK1	PPIA	RPL13A	QARS	POLR2L	Normalisation Factor
90 T	1.86E+01	1.85E+01	2.08E+01	2.52E+01	2.36E+01	2.64E+01	1.78E+01	2.34E+01	2.77E+01	0.9928
90 N	2.15E+01	1.99E+01	2.11E+01	2.67E+01	2.23E+01	2.28E+01	1.82E+01	2.69E+01	2.83E+01	1.0230
89 T	1.77E+01	1.77E+01	1.87E+01	2.59E+01	1.88E+01	2.22E+01	1.75E+01	2.26E+01	2.35E+01	0.9094
89 N	1.83E+01	1.72E+01	1.91E+01	2.40E+01	1.96E+01	2.02E+01	1.62E+01	2.53E+01	2.75E+01	0.9185
54 T	2.12E+01	2.11E+01	2.25E+01	2.70E+01	2.33E+01	2.45E+01	2.05E+01	2.63E+01	2.99E+01	1.0680
54 N	2.07E+01	2.07E+01	2.26E+01	2.82E+01	2.83E+01	3.04E+01	2.36E+01	2.32E+01	2.85E+01	1.1144
38 T	1.65E+01	1.48E+01	1.75E+01	2.29E+01	1.93E+01	2.17E+01	1.68E+01	2.48E+01	2.84E+01	0.8901
38 N	2.22E+01	2.24E+01	2.31E+01	2.83E+01	2.68E+01	2.87E+01	2.26E+01	2.35E+01	2.72E+01	1.1126
M < 1.5	0.118	0.129	0.104	0.118	0.142	0.152	0.136	0.191	0.165	

Figura 15. Análisis de geNorm para la identificación de estabilidad de normalizadores, todos ellos presentan un $M < 1.5$ siendo todos considerados como factores de normalización.

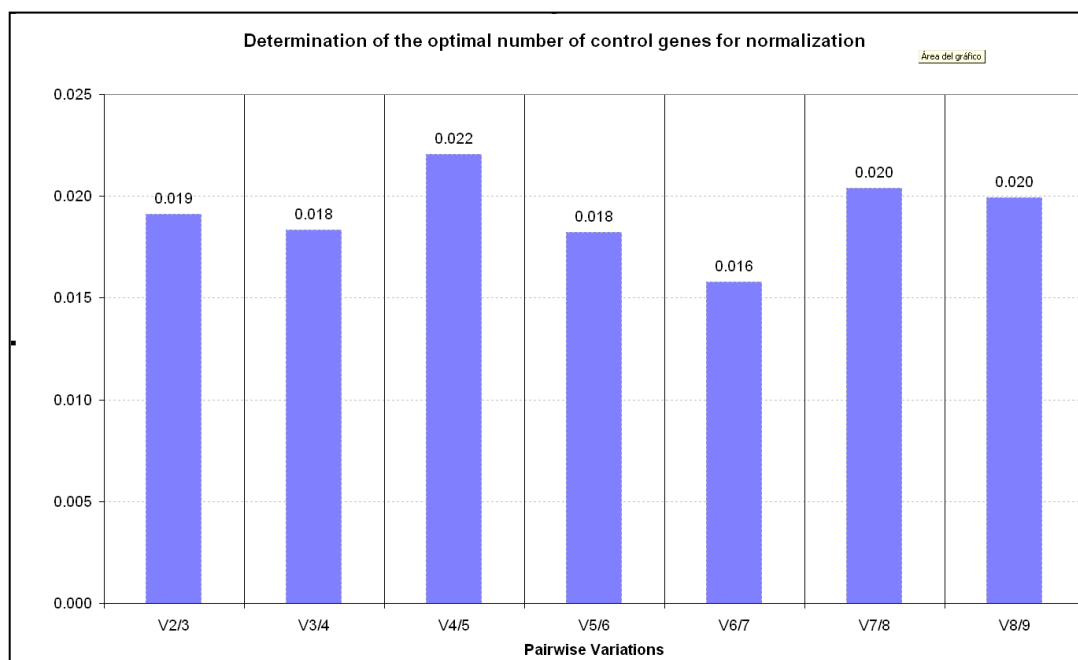


Figura 16. Análisis de geNorm para la identificación del número óptimo de genes normalizadores a utilizar.

De los nueve normalizadores analizados, GAPDH, ACTB y HPRT1 fueron los con menor variabilidad, mientras que QARS, POLR2L y PPIA fueron los con mayor variabilidad en las muestras analizadas. Sin embargo, todos ellos presentan un valor de M ($M < 1,5$) o media geométrica, muy por debajo de la máxima recomendada por el software, no descartándose ninguno de ellos para el posterior análisis.

4.4. PI3K Pathway Array y genes desregulados.

De la totalidad de genes evaluados para esta vía de señalización, un número considerable de ellos (44) se encontró sobreexpresado, concluyendo que la vía en estas muestras se encontraba alterada. En la figura 17 se pueden identificar los cambios de expresión relativos de cada uno de los genes, 18 de ellos presentaron un valor de cambio superior a 10, indicando que están muy sobreexpresados en el tumor, con respecto a su control fenotípicamente normal (tejido adyacente).

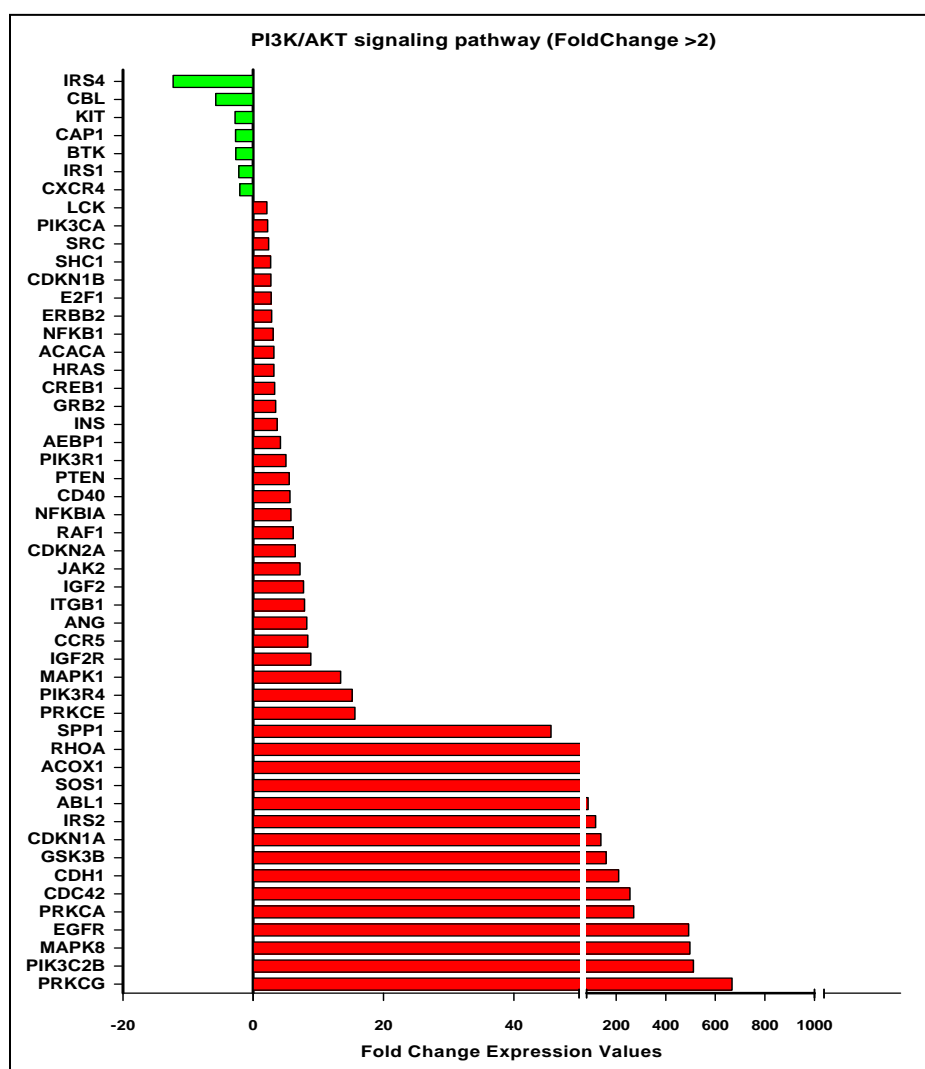


Figura 17. Gráfica de expresión de muestras analizadas para PI3K, en rojo genes sobre expresados, en verde genes reprimidos respecto a la condición control.

Se puede observar una alta expresión del gen **AKT1** (FC: 293,39, ver gráfica angiogénesis PCR array), gen que se ha postulado como un blanco terapéutico en cáncer gástrico, ya que la inhibición de este gen por siRNA disminuye los niveles de expresión de BCL-2 y incrementa la apoptosis en líneas celulares de cáncer gástrico (Cui *et al.*, 2009). Así también se ha demostrado que la inhibición de AKT1 potencia significativamente la sensibilidad de la línea celular de cáncer gástrico AGS a drogas utilizadas en quimioterapia como vincristina, *cis* platino, 5-fluorouracilo y adriamicina (Han *et al.*, 2006).

Los resultados muestran una alta expresión de los sustratos del receptor de insulina **IRS-2** (FC: 117,142) y una disminución de **IRS-1** (FC: -2,21) y **IRS-4** (FC: -12,29). Estas proteínas se relacionan estructuralmente con proteínas adaptadoras de señalización intracelular que integran y coordinan numerosas señales intracelulares claves dentro de la célula. Además, se sabe que son moléculas de señalización responsables de algunas funciones del receptor de IGF-I (IGF-IR). La expresión de las proteínas IRS es regulada por una serie de vías fisiológicas en respuesta a mitógenos y metabolismo, esteroides, citoquinas, hormonas y integrinas. Alteraciones en IRS también se han relacionado con diabetes y determinados cánceres (hepático, páncreas y mama). Existen dos vías de señalización descritas para IRS: la canónica y no canónica. La canónica se caracteriza por el enlace de IRS-1 y IRS-2, vía los dominios conservados PH y PTB, para enlazarse y fosforilar a IGF-IR, como resultado se activan vías corriente abajo, siendo dos de las más estudiadas PI3K y la vía de señal extracelular regulada por quinasas (ERK), vías extensamente relacionadas a la malignidad y progresión tumoral. Por otro lado, la vía no canónica se relaciona con la activación mediante IRS de tirosinas quinasas citoplasmáticas asociadas a receptores que pertenecen a la súper familia de receptores de citoquinas. IRS fosforilado se une al bucle de la proteína de señalización BCL-2, suprimiendo la fosforilación de este último, lo que conduce a aumentar su actividad anti-apoptótica. Por esto es que varios investigadores se han dedicado a examinar los niveles de IRS en líneas celulares de cáncer y tejidos. IRS1 y 2 se han encontrado sobre expresados en carcinoma hepatocelular y de páncreas, mientras que la expresión de IRS-1 se ha encontrado reprimida en cáncer escamoso de pulmón. IRS-1 se ha encontrado activa en cáncer de mama y su sobreexpresión no sólo se relaciona a la transformación y tumorigenesis, sino también al aumento de vías oncogénicas conocidas

previamente para este cáncer (Dearth *et al.*, 2007). Existen estudios limitados al cáncer de mama los que se ha utilizado la siRNA para generar supresión de IRS-2.

PRKCA (FC: 270,97) y **PRKCG** (FC: 667,37) son proteínas quinasa (PKC), PRKCA equivale a la forma alfa y PRKCG a la gamma. Son proteínas específicas de tipo serina-treonina quinasa que pueden ser activadas por calcio y el segundo mensajero es diacilglicerol. Estas proteínas están implicadas en varias funciones biológicas como proliferación, apoptosis y migración. Las PKCs convencionales son activadas en respuesta a aumentos en las concentraciones de calcio intracelular y diacilglicerol. Las diferentes isoenzimas se han encontrado alteradas en líneas celulares de cáncer de colon y carcinomas comparados con epitelio intestinal normal. PRKCA se ha encontrado sobreexpresada en la línea celular de mama MCF-7 y células de glioma U87. Se ha reportado que PRKCA fosforila la proteína transcriptasa reversa de los telómeros, llevando a la activación de estos en células de cáncer de mama. Por otro lado, esta proteína se encuentra altamente sobreexpresada en las líneas celulares de adenocarcinoma gástrico CPP32, MKN-45 y MKN-74, relacionándose esta con el fenómeno de amplificación génica. PRKCA es propuesto como un marcador pronóstico para cáncer gástrico (Lin *et al.*, 2008). Se ha encontrado una asociación entre PRKCA y resistencia a drogas en cáncer humano (Ying Chen, 2009). El silenciamiento génico de PRKCA, mediante oligonucleótido anti sentido (ASO), llamado Aprinocarsen hace ser más sensibles a las células tumorales a la apoptosis y al arresto celular. En relación a PKCG, un alto nivel de expresión se ha relacionado con líneas celulares de cáncer de colon avanzado o metastásico. Se ha reportado que PKCG está envuelto en migración celular inducida por IGF-1 en células epiteliales de colon (Andre *et al.*, 1999; Garczarczyk *et al.*, 2010). Se ha encontrado un alto nivel de expresión de PKCG en líneas epiteliales de mama en transformación (Mazzoni *et al.*, 2003). Además, la expresión de PKCG ha demostrado ser un factor pronóstico positivo en linfoma de células B (Kamimura *et al.*, 2004). Actualmente, existen inhibidores de PKC convencionales que se encuentran en ensayos pre-clínicos (Martiny-Baron and Fabbro, 2007).

RHOA (FC: 53,36) es un miembro de la familia de las GTPasas, que ha sido extensamente estudiado en la regulación de la dinámica del citoesqueleto, transcripción génica, progresión del ciclo celular y transformación celular. Una sobreexpresión de RHOA se ha encontrado en muchas enfermedades y su elevada actividad se asocia con la proliferación de células cancerosas. La sobreexpresión ha sido detectada en cáncer pancreático, cáncer de mama no inflamatorio, melanomas, pulmón, color rectal y cáncer gástrico. La inhibición de la mutante de RhoA previene la transformación de la vía Ras en fibroblastos. La activación de RhoA es crucial para la progresión del ciclo G1-S a través de la regulación de la familia de supresor de tumores Cip/Kip. La supresión selectiva de RhoA mediante siRNA y inhibidores farmacológicos disminuye la proliferación y la transición del ciclo celular de G1-S en líneas celulares de cáncer gástrico (Zhang *et al.*, 2009).

El protooncogen **ABL1**, C-BL Oncogene 1 (FC: 86,86), codifica a una proteína tirosina quinasa citoplasmática y nuclear que ha sido implicada en los procesos de diferenciación celular, división celular, adhesión celular y respuesta al estrés. La actividad de la proteína, es regulada negativamente por un dominio SH3, y la delección del dominio SH3 convierte a ABL1 en un oncogen. La represión de ABL1 con el inhibidor *imatinib* potencia la sensibilización al tratamiento con *fulvestrant* en cáncer de mama ER positivo, decreciendo el número de células en proliferación y la progresión del ciclo celular (Zhao *et al.*, 2011). No existiendo referencias de este gen y su inhibición en cáncer gástrico.

SOS1 (FC: 75,22) llamado “*son of sevenless homolog 1*” es un activador de Ras/MAPK y, se ha reportado como blanco terapéutico en cáncer de próstata. El silenciamiento de SOS1 disminuye la sobrevivencia y proliferación, migración e invasión en líneas celulares de próstata. El mecanismo para su inhibición es la disminución de la fosforilación de ERK1/2. La expresión de SOS1 se relaciona con el grado de tumor y por ende con la agresividad del cáncer de próstata (Timofeeva *et al.*, 2009). Existe información en que el complejo SOS1/EP28/ABIL se relaciona con metástasis en cáncer de ovario (Chen *et al.*, 2010).

PIK3C2B (FC: 511,57) es un miembro de la familia de las PI3K que han sido relacionado en múltiples procesos celulares. PI3KC2 α y PI3KC β se han implicado en la señalización de receptores de tirosina quinasas. La interacción de PI3KC β con el receptor EGF requiere de la proteína adaptadora GRB2, y de los dominios SH3 que se enlazan directamente a tres regiones ricas en prolina cerca del amino terminal de PI3KC2 β . La proteína PI3KC2 β es requerida para la activación de AKT y SCF. PI3KC2 β regula la activación de Rac y N-terminal quinasa (JNK). Interesantemente, dentro de los datos de la PCR Array se encuentra aumentada la expresión de **IGF1** (FC: 1001,71) **IGF2** (FC: 7,72) y de **AKT1** (FC: 293,39). Todos relacionados de forma intrínseca con proteínas quinasas. Estudios realizados con siRNA en células de carcinoma epidérmicas sugieren que PI3KC2 β regula la migración y la supervivencia de las células tumorales humanas por diferentes mecanismos moleculares (Katso *et al.*, 2006). Además, se ha encontrado una asociación entre PI3KC2 β y riesgo de cáncer de próstata (Koutros *et al.*, 2010).

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (**EGFR**) (FC: 492,69), es un miembro de la familia de los receptores ERBB, que se encuentra envuelto en la regulación de la proliferación y progresión de los carcinomas gástricos. La sobreexpresión de EGFR se asocia con un mal pronóstico en cáncer gástrico. Se sugiere a EGFR como un buen blanco molecular para la terapia del cáncer, la combinación entre cetuximab (anticuerpo monoclonal de EGFR) y FOLFIRI ha demostrado ser muy positivo en cáncer gástrico. La activación del receptor EGFR inicia múltiples cascadas de señal corriente abajo que influyen muchos aspectos de la biología del tumor, incluyendo la proliferación, apoptosis, adhesión, migración y diferenciación. Dentro de las cascadas de señalización activadas por EGFR destacan la vía de señalización de Ras/MAPK, PI3K/AKT, JAK-STAT, PLC γ (fosfolipasa γ) y la liberación de calcio intracelular (Wu *et al.*, 2010).

La *glycogen synthase kinase 3 beta* (**GSK3B**) (FC: 159,33) se caracteriza por reprimir la vía Wnt/beta-catenina y regular el balance entre la proliferación celular y la apoptosis. La inactivación de GSK3B puede jugar un rol crítico en la tumorigénesis y el desarrollo de malignidad. Estudios realizados en cáncer gástrico indican la sobreexpresión de GSK3B y que

esta se relaciona con carcinogénesis gástrica y progresión, por lo cual, se postula el empleo de esta proteína como marcador de agresividad y pronóstico (Zheng *et al.*, 2010). GSK3B es necesaria para mantener la arquitectura del epitelio, la inhibición de esta proteína genera transición epitelio-mesenquimal (EMT), un fenómeno necesario para el normal desarrollo y progresión de los tumores epiteliales malignos. GSK3B puede mantener la morfología epitelial por inhibición de la expresión de SNAIL. Cabe destacar, que la inactivación de GSK3B se relaciona con la infección por *H. pylori*.

SPP1 (*secreted phosphoprotein 1*, Spp1) (FC: 45,70) es una proteína envuelta en respuesta al estrés, adhesión celular, inflamación, cicatrización, quimiotaxis y sistema inmune. Se ha demostrado que su expresión está aumentada en muestras de cáncer gástrico con presencia de metástasis. Se ha reportado como promotor de la angiogénesis y metástasis en cáncer gástrico. La alta expresión de SPP1 también se encuentra asociada a cánceres de pulmón, próstata, mama, páncreas y ovario (Junnila *et al.*, 2010). Mediante la inhibición con siRNA células de glioma han demostrado que la expresión disminuida del gen promueven la apoptosis (Xu Tao1 and Luo Chun1, 2010).

MAPK8 (*mitogen-activated proteína kinase 8*) o JNK1 (FC: 497,56) es un miembro de la familia de las MAP quinasa. Las MAPKs o quinasas mitógena están envueltas en varios procesos celulares, como proliferación, diferenciación, regulación de la transcripción y desarrollo. El efecto inhibitorio de JNK contribuye al efecto antitumoral por inhibición específica COX-2, también se ha referenciado que inhibición de JNK activado puede tener un efecto terapéutico en cáncer gástrico (Wong *et al.*, 2004).

4.5. Angiogenesis Pathway Array y genes desregulados.

La vía de señalización de angiogénesis presentó un total de 62 genes alterados, con tendencia a la sobreexpresión génica, en la figura 18 se pueden identificar los genes con mayores veces de cambio. Así, 56 genes presentaron al menos dos veces de cambio respecto a los tejidos adyacentes, 25 presentaron un nivel de cambio mayor a diez, los cuales tienen relación diversa a la enfermedad.

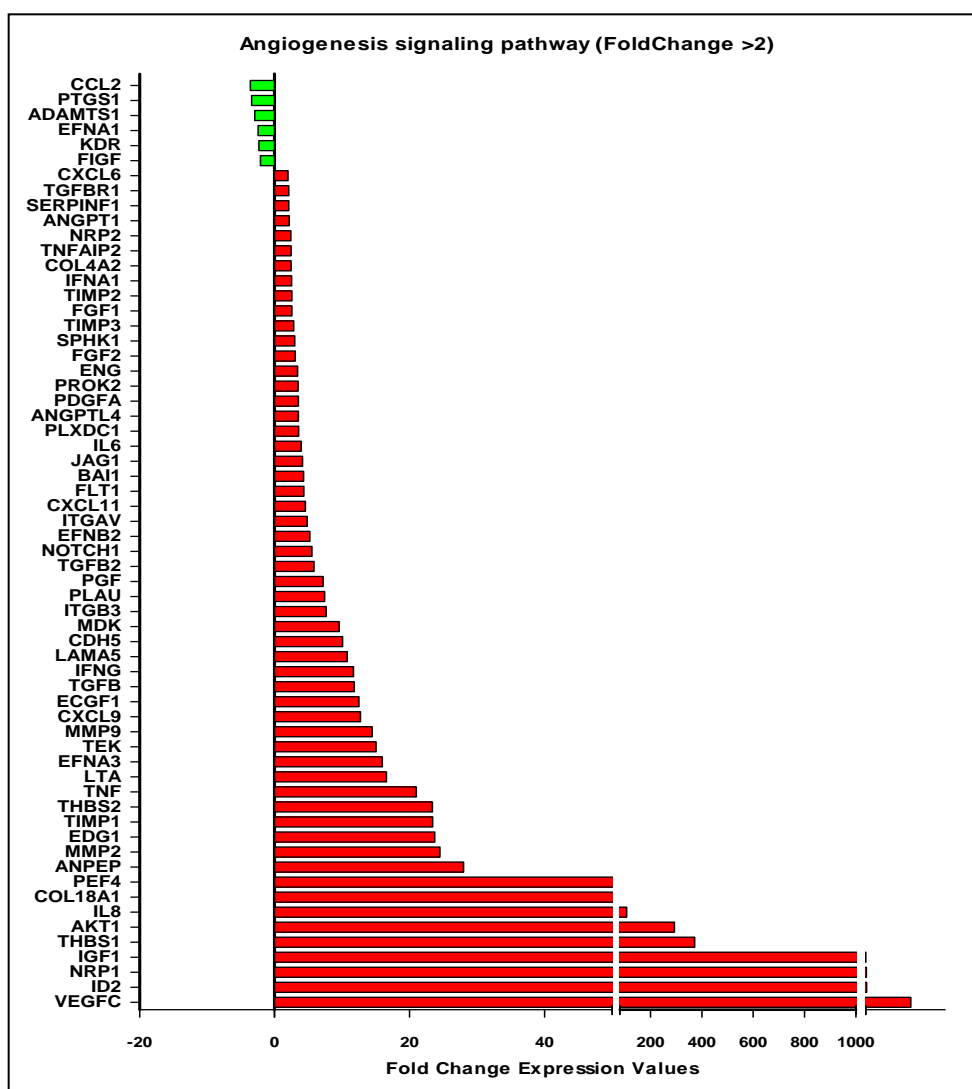


Figura 18. Gráfica de expresión de muestras analizadas para Angiogenesis, en rojo genes sobre expresados, en verde genes reprimidos respecto a la condición control.

Estudios previos han reportado que **VEGFC** (FC: 284915,13), podría mediar fenotipos tumorales confinados, siendo un aparente blanco terapéutico (He *et al.*, 2004) en cáncer de pulmón y de tubo digestivo (Zwaans and Bielenberg, 2007). Así también, otro factor involucrado en la progresión vascular es Interleuquina 8 (**IL8**) (FC: 107,17) la cual presenta patrones de expresión similares a VEGFR y VEGF en metástasis de cuello y cabeza (Gokhale *et al.*, 2005). Se ha reportado que puede ser un potencial marcador sérico tanto como VEGF-C (Yano *et al.*, 2006).

INFG (FC: 11,68) es el gen codificante para INF- γ , citoquina producida solo por células linfocitarias y por lo mismo responde a la heterogeneidad propia de las muestras, al igual que **COL18A1** (FC: 54,95), colágeno propio de las muestras fibroblastos, accesorios a las células neoplásicas (Spivey *et al.*, 2010). INF-G representa una molécula activadora de linfocitos, siendo producida mayoritariamente por linfocitos T *helpers*, relacionado con el aumento de actividad antitumoral. (Schroder *et al.*, 2004).

CXCL9 (FC: 12,74) es una citoquina que no presenta una función descrita, así también existen pocos trabajos de esta proteína en cáncer, no obstante a ello, en el año 2011, el grupo de Amatschek *et al.* (2011) demostró que células endoteliales en melanoma aumentaban la expresión de esta proteína, fomentando fenotipos metastásicos.

EFNA3 (FC:15,97) es una proteína de desarrollo neural y su expresión está regulada por miR-210 (Pulkkinen *et al.*, 2008) siendo inactivado por este miRNA (Fasanaro *et al.*, 2008), sin embargo la información que se posee de este gen en cáncer es muy escasa, siendo un posible marcador de cáncer gástrico y un gen potencial a estudiar en este modelo.

Thrombospondin 1 y 2, **THBS1** y **THBS2** (FC: 371,72, FC: 23,38) son dos proteínas que juegan un papel importante en la progresión tumoral (Zhou *et al.*, 2009), ambas proteínas están involucradas en la vía de señalización de **TGF-B** (FC: 11,82), actuando como activador de la vía de señalización SMAD, proteínas que presentan un rol bivalente en distintos cánceres (Crawford

et al., 1998). El rol de THBS en diversidad de cánceres también varía, siendo un gen de progresión tumoral en cáncer esofágico, incluso señalado como marcado angiogénico en algunos trabajos (Secord *et al.*, 2007). En el mismo trabajo Secord (2007), identificó que existe una menor sobrevida relacionada a pacientes con mayor expresión de THBS1 en cáncer ovárico.

Uno de los factores fundamentales tanto en la proliferación celular, invasión tumoral, en la angiogénesis y en la metástasis es la producción de enzimas proteolíticas envueltas en la degradación y remodelación de la matriz extracelular. Una de estas familias son las enzimas denominadas metaloproteinasas de matriz (MMPs). **MMP9** (FC: 14,47) o gelatinasa, es una metaloproteinasa dependiente de zinc, expresada predominantemente en células epiteliales y glandulares (Leinonen *et al.*, 2006; Fukuda *et al.*, 2011) estando sobre expresada en variedad de cánceres glandulares, siendo reportado ampliamente en adenocarcinoma pancreático ductal y lesiones preneoplásicas pancreáticas (Yamamoto *et al.*, 2001). Su aumento en la expresión está correlacionado con una menor sobrevida, como también en el desarrollo tumoral (Stetler-Stevenson *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 2001). En diversidad de cánceres del tubo digestivo su aumento en la expresión está correlacionado con un aumento de β -catetina, aumentando MMP7 y MMP9 (Ougolkov *et al.*, 2002; Leinonen *et al.*, 2006). Su inhibición en conjunto con otras metaloproteinasas como es **MMP2** (FC: 24,50) produce una disminución de la progresión en fenotipos metastásicos en modelos de cáncer de colon (Chu *et al.*, 2011). En cáncer gástrico se ha identificado un aumento en la expresión de estas proteínas (Lee *et al.*, 2008).

El desprendimiento celular desde la matriz extracelular (MEC) requiere un balance constante entre la expresión de MMPs, los componentes de la matriz, los factores angiogénicos y las proteínas inhibitorias de metaloproteinasas o TIMP (**TIMP1** FC: 23,43), estas últimas presentan variedad en su expresión (Mroczko *et al.*, 2009), teniendo TIMP1 un patrón aumentado en pacientes diagnosticados con cáncer gástrico, siendo un marcador pronostico para la enfermedad (Lukaszewicz-Zajac *et al.*, 2009).

LAMA5 (FC: 10,75) es el codificante para *Laminin $\alpha 5$* , familia de proteínas involucrada en matriz extracelular que lidera procesos de adhesión, migración y proliferación (Tani *et al.*, 1997), se ha descubierto que su expresión correlaciona con la invasividad en melanomas (Vogelmann *et al.*, 1999) (Oikawa *et al.*, 2011). **ANPEP** (FC: 28,00) es una alanina peptidasa que presenta muy pocas referencias bibliográficas, sin embargo, un *screening* por microarreglos de cáncer de colon lo propuso como un marcador pronóstico de la enfermedad (Wiese *et al.*, 2007).

Neurophylin 1 o **NRP-1** (FC: 4450,00) es un receptor de membrana que está frecuentemente expresado en células cancerosas y contribuye de forma positiva a la progresión tumoral interactuando con TGF- β (Glinka *et al.*, 2011). En cáncer de pulmón se demostró que existe una fuerte asociación entre aumentos de expresión de ambas isoformas y un incremento en el número de vasos sanguíneos alrededor del tumor (Kim *et al.*, 2009) suponiendo que NRP-1 es un componente crucial en la angiogénesis y podría ser eventualmente un blanco terapéutico interesante en distintos tipos de cáncer, incluido al cáncer gástrico (Larsen *et al.*, 2011; Zagouri *et al.*, 2011).

MKD (FC: 9,57) corresponde a un factor de crecimiento expresado en procesos de embriogénesis, angiogénesis, crecimiento celular y migración celular vinculándose de forma positiva en una serie de cánceres entre los que se incluyen al cáncer al pulmón, mama, cáncer gástrico y páncreas (Reynolds *et al.*, 2004; Ibusuki *et al.*, 2009; Qin Li *et al.*, 2011; Rawnaq *et al.*, 2011). Se ha descrito que su expresión promueve el crecimiento de líneas celulares gástricas (Rawnaq *et al.*, 2011).

TEK (FC: 15,03) codifica para el receptor Tie-2, el cual está involucrado en la angiogénesis y cáncer, la inhibición de genes relacionados (Ang1 y Ang2) disminuye su expresión en líneas gástricas (Park *et al.*, 2011), siendo además encontrado en concentraciones superiores en pacientes con cáncer que los controles en cáncer cervical y gástrico, suponiendo que representaría un buen marcador angiogénico y blanco para su silenciamiento (Wang *et al.*, 2005; Kopczynska *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Harfouche *et al.*, 2011).

Junto con otros factores angiogénicos **TYMP** (FC: 12,50), anteriormente llamado **ECGF1**, representa una fosfatasa que lidera la agresividad y metástasis tumoral en diversidad de cánceres, incluyendo al cáncer gástrico (Jang *et al.*, 2007) (Bijnsdorp *et al.*, 2011). Jang (2007) encontró una correlación positiva entre la expresión de esta proteína y la menor supervivencia de los pacientes a distintos estadios de la enfermedad, siendo un posible marcador gástrico e interesante blanco terapéutico.

ID2, inhibidor de unión a DNA 2 (FC: 6777,65) ha sido caracterizado como un inductor de la proliferación y metástasis en el cáncer colon rectal, parte de la vía de señalización SMAD4/BMP.7, genes que presentan un comportamiento heterogéneo en distintos tipos tumorales (Shi *et al.*, 2011), se ha demostrado además que es un fuerte promotor tumoral en células gliales (Coma *et al.*, 2010).

4.6. WNT/Hedgehog Pathway Array y genes desregulados.

A partir de los resultados obtenidos de la PCR Array podemos concluir que en cáncer gástrico, la desregulación la vía Wnt está dada principalmente por la activación de dos vías: la vía no canónica/JNK (Jun N-terminal kinase) y la vía de señalización mediada por calcio. Se destaca, de la vía canónica de Wnt la activación corriente debajo de β -catenina y el alto nivel de expresión de algunos antagonistas de la vía canónica como **SFRP4** (FC: 41,78) y **CTBP1** (FC: 70,08). En la figura 19 se observa las veces de cambio de todos los genes involucrados para esta metodología, encontrándose 55 genes desregulados. Siendo importante destacar la activación de Wnt en estos tumores.

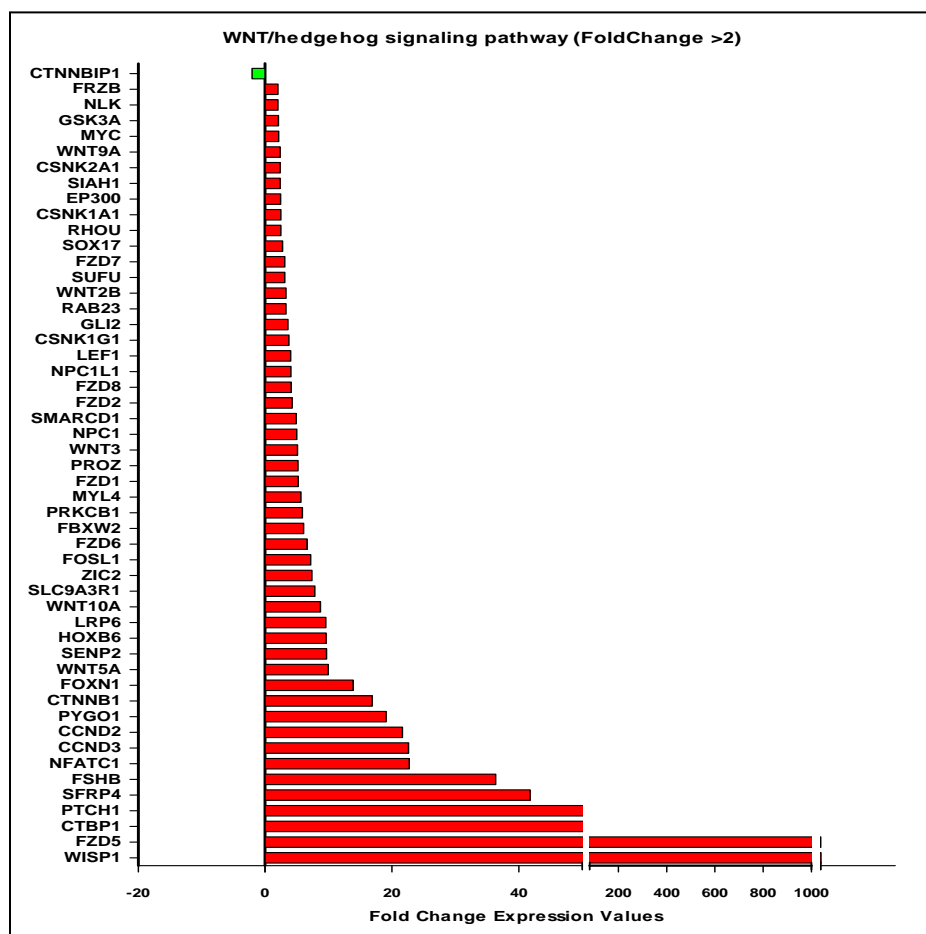


Figura 19. Gráfica de expresión de muestras analizadas para WNT/Hedgehog. En rojo genes sobre expresados, en verde genes reprimidos respecto a la condición control.

En la PCR Array para la vía de Wnt, se encontraban los genes WNT10A, WNT11, WNT16, WNT2B, WNT3, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT7A, WNT8A, WNT9A. De ambas vías los componentes principalmente alterados son los ligandos **WNT10A** (FC: 8,73), **WNT2B** (FC: 3,31), **WNT3** (FC: 5,11), **WNT9A** (FC: 2,37) y **WNT5A** (FC: 9,95), los receptores **FZD1** (FC: 5,24), **FZD2** (FC: 4,28), **FDZ5** (FC: 1083,29), **FZD6** (FC: 6,61), **FDZ7** (FC: 3,09) y **FDZ8** (FC: 4,10) y el co-receptor **LRP6** (FC: 9,58). ligando que se encontró más alterado fue **WNT5A** (FC: 9,95) y su respectivo receptor **FZD5** (FC: 1083,29).

La vía Wnt/ β -catenina es una vía de señalización ampliamente estudiada en cuanto a su rol respecto al desarrollo del cáncer, cuyo componente principal es β -catenina que normalmente es ubiquitinada y degradada al estar arrestada en el complejo GSK3B/APC/Axina. Su activación depende de las proteínas WNT, ligandos que se unen a los receptores de membrana FZD, los cuales interactúan con LRP, provocando el secuestro intracelular del complejo y liberando β -catenina, para que este difunda hacia el núcleo e interaccione con los factores de transcripción LEF y TCF.

Wnt5a, es el ligando de FZD5 y está envuelto en la activación de la vía canónica y no canónica. Sin embargo, este ha sido principalmente asociado como miembro de la familia no canónica, con relevancia en la vía modulada por quinasas RHO y Calcio (Ca^{+2} , Calmodulina) (Nishita *et al.*, 2010). Esta proteína es un ligando envuelto en la migración e invasión a través de la activación de Wnt independiente de β -catenina. Algunos estudios indican que Wnt5a actúa como un supresor tumoral, debido a su capacidad de inhibir β -catenina. Por ejemplo, se ha demostrado que Wnt5a induce la represión de β -catenina a través de SIAH2, que actúa como una ubiquitina ligasa de β -catenina (Topol *et al.*, 2003) o por la inhibición de la actividad transcripcional de Tcf/Lef (Mikels and Nusse, 2006). Por otra parte se ha descrito que Wnt5a inhibe la proliferación, migración y la invasión en líneas celulares de tumor de tiroides y cáncer color rectal (Dejmek *et al.*, 2005; Kremenevskaja *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2009). En contraste a estas observaciones, se ha sugerido un potencial oncogénico basado en la sobreexpresión en los niveles de ARNm que se ha encontrado en cáncer de pulmón, próstata y

mama (Iozzo *et al.*, 1995). Existe una correlación entre la expresión de Wnt5a y el aumento de la motilidad e invasión celular en células melanoma, cáncer gástrico y células de cáncer de mama asociadas a macrófagos (Weeraratna *et al.*, 2002; Pukrop *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2009). Por lo tanto el papel de Wnt5a en cáncer humano ha sido controversial y poco claro.

En relación a cáncer gástrico previamente se ha descrito que la vía no canónica de Wnt es inducida (Gencer *et al.*, 2010). En cáncer gástrico el silenciamiento de Wnt5a en líneas celulares y posterior implante de estas en el bazo de ratones desnudos disminuye el número de metástasis en el hígado (Yamamoto *et al.*, 2009). En líneas celulares de pulmón la interferencia con siRNA de Wnt5a disminuye la proliferación celular (Huang *et al.*, 2010) y en líneas celulares endoteliales disminuye la proliferación y migración celular (Cheng *et al.*, 2008). Siendo descrito que la represión de su receptor FZD5, por medio del uso de siRNA, en líneas celulares de carcinoma embrionario NT2/D1 suprime el crecimiento y mitosis de este tejido (Snow *et al.*, 2009).

Con respecto a la activación de algunos antagonistas, **SFRP4** (FC: 41,78) (Secreted Frizzled-Related Protein 4) es un miembro de la familia de SFRP que contiene un dominio rico en cisteína que se une al sitio de enlace de Wnt a las proteínas FZD, por lo cual esta proteína actúa como moduladora de la vía Wnt. La expresión de SFRP4 no ha sido estudiada en cáncer gástrico y su sobreexpresión ha sido reportada sólo en cáncer color rectal, cáncer de próstata y carcinoma de endometrio. Muley *et al.* (2010) describió a SFRP4 como un inhibidor o antagonista poco importante en la vía Wnt en el contexto del cáncer. La inhibición de SFRP4 por siRNA se ha realizado sólo en células de mesotelioma, relacionándose este con la activación de la vía Wnt, promoción del crecimiento y disminución de la apoptosis celular mediada por la quimioterapia (He *et al.*, 2005).

Por otro lado, **CTBP1** (FC: 70,08) (*C-terminal binding protein 1*) es una fosfoproteína que actúa como represor transcripcional de la vía y puede jugar un rol durante la proliferación celular. Los reportes de la expresión de CTBP1 en cáncer son limitados, no existiendo reportes en cáncer

gástrico. Recientemente, se ha identificado que la desregulación de CTBP1 como un paso clave en la iniciación de la formación en tumores de colon: la degradación de CTBP1 depende de APC en estas células y la mutación de APC conduce a un aumento de CTBP1, cuyo resultado es la iniciación de la formación de adenomas. Además, de sus funciones en la iniciación y progresión de la tumorigenesis, CTBP1 también han sido implicada en la respuesta celular a la quimioterapia. Se ha postulado a las diferentes proteínas CTBP o como un biomarcadores en cáncer de mama, ya que BRCA-1 y E-Cadherina estarían siendo regulados transcripcionalmente por CTBPs. El silenciamiento de CTBPs por siRNA se ha realizado en líneas celulares de cáncer de mama, restaurándose los niveles de expresión de BRCA1 y CDH1 (Deng *et al.*, 2011).

Tanto para **CCDN2** (FC: 21,64) como para **CCDN3** (FC:21,62) existe amplia evidencia que la interferencia mediada por miRNA disminuye la expresión del gen, arrojando la proliferación para líneas celulares de hepatocarcinoma (Kota *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011), así también se ha demostrado que el tratamiento con miRNA en líneas linfoides como co adyuvante a tratamientos de quimio y radioterapia han sido positivos en el tratamiento de la enfermedad (Shimura, 2011). En líneas celulares de cáncer gástrico se ha referenciado que la inhibición de estos genes promueve procesos apoptóticos y fenotipos con menores tasas proliferativas (Kota *et al.*, 2009).

B-Catetina (**CTNNB1** FC: 21,64) es el componente principal de la vía de señalización de WNT, siendo trascendental en la denominada vía canónica de Wnt (Bowerman, 2008), esta proteína está constitutivamente inhibida, por el complejo APC/GSK3B/Axina (Camilli and Weeraratna, 2010) siendo ubiquitinada y degradada. La activación está promovida por WNT al unirse al receptor de membrana FZD reclutando al complejo y liberando a β -catenina para que esta difunda al núcleo, activando y promoviendo vías de señalización relacionadas con procesos carcinogénicos por medio de la activación y reclutamiento de TCF/LEF (Angers and Moon, 2009; Deng *et al.*, 2011) y otra diversidad de factores de transcripción (Komiya and Habas, 2008; Deng *et al.*, 2011). Se ha demostrado que β -catenina es capaz de activar y promover SOX2, ciclinas D, metaloproteinasas (Deng *et al.*, 2011) entre otras proteínas involucradas en el desarrollo y malignidad de diversos tipos de cáncer (Nunez *et al.*, 2011). Se ha referenciado que

el uso de siRNA en líneas celulares gástricas produce fenotipos con menores tasas proliferativas y un aumento en la apoptosis, disminuyendo la expresión de MMPs (Ganesan *et al.*, 2008).

PYGO1 (FC: 19,06) es una proteína que presenta dos dominios, uno denominado Dominio de Homología, el cual es común a todas las isoformas y un segundo del tipo dedos de zinc (Nakamura *et al.*, 2007) actuando como promotor proximal durante en la activación génica (Mosimann *et al.*, 2009). Se ha referenciado que la inactivación de PYGO1 y PYGO2 no produce fenotipos con mayores alteraciones en la unión y actividad de BCL9 en líneas celulares HeLa y HEK293 (Dawlaty *et al.*, 2008)

FOXN1 (FC:13,88) es un gen regulatorio del desarrollo tímico, y su inhibición promueven desarrollo epitelial aberrante en ratones. No existen referencias sobre su vinculación en el cáncer (Zook *et al.*, 2011), más se sabe que su expresión está modulada por WNT (Balciunaite *et al.*, 2002; Mecklenburg *et al.*, 2005), así también el gen **HOXB6** (FC: 9,62), el cual está vinculado con el desarrollo del tubo digestivo y la señalización de Sonic-Hedgehog, es un factor de transcripción que presenta vaguísima información sobre su rol en el desarrollo del cáncer, viéndose alterada su expresión en cánceres del tubo digestivo (Yu *et al.*, 2007).

La proteína **NFATC1** o *Nuclear factor of activated T-cells cytoplasmatic 1* (FC: 22,75) es parte de una familia de factores de transcripción que se unen a la cromatina actuando como coactivadores de la regulación del crecimiento celular y sobrevivencia de líneas hematopoyéticas, capaz de unirse a c-Myc produciendo la activación de acetilasas y la activación de ELK-1 promoviendo el crecimiento y malignidad del cáncer, como se ha descrito para el cáncer pancreático y colon (Koenig *et al.*, 2010; Pham *et al.*, 2010)

Junto con las investigación de la señalización en WNT1, en 1998 fue descubierta la proteína **WISP1** (FC: 3313,3) en una línea epitelial de mama. “*WNT1 inducible signaling pathway protein 1*” es una proteína que modula múltiples respuestas celulares como el crecimiento, diferenciación y sobrevivencia en multiplicidad de cánceres, incluyendo al cáncer de colon, hígado y gástrico

(Berschneider and Konigshoff, 2011). Sin embargo, su función aun no está bien establecida (Konigshoff *et al.*, 2009). Se ha descrito que su inducción está relacionada con WNT1 y WNT3a y que presenta regiones *cis* dependientes de β -catetina, siendo definida su función como un remodelador de tejido. Su inhibición solo se ha descrito en torno a su rol como agente mitótico (Shanmugam *et al.*, 2011) , sin embargo en trabajos recientes se ha identificado como un marcador pronóstico en cáncer esofágico (Nagai *et al.*, 2011).

PTCH1 (FC: 52,15) o *patched* 1 es un receptor de naturaleza proteica que es esencial en la señalización de Hedgehog , involucrado en variedad de procesos que incluyen diferenciación, crecimiento y cáncer (Ingham and McMahon, 2001), se ha identificado que su expresión es variable en cada tipo tumoral, sin embargo es considerado un gen represor de tumores y normalmente su actividad es analizada en comparación al silenciamiento de otros genes (Gli y otros). No obstante a ello, se cree que está involucrado en las primeras fases de desarrollo tumoral hepático (Sanchez *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2008).

4.7. Activación Linfocitaria Pathway Array y genes desregulados.

La activación linfocitaria es común en múltiples enfermedades, mediando procesos inflamatorios e inmunes para la defensa del organismo. Se ha descrito que multiplicidad de cánceres median la respuesta inmunitaria para su propio provecho, incrementando su desarrollo y permitiendo el progreso de este. Con motivo a analizar la activación del sistema inmune y células fue realizada este experimento de PCR Array, identificando 29 genes con una sobreexpresión superior a las 10 veces en comparación al tejido adyacente.

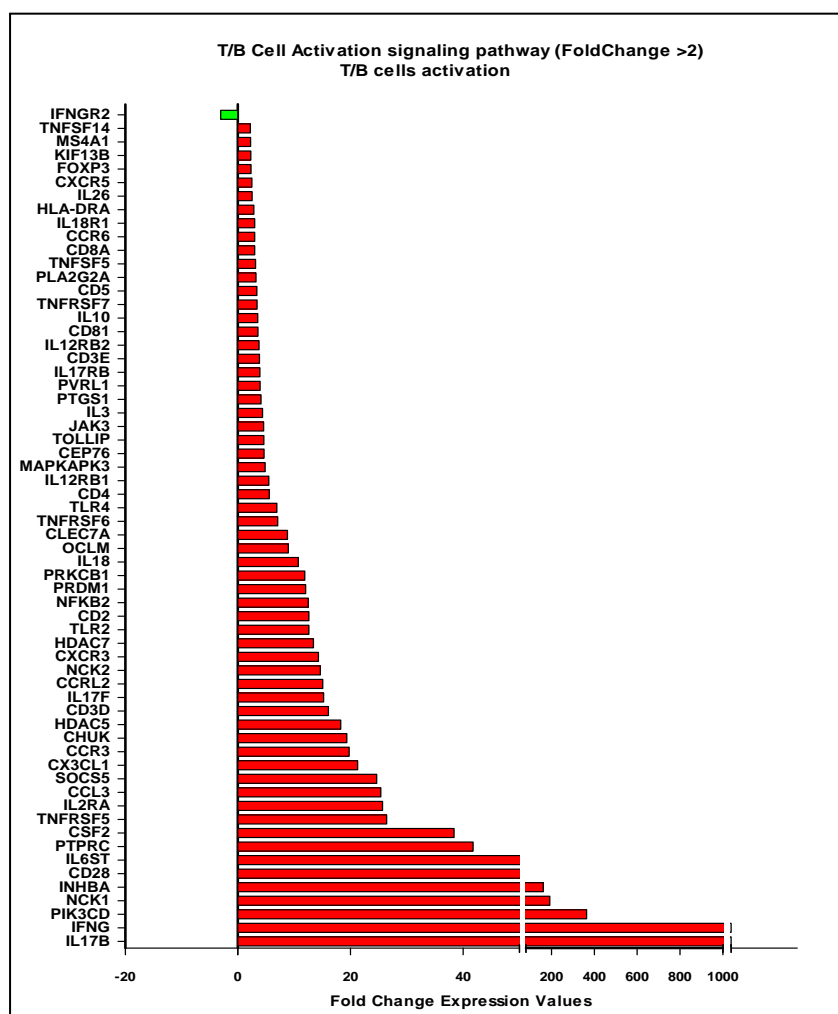


Figura 20. Gráfica de expresión de muestras analizadas para Activación Linfocitaria. En rojo genes sobre expresados, en verde genes reprimidos respecto a la condición control.

Uno de los factores a considerar en tejidos tumorales, es la presencia de múltiples estirpes celulares, las cuales promueven el ruido y aumenten la complejidad del entendimiento de los resultados. Esta vía de señalización analizada, compromete el estudio de factores y células de respuesta al tumor, tales como linfocitos, así en este PCR Array se encontró sobre expresión de múltiples proteínas de membrana expresadas solo por células linfocitarias, tales como **CD28** (FC: 63,01), **CD3D** (FC: 16,07), **CD2** (FC: 12,61) y **CXCR3** (FC: 19,77), todas ellas marcadores de linfocitos T, indicando que las muestras presentaban gran infiltración linfocitaria, propia de la respuesta orgánica en el desarrollo del cáncer. Seguido de esto, gran cantidad de quimioquinas, interleuquinas y factores activadores de la respuesta linfocitaria fue encontrado, prediciendo la gran reactividad que el tumor produce en los tejidos adyacentes.

Las Interleuquinas (IL) son citoquinas que actúan en la respuesta inflamatoria, expresados por diversidad de células, entre las que destacan células del sistema inmune y células endoteliales, su expresión está vinculada a procesos infecciosos, inflamatorios y activación del sistema inmune, **IL-17F /IL-17B** (FC:15,22 ; FC: 1795,43), **IL-18** (FC: 10,72), e **IL-6ST** (FC:52,75) son cuatro Interleuquinas pro inflamatorias incluidas en el desarrollo y progresión del cáncer (Felderhoff-Mueser *et al.*, 2005; Heikkila *et al.*, 2008; Reynolds *et al.*, 2010). Todas ellas han sido descritas como parte importante de la respuesta inflamatoria y progresión en diversos cánceres, incluyendo al cáncer gástrico (Zambon *et al.*, 2004). Las quimioquinas y sus receptores (**CCL3** FC:25,4 ; **CCRL2** FC:15,08 ; **CCR3** FC:19,77), en conjunto con otras moléculas como **INF-G** (FC: 1197) e interleuquinas (IL), son encargadas de mediar la respuesta pro inflamatoria activando distintos componentes inflamatorios, **CCL3** (FC: 25.4), es el codificante para una proteína inflamatoria, también denominada MIP (Montecucco *et al.*, 2008) que se ha encontrado en elevadas concentraciones en biopsias rectales (Ajuebor *et al.*, 2004) que además se ha relacionado al reclutamiento de neutrófilos y la inducción de células endoteliales por medio VEGF(Roffe *et al.*, 2010).

INHBA (FC: 1197) codifica para inhibina, subunidad de una proteína compuesta por activina e inhibina, la cual se encuentra sobre expresada en cáncer gástrico, considerándose como marcador de la enfermedad (Wang *et al.*, 2010; Kaneda *et al.*, 2011). La inhibición por siRNA en cáncer de pulmón demostró una baja en la proliferación a las 96 horas de (Seder *et al.*, 2009).

La familia de genes NCK (**NCK1** FC: 192,11 y **NCK2** FC: 14,62) corresponden a proteínas adaptadoras con dominios SH2/SH3 que tienen como función guiar y reclutar proteínas para facilitar su interacción (Ger *et al.*, 2011). En el caso de las NCK1 y NCK2, estas son capaces de activar y reclutar proteínas de la vía MAPK, tales como RAS y SOS para su fosforilación y señalización concertada, siendo estas partes de múltiples respuestas celulares (Buday *et al.*, 2002). Se ha descrito su rol como proteínas oncogénicas (Li *et al.*, 1992) y su inhibición se ha realizado en experimentos del desarrollo en ratones identificando que el doble negativo de ambos genes presenta aberraciones en su desarrollo (ver referencias de Hehlhans *et al.*, 2007).

Por último, es importante mencionar la sobre expresión encontrada para los genes **TLR2** y **TLR4** (FC: 12,61 ; FC: 6,91) o los receptores *Toll*, ambos receptores asociados a un aumento de la inmunidad innata mediada por bacterias, siendo asociado un aumento de expresión a la prevalencia de *Helicobacter pylori* en muestras de cáncer gástrico, encontrándose que las muestras analizadas presentan un alteración de este marcador probablemente mediada por la presencia de esta infección bacteriana.

4.8. Relación entre la expresión de ARNm y marcaje de proteínas por medio del uso del Human Atlas Protein.

Una vez categorizado los genes con mayor nivel de cambio, se realizó una búsqueda de la expresión de proteínas en tejidos de carcinoma gástrico, en la base de datos del Human Atlas Protein (HAP) (<http://www.proteinatlas.org>), una base de datos que presenta imágenes de inmunohistoquímica de múltiples proteínas y tejidos. A la fecha almacena más de 12.238 genes con sus respectivas tinciones, con más de 15.000 perfiles de tinción. Esta base de datos presenta cortes histológicos de diversos cánceres como también distintos anticuerpos para la detección de la expresión de un gen, los cuales permiten identificar correlaciones entre los niveles de ARNm y proteínas, diferenciando tejidos normales de tejidos tumorales.

De 125 genes diferencialmente expresados (con un valor de cambio mayor a 5), 29 de ellos presentaron la misma tendencia al ser comparados los valores de las PCR Array y las imágenes de cáncer gástrico y tejidos gástricos normales del HAP. 8 de los cuales son parte de la PCR array de WNT, 11 del PCR de PI3K, 6 de la vía de angiogénesis y solo cuatro de ellos son parte de la PCR Array de activación linfocitaria. 60 genes se encontraron expresados tanto en tejido tumoral como normal en el HAP, 32 de los genes diferencialmente expresados de la PCR Array no presentaban información alguna en el HAP imposibilitando cualquier tipo de comparación y solo 4 genes, pertenecientes a la PCR Array de activación linfocitaria, presentaron una tendencia de expresión contraria al comparar ambas estrategias.

En el cuadro 8 se puede identificar el número de genes por vía de señalización y su relación respecto a la tinción inmunohistoquímica presente en la base de datos del HAP. Cabe destacar que la vía de activación linfocitaria es la placa que presenta mayor número de genes sin información en el HAP, así como la única placa donde existen genes con relación inversa entre los resultados del PCR Array y las tinciones del HAP. Lo que podría explicarse a la

heterogeneidad propia del tejido tumoral, tejido que incluye diversidad de estirpes celulares, con diversos perfiles de expresión, como lo señala Kubista, et al (2006).

Vía de Señalización	Misma relación de expresión	Expresado tanto en ambos tejidos (HAP)	No existe información en HAP	Diferencias entre la relación de expresión
PI3K (HAKT-1)	11	15	4	0
WNT/Hedgehog	8	12	8	0
Angiogénesis (HAKT-2)	6	18	8	0
Activación linfocitaria	4	15	12	4

Cuadro 8. Resumen del número de genes y su relación entre la expresión del PCR Array y la tinción inmunohistoquímica del HAP.

En el cuadro 9 se pueden identificar el resumen de los genes con la misma tendencia de expresión entre el HAP y los resultados del PCR Array. 29 de ellos presentaban un valor de cambio mayor a 5 y solo 3 genes correlacionaron de forma positiva al poseer un valor de cambio entre 5 y mayor a 2 con respecto a los tejidos adyacentes. Estos 32 genes podrían ser genes de interés para futuros estudios, pues existe poca bibliografía relevante sobre su función y rol en la enfermedad. Desde la figura 21a hasta la figura 21p se presenta el marcaje de 17 de estas proteínas.

Vía de señalización	Probables genes marcadores de la enfermedad
PI3K (HAKT-1)	IRS2,MAPK8,EGFR,PI3KC2B,GSK3B,CDKN1A,SPP1,IG2R,JAK2,RAF1,PIK3R1
WNT/Hedgehog (Custom 1)	WISP1,CTBP1,CCND3,CCND2,PYGO,LRP6,WNT10A,FOSL1,PRKCB1,GSK3A
Angiogénesis (HAKT-2)	NRP1/2,THBS1,ANPEP,MMP2,MDK,SERPINF1,ECGF1,CDH5,ITGB3
Activación linfocitaria (Custom 2)	INFG,PTPRC,TLR4,CD2

Cuadro 9. Resumen de genes con marcaje diferencial en el atlas de proteínas humanas (HAP). Genes obtenidos previo el análisis de expresión de PCR Array y comparados con HAP.

Estos 17 genes presentaban una alta desregulación de su expresión en el PCR Array (valor de cambio mayor a 5) y la mayoría de ellos no presentan información bibliográfica sobre su desregulación en relación al estudio del cáncer gástrico, siendo genes de interés para el estudio del cáncer gástrico y si bien es necesario un estudio acabado de estos genes, estas 17 proteínas podrían presentarse como posibles marcadores moleculares para el reconocimiento y fenotipificación de la enfermedad, ayudando al entendimiento del cáncer gástrico.

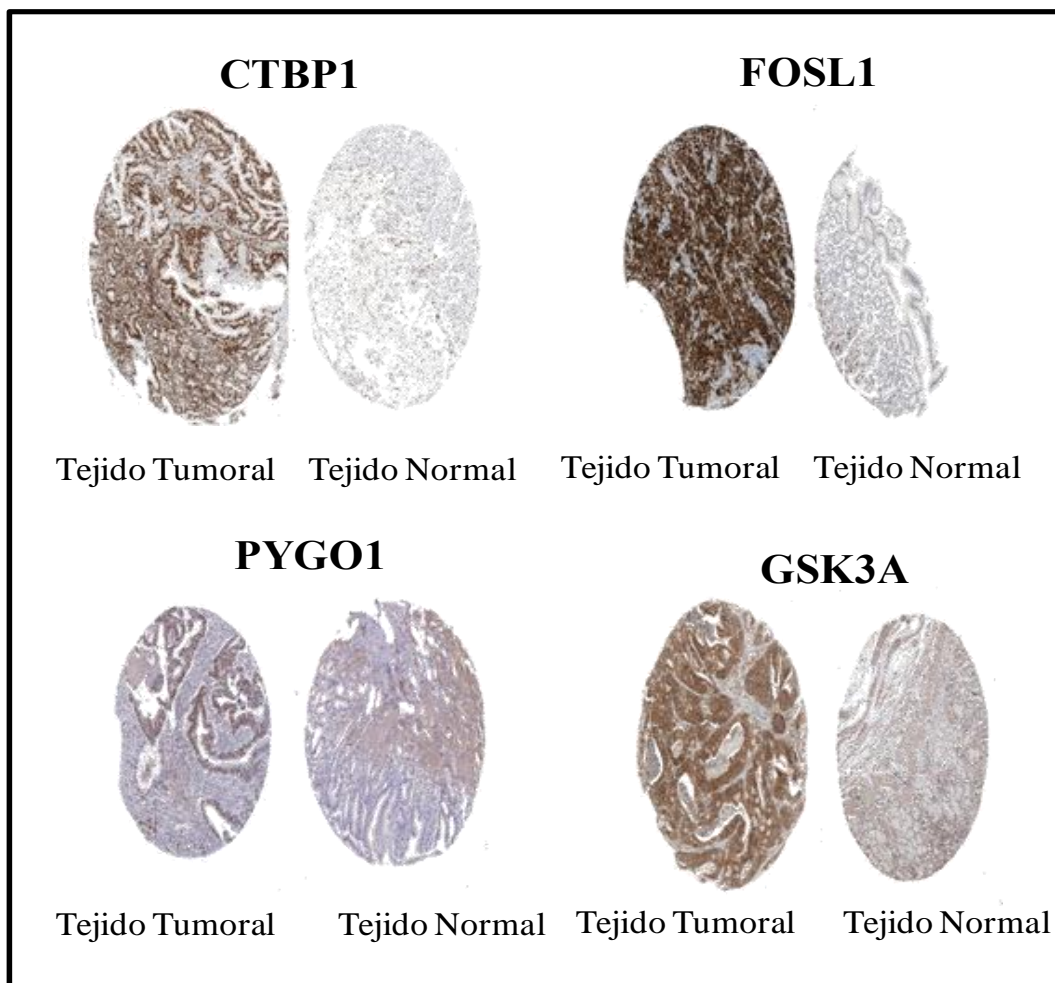


Figura 21a. Principales genes con marcaje inmunohistoquímico diferencial de la vía Wnt/Hedgehog.

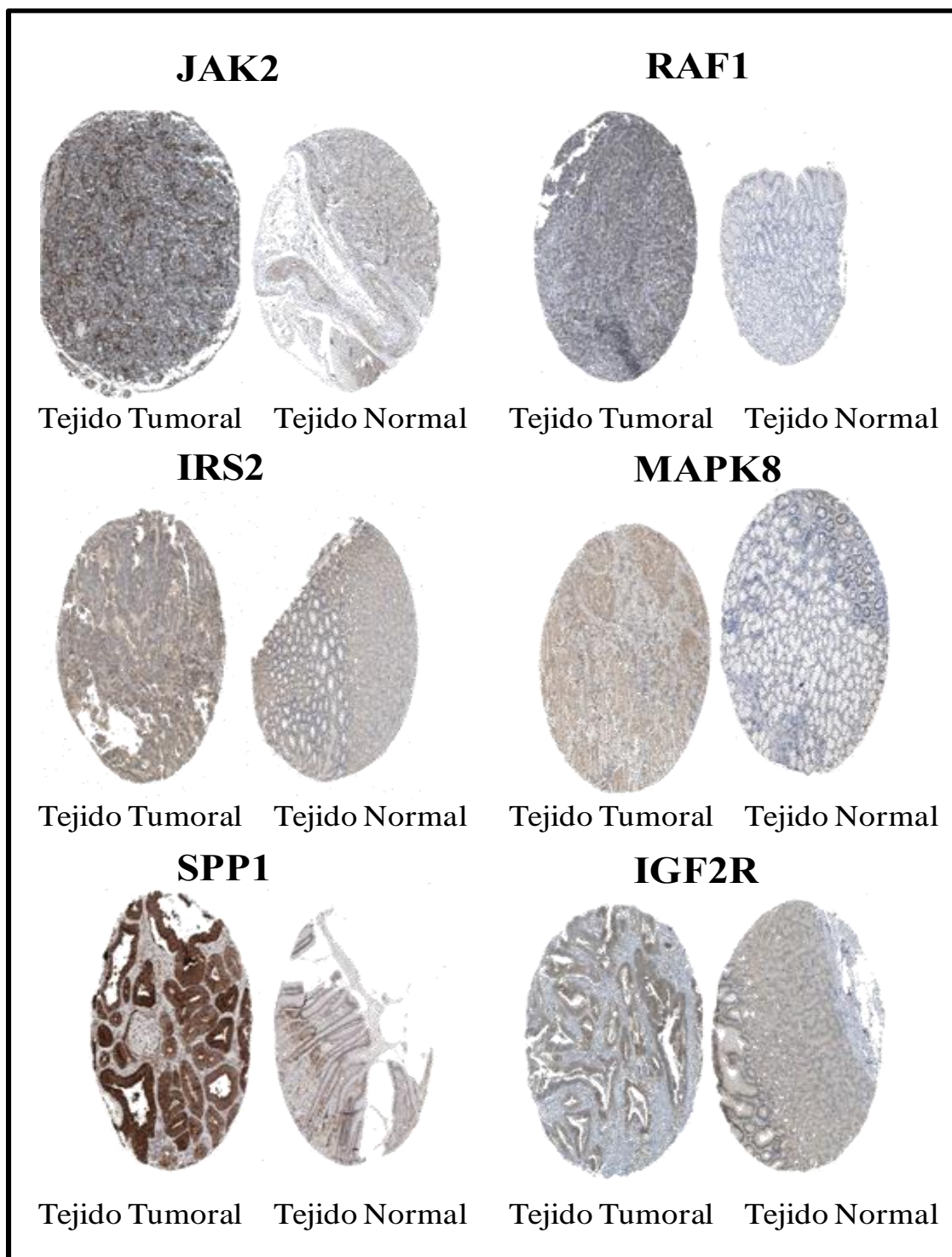


Figura 21b. Principales genes con marcaje inmunohistoquímico diferencial de la vía PI3K/AKT.

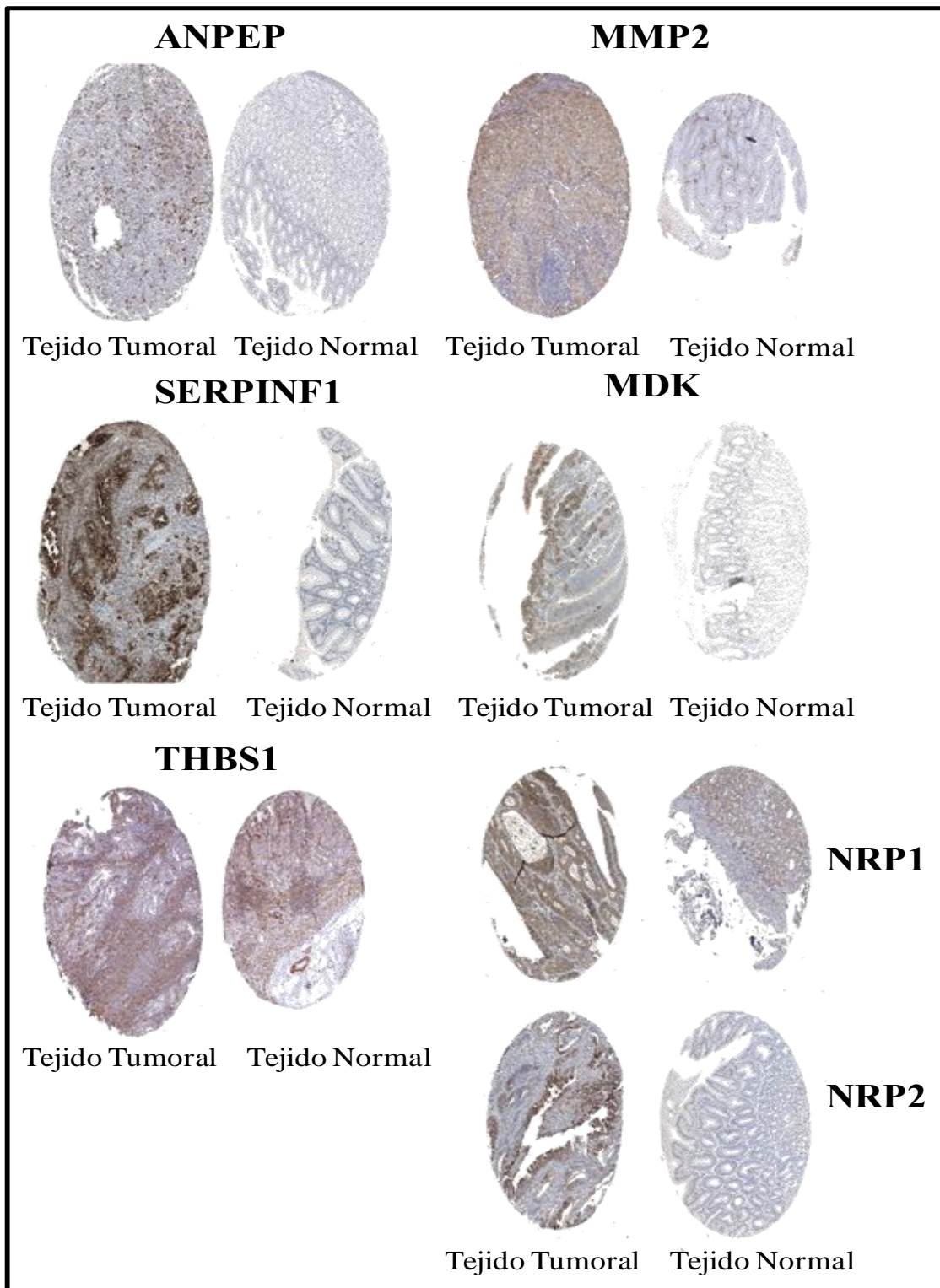


Figura 21c. Principales genes con marcaje inmunohistoquímico diferencial de la vía de angiogénesis.

5. CONCLUSIONES

El presente estudio identificó de forma efectiva la desregulación de las vías de señalización de PI3K, Wnt, angiogénesis y activación linfocitaria en 4 muestras de adenocarcinoma gástrico, identificando 224 genes con cambios en su expresión entre las cuatro vías de señalización analizadas, donde 82 de estos genes presentaron un cambio de expresión de más de 10 veces comparado con los tejidos normales.

La tendencia de desregulación de estas vías de señalización es hacia la sobre expresión de sus componentes, muchos de los cuales presentan hasta 1000 veces la expresión de los tejidos normales.

La tecnología de PCR Array permite de forma rápida identificar cambios en un amplio conjunto de genes pertenecientes a una vía de señalización, siendo una tecnología robusta, ya que sobre el 90% de las reacciones presentaban la eficiencia esperada.

Si bien este trabajo presentó un número acotado de muestras, se logró identificar al menos 85 genes diferencialmente expresados, muchos de los cuales presentan escasa bibliografía relacionada a la enfermedad, como también no presentaban información relevante sobre su rol en las vías de señalización.

Finalmente, 32 genes presentaron una expresión diferencial tanto en el PCR Array como a nivel de inmunohistoquímica al ser comparados y analizados en el Human Atlas Protein, pudiendo ser nuevos candidatos para futuros estudios vinculados a la caracterización y entendimiento de la enfermedad.

6. RESUMEN

El cáncer gástrico es el cuarto tipo de cáncer con mayor frecuencia mundial y la primera causa de muerte por tumores en Chile. Su elevada tasa de mortalidad se relaciona a la inexistencia de sintomatología específica en estadios tempranos de la enfermedad, diagnosticándose en fases avanzada donde las terapias existentes son poco efectivas.

Se ha descrito con anterioridad que el conjunto de alteraciones genómicas en el cáncer cumplen un importante rol en el desarrollo y progresión del tumor, relacionado a la desregulación de genes y a cambios en los niveles de expresión que contribuyen al fenotipo tumoral. Sin embargo, los eventos genéticos que regulan el desarrollo y progresión cáncer gástrico están poco descritos.

Este trabajo tiene como objetivo evaluar la expresión génica de cuatro vías de señalización involucradas en el desarrollo del cáncer gástrico mediante el análisis de la expresión de tejido tumoral y adyacente al tumor proveniente de pacientes con cáncer gástrico, con motivo a identificar futuros genes candidatos relacionados a la caracterización de la enfermedad, utilizando la metodología de PCR Array.

Mediante el PCR Array se identificó que todas las vías de señalización analizadas presentaban una tendencia hacia la sobreexpresión de sus genes, encontrándose genes marcadores clásicos del cáncer como β -catenina, VEGFC y AKT1 altamente sobre expresados en las muestras analizadas. Adicionalmente, identificamos 125 genes diferencialmente expresados, muchos de los cuales presentan escasa bibliografía relacionada a la enfermedad y el rol de estos en la terapia del cáncer. Finalmente, encontramos que los niveles de expresión de una alta proporción de estos genes presentaba la misma tendencia de expresión al comparar los resultados del PCR Array con las tinciones inmunohistoquímicas presentes en la base de datos del Human Atlas Protein (HAP), logrando identificar nuevos genes que podrían convertirse en objetivo de estudio como potenciales marcadores moleculares y blancos de terapéuticos para la enfermedad.

7. SUMMARY

Gastric cancer is fourth most frequently cancer type in the world and the first cause of deaths by tumors in Chile. Its high mortality rate is associated to the absence of specific symptoms in the early stages of the disease, leading to a diagnosis in advanced stages where the actual therapies are poorly effective.

In previous works has been described that the set of genomics alterations in the cancer play an important role in the development and progression of the tumors, related to deregulations in the genes and changes in their expression which contribute in the tumoral phenotype. However, the genetic events which regulate the gastric cancer are poorly described.

The aim of this thesis was evaluate the gene expression of four signaling pathways related to the development of the gastric cancer through the analysis of gene expression of tumoral and adjacent tissues of gastric cancer patients, with the purpose to identify novel genes related to the characterization of the disease using the PCR Array technology.

Using the PCR Array we identified a totally deregulation of the pathways involved in the study, where we found classic cancer markers deregulated, which included the β -catenin, VEGFC and AKT1 genes, strongly over expressed in the tumoral samples. Furthermore, this work allowed to identifying 85 genes without relevant information related to the gastric cancer knowledge and their role in the therapy of the cancer. Finally, using the Human Atlas Protein (HAP) database, we shows a positive relation between the PCR transcription profile y the immunohistochemical stain of an important gene number included in the study which help to us in the context of the characterization of the disease and could perform as novel molecular markers and new therapy targets for the gastric cancer.

8. LITERATURA CITADA

- Ailles, L., Siu, L.L.**, 2011. Targeting the Hedgehog pathway in cancer: can the spines be smoothed? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 2071-2073.
- Ajuebor, M.N., Kunkel, S.L., Hogaboam, C.M.**, 2004. The role of CCL3/macrophage inflammatory protein-1alpha in experimental colitis. *European journal of pharmacology* 497, 343-349.
- Amatschek, S., Lucas, R., Eger, A., Pflueger, M., Hundsberger, H., Knoll, C., Grosse-Kracht, S., Schuett, W., Koszik, F., Maurer, D., Wiesner, C.**, 2011. CXCL9 induces chemotaxis, chemorepulsion and endothelial barrier disruption through CXCR3-mediated activation of melanoma cells. *British journal of cancer* 104, 469- 479.
- Andre, F., Rigot, V., Remacle-Bonnet, M., Luis, J., Pommier, G., Marvaldi, J.**, 1999. Protein kinases C-gamma and -delta are involved in insulin-like growth factor I- induced migration of colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 116, 64-77.
- Angers, S., Moon, R.T.**, 2009. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 468-477.
- Araki, Y., Okamura, S., Hussain, S.P., Nagashima, M., He, P., Shiseki, M., Miura, K., Harris, C.C.**, 2003. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways. *Cancer research* 63, 728-734.
- Axon, A.**, 2006. Symptoms and diagnosis of gastric cancer at early curable stage. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 20, 697-708.
- Balciunaite, G., Keller, M.P., Balciunaite, E., Piali, L., Zuklys, S., Mathieu, Y.D., Gill, J., Boyd, R., Sussman, D.J., Hollander, G.A.**, 2002. Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nature immunology* 3, 1102-1108.
- Bar, T., Kubista, M., Tichopad, A.**, 2011. Validation of kinetics similarity in qPCR. *Nucleic acids research*.
- Baudot, A., de la Torre, V., Valencia, A.**, 2010. Mutated genes, pathways and processes in tumours. *EMBO Rep* 11, 805-810.
- Bauvois, B.**, 2011. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochimica et biophysica acta* 1825, 29-36.

- Bergers, G., Benjamin, L.E.,** 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews. Cancer* 3, 401-410.
- Berschneider, B., Konigshoff, M.,** 2011. WNT1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1): a novel mediator linking development and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 43, 306-309.
- Beuzen, F., Dubois, S., Flejou, J.F.,** 2000. Chromosomal numerical aberrations are frequent in oesophageal and gastric adenocarcinomas: a study using in-situ hybridization. *Histopathology* 37, 241-249.
- Bijnsdorp, I.V., Capriotti, F., Kruyt, F.A., Losekoot, N., Fukushima, M., Griffioen, A.W., Thijssen, V.L., Peters, G.J.,** 2011. Thymidine phosphorylase in cancer cells stimulates human endothelial cell migration and invasion by the secretion of angiogenic factors. *British journal of cancer* 104, 1185-1192.
- Bizama, C.,** 2010. Identificación de perfiles expresión génica en cáncer gástrico, mediante uso de tecnología de microarreglos. Tesis para obtención del grado académico de Doctor en Ciencias Mención Biología Celular Y Molecular Aplicada, Universidad de La Frontera. Temuco, Chile.
- Bosetti, C., Malvezzi, M., Chatenoud, L., Negri, E., Levi, F., La Vecchia, C.,** 2005. Trends in cancer mortality in the Americas, 1970-2000. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 16, 489- 511.
- Bowerman, B.,** 2008. Cell signaling. Wnt moves beyond the canon. *Science* 320, 327-328.
- Bradley, E.W., Ruan, M.M., Vrable, A., Oursler, M.J.,** 2008. Pathway crosstalk between Ras/Raf and PI3K in promotion of M-CSF-induced MEK/ERK-mediated osteoclast survival. *Journal of cellular biochemistry* 104, 1439-1451.
- Brenner, H., Rothenbacher, D., Arndt, V.,** 2009. Epidemiology of stomach cancer. *Methods Mol Biol* 472, 467-477.
- Brooks, S.A., Lomax-Browne, H.J., Carter, T.M., Kinch, C.E., Hall, D.M.,** 2010. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta histochemica* 112, 3-25.
- Buday, L., Wunderlich, L., Tamas, P.,** 2002. The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cellular signalling* 14, 723-731.
- Bustin, S.A.,** 2010. Why the need for qPCR publication guidelines?--The case for MIQE. *Methods* 50, 217-226.

- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T.,** 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 55, 611-622.
- Camilli, T.C., Weeraratna, A.T.,** 2010. Striking the target in Wnt-y conditions: intervening in Wnt signaling during cancer progression. *Biochemical pharmacology* 80, 702-711.
- Carmeliet, P.,** 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.
- Carmeliet, P., Jain, R.K.,** 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298-307.
- Carnero, A., Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Link, W., Leal, J.F.,** 2008. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Current cancer drug targets* 8, 187-198.
- Catalano, V., Labianca, R., Beretta, G.D., Gatta, G., de Braud, F., Van Cutsem, E.,** 2009. Gastric cancer. *Critical reviews in oncology/hematology* 71, 127-164.
- Chandelier, A., Planchon, V., Oger, R.,** 2010. Determination of cycle cut off in real-time PCR for the detection of regulated plant pathogens. *EPPO Bulletin* 40, 52-58.
- Chaudary, N., Milosevic, M., Hill, R.P.,** 2011. Suppression of vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) and vascular endothelial growth factor C (VEGFC) inhibits hypoxia-induced lymph node metastases in cervix cancer. *Gynecologic oncology*.
- Chen, C.S., Lee, C.H., Hsieh, C.D., Ho, C.T., Pan, M.H., Huang, C.S., Tu, S.H., Wang, Y.J., Chen, L.C., Chang, Y.J., Wei, P.L., Yang, Y.Y., Wu, C.H., Ho, Y.S.,** 2011. Nicotine-induced human breast cancer cell proliferation attenuated by garcinol through down-regulation of the nicotinic receptor and cyclin D3 proteins. *Breast cancer research and treatment* 125, 73-87.
- Chen, H., Wu, X., Pan, Z.K., Huang, S.,** 2010. Integrity of SOS1/EPS8/ABI1 tri-complex determines ovarian cancer metastasis. *Cancer Res* 70, 9979-9990.
- Chen, J., Killary, A.M., Sen, S., Amos, C.I., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., Frazier, M.L.,** 2008. Polymorphisms of p21 and p27 jointly contribute to an earlier age at diagnosis of pancreatic cancer. *Cancer letters* 272, 32-39.
- Cheng, C.W., Yeh, J.C., Fan, T.P., Smith, S.K., Charnock-Jones, D.S.,** 2008. Wnt5a-mediated non-canonical Wnt signalling regulates human endothelial cell proliferation and migration. *Biochemical and biophysical research communications* 365, 285-290.

- Chu, E.S., Sze, S.C., Cheung, H.P., Wong, K.L., Liu, Q., Ng, T.B., Tong, Y., 2011.** Differential effects of anti-metastatic mechanism of Tian-Xian liquid (TXL) and its bioactive fractions on human colorectal cancer models. *Journal of ethnopharmacology* 137, 403-413.
- Chun, Y.H., Kil, J.I., Suh, Y.S., Kim, S.H., Kim, H., Park, S.H., 2000.** Characterization of chromosomal aberrations in human gastric carcinoma cell lines using chromosome painting. *Cancer genetics and cytogenetics* 119, 18-25.
- Cikos, S., Bukovska, A., Koppel, J., 2007.** Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC molecular biology* 8, 113.
- Coma, S., Amin, D.N., Shimizu, A., Lasorella, A., Iavarone, A., Klagsbrun, M., 2010.** Id2 promotes tumor cell migration and invasion through transcriptional repression of semaphorin 3F. *Cancer research* 70, 3823-3832.
- Corso, G., Velho, S., Paredes, J., Pedrazzani, C., Martins, D., Milanezi, F., Pascale, V., Vindigni, C., Pinheiro, H., Leite, M., Marrelli, D., Sousa, S., Carneiro, F., Oliveira, C., Roviello, F., Seruca, R., 2011.** Oncogenic mutations in gastric cancer with microsatellite instability. *Eur J Cancer* 47, 443-451.
- Crawford, S.E., Stellmach, V., Murphy-Ullrich, J.E., Ribeiro, S.M., Lawler, J., Hynes, R.O., Boivin, G.P., Bouck, N., 1998.** Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 93, 1159-1170.
- Cui, X.W., Zhao, F.J., Liu, J., Song, X.M., Xu, P., Zhou, X., Zhang, J., Wang, T., Kang, C.S., Zhang, Q.Y., 2009.** Suppression of Akt1 expression by small interference RNA inhibits SGC7901 cell growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep* 22, 1305-1313.
- Curran, S., Murray, G.I., 2000.** Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 36, 1621-1630.
- Dawlaty, M.M., Malureanu, L., Jeganathan, K.B., Kao, E., Sustmann, C., Tahk, S., Shuai, K., Grosschedl, R., van Deursen, J.M., 2008.** Resolution of sister centromeres requires RanBP2-mediated SUMOylation of topoisomerase IIalpha. *Cell* 133, 103-115.
- Dearth, R.K., Cui, X., Kim, H.J., Hadsell, D.L., Lee, A.V., 2007.** Oncogenic transformation by the signaling adaptor proteins insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *Cell Cycle* 6, 705-713.
- Dejmek, J., Dejmek, A., Safholm, A., Sjolander, A., Andersson, T., 2005.** Wnt-5a protein expression in primary duodenal colon cancers identifies a subgroup of patients with good prognosis. *Cancer Res* 65, 9142-9146.

- Deng, Y., Deng, H., Liu, J., Han, G., Malkoski, S., Liu, B., Zhao, R., Wang, X.J., Zhang, Q.,** 2011. Transcriptional down-regulation of Brca1 and E-cadherin by CtBP1 in breast cancer. *Mol Carcinog.*
- Derveaux, S., Vandesomepele, J., Hellemans, J.,** 2010. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 50, 227-230.
- Ding, L., Getz, G., Wheeler, D.A., Mardis, E.R., McLellan, M.D., Cibulskis, K., Sougnez, C., Greulich, H., Muzny, D.M., Morgan, M.B., Fulton, L., Fulton, R.S., Zhang, Q., Wendl, M.C., Lawrence, M.S., Larson, D.E., Chen, K., Dooling, D.J., Sabo, A., Hawes, A.C., Shen, H., Jhangiani, S.N., Lewis, L.R., Hall, O., Zhu, Y., Mathew, T., Ren, Y., Yao, J., Scherer, S.E., Clerc, K., Metcalf, G.A., Ng, B., Milosavljevic, A., Gonzalez-Garay, M.L., Osborne, J.R., Meyer, R., Shi, X., Tang, Y., Koboldt, D.C., Lin, L., Abbott, R., Miner, T.L., Pohl, C., Fewell, G., Haipek, C., Schmidt, H., Dunford-Shore, B.H., Kraja, A., Crosby, S.D., Sawyer, C.S., Vickery, T., Sander, S., Robinson, J., Winckler, W., Baldwin, J., Chirieac, L.R., Dutt, A., Fennell, T., Hanna, M., Johnson, B.E., Onofrio, R.C., Thomas, R.K., Tonon, G., Weir, B.A., Zhao, X., Ziaugra, L., Zody, M.C., Giordano, T., Orringer, M.B., Roth, J.A., Spitz, M.R., Wistuba, II, Ozenberger, B., Good, P.J., Chang, A.C., Beer, D.G., Watson, M.A., Ladanyi, M., Broderick, S., Yoshizawa, A., Travis, W.D., Pao, W., Province, M.A., Weinstock, G.M., Varmus, H.E., Gabriel, S.B., Lander, E.S., Gibbs, R.A., Meyerson, M., Wilson, R.K.,** 2008. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 455, 1069-1075.
- Duensing, A., Duensing, S.,** 2005. Guilt by association? p53 and the development of aneuploidy in cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 331, 694-700.
- Dvorak, H.F.,** 2005. Angiogenesis: update 2005. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 3, 1835-1842.
- Fasanaro, P., D'Alessandra, Y., Di Stefano, V., Melchionna, R., Romani, S., Pompilio, G., Capogrossi, M.C., Martelli, F.,** 2008. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin- A3. *The Journal of biological chemistry* 283, 15878-15883.
- Fayette, J., Soria, J.C., Armand, J.P.,** 2005. Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. *Eur J Cancer* 41, 1109-1116.
- Fearon, E.R., Vogelstein, B.,** 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.

- Fedele, C.G., Ooms, L.M., Ho, M., Vieuxseux, J., O'Toole, S.A., Millar, E.K., Lopez-Knowles, E., Sriratana, A., Gurung, R., Baglietto, L., Giles, G.G., Bailey, C.G., Rasko, J.E., Shields, B.J., Price, J.T., Majerus, P.W., Sutherland, R.L., Tiganis, T., McLean, C.A., Mitchell, C.A., 2010.** Inositol polyphosphate 4-phosphatase II regulates PI3K/Akt signaling and is lost in human basal-like breast cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 22231-22236.
- Felderhoff-Mueser, U., Schmidt, O.I., Oberholzer, A., Buhrer, C., Stahel, P.F., 2005.** IL-18: a key player in neuroinflammation and neurodegeneration? *Trends in neurosciences* 28, 487-493.
- Ferti-Passantonopoulou, A.D., Panani, A.D., Vlachos, J.D., Raptis, S.A., 1987.** Common cytogenetic findings in gastric cancer. *Cancer genetics and cytogenetics* 24, 63-73.
- Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., Gonzalez-Baron, M., 2004.** PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer treatment reviews* 30, 193-204.
- Fu, X., Wang, Q., Chen, X., Huang, X., Cao, L., Tan, H., Li, W., Zhang, L., Bi, J., Su, Q., Chen, L., 2008.** Expression patterns and polymorphisms of PTCH in Chinese hepatocellular carcinoma patients. *Experimental and molecular pathology* 84, 195-199.
- Fukuda, A., Wang, S.C., Morris, J.P.t., Folias, A.E., Liou, A., Kim, G.E., Akira, S., Boucher, K.M., Firpo, M.A., Mulvihill, S.J., Hebrok, M., 2011.** Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression. *Cancer cell* 19, 441-455.
- Furuya, M., Yonemitsu, Y., Aoki, I., 2009.** III. Angiogenesis: complexity of tumor vasculature and microenvironment. *Current pharmaceutical design* 15, 1854-1867.
- Ganesan, K., Ivanova, T., Wu, Y., Rajasegaran, V., Wu, J., Lee, M.H., Yu, K., Rha, S.Y., Chung, H.C., Ylstra, B., Meijer, G., Lian, K.O., Grabsch, H., Tan, P., 2008.** Inhibition of gastric cancer invasion and metastasis by PLA2G2A, a novel beta-catenin/TCF target gene. *Cancer research* 68, 4277-4286.
- Garcea, G., Neal, C.P., Pattenden, C.J., Steward, W.P., Berry, D.P., 2005.** Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review. *Eur J Cancer* 41, 2213-2236.
- Garczarczyk, D., Szeker, K., Galfi, P., Csordas, A., Hofmann, J., 2010.** Protein kinase C gamma in colon cancer cells: expression, Thr514 phosphorylation and sensitivity to butyrate-mediated upregulation as related to the degree of differentiation. *Chem Biol Interact* 185, 25-32.

- Gencer, S., Sen, G., Dogusoy, G., Belli, A.K., Paksoy, M., Yazicioglu, M.B., 2010.** beta-Catenin-independent noncanonical Wnt pathway might be induced in gastric cancers. *Turk J Gastroenterol* 21, 224-230.
- Ger, M., Zitkus, Z., Valius, M., 2011.** Adaptor protein Nck1 interacts with p120 Ras GTPase-activating protein and regulates its activity. *Cellular signalling* 23, 1651- 1658.
- Getzenberg, R.H., Coffey, D.S., 2011.** Changing the Energy Habitat of the Cancer Cell in Order To Impact Therapeutic Resistance. *Molecular pharmaceuticals*.
- Glinka, Y., Stoilova, S., Mohammed, N., Prud'homme, G.J., 2011.** Neuropilin-1 exerts co-receptor function for TGF-beta-1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF-beta. *Carcinogenesis* 32, 613- 621.
- Gokhale, A.S., Haddad, R.I., Cavacini, L.A., Wirth, L., Weeks, L., Hallar, M., Faucher, J., Posner, M.R., 2005.** Serum concentrations of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell cancer of the head and neck. *Oral oncology* 41, 70-76.
- Gontero, P., Banisadr, S., Frea, B., Brausi, M., 2004.** Metastasis markers in bladder cancer: a review of the literature and clinical considerations. *European urology* 46, 296-311.
- Greaves, M., 2010.** **Cancer stem cells: back to Darwin? *Seminars in cancer biology* 20, 65-70.**
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M., 2010.** Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883-899.
- Gudnason, H., Dufva, M., Bang, D.D., Wolff, A., 2007.** Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic acids research* 35, e127.
- Han, Z., Hong, L., Wu, K., Han, S., Shen, H., Liu, C., Han, Y., Liu, Z., Fan, D., 2006.** Reversal of multidrug resistance of gastric cancer cells by downregulation of Akt1 with Akt1 siRNA. *J Exp Clin Cancer Res* 25, 601-606.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Harfouche, R., Echavarria, R., Rabbani, S.A., Arakelian, A., Hussein, M.A., Hussain, S.N., 2011.** Estradiol-dependent regulation of angiopoietin expression in breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 123, 17- 24.
- Hayden, K., Ivors, K., Wilkinson, C., Garbelotto, M., 2006.** TaqMan Chemistry for *Phytophthora ramorum* Detection and Quantification, with a Comparison of Diagnostic Methods. *Phytopathology* 96, 846-854.

- He, B., Lee, A.Y., Dadfarmay, S., You, L., Xu, Z., Reguart, N., Mazieres, J., Mikami, I., McCormick, F., Jablons, D.M.,** 2005. Secreted frizzled-related protein 4 is silenced by hypermethylation and induces apoptosis in beta-catenin-deficient human mesothelioma cells. *Cancer Res* 65, 743-748.
- He, Y., Karpanen, T., Alitalo, K.,** 2004. Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis. *Biochimica et biophysica acta* 1654, 3-12.
- Hehlgans, S., Haase, M., Cordes, N.,** 2007. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochimica et biophysica acta* 1775, 163-180.
- Heikkila, K., Ebrahim, S., Lawlor, D.A.,** 2008. Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer. *Eur J Cancer* 44, 937-945.
- Heise, K., Bertran, E., Andia, M.E., Ferreccio, C.,** 2009. Incidence and survival of stomach cancer in a high-risk population of Chile. *World journal of gastroenterology : WJG* 15, 1854-1862.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J.,** 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome biology* 8, R19.
- Hirsch, E., Ciruolo, E., Ghigo, A., Costa, C.,** 2008. Taming the PI3K team to hold inflammation and cancer at bay. *Pharmacology & therapeutics* 118, 192-205.
- Houghton, J., Morozov, A., Smirnova, I., Wang, T.C.,** 2007. Stem cells and cancer. *Seminars in cancer biology* 17, 191-203.
- Huang, Y., Liu, G., Zhang, B., Xu, G., Xiong, W., Yang, H.,** 2010. Wnt-5a regulates proliferation in lung cancer cells. *Oncol Rep* 23, 177-181.
- Huiping, C., Kristjansdottir, S., Bergthorsson, J.T., Jonasson, J.G., Magnusson, J., Egilsson, V., Ingvarsson, S.,** 2002. High frequency of LOH, MSI and abnormal expression of FHIT in gastric cancer. *Eur J Cancer* 38, 728-735.
- Iakovlev, V.V., Pintilie, M., Morrison, A., Fyles, A.W., Hill, R.P., Hedley, D.W.,** 2007. Effect of distributional heterogeneity on the analysis of tumor hypoxia based on carbonic anhydrase IX. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 87, 1206-1217.
- Ibusuki, M., Fujimori, H., Yamamoto, Y., Ota, K., Ueda, M., Shinriki, S., Taketomi, M., Sakuma, S., Shinohara, M., Iwase, H., Ando, Y.,** 2009. Midkine in plasma as a novel breast cancer marker. *Cancer science* 100, 1735-1739.
- Ingham, P.W., McMahon, A.P.,** 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & development* 15, 3059-3087.

- Iozzo, R.V., Eichstetter, I., Danielson, K.G.,** 1995. Aberrant expression of the growth factor Wnt-5A in human malignancy. *Cancer Res* 55, 3495-3499.
- Jang, J.S., Lee, W.S., Lee, J.S., Kim, H.W., Ko, G.H., Ha, W.S.,** 2007. The expression of thymidine phosphorylase in cancer-infiltrating inflammatory cells in stomach cancer. *Journal of Korean medical science* 22 Suppl, S109-114.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D.,** 2011. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 61, 69-90.
- Jiang, B.H., Liu, L.Z.,** 2009. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Advances in cancer research* 102, 19-65.
- Jiang, J., Hui, C.C.,** 2008. Hedgehog signaling in development and cancer. *Developmental cell* 15, 801-812.
- Johnson, S.M., Gulhati, P., Rampy, B.A., Han, Y., Rychahou, P.G., Doan, H.Q., Weiss, H.L., Evers, B.M.,** 2010. Novel expression patterns of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway components in colorectal cancer. *Journal of the American College of Surgeons* 210, 767-776, 776-768.
- Junnila, S., Kokkola, A., Mizuguchi, T., Hirata, K., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Puolakkainen, P., Monni, O.,** 2010. Gene expression analysis identifies over-expression of CXCL1, SPARC, SPP1, and SULF1 in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 49, 28-39.
- Kamimura, K., Hojo, H., Abe, M.,** 2004. Characterization of expression of protein kinase C isozymes in human B-cell lymphoma: Relationship between its expression and prognosis. *Pathol Int* 54, 224-230.
- Kaneda, H., Arao, T., Matsumoto, K., De Velasco, M.A., Tamura, D., Aomatsu, K., Kudo, K., Sakai, K., Nagai, T., Fujita, Y., Tanaka, K., Yanagihara, K., Yamada, Y., Okamoto, I., Nakagawa, K., Nishio, K.,** 2011. Activin A inhibits vascular endothelial cell growth and suppresses tumour angiogenesis in gastric cancer. *British journal of cancer*.
- Katoh, M.,** 2007. Dysregulation of stem cell signaling network due to germline mutation, SNP, Helicobacter pylori infection, epigenetic change and genetic alteration in gastric cancer. *Cancer biology & therapy* 6, 832-839.
- Katso, R.M., Pardo, O.E., Palamidessi, A., Franz, C.M., Marinov, M., De Laurentiis, A., Downward, J., Scita, G., Ridley, A.J., Waterfield, M.D., Arcaro, A.,** 2006. Phosphoinositide 3-Kinase C2beta regulates cytoskeletal organization and cell migration via Rac-dependent mechanisms. *Mol Biol Cell* 17, 3729-3744.

- Kaurah, P., MacMillan, A., Boyd, N., Senz, J., De Luca, A., Chun, N., Suriano, G., Zaor, S., Van Manen, L., Gilpin, C., Nikkel, S., Connolly-Wilson, M., Weissman, S., Rubinstein, W.S., Sebold, C., Greenstein, R., Stroop, J., Yim, D., Panzini, B., McKinnon, W., Greenblatt, M., Wirtzfeld, D., Fontaine, D., Coit, D., Yoon, S., Chung, D., Lauwers, G., Pizzuti, A., Vaccaro, C., Redal, M.A., Oliveira, C., Tischkowitz, M., Olschwang, S., Gallinger, S., Lynch, H., Green, J., Ford, J., Pharoah, P., Fernandez, B., Huntsman, D., 2007.** Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 297, 2360-2372.
- Kim, S.S., Ruiz, V.E., Carroll, J.D., Moss, S.F., 2011.** Helicobacter pylori in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma. *Cancer letters* 305, 228- 238.
- Kim, W.H., Lee, S.H., Jung, M.H., Seo, J.H., Kim, J., Kim, M.A., Lee, Y.M., 2009.** Neuropilin2 expressed in gastric cancer endothelial cells increases the proliferation and migration of endothelial cells in response to VEGF. *Experimental cell research* 315, 2154-2164.
- Klaus, A., Birchmeier, W., 2008.** Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature reviews. Cancer* 8, 387-398.
- Koenig, A., Linhart, T., Schlegemann, K., Reutlinger, K., Wegele, J., Adler, G., Singh, G., Hofmann, L., Kunsch, S., Buch, T., Schafer, E., Gress, T.M., Fernandez-Zapico, M.E., Ellenrieder, V., 2010.** NFAT-induced histone acetylation relay switch promotes c-Myc-dependent growth in pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* 138, 1189-1199 e1181-1182.
- Kolasa, I.K., Rembiszewska, A., Felisiak, A., Ziolkowska-Seta, I., Murawska, M., Moes, J., Timorek, A., Dansonka-Mieszkowska, A., Kupryjanczyk, J., 2009.** PIK3CA amplification associates with resistance to chemotherapy in ovarian cancer patients. *Cancer biology & therapy* 8, 21-26.
- Komiya, Y., Habas, R., 2008.** Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4, 68- 75.
- Konigshoff, M., Kramer, M., Balsara, N., Wilhelm, J., Amarie, O.V., Jahn, A., Rose, F., Fink, L., Seeger, W., Schaefer, L., Gunther, A., Eickelberg, O., 2009.** WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 119, 772-787.
- Kopczynska, E., Makarewicz, R., Biedka, M., Kaczmarczyk, A., Kardymowicz, H., Tyrakowski, T., 2009.** Plasma concentration of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 in cervical cancer. *European journal of gynaecological oncology* 30, 646- 649.

- Kota, J., Chivukula, R.R., O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Montgomery, C.L., Hwang, H.W., Chang, T.C., Vivekanandan, P., Torbenson, M., Clark, K.R., Mendell, J.R., Mendell, J.T., 2009.** Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 137, 1005-1017.
- Koutros, S., Schumacher, F.R., Hayes, R.B., Ma, J., Huang, W.Y., Albanes, D., Canzian, F., Chanock, S.J., Crawford, E.D., Diver, W.R., Feigelson, H.S., Giovanucci, E., Haiman, C.A., Henderson, B.E., Hunter, D.J., Kaaks, R., Kolonel, L.N., Kraft, P., Le Marchand, L., Riboli, E., Siddiq, A., Stampfer, M.J., Stram, D.O., Thomas, G., Travis, R.C., Thun, M.J., Yeager, M., Berndt, S.I., 2010.** Pooled analysis of phosphatidylinositol 3-kinase pathway variants and risk of prostate cancer. *Cancer Res* 70, 2389-2396.
- Kremenevskaja, N., von Wasielewski, R., Rao, A.S., Schofl, C., Andersson, T., Brabant, G., 2005.** Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma. *Oncogene* 24, 2144-2154.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., Zoric, N., 2006.** The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* 27, 95-125.
- Kusters, J.G., van Vliet, A.H., Kuipers, E.J., 2006.** Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical microbiology reviews* 19, 449-490.
- Lamoureux, D.P., Kobzik, L., Fedulov, A.V., 2010.** Customized PCR-array analysis informed by gene-chip microarray and biological hypothesis reveals pathways involved in lung inflammatory response to titanium dioxide in pregnancy. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 73, 596-606.
- Larsen, A.K., Ouaret, D., El Ouadrani, K., Petitprez, A., 2011.** Targeting EGFR and VEGF(R) pathway cross-talk in tumor survival and angiogenesis. *Pharmacology & therapeutics* 131, 80-90.
- Lauren, P., 1965.** The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* 64, 31-49.
- Lee, L.Y., Wu, C.M., Wang, C.C., Yu, J.S., Liang, Y., Huang, K.H., Lo, C.H., Hwang, T.L., 2008.** Expression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in gastric cancer and their relation to claudin-4 expression. *Histology and histopathology* 23, 515-521.
- Leinonen, T., Pirinen, R., Bohm, J., Johansson, R., Ropponen, K., Kosma, V.M., 2006.** Expression of matrix metalloproteinases 7 and 9 in non-small cell lung cancer. Relation to clinicopathological factors, beta-catenin and prognosis. *Lung Cancer* 51, 313-321.

- Li, S., Meng, L., Zhu, C., Wu, L., Bai, X., Wei, J., Lu, Y., Zhou, J., Ma, D.,** 2010. The universal overexpression of a cancer testis antigen hiwi is associated with cancer angiogenesis. *Oncology reports* 23, 1063-1068.
- Li, W., Hu, P., Skolnik, E.Y., Ullrich, A., Schlessinger, J.,** 1992. The SH2 and SH3 domain-containing Nck protein is oncogenic and a common target for phosphorylation by different surface receptors. *Molecular and cellular biology* 12, 5824-5833.
- Lin, K.Y., Fang, C.L., Uen, Y.H., Chang, C.C., Lou, H.Y., Hsieh, C.R., Tiong, C., Pan, S., Chen, S.H.,** 2008. Overexpression of protein kinase C α mRNA may be an independent prognostic marker for gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 97, 538-543.
- Logan, C.Y., Nusse, R.,** 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 20, 781-810.
- Lukaszewicz-Zajac, M., Mroczko, B., Szmitkowski, M.,** 2009. [The significance of metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 63, 258-265.
- Macgregor, P.F., Squire, J.A.,** 2002. Application of microarrays to the analysis of gene expression in cancer. *Clin Chem* 48, 1170-1177.
- Maitra, A., Hruban, R.H.,** 2008. Pancreatic cancer. *Annual review of pathology* 3, 157-188.
- Manning, B.D., Cantley, L.C.,** 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- Martin, V., Valencia, A., Agirre, X., Cervera, J., San Jose-Eneriz, E., Vilas-Zornoza, A., Rodriguez-Otero, P., Sanz, M.A., Herrera, C., Torres, A., Prosper, F., Roman-Gomez, J.,** 2010. Epigenetic regulation of the non-canonical Wnt pathway in acute myeloid leukemia. *Cancer science* 101, 425-432.
- Martiny-Baron, G., Fabbro, D.,** 2007. Classical PKC isoforms in cancer. *Pharmacol Res* 55, 477-486.
- Mazzoni, E., Adam, A., Bal de Kier Joffe, E., Aguirre-Ghiso, J.A.,** 2003. Immortalized mammary epithelial cells overexpressing protein kinase C γ acquire a malignant phenotype and become tumorigenic in vivo. *Mol Cancer Res* 1, 776-787.
- Mecklenburg, L., Tychsen, B., Paus, R.,** 2005. Learning from nudity: lessons from the nude phenotype. *Experimental dermatology* 14, 797-810.
- Merchant, A.A., Matsui, W.,** 2010. Targeting Hedgehog--a cancer stem cell pathway. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 3130-3140.

- Mi, H., Lazareva-Ulitsky, B., Loo, R., Kejariwal, A., Vandergriff, J., Rabkin, S., Guo, N., Muruganujan, A., Doremieux, O., Campbell, M.J., Kitano, H., Thomas, P.D., 2005.** The PANTHER database of protein families, subfamilies, functions and pathways. *Nucleic acids research* 33, D284-288.
- Mikels, A.J., Nusse, R., 2006.** Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* 4, e115.
- Mineur, L., Jaegle, E., Pointreau, Y., Denis, F., 2010.** [Gastric cancer]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique* 14 Suppl 1, S84-93.
- Ming, S.C., 1998.** Cellular and molecular pathology of gastric carcinoma and precursor lesions: A critical review. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association* 1, 31- 50.
- Montecucco, F., Steffens, S., Burger, F., Da Costa, A., Bianchi, G., Bertolotto, M., Mach, F., Dallegrì, F., Ottonello, L., 2008.** Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CCchemokine CCL3 (MIP-1alpha) on human neutrophils through defined signalling pathways. *Cellular signalling* 20, 557-568.
- Mosimann, C., Hausmann, G., Basler, K., 2009.** Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 276-286.
- Mroczko, B., Lukaszewicz-Zajac, M., Groblewska, M., Czyzewska, J., Gryko, M., Guzinska-Ustymowicz, K., Kemonia, A., Kedra, B., Szmitkowski, M., 2009.** Expression of tissue inhibitors of metalloproteinase 1 (TIMP-1) in gastric cancer tissue. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* 47, 511-516.
- Muley, A., Majumder, S., Kolluru, G.K., Parkinson, S., Viola, H., Hool, L., Arfuso, F., Ganss, R., Dharmarajan, A., Chatterjee, S., 2010.** Secreted frizzled-related protein 4: an angiogenesis inhibitor. *The American journal of pathology* 176, 1505- 1516.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1992.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24, 17-27.
- Nagai, Y., Watanabe, M., Ishikawa, S., Karashima, R., Kurashige, J., Iwagami, S., Iwatsuki, M., Baba, Y., Imamura, Y., Hayashi, N., Baba, H., 2011.** Clinical significance of Wnt-induced secreted protein-1 (WISP-1/CCN4) in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer research* 31, 991-997.

- Nakamura, Y., Umehara, T., Hamana, H., Hayashizaki, Y., Inoue, M., Kigawa, T., Shirouzu, M., Terada, T., Tanaka, A., Padmanabhan, B., Yokoyama, S., 2007.** Crystal structure analysis of the PHD domain of the transcription co-activator Pygopus. *Journal of molecular biology* 370, 80-92.
- Ng, J.M., Curran, T., 2011.** The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer. *Nature reviews. Cancer* 11, 493-501.
- Ng, T.L., Gown, A.M., Barry, T.S., Cheang, M.C., Chan, A.K., Turbin, D.A., Hsu, F.D., West, R.B., Nielsen, T.O., 2005.** Nuclear beta-catenin in mesenchymal tumors. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 18, 68-74.
- Ng, Y.S., Krilleke, D., Shima, D.T., 2006.** VEGF function in vascular pathogenesis. *Experimental cell research* 312, 527-537.
- Nguyen, D.X., Bos, P.D., Massague, J., 2009.** Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature reviews. Cancer* 9, 274-284.
- Nishita, M., Enomoto, M., Yamagata, K., Minami, Y., 2010.** Cell/tissue-tropic functions of Wnt5a signaling in normal and cancer cells. *Trends in cell biology* 20, 346-354.
- Nobili, S., Bruno, L., Landini, I., Napoli, C., Bechi, P., Tonelli, F., Rubio, C.A., Mini, E., Nesi, G., 2011.** Genomic and genetic alterations influence the progression of gastric cancer. *World journal of gastroenterology : WJG* 17, 290-299.
- Nunez, F., Bravo, S., Cruzat, F., Montecino, M., De Ferrari, G.V., 2011.** Wnt/beta-catenin signaling enhances cyclooxygenase-2 (COX2) transcriptional activity in gastric cancer cells. *PLoS one* 6, e18562.
- Ohta, H., Aoyagi, K., Fukaya, M., Danjoh, I., Ohta, A., Isohata, N., Saeki, N., Taniguchi, H., Sakamoto, H., Shimoda, T., Tani, T., Yoshida, T., Sasaki, H., 2009.** Cross talk between hedgehog and epithelial-mesenchymal transition pathways in gastric pit cells and in diffuse-type gastric cancers. *British journal of cancer* 100, 389-398.
- Oikawa, Y., Hansson, J., Sasaki, T., Rousselle, P., Domogatskaya, A., Rodin, S., Tryggvason, K., Patarroyo, M., 2011.** Melanoma cells produce multiple laminin isoforms and strongly migrate on alpha5 laminin(s) via several integrin receptors. *Experimental cell research* 317, 1119-1133.
- Oliveira, C., Senz, J., Kaurah, P., Pinheiro, H., Sanges, R., Haegert, A., Corso, G., Schouten, J., Fitzgerald, R., Vogelsang, H., Keller, G., Dwerryhouse, S., Grimmer, D., Chin, S.F., Yang, H.K., Jackson, C.E., Seruca, R., Roviello, F., Stupka, E., Caldas, C., Huntsman, D., 2009a.** Germline CDH1 deletions in hereditary diffuse gastric cancer families. *Human molecular genetics* 18, 1545-1555.

- Oliveira, C., Seruca, R., Carneiro, F., 2009b.** Hereditary gastric cancer. Best practice & research. Clinical gastroenterology 23, 147-157.
- Ooi, C.H., Ivanova, T., Wu, J., Lee, M., Tan, I.B., Tao, J., Ward, L., Koo, J.H., Gopalakrishnan, V., Zhu, Y., Cheng, L.L., Lee, J., Rha, S.Y., Chung, H.C., Ganesan, K., So, J., Soo, K.C., Lim, D., Chan, W.H., Wong, W.K., Bowtell, D., Yeoh, K.G., Grabsch, H., Boussioutas, A., Tan, P., 2009.** Oncogenic pathway combinations predict clinical prognosis in gastric cancer. PLoS genetics 5, e1000676.
- Ougolkov, A.V., Yamashita, K., Mai, M., Minamoto, T., 2002.** Oncogenic beta-catenin and MMP-7 (matrilysin) cosegregate in late-stage clinical colon cancer. Gastroenterology 122, 60-71.
- Panani, A.D., 2008.** Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: clinical implications. Cancer letters 266, 99-115.
- Park, J., Park, E., Han, S.W., Im, S.A., Kim, T.Y., Kim, W.H., Oh, D.Y., Bang, Y.J., 2011.** Down-regulation of P-cadherin with PF-03732010 inhibits cell migration and tumor growth in gastric cancer. Investigational new drugs.
- Peng, J., Wang, Y., 2010.** Epidemiology, pathology and clinical management of multiple gastric cancers: a mini-review. Surgical oncology 19, e110-114.
- Pfaffl, M.W., 2010.** The ongoing evolution of qPCR. Methods 50, 215-216.
- Pham, L.V., Tamayo, A.T., Li, C., Bueso-Ramos, C., Ford, R.J., 2010.** An epigenetic chromatin remodeling role for NFATc1 in transcriptional regulation of growth and survival genes in diffuse large B-cell lymphomas. Blood 116, 3899-3906.
- Polette, M., Nawrocki-Raby, B., Gilles, C., Clavel, C., Birembaut, P., 2004.** Tumour invasion and matrix metalloproteinases. Critical reviews in oncology/hematology 49, 179-186.
- Polk, D.B., Peek, R.M., Jr., 2010.** Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond. Nature reviews. Cancer 10, 403-414.
- Psaila, B., Lyden, D., 2009.** The metastatic niche: adapting the foreign soil. Nature reviews. Cancer 9, 285-293.
- Pukrop, T., Klemm, F., Hagemann, T., Gradl, D., Schulz, M., Siemes, S., Trumper, L., Binder, C., 2006.** Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 5454-5459.
- Pulkkinen, K., Malm, T., Turunen, M., Koistinaho, J., Yla-Herttuala, S., 2008.** Hypoxia induces microRNA miR-210 in vitro and in vivo ephrin-A3 and neuronal pentraxin 1 are potentially regulated by miR-210. FEBS letters 582, 2397-2401.

- Qin Li, L., Huang, H.L., Ping, J.L., Xu, W., Li, J., Dai, L.C.,** 2011. Expression of midkine and endoglin in breast carcinomas with different immunohistochemical profiles. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 119, 103-110.
- Rawnaq, T., Kunkel, M., Bachmann, K., Simon, R., Zander, H., Brandl, S., Sauter, G., Izbicki, J.R., Kaifi, J.T.,** 2011. Serum midkine correlates with tumor progression and imatinib response in gastrointestinal stromal tumors. *Annals of surgical oncology* 18, 559-565.
- Reynolds, J.M., Angkasekwinai, P., Dong, C.,** 2010. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine & growth factor reviews* 21, 413-423.
- Reynolds, P.R., Mucenski, M.L., Le Cras, T.D., Nichols, W.C., Whitsett, J.A.,** 2004. Midkine is regulated by hypoxia and causes pulmonary vascular remodeling. *The Journal of biological chemistry* 279, 37124-37132.
- Riva, S.d.l., Muñoz-Navas, M., Sola, J.J.,** 2004. Gastric carcinogenesis. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 96, 265-276.
- Roffe, E., Oliveira, F., Souza, A.L., Pinho, V., Souza, D.G., Souza, P.R., Russo, R.C., Santiago, H.C., Romanha, A.J., Tanowitz, H.B., Valenzuela, J.G., Teixeira, M.M.,** 2010. Role of CCL3/MIP-1 α and CCL5/RANTES during acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 12, 669-676.
- Rubie, C., Kempf, K., Hans, J., Su, T., Tilton, B., Georg, T., Brittner, B., Ludwig, B., Schilling, M.,** 2005. Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Molecular and cellular probes* 19, 101-109.
- Rubin, L.L., de Sauvage, F.J.,** 2006. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nature reviews. Drug discovery* 5, 1026-1033.
- Saif, M.W., Makrilia, N., Zalonis, A., Merikas, M., Syrigos, K.,** 2010. Gastric cancer in the elderly: an overview. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 36, 709-717.
- Sanchez, P., Hernandez, A.M., Stecca, B., Kahler, A.J., DeGueme, A.M., Barrett, A., Beyna, M., Datta, M.W., Datta, S., Ruiz i Altaba, A.,** 2004. Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 12561-12566.

- Scales, S.J., de Sauvage, F.J.,** 2009. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends in pharmacological sciences* 30, 303-312.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J.,** 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* 3, 1101-1108.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A.,** 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology* 75, 163-189.
- Secord, A.A., Darcy, K.M., Hutson, A., Lee, P.S., Havrilesky, L.J., Grace, L.A., Berchuck, A.,** 2007. Co-expression of angiogenic markers and associations with prognosis in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology* 106, 221-232.
- Seder, C.W., Hartojo, W., Lin, L., Silvers, A.L., Wang, Z., Thomas, D.G., Giordano, T.J., Chen, G., Chang, A.C., Orringer, M.B., Beer, D.G.,** 2009. Upregulated INHBA expression may promote cell proliferation and is associated with poor survival in lung adenocarcinoma. *Neoplasia* 11, 388-396.
- Shanmugam, P., Valente, A.J., Prabhu, S.D., Venkatesan, B., Yoshida, T., Delafontaine, P., Chandrasekar, B.,** 2011. Angiotensin-II type 1 receptor and NOX2 mediate TCF/LEF and CREB dependent WISP1 induction and cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology* 50, 928-938.
- Shi, Q., Zhong, Y.S., Ren, Z., Li, Q.L., Zhou, P.H., Xu, M.D., Yao, L.Q.,** 2011. Analysis of the role of the BMP7-Smad4-Id2 signaling pathway in SW480 colorectal carcinoma cells. *Molecular medicine reports* 4, 627-631.
- Shimura, T.,** 2011. Acquired radioresistance of cancer and the AKT/GSK3beta/cyclin D1 overexpression cycle. *Journal of radiation research* 52, 539-544.
- Singh, P., Lata, P., Patel, S., Pandey, A.K., Jain, S.K., Shanker, R., Dhawan, A.,** 2011. Expression profiling of toxicity pathway genes by real-time PCR array in cypermethrin-exposed mouse brain. *Toxicology mechanisms and methods* 21, 193-199.
- Snow, G.E., Kasper, A.C., Busch, A.M., Schwarz, E., Ewings, K.E., Bee, T., Spinella, M.J., Dmitrovsky, E., Freemantle, S.J.,** 2009. Wnt pathway reprogramming during human embryonal carcinoma differentiation and potential for therapeutic targeting. *BMC Cancer* 9, 383.
- Song, G., Ouyang, G., Bao, S.,** 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of cellular and molecular medicine* 9, 59-71.

- Spivey, K.A., Banyard, J., Solis, L.M., Wistuba, II, Barletta, J.A., Gandhi, L., Feldman, H.A., Rodig, S.J., Chirieac, L.R., Zetter, B.R.,** 2010. Collagen XXIII: a potential biomarker for the detection of primary and recurrent non-small cell lung cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 19, 1362-1372.
- Stetler-Stevenson, M., Mansoor, A., Lim, M., Fukushima, P., Kehrl, J., Marti, G., Ptaszynski, K., Wang, J., Stetler-Stevenson, W.G.,** 1997. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cells. *Blood* 89, 1708-1715.
- Stock, M., Otto, F.,** 2005. Gene deregulation in gastric cancer. *Gene* 360, 1-19.
- Svensson, K., Granberg, M., Karlsson, L., Neubauerova, V., Forsman, M., Johansson, A.,** 2009. A real-time PCR array for hierarchical identification of *Francisella* isolates. *PLoS one* 4, e8360.
- Tani, T., Lumme, A., Linnala, A., Kivilaakso, E., Kiviluoto, T., Burgeson, R.E., Kangas, L., Leivo, I., Virtanen, I.,** 1997. Pancreatic carcinomas deposit laminin-5, preferably adhere to laminin-5, and migrate on the newly deposited basement membrane. *The American journal of pathology* 151, 1289-1302.
- Testa, J.R., Tsihchlis, P.N.,** 2005. AKT signaling in normal and malignant cells. *Oncogene* 24, 7391-7393.
- Thornton, B., Basu, C.,** 2011. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 39,145-154.
- Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., Pfaffl, M.W.,** 2003. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic acids research* 31, e122.
- Timofeeva, O.A., Zhang, X., Ransom, H.W., Varghese, R.S., Kallakury, B.V., Wang, K., Ji, Y., Cheema, A., Jung, M., Brown, M.L., Rhim, J.S., Dritschilo, A.,** 2009. Enhanced expression of *SOS1* is detected in prostate cancer epithelial cells from African-American men. *Int J Oncol* 35, 751-760.
- Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, P.J., Yang, Y.,** 2003. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol* 162, 899-908.
- Tsugane, S., Sasazuki, S.,** 2007. Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association* 10, 75- 83.

- Urbich, C., Kuehbacher, A., Dimmeler, S., 2008.** Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovascular research* 79, 581-588.
- Valentini, V., Cellini, F., Minsky, B.D., Mattiucci, G.C., Balducci, M., D'Agostino, G., D'Angelo, E., Dinapoli, N., Nicolotti, N., Valentini, C., La Torre, G., 2009.** Survival after radiotherapy in gastric cancer: systematic review and meta-analysis. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 92, 176-183.
- Van Dekken, H., Pizzolo, J.G., Kelsen, D.P., Melamed, M.R., 1990.** Targeted cytogenetic analysis of gastric tumors by in situ hybridization with a set of chromosome-specific DNA probes. *Cancer* 66, 491-497.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3, RESEARCH0034.
- Verheul, H.M., Pinedo, H.M., 2000.** The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in tumor angiogenesis and early clinical development of VEGF-receptor kinase inhibitors. *Clinical breast cancer* 1 Suppl 1, S80-84.
- Vogelmann, R., Kreuser, E.D., Adler, G., Lutz, M.P., 1999.** Integrin $\alpha_6\beta_1$ role in metastatic behavior of human pancreatic carcinoma cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 80, 791-795.
- Vogelstein, B., 2004.** Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine* 10, 789-799.
- Wang, J., Wu, K., Zhang, D., Tang, H., Xie, H., Hong, L., Pan, Y., Lan, M., Hu, S., Ning, X., Fan, D., 2005.** Expressions and clinical significances of angiopoietin-1, -2 and Tie2 in human gastric cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 337, 386-393.
- Wang, Q., Wen, Y.G., Li, D.P., Xia, J., Zhou, C.Z., Yan, D.W., Tang, H.M., Peng, Z.H., 2010.** Upregulated INHBA expression is associated with poor survival in gastric cancer. *Med Oncol.*
- Webb, C.P., Vande Woude, G.F., 2000.** Genes that regulate metastasis and angiogenesis. *Journal of neuro-oncology* 50, 71-87.
- Weber, G.F., 2008.** Molecular mechanisms of metastasis. *Cancer letters* 270, 181-190.
- Weeraratna, A.T., Jiang, Y., Hostetter, G., Rosenblatt, K., Duray, P., Bittner, M., Trent, J.M., 2002.** Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 1, 279-288.

- Weigelt, B., Warne, P.H., Downward, J., 2011.** PIK3CA mutation, but not PTEN loss of function, determines the sensitivity of breast cancer cells to mTOR inhibitory drugs. *Oncogene* 30, 3222-3233.
- Weinberg, R.A., 2000.** The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Widelitz, R., 2005.** Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress. *Growth Factors* 23, 111-116.
- Wiese, A.H., Auer, J., Lassmann, S., Nahrig, J., Rosenberg, R., Hofler, H., Ruger, R., Werner, M., 2007.** Identification of gene signatures for invasive colorectal tumor cells. *Cancer detection and prevention* 31, 282-295.
- Wong, B.C., Jiang, X.H., Lin, M.C., Tu, S.P., Cui, J.T., Jiang, S.H., Wong, W.M., Yuen, M.F., Lam, S.K., Kung, H.F., 2004.** Cyclooxygenase-2 inhibitor (SC-236) suppresses activator protein-1 through c-Jun NH2-terminal kinase. *Gastroenterology* 126, 136-147.
- Woo, Y., Affourtit, J., Daigle, S., Viale, A., Johnson, K., Naggert, J., Churchill, G., 2004.** A comparison of cDNA, oligonucleotide, and Affymetrix GeneChip gene expression microarray platforms. *Journal of biomolecular techniques : JBT* 15, 276-284.
- Wright, P.A., Quirke, P., Attanoos, R., Williams, G.T., 1992.** Molecular pathology of gastric carcinoma: progress and prospects. *Human pathology* 23, 848-859.
- Wroblewski, L.E., Peek, R.M., Jr., Wilson, K.T., 2010.** Helicobacter pylori and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clinical microbiology reviews* 23, 713-739.
- Wu, W.K., Cho, C.H., Lee, C.W., Fan, D., Wu, K., Yu, J., Sung, J.J., 2010.** Dysregulation of cellular signaling in gastric cancer. *Cancer letters* 295, 144-153.
- Xie, K., Wei, D., Huang, S., 2006.** Transcriptional anti-angiogenesis therapy of human pancreatic cancer. *Cytokine & growth factor reviews* 17, 147-156.
- Xu Tao¹, C.J., Lu Yicheng¹, Zhou Jinxu¹, Yan Yong¹, Hu Guohan¹, Luo Chun¹, H.Y., 2010.** Lentiviral-mediated siRNA against osteopontin in U251 glioma cell line. *Journal of Medical Colleges of PLA* 25, 1-10.
- Yamamoto, H., Itoh, F., Iku, S., Adachi, Y., Fukushima, H., Sasaki, S., Mukaiya, M., Hirata, K., Imai, K., 2001.** Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human pancreatic adenocarcinomas: clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 19, 1118-1127.

- Yamamoto, H., Kitadai, Y., Oue, N., Ohdan, H., Yasui, W., Kikuchi, A., 2009.** Laminin gamma2 mediates Wnt5a-induced invasion of gastric cancer cells. *Gastroenterology* 137, 242-252, 252 e241-246.
- Yano, A., Fujii, Y., Iwai, A., Kawakami, S., Kageyama, Y., Kihara, K., 2006.** Glucocorticoids suppress tumor lymphangiogenesis of prostate cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 6012-6017.
- Yasui, W., Oue, N., Kuniyasu, H., Ito, R., Tahara, E., Yokozaki, H., 2001.** Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association* 4, 113-121.
- Yasui, W., Yokozaki, H., Shimamoto, F., Tahara, H., Tahara, E., 1999.** Molecular-pathological diagnosis of gastrointestinal tissues and its contribution to cancer histopathology. *Pathology international* 49, 763-774.
- Ying Chen, G.Y., Danghui Yu, Minghua Zhu, 2009.** PKCa-induced drug resistance in pancreatic cancer cells is associated with transforming growth factor-b1. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 29, 104.
- You, Z., Saims, D., Chen, S., Zhang, Z., Guttridge, D.C., Guan, K.L., MacDougald, O.A., Brown, A.M., Evan, G., Kitajewski, J., Wang, C.Y., 2002.** Wnt signaling promotes oncogenic transformation by inhibiting c-Myc-induced apoptosis. *The Journal of cell biology* 157, 429-440.
- Yu, Y.Y., Pan, Y.S., Zhu, Z.G., 2007.** Homeobox genes and their functions on development and neoplasm in gastrointestinal tract. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 33, 129-132.
- Zagouri, F., Papadimitriou, C.A., Dimopoulos, M.A., Pectasides, D., 2011.** Molecularly targeted therapies in unresectable-metastatic gastric cancer. A systematic review. *Cancer treatment reviews.*
- Zambon, C.F., Basso, D., Navaglia, F., Falda, A., Belluco, C., Fogar, P., Greco, E., Gallo, N., Farinati, F., Cardin, R., Rugge, M., Di Mario, F., Plebani, M., 2004.** Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology* 126, 382-384.
- Zhang, J., Roberts, T.M., Shivdasani, R.A., 2011.** Targeting PI3K signaling as a therapeutic approach for colorectal cancer. *Gastroenterology* 141, 50-61.

- Zhang, S., Tang, Q., Xu, F., Xue, Y., Zhen, Z., Deng, Y., Liu, M., Chen, J., Liu, S., Qiu, M., Liao, Z., Li, Z., Luo, D., Shi, F., Zheng, Y., Bi, F.,** 2009. RhoA regulates G1-S progression of gastric cancer cells by modulation of multiple INK4 family tumor suppressors. *Mol Cancer Res* 7, 570-580.
- Zhao, H., Lo, Y.H., Yu, L., Wang, S.C.,** 2011. Overcoming resistance to fulvestrant (ICI182,780) by downregulating the c-ABL proto-oncogene in breast cancer. *Mol Carcinog* 50, 383-389.
- Zheng, H.C., Xu, X.Y., Xia, P., Yu, M., Takahashi, H., Takano, Y.,** 2010. Involvement of inactive GSK3beta overexpression in tumorigenesis and progression of gastric carcinomas. *Hum Pathol* 41, 1255-1264.
- Zhou, Z.Q., Cao, W.H., Xie, J.J., Lin, J., Shen, Z.Y., Zhang, Q.Y., Shen, J.H., Xu, L.Y., Li, E.M.,** 2009. Expression and prognostic significance of THBS1, Cyr61 and CTGF in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC cancer* 9, 291.
- Zook, E.C., Krishack, P.A., Zhang, S., Zeleznik-Le, N.J., Firulli, A.B., Witte, P.L., Le, P.T.,** 2011. Overexpression of Foxn1 attenuates age-associated thymic involution and prevents the expansion of peripheral CD4 memory T cells. *Blood*.
- Zou, G.M.,** 2007. Cancer stem cells in leukemia, recent advances. *Journal of cellular physiology* 213, 440-444.
- Zwaans, B.M., Bielenberg, D.R.,** 2007. Potential therapeutic strategies for lymphatic metastasis. *Microvascular research* 74, 145-158.

9. ANEXOS

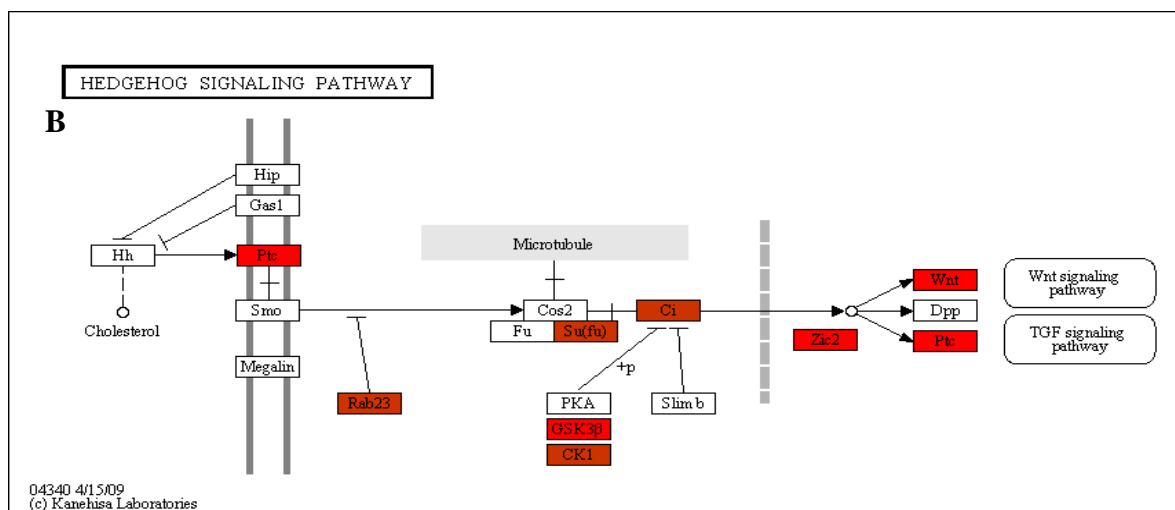
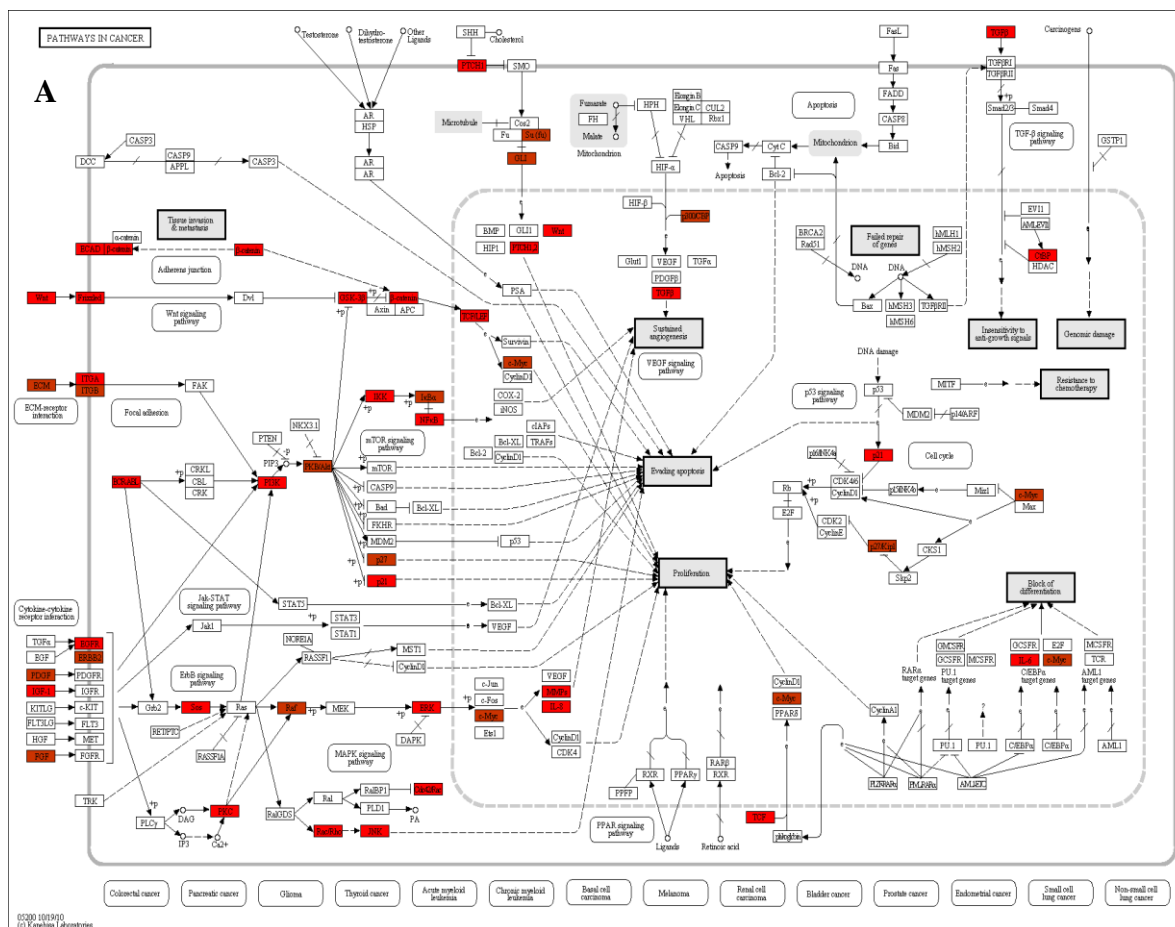
Anexo 1. Listas de genes (símbolos oficiales ENTREZ) incluidos en el estudio.

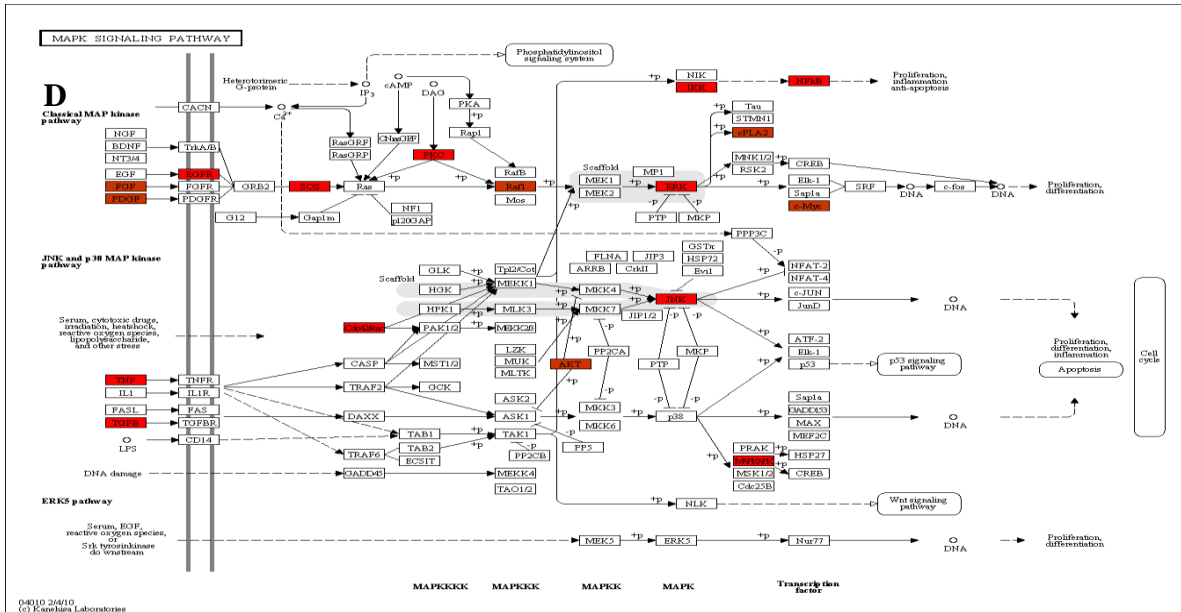
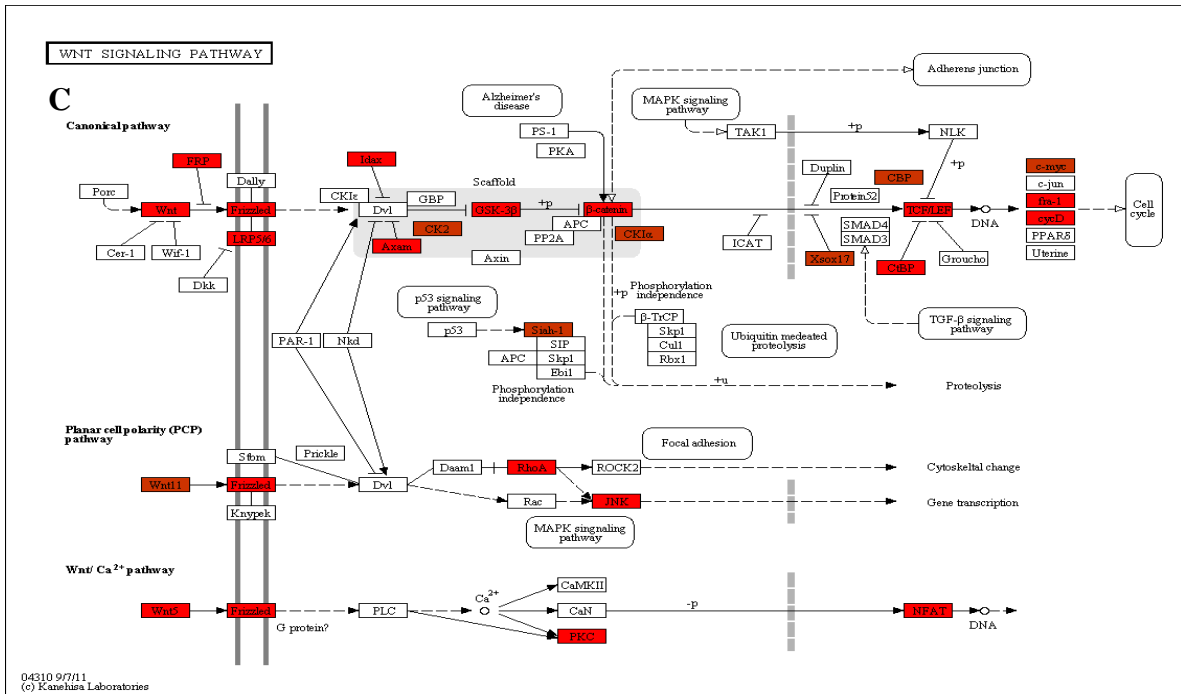
WNT Array	Activación Linfocitaria Array	PI3K array	Angiogenesis Array
AES	PTPRC	ABL1	ADAMTS1
AXIN1	PIK3CD	ACACA	AKT1
FZD5	NFKB2	ACOX1	ANGPT1
CCND2	PRKCB1	AEBP1	ANGPT2
CCND3	CHUK	AKT1	ANGPTL3
CSNK1A1	NFATC1	AKT2	ANGPTL4
CSNK1D	CD5L	AKT3	ANPEP
CSNK1G1	IL10	ANG	BAIL
CSNK2A1	INHBA	ARAF	CCL11
CTBP1	INHBA	BAD	CCL2
CTNNB1	CD81	BLC2	CDH5
CTNNBIP1	TNFRSF7	BCL2L1	COL18A1
CXXC4	TNFRSF5	BRAF	COL4A2
DKK1	IFNB1	BTK	CXCL1
DVL1	HDAC5	CAP1	CXCL11
EP300	HDAC7	CASP9	CXCL2
FBXW2	HDAC9	CBL	CXCL5
FGF4	CXCR5	CCND1	CXCL6
FOSL1	IGBP1	CCR2	CXCL9
FOXP1	MS4A1	CCR5	ECGF1
FRAT1	RGS1	CD4	EDG1
FRZB	TNFRSF6	CD40	EFNA1
FSHB	IL2	CDC42	EFNA3
FZD1	TNFSF5	CDH1	EFNA5
FZD2	TNFSF6	CDKN1A	EFNB2
FZD3	CD2	CDKN1B	EGF
FZD4	CD3D	CDKN2A	ENG
FZD6	CD3E	CREB1	PHB4
FZD7	CD3G	CTNNB1	EREG
FZD8	CD4	CXCR4	FGF1
GSK3A	CD7	E2F1	FGF2
JUN	HLA-DRA	EGFR	FGFR3
KREMEN1	CD86	ERBB2	FIGF
LEF1	CD8A	FRAP1	FLT1
LRP5	CLEC7A	GRB2	HY1
LRP6	KIF13B	G8K3A	HGF
MYC	NCK1	G8K3B	HIF1A
NLK	NCK2	GYS1	HPSE
PITX2	TNFSF14	HK2	ID1
PPP2CA	CD28	HRAS	ID2
PYGO1	IL12B	IGF1	IFNA1
RHOU	IL12RB1	IGF1R	IFNB1
SENP2	IL12RB2	IGF2	IFNG
SFRP1	IL18	IGF2R	IGF1
SFRP4	SFTPD	INS	IL1B
SLC9A3R1	SOCS5	INSR	IL6
SOX17	CD5	IRS1	IL8
TCF7	CSF2	IRS2	ITGAV
TCF7L1	IFNG	IRS4	ITGB3
TLE1	IL3	ITGB1	JAG1

Anexo 1. Listas de genes (símbolos oficiales ENTREZ) incluidos en el estudio (continuación).

WNT Array	Activación Linfocitaria Array	PI3K array	Angiogenesis Array
TLE2	IL5	ITGB3	KDR
WIF1	TLR2	JAK2	LAMA5
WISP1	TLR4	KIT	LECT1
WNT10A	TLR9	KRAS	LEP
WNT11	IFNGR2	LCK	LTA
WNT16	IL18R1	LEP	MDK
WNT7A	CXCR3	NFKBIA	PECAM1
WNT8A	CXCR4	NOS3	PEF4
WNT9A	BMP7	PAK1	PGF
MYL4	CEP76	PDE3B	PLAU
PROZ	TLR6	PDPK1	PLG
PRKCB1	IL8	PIK3C3B	PLXDC1
CDH7	CX3CL1	PIK3C3	PROK2
HOXB6	TOLLIP	PIK3CA	PTGS1
SMARCD1	HLA-DOA	PIK3R1	SERPINF1
NFATC1	PRDM1	PIK3R4	SPHK1
PPP2R5D	IL17A	PRKCA	STAB1
STK36	IL17B	PRKCE	TEK
BMP2	IL17F	PRKCG	TGFA
BMP4	IL17RB	PTEN	TGFB
PTCH1	FOXP3	RAC1	TGFB2
BMP6	IL22	RAF1	TGFBR1
RAB23	IL21	RELA	THBS1
SMO	IL26	RHOA	THBS2
ZIC2	NFKB1	SGK1	TIMP1
HHAT	CCR6	SHC1	TIMP2
SHH	BMP5	SOS1	TIMP3
SIAH1	MAPKAPK3	SPP1	TNF
NPC1	IL6ST	SRC	TNFAIP2
NPC1L1	NOS1	SYK	VEGFA
GLI	JAK3	RLR4	VEGFB
GLI2	OCLM	TNF	VEGFC
SUFU	SOX14	ACTB	ACTB
CDON	PTGS1	B2M	B2M
FGF9	ARPC2	GAPD	GAPD
FKBP8	CCRL2	GUSB	GUSB
OTX2	TNF	HPRT1	HPRT1
PRKACA	IL1B	PGK1	PGK
PRKACG	IL6	PPIA	PPIA
PRKACB	PLA2G2A	RPL13A	RPL13A

Anexo 2. Figuras de vías de señalización Kegg.





Anexo 2. En rojo todos los genes sobre expresados (nivel de cambio mayor a 2), en color amarillo-café genes con nivel de cambio menor a 2. En la figura A se visualiza “vías de señalización en cáncer” un compendio de desregulaciones en distintos tejidos. En B la vía Hedgehog, en C la señalización y cascada desregulada de WNT. Por último en D se visualiza la señalización de MAPK y la desregulación de esta vía.

Anexo 3. Resumen con cambios de expresión de todos los genes incluidos.

Wnt-Hedgehog	
Symbol	Fold Change (Promedio)
CCND2	21.64
CCND3	22.62
CSNK1A1	2.48
CSNK1G1	3.75
CSNK2A1	2.38
CTBP1	70.08
CTNNB1	16.9
CTNNBIP1	-2.04
EP300	2.44
FBXW2	6.06
FOSL1	7.2
FOXP1	13.88
FRZB	2.02
FSHB	36.34
FZD1	5.24
FZD2	4.28
FZD5	1083.29
FZD6	6.61
FZD7	3.09
FZD8	4.1
GLI2	3.6
GSK3A	2.12
HOXB6	9.62
LEF1	4.02
LRP6	9.58
MYC	2.16
MYL4	5.64
NFATC1	22.75
NLK	2.04
NPC1	5
NPC1L1	4.06
PRKCB1	5.87
PROZ	5.2
PTCH1	52.15
PYGO1	19.06
RAB23	3.31
RHOA	2.51
SENP2	9.68
SFRP4	41.78
SIAH1	2.39
SLC9A3R1	7.83
SMARCD1	4.91
SOX17	2.78
SUFU	3.1
WISP1	3313.29
WNT10A	8.73
WNT2B	3.31
WNT3	5.12
WNT5A	9.95
WNT9A	2.37
ZIC2	7.38

PI3K/AKT	
Symbol	Fold Change (Promedio)
ABL1	86.86
ACACA	3.17
ACOX1	72.02
AEBP1	4.17
BTK	-2.66
CAP1	-2.69
CBL	-5.74
CCR5	8.37
CD40	5.66
CDC42	255.26
CDH1	209.73
CDKN1A	138.25
CDKN1B	2.73
CXCR4	-2.06
E2F1	2.76
EGFR	492.69
ERBB2	2.86
GSK3B	159.33
IGF2	7.72
IGF2R	8.85
IRS1	-2.21
IRS2	117042.46
IRS4	-12.29
ITGB1	7.88
JAK2	7.18
KIT	-2.78
LCK	2.11
MAPK1	13.42
MAPK8	497.56
NFKB1	3.06
NFKBIA	5.82
PIK3C2B	511.57
PIK3CA	2.23
PIK3R1	5.05
PIK3R4	15.21
PRKCA	270.97
PRKCE	15.62
PRKCG	667.37
PTEN	5.55
RAF1	6.14
RHOA	53.36
SHC1	2.69
SOS1	75.22
SPP1	45.7
SRC	2.38
ABL1	86.86
ACACA	3.17
ACOX1	72.02
AEBP1	4.17
BTK	-2.66
CAP1	-2.69

Anexo 3. Resumen con cambios de expresión de todos los genes incluidos (Continuación).

Angiogenesis	
Symbol	Fold Change (Promedio)
ADAMTS1	-2.94
AKT1	293.39
ANGPT1	2.17
ANGPTL4	3.53
ANPEP	28
BAI1	4.31
CCL2	-3.58
CDH5	10.09
COL18A1	54.95
COL4A2	2.45
CXCL6	2.01
CXCL9	12.74
ECGF1	12.5
EDG1	23.75
EFNA1	-2.42
EFNA3	15.97
EFNB2	5.24
ENG	3.41
FGF1	2.58
FGF2	3.07
FIGF	-2.09
ID2	6777.65
IFNA1	2.53
IFNG	11.68
IGF1	1001.71
IL6	3.96
IL8	107.17
ITGAV	4.83
ITGB3	7.65
JAG1	4.13
KDR	-2.31
LAMA5	10.75
LTA	16.59
MDK	9.57
MMP2	24.5
MMP9	14.47
NOTCH1	5.53
NRP1	4450.07
NRP2	2.43
PDGFA	3.53
PGF	7.19
PLAU	7.42
PLXDC1	3.58
PROK2	3.5
PTGS1	-3.41
SERPINF1	2.12
SPHK1	2.98
TGFB	11.82
TGFB2	5.86
TGFBR1	2.09
THBS1	371.72
THBS2	23.38
TIMP1	23.43
TIMP2	2.56
TIMP3	2.84
TNFAIP2	2.44
TNF	21
VEGFC	284915.32

T cell y B cell activation	
Symbol	Fold Change (Promedio)
CCL3	25.4
CCR3	19.77
CCR6	2.98
CCRL2	15.08
CD2	12.61
CD28	63.01
CD3D	16.07
CD3E	3.83
CD4	5.56
CD5	3.37
CD81	3.57
CD8A	3.01
CEP76	4.66
CHUK	19.36
CLEC7A	8.82
CSF2	38.4
CX3CL1	21.28
CXCR3	14.29
CXCR5	2.49
FOXP3	2.33
HDAC5	18.28
HDAC7	13.43
HLA-DRA	2.83
IFNG	1197
IFNGR2	-3.06
IL10	3.55
IL12RB1	5.51
IL12RB2	3.75
IL17B	1795.43
IL17F	15.22
IL17RB	3.92
IL18	10.72
IL18R1	2.98
IL26	2.55
IL2RA	25.68
IL3	4.39
IL6ST	52.75
INHBA	161.15
JAK3	4.57
KIF13B	2.29
MAPKAPK3	4.84
MS4A1	2.27
NCK1	192.11
NCK2	14.65
NFKB2	12.5
OCLM	8.97
PIK3CD	364.36
PLA2G2A	3.21
PRDM1	12.03
PRKCB1	11.88
PTGS1	4.12
PTPRC	41.77
PVRL1	3.97
SOCS5	24.66
TLR2	12.62
TLR4	6.91
TNFRSF5	26.43
TNFRSF6	7.08
TNFRSF7	3.43
TNFSF14	2.22