
Incremento en la expresión del ARNm del receptor c-Met en el cáncer gástrico.

Hideki Amemiya¹, Alix Peña², Miguel Chiurillo³, Jaime Moscoso¹, Alejandro Useche⁴ y Raúl Baffi⁵.

¹Departamento de Ciencias Morfológicas, Sección de Anatomía Macroscópica, Decanato de Ciencias de la Salud, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado".

²Clínica Razetti.

³Departamento de Ciencias Funcionales, Sección de Bioquímica, Decanato de Ciencias de la Salud, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado".

⁴Departamento de Cirugía General, Hospital Central Universitario "Antonio María Pineda".

⁵Sociedad Anticancerosa del Estado Lara. Barquisimeto, Venezuela.

Palabras clave: cáncer gástrico, ARNm, receptor c-Met, RT-PCR, inmunohistoquímica.

Resumen. El cáncer gástrico es una de las patologías malignas más frecuentes en el mundo. En las últimas décadas la atención se ha centrado en posibles alteraciones de factores genéticos que incluyen la activación de proto-oncogenes y/o la inactivación de genes supresores tumorales. El producto del *C-MET* proto-oncogen y su ligando, el factor de crecimiento del hepatocito (HGF), han sido implicados en la proliferación y migración celular en el cáncer gástrico. En este estudio se analizó a nivel molecular la amplificación del ARNm del receptor c-Met a partir del tejido tumoral gástrico de pacientes a quienes se les practicó gastrectomías, utilizando el método del ácido guanidina-tiocianato-fenol-cloroformo, y el método semicuantitativo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR), encontrándose que los elevados niveles del ARNm del receptor c-Met en las muestras tumorales de los pacientes están relacionados con mayor invasión en la profundidad de la pared gástrica ($r = 0,762$, $p < 0,01$), incremento en la metástasis a los ganglios linfáticos ($r = 0,766$, $p < 0,01$), alta frecuencia en tumores pocos diferenciados o indiferenciados ($r = 0,912$, $p < 0,001$), aumento en el estadiaje del cáncer gástrico ($r = 0,838$, $p < 0,001$), y en la sobreexpresión por el método inmunohistoquímico (IHQ) de la estreptavidina-biotina marcada de su receptor a nivel proteico ($r = 0,858$, $p < 0,001$). La amplificación del ARNm y/o la sobreexpresión a nivel proteico del receptor c-Met, pudieran ser utilizados como factores pronósticos en el cáncer gástrico.

Increased expression of the c-Met receptor mRNA in gastric cancer.*Invest Clin: 2013; 54(3): 284 - 298***Keywords:** Gastric cancer, c-Met receptor, RT-PCR, immunohistochemistry.

Abstract. Gastric cancer is one of the most common malignancies in the world. In the last decades, the attention has been focused in possible alterations of genetic factors that include proto-oncogene activation and/or the tumor suppressor gene inactivation. The product of the proto-oncogene c-MET and its ligand, hepatocyte growth factor (HGF), have been implicated in cell proliferation and migration in gastric cancer. In this study we analyzed at the molecular level, the amplification of c-Met receptor mRNA from gastric tumor tissue of patients who underwent gastrectomy, using the acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform method and the semiquantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) method. It was found that high levels of c-Met receptor mRNA in tumor samples from patients are associated with greater depth of invasion in the gastric wall ($r = 0.762$, $p < 0.01$), increase in metastases to lymph nodes ($r = 0.766$, $p < 0.01$), high frequency of poorly differentiated or undifferentiated tumors ($r = 0.912$, $p < 0.001$), increase in the gastric cancer staging ($r = 0.838$, $p < 0.001$), and the overexpression, by the immunohistochemistry method (IHC) of the labeled streptavidin-biotin, of the c-Met receptor at the protein level ($r = 0.858$, $p < 0.001$). The amplification of mRNA and/or protein level overexpression of the c-Met receptor could be used as prognostic factors in gastric cancer.

Recibido: 11-03-2013. Aceptado: 18-07-2013

INTRODUCCIÓN

El carcinoma gástrico continúa siendo una de las neoplasias más frecuentes del ser humano. En Venezuela, el estado Táchira es el que ocupa el primer lugar con una tasa de mortalidad por cáncer gástrico de 15,91 por 100.000 habitantes, seguido de Mérida y Trujillo con 15,22 y 11,02 por 100.000 habitantes respectivamente. El estado Lara ocupa el noveno lugar en la mortalidad por cáncer gástrico con 8,15 por 100.000 habitantes, presentando una tasa de mortalidad más alta que la mortalidad general por cáncer gástrico en Venezuela el cual es de 6,73 por 100.000 habitantes (1). Además para

Barquisimeto, el cáncer gástrico representa un problema de salud pública ya que ocupa el primer lugar en las defunciones por cáncer (2).

Las neoplasias malignas frecuentemente resultan por una serie de alteraciones genéticas que incluyen la activación de proto-oncogenes y/o la inactivación de los genes supresores tumorales (3). El c-Met proto-oncogen regula la proliferación o migración celular (4, 5), y codifica el receptor c-Met con actividad de tirosina kinasa (6). La molécula del receptor es un heterodímero de 190 kDa, que consta de 2 cadenas unidas a un puente disulfuro: la subunidad α , de 50 kDa, está expuesta en la superficie

extracelular y la subunidad β , de 145 kDa, atraviesa la membrana celular (6), ésta última incluye los sitios de fosforilación de la tirosina (7).

El ligando para el receptor c-Met es el factor de crecimiento del hepatocito (HGF), el cual fue inicialmente identificado como un potente mitógeno para los cultivos primarios de hepatocitos a partir del suero de ratas con hepatectomías parciales (8). HGF fue aislado de varias fuentes, incluyendo las plaquetas de rata (9), suero de pacientes humanos con falla hepática (10) y suero de conejo (11). HGF es considerado el mayor mediador en la regeneración hepática *in vivo* (12). HGF es conocido por estimular el crecimiento de otros tejidos epiteliales, tales como epitelio tubular renal, queratinocitos (13), células endoteliales y melanocitos (14).

El receptor c-Met ha sido encontrado con sobreexpresión en los cánceres gástrico (15), colorrectal (16), pulmonar (17), tiroideo (18), renales (19), ovárico (20) y de mamas (21). Además se ha reportado acerca del pobre pronóstico de los pacientes con cáncer gástrico productor de alfa-feto-proteínas (22) y se ha encontrado una alta frecuencia en la expresión del receptor c-Met en este tipo de cáncer gástrico (23). Recientemente se ha publicado un estudio en donde se observó una alta expresión del receptor c-Met a nivel proteico en pacientes venezolanos con estadios avanzados (III y IV) con respecto a pacientes en estadios precoces (I y II) del cáncer gástrico, encontrando además sobreexpresión del receptor c-Met en las variables histológicas con bajo grado de diferenciación, mayor invasión tumoral, metástasis hepática y se reportó una sobrevida menor de los pacientes con mayor expresión del receptor comparados con el grupo de menor expresión (24).

Motivados por las investigaciones previas y desconociendo la existencia de publicaciones en español, en las que se evalúe a

nivel molecular el ARNm del receptor c-Met en el cáncer gástrico, se ha propuesto realizar el presente estudio a objeto de determinar por RT-PCR la amplificación del receptor c-Met en pacientes con cáncer gástrico diagnosticados en la ciudad de Barquisimeto, estado Lara, Venezuela.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes

Se realizó un estudio poblacional, longitudinal y transversal, en el que se incluyeron en este estudio 12 pacientes a quienes se les practicó gastrectomía total o subtotal por presentar diagnóstico de cáncer gástrico en la Clínica Razetti de Barquisimeto, Estado Lara, Venezuela, en el período comprendido entre Marzo 2008 hasta Marzo 2012.

El aspecto bioético del trabajo fue discutido y aprobado por la comisión de Bioética de la Clínica Razetti y a cada paciente se les explicó sobre los procedimientos a realizar en los especímenes tomados de las gastrectomías por cáncer gástrico, y se les solicitó sus firmas para la hoja del consentimiento informado.

Extracción del ARN total

Se recolectaron muestras tanto de tejido tumoral con cáncer gástrico y tejido gástrico sano de los pacientes que fueron intervenidos en la Clínica Razetti de Barquisimeto, siendo congelados inmediatamente con nitrógeno líquido, posteriormente fueron almacenados en un refrigerador de -80°C hasta la extracción del ARN total.

Para la extracción del ARN total se utilizó el método del ácido guanidina-tiocianato-fenol-cloroformo (Trizol Reagent, Invitrogen) con modificaciones menores como previamente se describe (25, 26). Brevemente, cada muestra de tejido fue pulverizado dentro del nitrógeno líquido, y se le agregó la solución denaturizante conteniendo

do 4M de guanidina-tiocianato. Secuencialmente, se le agregó 2M de acetato sódico, fenol saturado en agua y cloroformo/isoamyl alcohol. El ARN total se separó por centrifugación y fue precipitado con isopropanol. El precipitado del RNA se disolvió en la solución denaturizante y fue reprecipitado con isopropanol, se lavó con 70% de etanol y finalmente se disolvió en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

Oligonucleótidos

Se utilizaron las secuencias del receptor c-Met (número de acceso NM 000245, GenBank), β -actina (número de acceso XM 004814, GenBank) y los iniciadores que fueron diseñados por el autor en estudios previos (25, 26) con el Primer3 software desarrollado por el Instituto Whitehead, Investigaciones Biomédicas (Cambridge, Massachusetts). Los iniciadores oligonucleótidos son los siguientes: receptor c-Met: (sentido): AAG CTG CCA GTG AAG TGG AT; (antisentido): AAA CCA TTG GAC AAA GTG TGG (tamaño del producto de 491 pares de bases de PCR) y β -actina: (sentido): CTA CAA TGA GCT GCG TGT GC; (antisentido): CGG TGA GGA TCT TCA TGA GG (tamaño del producto de 314 pares de bases de PCR).

Método semicuantitativo de la reacción de la cadena de polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

Un microgramo del ARN total fue agregado a la mezcla de reactivos usando el Access RT-PCR System (Promega, Madison, WI, USA) el cual contiene 0,1 μ/μ L de la transcriptasa reversa del Virus de la Mieloblastosis Aviaria (AMV), 0,1 μ/μ L del ADN Polimerasa del *Thermus flavus* (Tfl), 10 μ L AMV/Tfl bufer, 1 mM $MgSO_4$, 0,2 mM dNTP, 0,1 μ M para cada iniciador y agua tratada con DEPC para completar un volumen total de 50 μ L.

Tanto para el receptor c-Met y β -actina, la reacción de la transcriptasa reversa fue llevado a cabo en 1 ciclo de 45 min a 45° y de 2 min a 94°C para la inactivación del AMV transcriptasa reversa. Para determinar la mejor cantidad de ciclos para el método semicuantitativo del PCR, se escogió un ciclo en la línea ascendente de la amplificación del producto del PCR por análisis densitométrico de las bandas entre 10 a 40 ciclos, y se utilizaron las siguientes condiciones cíclicas: para el receptor c-Met, 20 ciclos de 30 seg a 94°C para la desnaturalización, 1 minuto a 60° para el acoplamiento y 2 min a 68°C para la elongación y para la β -actina, el protocolo fue similar al descrito anteriormente pero con 15 ciclos (Fig. 1). Se utilizó el termociclador (Gene Amp, PCR System 9700, Applied Biosystem).

Para evaluar la cantidad del producto del PCR, 10 μ L del producto amplificado se le realizó electroforesis en gel de agarosa (Scientific Trade Corp. Miami, USA) al 1,2% y 1,5% equilibrado en buffer 40 mM Tris-acetato, 2mM EDTA (TAE) para c-Met y β -actina respectivamente. Bromuro de etidio (0,5 μ g/mL) fue agregado al gel de agarosa-TAE y al buffer-TAE para electroforesis para visualizar el fragmento amplificado de ADN y fueron visualizados bajo luz ultravioleta con el equipo Kodak Gel Logic 2000 Imaging System (Rochester, NY, 14650). Las fotografías fueron analizadas calculando la intensidad de las bandas utilizando el software Kodak Molecular Imaging Software Version 4.0 (Rochester, NY, 14650). Las cantidades relativas del receptor c-Met fueron estandarizados al gen control, la β -actina, del mismo paciente.

Inmunohistoquímica

El análisis inmunohistoquímico (IHQ) fue realizado por el método de la estreptavidina-biotina marcada (LSAB+), usando el kit LSAB+ (DAKO Corporation, CA, USA)

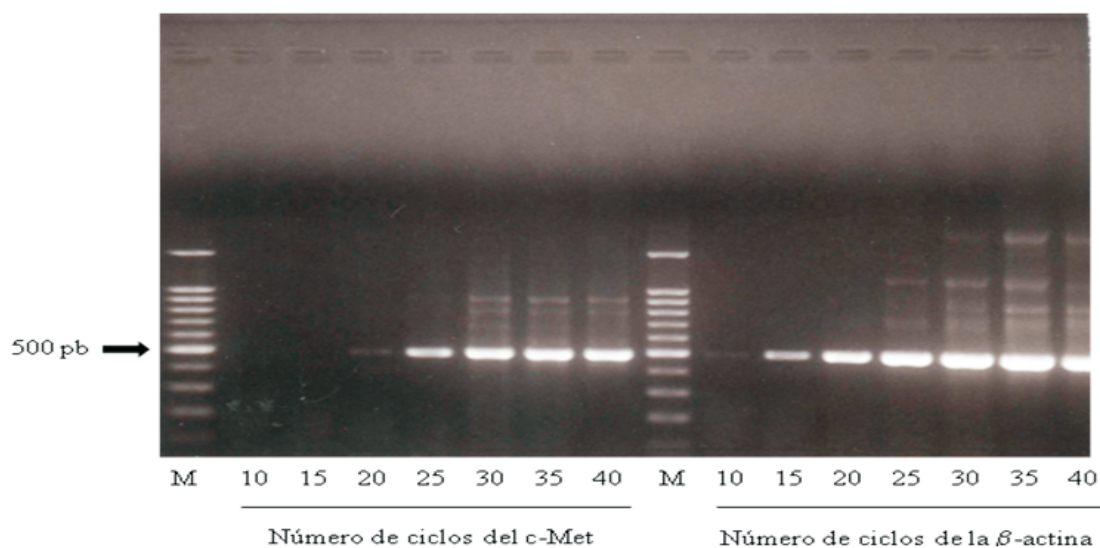


Fig. 1. Amplificación según el número de ciclos de los niveles del ARNm del receptor c-Met y β -actina por la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR). M= Marcador.

sobre bloques de tejidos en parafina fijadas con formalina al 10%. Secciones seriadas de 2- μ m fueron desparafinadas en xileno y rehidratadas a través de concentraciones alcohólicas decrecientes. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada por incubación en peróxido de hidrógeno al 0,1% por 15 minutos. El anticuerpo primario incluyó un anticuerpo policlonal anti-Met de conejo contra el carboxilo terminal del c-Met humano (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) a dilución de 1 en 50, y fue detectado incubando el anticuerpo secundario y la estreptavidina-peroxidasa por 30 min a temperatura ambiente, seguida de tres enjuagues con PBS cada uno. Diaminobenzidina fue usado por 5 min para visualizar la deposición de la peroxidasa en los sitios antigénicos. Por último, las secciones fueron teñidas con hematoxilina.

Clasificación

La inmunorreacción observada en el citoplasma y la membrana celular de las células tumorales para el receptor c-Met fueron tomadas como positivas para clasificar el método IHQ como sigue: negativo (-): no

hay inmunorreacción en las células neoplásicas; una cruz (+): de 1 a 24% de las células neoplásicas exhibieron inmunorreacción; dos cruces (++) : de 25 a 49%; tres cruces (+++) : de 50 a 74%; cuatro cruces (++++) : de 75% o más de las células neoplásicas presentaron inmunorreacción.

Se utilizó para la clasificación del cáncer gástrico por estadios, profundidad e invasión a los ganglios linfáticos, los parámetros de la 7ma. Edición de la American Joint Committee of Cancer (AJCC) (27) y para la clasificación histológica según la 1era. Edición en inglés de la Japanese Research Society for Gastric Cancer (JRS GC) (28).

Análisis estadístico

Para determinar el análisis estadístico, se utilizó el paquete estadístico SPSS 15 y los niveles del ARNm para evaluar 2 grupos fueron analizados con el t student. Los resultados de la IHQ se compararon mediante las pruebas de Fisher y Chi Cuadrado. Para determinar el grado de asociación entre el nivel del ARNm y a nivel proteico del receptor c-Met, se utilizó el coeficiente de corre-

lación de Pearson. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Características clinicopatológicas de los pacientes

Del total de 12 pacientes incluidos en éste estudio, 2 pacientes fueron del género femenino (17%) y 10 pacientes del masculino (83%). La edad de los pacientes osciló de 28 a 75 años ($X \pm DE$: $57,42 \pm 13,26$ años).

En cuanto al grado de diferenciación del tejido tumoral, en el 50 % de los casos presentaron adenocarcinomas moderadamente diferenciados, en el 25 % los poco diferenciados, y para las células en anillo de sello, papilar y el bien diferenciado correspondió a 1 paciente respectivamente.

Según la profundidad de la invasión tumoral en la pared gástrica, fue más frecuente hasta la serosa (T4a) con 6 casos (50%), seguidos de la infiltración neoplásica que sobrepasa la serosa (T4b) con 3 pacientes (25%), y un caso cada uno en los niveles T1b (submucosa), T2 (muscularis mucosa) y T3 (subserosa). Con estos resultados, el 91,7% de los pacientes ($n=11$) presentaron cáncer gástrico avanzado.

Se observó infiltración tumoral en varios órganos en una paciente (peritoneo parietal, peritoneo visceral de asas delgadas, páncreas y epiplón mayor), en otro paciente en 2 órganos (páncreas y colon) y en 2 casos presentaron infiltración a un órgano (epiplón mayor y páncreas respectivamente). Y en el resto de los pacientes ($n=8$, 66,7 %), no presentaron evidencias de infiltración a órganos vecinos o metástasis.

En relación al número de ganglios linfáticos afectados, se observó que predominó el N2 (metástasis de 3 a 6 ganglios linfáticos) con 4 casos (33,3 %), seguidos de N3a (metástasis de 7 a 15 ganglios linfáticos) y N3b (mayor de 16 ganglios linfáticos invadidos) ambos con 3 pacientes (25% cada

uno), y un caso cada uno para N0 (sin afectación en los ganglios linfáticos) y N1 (invasión de 1 a 2 ganglios linfáticos).

De acuerdo a la última edición del TNM (27) para el estadiaje del cáncer gástrico se clasificó en: IA: 1 paciente; IB: 0 pacientes; IIA: 1 paciente; IIB: 0 pacientes; IIIA: 1 paciente; IIIB: 3 pacientes; IIIC: 4 pacientes y IV: 2 pacientes.

Amplificación del ARNm del receptor c-Met en especímenes de cáncer gástrico

Se analizaron los niveles del ARNm del receptor c-Met en los especímenes congelados del carcinoma gástrico como de tejido normal del estómago de 12 pacientes por el método semicuantitativo de la RT-PCR.

El ARNm del receptor c-Met se observó en todas las muestras tanto tumorales como de tejidos gástricos normales de los 12 pacientes (Fig. 2).

Al analizar los tejidos tumorales de los pacientes, se encontró altos niveles del ARNm del receptor c-Met en el grupo de pacientes con invasión tumoral en profundidad T4 (27), con respecto a las categorías T3, T2 y T1. Además, se observó que a mayor amplificación en el ARNm del receptor c-Met, fue mayor la invasión tumoral en la profundidad de la pared gástrica ($r = 0,762$, $p < 0,01$) (Fig. 3). Con respecto a la invasión hacia los ganglios linfáticos según la clasificación de la AJCC (27), el grupo N3 presentó altos niveles del ARNm del receptor c-Met comparados con los grupos N1 y N0, evidenciándose una relación positiva entre la amplificación del ARNm con el grado de infiltración a los ganglios linfáticos ($r = 0,766$, $p < 0,01$) (Fig. 4). En cuanto al tipo histológico del cáncer gástrico según la JRSGC (28), se observó correlación con significancia estadística en donde los tumores con bajo grado de diferenciación presentaron elevados niveles del ARNm del receptor c-Met ($r = 0,912$, $p < 0,001$) (Fig. 5). Al evaluar los niveles del ARNm con el esta-

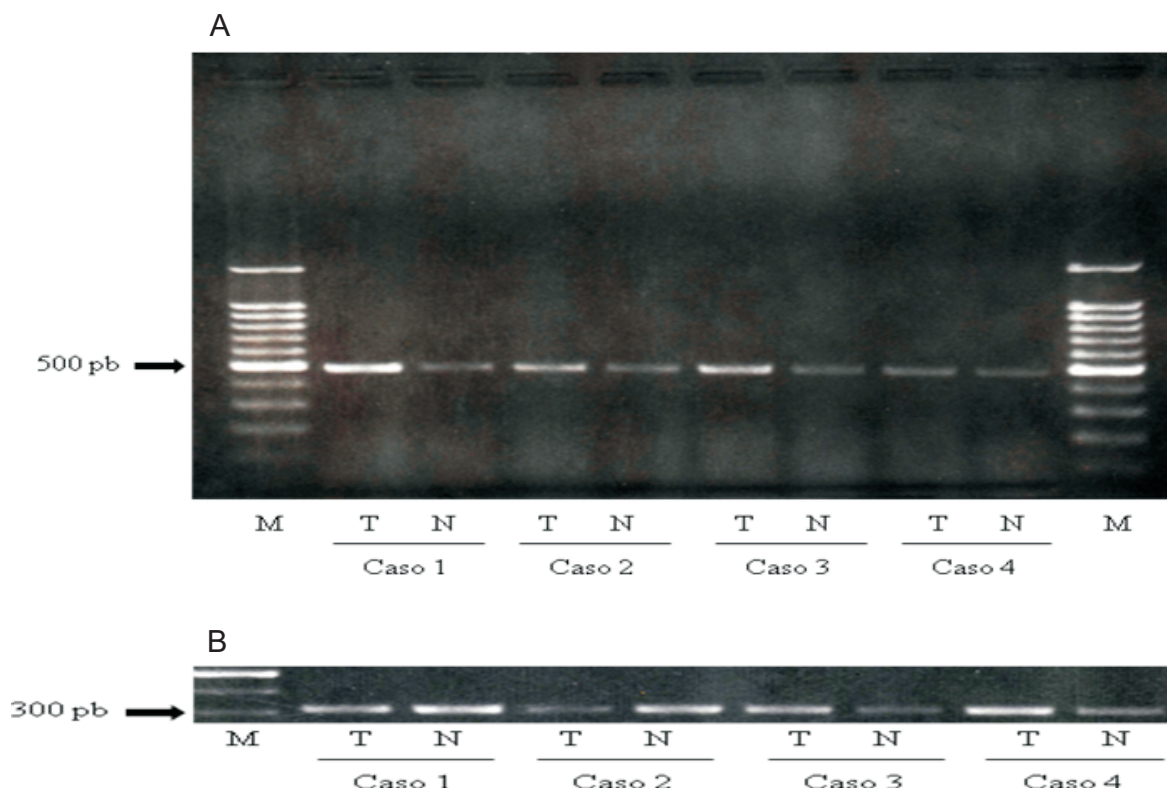


Fig. 2. (A) Niveles del ARNm del receptor c-Met en tejidos con tumor primario en casos representativos determinados por RT-PCR. (B). Niveles del ARNm de la β -actina utilizada como control interno. M= Marcador; T= Tumor gástrico; N= Tejido gástrico sano del mismo paciente.

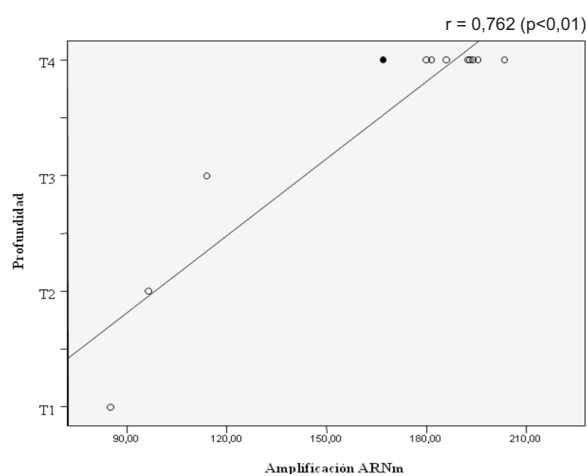


Fig. 3. Correlación entre la amplificación del ARNm del receptor c-Met por el método del RT-PCR en los tejidos tumorales con la invasión en la profundidad de la pared gástrica de acuerdo a los parámetros de la 7ma. edición de la American Joint Committee of Cancer (AJCC) (27).

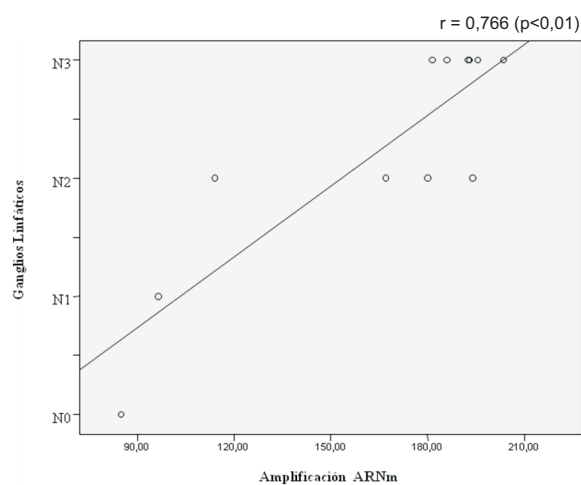


Fig. 4. Correlación entre la amplificación del ARNm del receptor c-Met por el método del RT-PCR en los tejidos tumorales con la invasión a los ganglios linfáticos de acuerdo a los parámetros de la 7ma. edición de la AJCC (27).

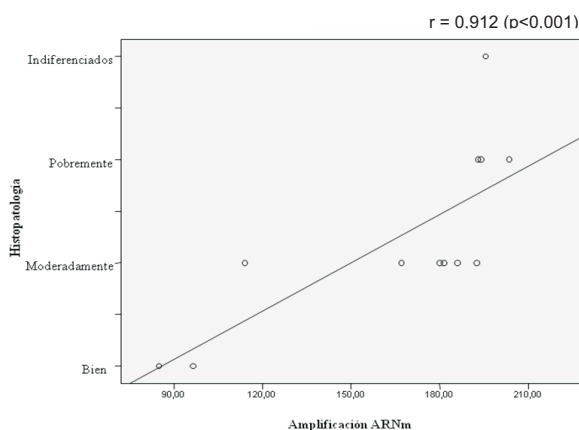


Fig. 5. Correlación entre la amplificación del ARNm del receptor c-Met por el método del RT-PCR en los tejidos tumorales con la clasificación histológica del cáncer gástrico de acuerdo a los parámetros de la Japanese Research Society for Gastric Cancer (JRS GC) (28).

dio del cáncer gástrico, se encontró amplificado el ARNm del receptor c-Met en los estadios III y IV con respecto a los estadios I y II, con una relación directamente proporcional entre el estadio del tumor con respecto al ARNm ($r = 0,838$, $p < 0,001$) (Fig. 6).

En el cálculo del coeficiente de regresión, se observó que por cada unidad densitométrica de la amplificación del ARNm del receptor c-Met, aumentan las siguientes variables: Invasión tumoral en la profundidad de la pared gástrica en 0,93; infiltración a los ganglios linfáticos en 0,87; histopatología hacia patrones menos diferenciados en 0,757 y el avance en el estadio del cáncer con 0,814 respectivamente.

Se apreció una elevada amplificación del ARNm del receptor c-Met en las especímenes tumorales comparados con los de tejido normal en los pacientes con estadio avanzado del cáncer gástrico ($p < 0,001$) mientras que no hubo diferencias significativas en los niveles del ARNm del receptor c-Met en las muestras tumorales y normales de los pacientes con estadio precoz ($p = 0,144$).

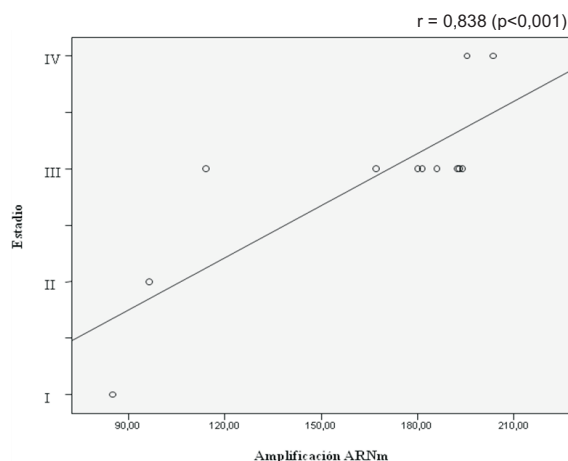


Fig. 6. Correlación entre la amplificación del ARNm del receptor c-Met por el método del RT-PCR en los tejidos tumorales con el estadio del cáncer gástrico de acuerdo a los parámetros de la 7ma. Edición de la AJCC (27).

Inmuno reacción del receptor c-Met en especímenes de cáncer gástrico

En la evaluación del receptor c-Met a nivel proteínico, se observó una fuerte expresión de tipo granular predominantemente en el citoplasma de las células tumorales (Fig. 7). En la Tabla I se detalla las características clinicopatológicas de los pacientes y la expresión del receptor c-Met por IHQ.

El análisis de la correlación de Pearson mostró una relación positiva significativa entre los niveles del ARNm a nivel genético con respecto a la expresión a nivel proteico del receptor c-Met en los especímenes de pacientes con cáncer gástrico ($r = 0,858$, $p < 0,001$) (Fig. 8). Finalmente, el coeficiente de regresión demostró un aumento en la IHQ de 0,957 por cada unidad densitométrica de la amplificación del ARNm del receptor c-Met.

DISCUSIÓN

Hay un incremento en las investigaciones a nivel de la biología molecular en el carcinoma gástrico. Pero no existe en la li-

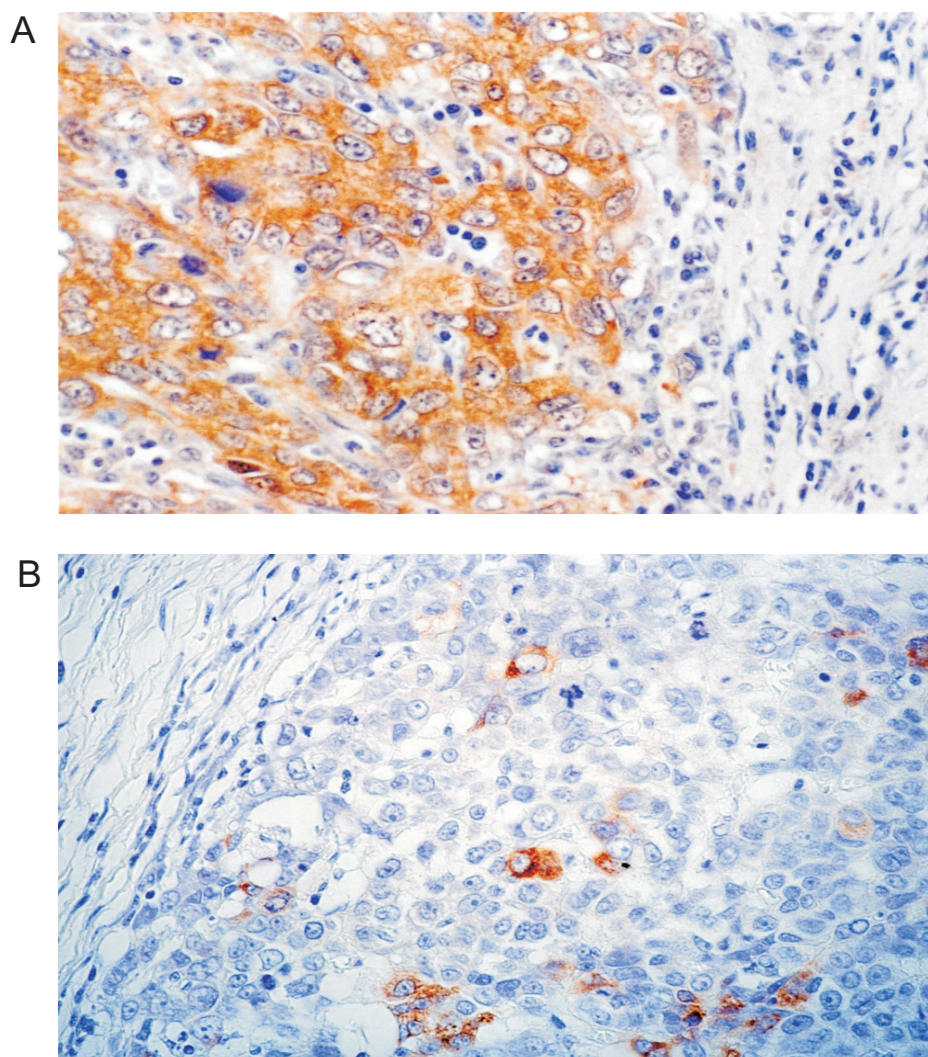


Fig. 7. (A) Inmunorreacción del receptor c-Met en un caso representativo grado ++++. Se aprecia fuerte expresión con un patrón granular a nivel de citoplasma de todas las células neoplásicas. (B) Inmunorreacción del receptor c-Met en un caso representativo grado +, observado en algunas células neoplásicas.

teratura en español reportes sobre la relación de la amplificación a nivel molecular del ARNm del receptor c-Met con el cáncer gástrico. Por tales motivos, surge este estudio en la región Centro-Occidental de Venezuela, para así comparar los resultados con los publicados en los reportes internacionales.

En el presente trabajo, se encontró elevados niveles del ARNm del receptor c-Met en las muestras tumorales de cáncer gástrico en los pacientes con estadios avan-

zados (III y IV), con bajo grado de diferenciación tumoral, con mayor infiltración tumoral en la pared gástrica (T4), y con mayor invasión a ganglios linfáticos (N3), en concordancia con reportes previos, en donde Kuniyasu y colaboradores demostraron que hay una amplificación genética del c-Met en los pacientes en estadios avanzados, en especial a los carcinomas gástricos tipo escirroso (que corresponde a un carcinoma con infiltración difusa o Borrmann tipo IV) (29), así como Wang y colaborado-

TABLA I
 CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO
 Y LA INMUNOEXPRESIÓN DEL RECEPTOR C-MET

Parámetros	Nº de pacientes según el grado de expresión del receptor c-Met				
	+	++	+++	++++	
	n=1	n=2	n=2	n=7	
Profundidad ^a	T1	1	0	0	0
	T2	0	1	0	0
	T3	0	1	0	0
	T4	0	0	2	7
Invasión a ganglios linfáticos ^a	N0	1	0	0	0
	N1	0	1	0	0
	N2	0	1	1	2
	N3	0	0	1	5
Clasificación histológica ^b	Bien	1	0	0	0
	Papilar	0	1	0	0
	Moderado	0	1	2	3
	Pobre	0	0	0	3
	Anillo de sello	0	0	0	1
Estadio del cáncer gástrico ^a	I	1	0	0	0
	II	0	1	0	0
	III	0	1	2	5
	IV	0	0	0	2

^a Según los parámetros de la 7ma. Edición de la American Joint Committee of Cancer (AJCC) (27). ^b Según los parámetros de la Japanese Research Society for Gastric Cancer (JRS GC) (28).

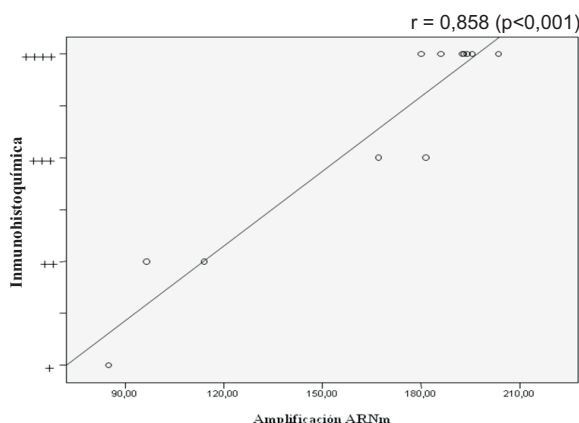


Fig. 8. Correlación entre la amplificación a nivel genético del ARNm del receptor c-Met por el método del RT-PCR con la expresión a nivel proteico del receptor c-Met por el método de IHQ en los tejidos tumorales.

res, analizaron la expresión del ARNm del receptor c-Met por RT-PCR en tejidos tumorales gástricos, encontrando sobreexpresado el ARNm del receptor con una relación significativa mientras mayor es la invasión tumoral en la profundidad ($p=0,007$), la metástasis a ganglios linfáticos ($p<0,01$), y el estadio TNM ($p=0,001$) (30). Otros investigadores encontraron una amplificación genética del receptor c-Met de 2 hasta 50 veces en los especímenes tumorales con respecto al tejido sano (16). Se ha involucrado en el incremento de los niveles del ARNm del receptor c-Met, a las citocinas tales como IL-1 α , IL-6, Factor de Necrosis Tumoral (FNT)- α , TGF β 1 y las hormonas esteroideas como la progesterona y el tamoxife-

no, en una variedad de líneas celulares de carcinomas humanos (31).

El 91,7% de los pacientes en este estudio presentaron cáncer gástrico avanzado, y de ellos, el 75% se encontraba en T4, quienes presentaron elevados niveles en el ARNm del receptor c-Met en comparación con los casos catalogados como T1, T2 y T3. Tsugawa y colaboradores (32) reportaron una incidencia alta de diseminación peritoneal en los pacientes con amplificación genética del c-Met. En ésta investigación, se evidenció que hubo diseminación en peritoneo parietal anterior y posterior, así como también en peritoneo visceral de asas delgadas en la misma paciente, quien presentó la más alta amplificación del ARNm del receptor. En los pacientes con invasión linfática N2 y N3, se apreció una amplificación del ARNm del c-Met en el 83,3% de los casos, al relacionarlos con los grupos N1 y N0, en concordancia con estudios previos (33).

Además del análisis de la amplificación del ARNm del c-Met por medio del RT-PCR, se evaluó a nivel protéico de dicho receptor por medio del método de IHQ, encontrando que los pacientes con alta expresión del receptor c-Met, presentaron mayor invasión tumoral en la profundidad de la pared gástrica, infiltración a órganos vecinos, así como también hacia los ganglios linfáticos (N2 y N3), observándose mayor expresión (++++) en los tumores menos diferenciados y en los casos en estadios avanzados del cáncer gástrico (III y IV).

Nakajima y colaboradores reportaron que tanto la amplificación genética y la sobreexpresión de la proteína del receptor c-Met en el cáncer gástrico, están relacionados con el grado de invasión en la profundidad de la pared gástrica, a los ganglios linfáticos y al pobre pronóstico de los pacientes (33). Se ha demostrado además, que los pacientes con amplificación genética del receptor c-Met, presentaron un período libre de enfermedad más corto

($p=0,0216$) y una sobrevida general más baja ($p=0,0134$) comparado con el grupo de pacientes sin amplificación genética (34). En un estudio previo, pero a nivel de la proteína del receptor c-Met, se observó que los pacientes que mostraron alta expresión en la inmunoreactividad del receptor c-Met, presentaban una supervivencia muy pobre (24). En la presente investigación, hubo una correlación entre las expresiones del ARNm con el de la proteína del receptor c-Met, demostrándose que mientras mayor era la amplificación genética en el ARNm, se apreciaba mayor inmunorreacción en la proteína del receptor, en línea con reportes previos (35). Sin embargo, otros autores, observaron que en tejidos como riñón, tiroides, placenta y páncreas, presentaron niveles elevados del ARNm del c-Met, pero no se correlacionaban debido a la inmunoreactividad apenas detectable en la proteína del receptor c-Met por IHQ (36). Una explicación pudiera ser una vida media extremadamente corta del ARNm del receptor c-Met en el mecanismo postranscripcional reportado en líneas celulares de carcinoma humano derivados del ovario, mama, endometrio, y que pudiera estar regulado de manera diferente para cada tejido (31).

Tajima y colaboradores, utilizando el HGF recombinante humano con I125, describieron una correlación entre la amplificación del ARNm del c-Met con la afinidad del receptor a su ligando en varias líneas celulares (36). Los niveles séricos del HGF fueron reportados elevados en los pacientes con cáncer gástrico, asociados a mayor invasión tumoral en la pared gástrica e infiltración de células cancerosas en los capilares venosos dentro del tumor (37). En una investigación aparte, el 61,5 % de los pacientes portadores de cáncer gástrico, se les detectaron la amplificación del ARNm del receptor c-Met en las células tumorales circulantes en la sangre periférica utilizando la técnica del RT-PCR, y fueron asocia-

dos a invasión tumoral y metástasis a ganglios linfáticos (38).

En estudios previos, se ha encontrado un alto grado de expresión proteica y amplificación genética del receptor c-Met en el grupo de pacientes con cáncer gástrico primario con metástasis hepática comparado con el grupo sin metástasis hepática (26). En una investigación similar, se observó un nivel elevado del ARNm del receptor c-Met usando el método RT-PCR en los tejidos con cáncer colorrectal primario con respecto al tejido normal, encontrando además una sobreexpresión del ARNm del receptor c-Met en el tejido hepático metastásico (39). De esta manera, la amplificación del ARNm del receptor c-Met, es uno de los mecanismos para la activación de la carcinogénesis, demostrando su rol en la progresión de las células tumorales hacia fenotipos más agresivos en el carcinoma gástrico (26, 29, 32). Así mismo, en el presente trabajo se demostró que los elevados niveles del ARNm del receptor c-Met está correlacionado a mayor invasión tumoral en la profundidad de la pared gástrica, incremento en la metástasis a los ganglios linfáticos, alta frecuencia en tumores pocos diferenciados o indiferenciados, aumento en el estadiaje del cáncer gástrico, y en la sobreexpresión por IHQ de su receptor a nivel proteico en los pacientes con carcinomas gástricos.

Por todo lo discutido anteriormente, la amplificación del ARNm y/o la sobreexpresión a nivel proteico del receptor c-Met, pudieran ser utilizados como factores pronósticos y como potencial blanco terapéutico tanto a nivel genético como a nivel de la proteína del receptor c-Met en el cáncer gástrico.

AGRADECIMIENTOS

El nitrógeno líquido utilizado para congelar los especímenes fue obtenido por

la colaboración de la planta productora de dicho elemento ubicado dentro del Decanato de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centrooccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA) y luego fueron almacenados en un refrigerador de -80°C localizado en el Laboratorio de Microbiología del Decanato de Ciencias de la Salud de la UCLA que gentilmente nos facilitaron hasta la extracción del ARN total. Se decidió realizar las tomas de las muestras del tejido gástrico en la Clínica Razetti debido al apoyo recibido por parte de la Unidad FECUNDAR para el depósito transitorio de las muestras dentro los envases especializados que contiene nitrógeno líquido hasta su traslado al refrigerador de -80°C .

A la profesora María Eugenia Camargo, adscrita al Departamento de Ciencias Funcionales, Sección de Bioquímica, Laboratorio de Genética Molecular "Dr. Yunis Turbay" de la UCLA, por su importante colaboración en la extracción del ARN total, y en el análisis de la intensidad de las bandas del ARNm.

Al Dr. Douglas García, adscrito al Departamento de Medicina Preventiva y Social, Sección de Epidemiología y Bioestadística de la UCLA, por sus valiosos consejos en la revisión del manuscrito.

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (C.D.C.H.T.) de la UCLA.

REFERENCIAS

1. Amemiya H, Menolascino F, Peña A. Factores anatomopatológicos y sobrevida de pacientes intervenidos de gastrectomías por cáncer gástrico. *Boletín Médico de Postgrado* 2008; 24: 11-19.
2. *Anuarios de Epidemiología y Estadística Vital*, MSAS. 1996.
3. Stemmermann G, Heffelfinger SC, Noffsinger A, Hui YZ, Miller MA, Fenoglio-Preiser CM. The molecular biology of esophageal and gastric cancer and

- their precursors: Oncogenes, tumor suppressor genes, and growth factors. *Hum Pathol* 1994; 25: 968-981.
4. **Matsumoto K, Nakamura T.** Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239: 639-644.
 5. **Halaban R, Rubin JS, Funasaka Y, Cobb M, Boulton T, Faletto D, Rosen E, Chan A, Yoko K, White W, Cook C, Moellmann G.** Met and hepatocyte growth factor/scatter factor signal transduction in normal melanocytes and melanoma cells. *Oncogene* 1992; 7: 2195-2206.
 6. **Giordano S, Ponzetto C, Di Renzo MF, Cooper CS, Comoglio PM.** Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-Met protein. *Nature* 1989; 339: 155-156.
 7. **Gonzatti-Haces M, Seth A, Park M, Copeland T, Oroszlan S, Vande Woude GF.** Characterization of the TPR-MET oncogene p65 and the MET protooncogene p140 protein-tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 21-25.
 8. **Nakamura T, Nawa K, Ichihara A.** Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 122: 1450-1459.
 9. **Nakamura T, Teramoto H, Ichihara A.** Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 86: 6489-6493.
 10. **Gohda E, Tsubouchi H, Nakayama H, Hirono S, Sakiyama O, Takahashi K, Miyazaki H, Hashimoto S, Daikuhara Y.** Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. *J Clin Invest* 1988; 81: 414-419.
 11. **Zarnegar R, Michalopoulos G.** Purification and biological characterization of human hepatopoietin A, a polypeptide growth factor for hepatocytes. *Cancer Res* 1989; 49: 3314-3320.
 12. **Michalopoulos G.** Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB J* 1990; 4: 176-187.
 13. **Kan M, Zhang GH, Zarnegar R, Michalopoulos G, Myoken Y, McKeehan WL, Stevens JI.** Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A stimulates the growth of rat kidney proximal tubule epithelial cells (RPTE), rat nonparenchymal liver cells, human melanoma cells, mouse keratinocytes and stimulates anchorage-independent growth of SV40-transformed RPTE. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174: 331-337.
 14. **Rubin J, Chan AM, Bottaro DP, Burgess WH, Taylor WG, Cech AC, Hirschfield DW, Wong J, Miki T, Finch PW.** A broad-spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 415-419.
 15. **Kaji M, Yonemura Y, Harada S, Liu X, Terada I, Yamamoto H.** Participation of c-met in the progression of human gastric cancers: anti c-met oligonucleotides inhibit proliferation or invasiveness of gastric cancer cells. *Cancer Gene Ther* 1996; 3: 393-404.
 16. **Di Renzo MF, Oliveros M, Giacomini A, Porte H, Chastre E, Mirossay L, Nordlinger B, Bretti S, Bottardi S, Giordano S, Plebani M, Gespach C, Comoglio PM.** Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1995; 1:147-154.
 17. **Harvey P, Warn A, Newman P, Perry LJ, Ball RY, Warn RM.** Immunoreactivity for hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, met, in human lung carcinomas and malignant mesotheliomas. *J Pathol* 1996; 180:389-394.
 18. **Di Renzo MF, Olivero M, Serini G, Orlandi F, Pilotti S, Belfiore A, Costantino A, Vigneri R, Angeli A, Pierotti MA.** Overexpression of the c-MET/HGF receptor in human thyroid carcinomas derived from the follicular epithelium. *J Endocrinol Invest* 1995; 18: 134-139.
 19. **Natali PG, Prat M, Nicotra MR, Bigotti A, Olivero M, Comoglio PM, Di Renzo MF.** Overexpression of the met/HGF receptor in renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 1996; 69: 212-217.

20. Di Renzo MF, Oliveros M, Crepaldi T, Gaglia P, Zola P, Sismondi P, Comoglio PM. Overexpression of the Met/HGF receptor in ovarian cancer. *Int J Cancer* 1994; 8: 658-662.
21. Jin L, Fuchs A, Schnitt SJ, Yao Y, Joseph A, Lamszus K, Park M, Goldberg ID, Rosen EM. Expression of scatter factor and c-met receptor in benign and malignant breast tissue. *Cancer* 1997; 79: 749-760.
22. Kono K, Amemiya H, Sekikawa T, Iizuka H, Takahashi A, Fujii H, Matsumoto Y. Clinicopathologic features of gastric cancers producing alpha-fetoprotein. *Dig Surg* 2002; 19: 359-365.
23. Amemiya H, Kono K, Mori Y, Takahashi A, Ichihara F, Iizuka H, Sekikawa T, Matsumoto Y. High frequency of c-Met expression in gastric cancers producing alpha-fetoprotein. *Oncology* 2000; 59: 145-151.
24. Amemiya H, Menolascino F, Peña A. Papel de la expresión del receptor c-Met en la progresión del cáncer gástrico. *Invest Clin* 2010; 51: 369-380.
25. Amemiya H, Kono K, Takahashi A, Kamei S, Sugai H, Ichihara F, Fujii H, Matsumoto Y. c-Met expression in gastric cancer cell line producing alpha-fetoprotein. *Surg Today* 2004; 34: 115-122.
26. Amemiya H, Kono K, Itakura J, Tang RF, Takahashi A, An FQ, Kamei S, Iizuka H, Fujii H, Matsumoto Y. c-Met expression in gastric cancer with liver metastasis. *Oncology* 2002; 63: 286-296.
27. American Joint Committee of Cancer (AJCC). *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York: Springer-Verlag; 2010, p 117-126.
28. Japanese Research Society for Gastric Cancer (JRS GC). *Japanese Classification of Gastric Carcinoma*. 1st English ed. Tokyo: Kanehara & CO., LTD.; 1995, p 37-43.
29. Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Ito H, Tahara E. Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 227-232.
30. Wang JY, Hsieh JS, Chen CC, Tzou WS, Cheng TL, Chen FM, Huang TJ, Huang YS, Huang SY, Yang T, Lin SR. Alterations of APS, c-Met, and p53 genes in tumor tissue and serum of patients with gastric cancers. *J Surg Res* 2004; 120: 242-248.
31. Moghul A, Lin L, Beedle A, Kanbour-Shakir A, DeFrances MC, Liu Y, Zarnegar R. Modulation of c-MET proto-oncogene (HGF receptor) mRNA abundance by cytokines and hormones: Evidence for rapid decay of the 8 kb c-MET transcript. *Oncogene* 1994; 9: 2045-2052.
32. Tsugawa K, Yonemura Y, Hirono Y, Fushida S, Kaji M, Miwa K, Miyazaki I, Yamamoto H. Amplification of the c-met, c-erbB2 and epidermal growth factor receptor gene in human gastric cancers: Correlation to clinical features. *Oncology* 1998; 55: 475-481.
33. Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, Watanabe A, Tatsumi M, Yamashita J, Matsuda M, Sakaguchi T, Hirao T, Nakano H. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer* 1999; 85: 1894-1902.
34. Lee J, Seo JW, Jun HJ, Ki CS, Park SH, Park YS, Lim HY, Choi MG, Bae JM, Sohn TS, Noh JH, Kim S, Jang HL, Kim JY, Kim KM, Kang WK, Park JO. Impact of Met amplification on gastric cancer: Possible roles as a novel prognostic marker and a potential therapeutic target. *Oncol Rep* 2011; 25: 1517-1524.
35. Prat M, Narsimhan RP, Crepaldi T, Nicotra R, Natali PG, Comoglio PM. The receptor encoded by the human c-Met oncogene is expressed in hepatocytes, epithelial cells and solid tumors. *Int J Cancer* 1991; 49:323-328.
36. Tajima H, Matsumoto K, Nakamura T. Regulation of cell growth and motility by hepatocyte growth factor and receptor expression in various cell species. *Exp Cell Res* 1992; 202: 423-431.
37. Taniguchi T, Kitamura M, Arai K, Iwasaki Y, Yamamoto Y, Igari A, Toil M. Increase

- in the circulating level of hepatocyte growth factor in gastric cancer patients. *Br J Cancer* 1997; 75: 673-677.
38. **Uen YH, Lin SR, Wu CH, Hsieh JS, Lu CY, Yu FJ, Huang TJ, Wang JY.** Clinical significance of MUC1 and c-Met RT-PCR detection of circulating tumor cells in patients with gastric carcinoma. *Clin Chim Acta* 2006; 367: 55-61.
39. **Fujita S, Sugano K.** Expression of c-met proto-oncogene in primary colorectal cancer and liver metastases. *Jpn J Clin Oncol* 1997; 27: 378-383.