

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

FACTORES PRONÓSTICOS DEL CARCINOMA GÁSTRICO.

VALOR DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

FERNANDO ESTEBAN COLLAZO

MADRID, MARZO 1996

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

Los abajo firmantes, certifican que D. Fernando Esteban Collazo ha realizado el Trabajo de Tesis Doctoral con el título "Factores pronóstico del - carcinoma gástrico. Valor de la citometría de flujo", elaborada bajo nuestra - dirección en el Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Univer- sidad Complutense de Madrid, reuniendo criterios suficientes para poder ser pre- sentada y juzgada por el tribunal correspondiente.



Fdo.: Prof. S. Tamames

D.N.I.: 141.578

V.º B.º
EL TUTOR (2)



Fdo.: Prof. D.S. De Vega

D.N.I.: 7.778.905



Fdo.: Dra. García Delgado

D.N.I.: 2.840.021

El Director de la Tesis

Fdo.: _____

(fecha y firma)

D.N.I.:

Fdo.: _____

(fecha y firma)

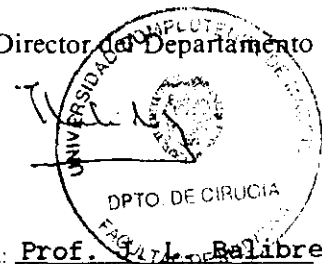
D.N.I.:

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

La Tesis Doctoral "FACTORES PRONOSTICO DEL CARCINOMA GASTRICO. VALOR DE LA CITOMETRIA DE FLUJO", realizada por D. Fernando Esteban Collazo, ha sido - considerada por el Consejo del Departamento apta para ser presentada ante el Tribunal Calificador.

Fecha reunión
Consejo Departamento
14 de febrero de 1996

El Director del Departamento



Fdo.: Prof. J. Balibrea
(fecha y firma) 8-3-96

A la memoria de Demetrio

A Matilde

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor S. Tamames, Catedrático de Cirugía, por su labor en la dirección de esta tesis.

Al Profesor D. Sanchez de Vega, Profesor Titular de Cirugía, por su gran dedicación y ayuda en la co-dirección y realización de este trabajo, así como por su apoyo personal.

A la Dra. R. García Delgado, del Departamento de Inmunología de la Fundación Jimenez Díaz, co-directora de esta Tesis, por su amabilidad y paciencia en la enseñanza de la Citometría de Flujo.

Al Dr. R. Rodriguez Merlo, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen de La Salud, Toledo, por su gran colaboración humana y técnica.

A la Dra. C. Lopez Elzaurdia, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General de Segovia, por su colaboración en la selección de las muestras.

A F. Rodriguez Salvanés, del Servicio de Investigación del Hospital de la Princesa, Madrid, por la realización y explicación del estudio estadístico.

A los Médicos residentes del Servicio de Cirugía del Hospital General de Segovia, por su colaboración en el seguimiento de los pacientes.

A todo el personal del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen de la Salud, y del laboratorio de Inmunología de la Fundación Jimenez Díaz.

A E. Muñiz Hernando, Doctora en Biología, por su ayuda y ánimo en la iniciación de esta Tesis.

INDICE

I.- INTRODUCCION.....	1
A.- Factores pronósticos en el Carcinoma Gástrico.....	4
1.- Factores Etiopatogénicos.....	4
1.1.- Factores Dietéticos.....	4
1.2.- Factores Genéticos.....	5
1.3.- Factores Bacterianos.....	7
1.4.- Lesiones Precancerosas.....	7
2.- Factores Anatomopatológicos.....	12
2.1.- Factores Macroscópicos.....	12
2.2.- Factores Microscópicos.....	13
2.3.- Extensión.....	16
2.4.- Estadiaje.....	18
2.5.- Cáncer Gástrico Precoz.....	20
3.- Factores Clínicos y Diagnósticos.....	21
4.- Marcadores tumorales.....	24
5.- Factores Terapéuticos.....	26
5.1- Quirúrgicos.....	26
5.2.- Coadyuvantes.....	31
B.- Citometría de Flujo.....	33
1.- Concepto.....	33
2.- Principios, Soporte instrumental.....	34
3.- Preparación de suspensiones nucleares.....	38
4.- Tinción del ADN.....	38
5.- Aplicación en tumores sólidos.....	39
6.- Importancia pronóstica.....	41
II.- JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.....	43
III.- MATERIAL Y METODOS.....	45
1.- Material Clínico.....	46

2.- Citometría de Flujo.....	49
3.- Datos Analizados.....	53
4.- Estudio Estadístico.....	55
IV.- RESULTADOS.....	57
1.- Clínicos y Terapéuticos.....	58
2.- Anatomopatológicos.....	62
3.- Supervivencia y Pronóstico.....	65
4.- Citometría de Flujo.....	77
4.1.- Ploidía, Fase Proliferativa.....	77
4.2.- Correlación de la Ploidía con los datos Clínicos y Patológicos...78	
4.3.- Correlación de la fase "S" con los datos Clínicos y Patológicos..82	
4.4.-Supervivencia y Pronóstico.....	85
5.- Análisis multivariado.....	87
V.- DISCUSION.....	88
1.- Discusión general de la serie.....	89
2.- Discusión de la Citometría de Flujo.....	96
VI.- CONCLUSIONES.....	109
BIBLIOGRAFIA.....	111
ANEXO.....	143

INTRODUCCION

El Cáncer Gástrico (CG) continua siendo uno de los tumores digestivos más frecuentes, a pesar de la inexplicada disminución de incidencia ocurrida en las últimas décadas. En Estados Unidos ha pasado de ser la primera causa de muerte por cáncer a ocupar la sexta posición⁽¹⁾, aunque en 1992 se diagnosticaron más de 24.000 nuevos casos y 13.000 personas murieron a causa de un carcinoma gástrico.

Su distribución geográfica es muy variable. Japón, Costa Rica, Chile, Hungría y Polonia se sitúan en la franja más alta de incidencia, con cifras superiores a los 30/100.000 habitantes. Los países de mas bajo riesgo, como EE.UU, Cuba, Australia, Canadá y Nueva Zelanda, tienen tasas inferiores a 15/100.000 para hombres y del 7/100.000 para mujeres⁽²⁾. Existe una franja de frecuencia intermedia, en la que estaría situada España, con unas cifras próximas a 20/100.000 habitantes⁽³⁾. Dentro de un mismo país se demuestra un aumento de la mortalidad en las grandes ciudades y en areas deprimidas económicamente⁽⁴⁾.

El CG es una enfermedad que afecta con mayor frecuencia al sexo masculino y, preferentemente, a partir de los 50 años de edad, con un pico máximo a los 70-80 años. Las formas más agresivas tienden a afectar a personas más jóvenes⁽⁵⁾.

La disminución de la incidencia a escala mundial ha llevado aparejada una menor mortalidad global. Pese a ello, la supervivencia a los cinco años sigue siendo baja, con cifras que se sitúan, en los países occidentales, entre el 5 y el 20%. Estos resultados se relacionan fundamentalmente con el avanzado estadio en que es diagnosticado el CG⁽⁶⁾. Sin embargo, en Japón, después de las campañas de detección en masa y los métodos de tratamiento realizados, las cifras de supervivencia han alcanzado valores nunca conseguidos en occidente⁽⁷⁾. Estas diferencias han justificado un nuevo análisis del Carcinoma Gástrico y de los criterios de elección terapéutica con el objetivo de mejorar significativamente los índices de supervivencia.

Uno de los aspectos más interesantes, es la investigación de los factores que influyen en el pronóstico del CG. Ello permitiría la identificación de los pacientes que se beneficiarían de determinados gestos quirúrgicos y coadyuvantes, así como de aquellos que muestran mayor riesgo de recidiva tumoral. Esta situación justificaría los esfuerzos por realizar un diagnóstico precoz y la investigación de factores de riesgo para detectar aquellos casos en los que podrían aplicarse determinados tratamientos quirúrgicos y coadyuvantes; así como para identificar tempranamente la aparición de recidivas o de metástasis a distancia, consiguiendo que fuesen susceptibles de tratamiento quirúrgico.

A.- FACTORES PRONOSTICOS

Se han descrito un gran número de factores que influyen en los resultados precoces y tardíos del CG. De una forma esquemática podrían dividirse en *Factores Etiopatogénicos, Factores Clínicos, Factores Anatomopatológicos y Factores Terapéuticos*. Se han realizado diversos estudios con el fin de determinar la importancia individual de cada uno de ellos. Sin embargo, los resultados son muy heterogéneos y frecuentemente contradictorios.

1.- Factores Etiopatogénicos.

Diversos factores pueden participar en la aparición de un Carcinoma Gástrico. Los más importantes son de tipo **Dietético, Genético y Bacteriano**. Sus mecanismos de actuación no siempre son conocidos. Además, existen diversas lesiones de la mucosa gástrica que pueden considerarse como procesos precancerosos.

1.1.- Factores Dietéticos

La influencia de la migración en la incidencia del CG ha sugerido el peso etiológico de los *factores ambientales*. Dentro de ellos, la investigación se ha centrado fundamentalmente en los *factores dietéticos*. De acuerdo con Correa^(8,9), las poblaciones de alto riesgo mantendrían el siguiente patrón:

a.- Baja ingesta de proteínas o grasas de origen animal con alta proporción de las de origen vegetal.

b.- Alta ingesta de carbohidratos ricos en residuos no digeribles.

c.- Alto consumo de sal, nitritos y nitratos.

d.- Bajo consumo de frutas y verduras.

Las formas de preparación de los alimentos también parecen relacionarse con la aparición de CG. Así, en Islandia se ha detectado gran cantidad de 3,4 benzopireno en los alimentos ahumados y, en otros países, de nitrosaminas en adobados, salazones y embutidos⁽¹⁰⁾.

Aunque no se puede demostrar una clara relación causa efecto, se sugiere una cierta influencia del alcohol y del tabaco⁽¹¹⁾, así como de la actividad laboral en trabajadores de minería, textil y caucho⁽¹²⁾.

1.2.- Factores Genéticos

Los *factores genéticos* se consideraron como menos importantes que los ambientales, aunque el descubrimiento de los Oncogenes ha modificado esta opinión.

No se ha encontrado asociación del CG con los antígenos HLA⁽¹³⁾. Se ha estudiado la relación con los grupos sanguíneos ABO, encontrando una mayor incidencia en pacientes con grupo sanguíneo A. No obstante, posteriormente se ha relacionado en Japón con personas del grupo sanguíneo B⁽¹⁴⁾. Se ha documentado una influencia Mendeliana recesiva en los niveles gástricos de nitritos⁽¹⁵⁾. Se ha sugerido una probable base genética de la mayor incidencia de neoplasias gástricas en pacientes afectos de anemia perniciosa⁽¹⁶⁾.

Estudios realizados en gemelos mono y dicigóticos no han demostrado una mayor incidencia de CG⁽¹⁷⁾. Se han descrito varias familias con grupos de parientes en los que la incidencia es doble o triple que la normal⁽¹⁸⁾.

Entre las alteraciones cromosómicas estudiadas en el CG se encuentran la inestabilidad de los cromosomas 7, 8, 9 y 17, investigados en linfocitos de

sangre periférica. Los tumores de tipo aneuploide presentarían una mayor alteración citogenética⁽¹⁹⁾. De la misma manera, se ha documentado la pérdida de heterocigotidad en los cromosomas 1q, 5q, 17p y 18q en los carcinomas de tipos intestinal y difuso⁽²⁰⁾.

Se ha observado que los pacientes con Síndrome de Poliposis Adenomatosa del Colon, actualmente atribuido a mutaciones en el cromosoma 5q, pueden desarrollar adenomas gástricos que pueden progresar a carcinoma⁽²¹⁾. El papel de estos cambios cromosómicos en el desarrollo del carcinoma gástrico está aún por determinar.

En los últimos años se discute el papel de los **Oncogenes** en la iniciación de algunos tumores malignos, así como la inactivación o pérdida de genes supresores. En el CG se han estudiado la familia del oncogene *ras*⁽²²⁾, que jugaría un papel básico en la regulación del crecimiento celular siendo activado por mutaciones puntuales o amplificación génica.

Se han detectado anomalías del gen supresor p53 en el tejido tumoral gástrico y lesiones metastásicas, y se ha sugerido una estrecha relación con la supervivencia⁽²³⁾. Los tumores gástricos avanzados tendrían una mayor proporción de anomalías en el gen p53 que los cánceres precoces⁽²⁴⁾.

Ninomiyama ha estudiado el proto-oncogene *c-myc* en una serie de 213 casos de carcinoma gástrico, apareciendo amplificado en el 24% de los casos y relacionándose inversamente con la supervivencia y con la recidiva⁽²⁵⁾. Se han estudiado también el oncogene *C-erb-2*⁽²⁶⁾ homólogo al receptor del Factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el *Her2/neu*⁽²⁷⁾. Yonemura y cols. en un estudio sobre 260 casos de carcinoma gástrico, identifican la oncoproteína *c-erb-2* asociada a la predicción de un importante incremento en las metástasis ganglionares⁽²⁸⁾.

1.3.- Factores Bacterianos

El *Helicobacter pylori* es una bacteria gram-negativa, microaerófila descrita en 1983⁽²⁹⁾. Existe abundante literatura que implica al *H. pylori* en la carcinogénesis temprana^(30,31,32).

En estudios recientes⁽³³⁾ se considera que la colonización de la mucosa gástrica por *Helicobacter pylori* en presencia de inflamación crónica, fundamentalmente gastritis crónica atrófica, predispone a un cambio maligno. El *Helicobacter pylori* estaría presente en los tipos intestinal y difuso de carcinoma gástrico (formas endémica y epidémica)⁽³⁴⁾. Los datos no son sin embargo concluyentes. Así, en China se ha observado una elevada incidencia de carcinoma gástrico con una alta prevalencia de infección por *H. pylori*⁽³⁵⁾. Sin embargo, en Africa donde la infección por *H. Pylori* es muy frecuente, la incidencia de carcinoma gástrico es muy baja⁽³⁶⁾. Por otra parte, existe una asociación muy frecuente de *H. pylori* con la gastritis antral difusa y con la úlcera duodenal, que no confiere en absoluto riesgo de carcinoma gástrico⁽³⁷⁾.

1.4.- Situaciones y lesiones precancerosas.

Diversas lesiones gástricas, de frecuencia variable, se consideran como lesiones precancerosas y, por tanto, susceptibles de transformación en CG.

Han sido descritos casos de CG en pacientes con gastropatía hipertrófica o *enfermedad de Menetrier*. A causa de su rareza, es difícil estimar la frecuencia con que se encuentra CG, citándose cifras de hasta un 10%^(38,39).

Clásicamente, los *Pólipos Gástricos* se han relacionado con el CG⁽⁴⁰⁾. Sin embargo existen diferencias en función del tipo de pólipo. Así, los pólipos hiperplásicos se descubren en el 1.5 al 5% de las exploraciones endoscópicas y representan del 65 al 90% de todos los pólipos⁽⁴¹⁾. Con elevada frecuencia son pólipos múltiples, con un tamaño menor de 1.5 cm., asientan en la región antral o cuerpo gástrico y se consideran sin potencial maligno⁽⁴²⁾. Por el contrario, los

pólipos adenomatosos son lesiones neoplásicas que constituyen el 25% de los pólipos gástricos, suelen ser únicos y menores de 2cm.⁽⁴³⁾ Tienen un importante potencial de malignidad, relacionado con el tamaño y aspecto del pólipo. Yamagata⁽⁴⁴⁾ encuentra carcinoma en el 1% de los pólipos adenomatosos y Laxen⁽⁴⁵⁾ en un 3.4%, elevándose la incidencia hasta un 10% en adenomas mayores de 2cm. y en los de tipo veloso (planos)⁽⁴⁶⁾.

La *resección gástrica* por patología benigna previa se ha relacionado con la aparición de un riesgo aumentado de cáncer a largo plazo⁽⁴⁷⁾. La localización preferente es en la boca anastomótica y se acompaña muy a menudo de gastritis atrófica, metaplasia intestinal, y lesiones polipoideas hiperplásicas. Se invocan como mecanismos la hipoclorhidria producida por la disminución de células parietales y el reflujo biliar junto con el aumento de bacterias productoras de nitritos⁽⁴⁸⁾.

En algunos estudios realizados en EEUU⁽⁴⁹⁾ e Inglaterra⁽⁵⁰⁾, no se ha encontrado un aumento de cáncer en pacientes sometidos previamente a resección gástrica. A pesar de ello, y en vista de la gran cantidad de estudios realizados y casos comunicados señalando la asociación resección gástrica-CG, parece lógico que todo paciente con gastrectomía previa y con síntomas debe ser sometido a revisión endoscópica⁽⁵¹⁾.

La posibilidad de aparición de CG sobre *úlcera gástrica* previa continúa siendo debatida. Actualmente parece aceptarse la existencia de un "ulcerocáncer" presente como tal desde la aparición de la lesión⁽⁵²⁾. Su frecuencia en úlceras gástricas seguidas clínicamente varía de 1 a 8% según las series⁽⁵³⁾. El mayor riesgo de cáncer en esta situación, parece relacionado con la frecuente asociación de la enfermedad ulcerosa gástrica con lesiones de gastritis crónica y metaplasia intestinal⁽⁵⁴⁾. La curación de una úlcera gástrica con tratamiento médico y el diagnóstico posterior de CG, no ha de presuponer la benignidad previa y posterior degeneración, pues las úlceras malignas pueden curarse ocasionalmente con tratamiento médico intensivo⁽⁵⁵⁾.

La *metaplasia intestinal* y la *gastritis crónica* aparecen como el denominador común de todas las lesiones precancerosas. En el estudio histológico de las piezas de resección de CG se observa frecuentemente la presencia de metaplasia intestinal e inflamación crónica en la mucosa adyacente, cambios que podrían considerarse adaptativos a la agresión inflamatoria crónica y sensibles a la acción de carcinógenos⁽⁵⁶⁾.

Algunas series reflejan la mayor incidencia de CG en una población afecta de gastritis crónica en relación a una población testigo⁽⁵⁷⁾ y la correlación entre la incidencia de CG y la frecuencia de gastritis crónica⁽⁵⁸⁾.

La gastritis crónica se define como un proceso inflamatorio localizado en la mucosa. La introducción de la endoscopia ha permitido su conocimiento profundo y su clasificación: Así,

- Whitehead (1972)⁽⁵⁹⁾ la clasifica en superficial y atrófica.

- Strickland y Mackay⁽⁶⁰⁾ (1973) en atrófica tipo A (atrofia de la mucosa corporal y anemia perniciosa), y tipo B (atrofia antral con hipersecreción).

- Correa⁽⁶¹⁾ (1988) en difusa antral, difusa corporal y atrófica multifocal.

La Gastritis Crónica atrófica multifocal se considera el precursor más común de CG, y se distribuye en el antro y cuerpo gástrico con áreas de atrofia, metaplasia y displasia⁽⁶¹⁾.

La Gastritis Crónica Autoinmune asociada a Anemia Perniciosa constituye un caso especial con un riesgo hasta 50 veces mayor de padecer CG. Afecta de forma difusa a cuerpo y fundus dejando el antro libre en función de su mecanismo de producción por anticuerpos anti célula parietal. Se heredaría por un carácter dominante simple⁽⁶²⁾.

La *metaplasia intestinal* ocurre asociada a gastritis crónica y consiste en el reemplazo de la mucosa gástrica normal por un epitelio similar al intestinal con

células mucosecretoras alternando con células cilíndricas con función de absorción. Aunque suele ir asociada a gastritis crónica, se ha identificado en el estómago de personas sanas o en aquellos con gastritis superficial. Estudios de carcinogénesis experimental sobre modelos animales, han observado la aparición de gastritis crónica y metaplasia intestinal previamente al desarrollo de CG⁽⁶³⁾. Por otra parte, se ha identificado metaplasia intestinal: en pacientes añosos sanos sin gastritis, en sujetos fallecidos con tumores extragástricos y en casos de úlcera péptica ⁽⁶⁴⁾.

Dadas la elevada prevalencia de la metaplasia intestinal y la estrecha relación de la gastritis crónica y la metaplasia intestinal con el CG, se ha propuesto que no toda metaplasia es precancerosa y se han establecido clasificaciones en función de datos morfológicos e histoquímicos.

Ming en 1967 ⁽⁶⁵⁾ divide la metaplasia intestinal en dos tipos:

- * Completa o Tipo I: semeja a la mucosa del intestino delgado, con células columnares que segregan fundamentalmente sialomucinas.

- * Incompleta o Tipo II: similar a la mucosa del intestino colónico, que segrega solo sulfomucinas. Jass y Filipe⁽⁶⁶⁾ dividen a su vez el Tipo II en los subgrupos "a" y "b" en función de que la secreción sea de mucinas neutras o sulfomucinas respectivamente. Según estos autores, el tipo "b" sería el más frecuentemente asociado al CG.

La *Displasia Epitelial* se considera una verdadera lesión precancerosa, en la que coexiste una atipia celular, una anormal diferenciación y una desorganización glandular de la mucosa⁽⁶⁷⁾. Se asocia con el tipo intestinal de carcinoma. Existe una gran controversia sobre la nomenclatura y los criterios de diagnóstico y clasificación de la displasia. La tabla I muestra las clasificaciones más utilizadas.

No obstante, se han observado cambios regenerativos hiperplásicos en los bordes ulcerosos y en la gastritis crónica, que es necesario diferenciar de la verdadera displasia. Además, puede haber dificultades para separar la displasia severa de la neoplasia, habiéndose observado que la displasia severa puede coexistir con el adenocarcinoma⁽⁷⁴⁾. Parece existir una clara relación entre la importancia de la displasia y el riesgo de carcinoma. Así, Rugge encuentra progresión a carcinoma de la displasia leve, moderada y severa en el 19%, 40% y 75% de los casos respectivamente⁽⁷⁵⁾.

TABLA I.I

Autores	Grados de Displasia			
NAGAYO⁽⁶⁸⁾	No atipias	Atipia leve	Bordeline	Probable cáncer
GRUNDMANN⁽⁶⁹⁾Y LANDSDOWN⁽⁷⁰⁾	Cambios inflamatorios	leve	moderada	severa
OEHLERT⁽⁷¹⁾		Grado I	Grado II	Grado III
CUELLO⁽⁷²⁾	Hiperplasia- displasia leve	Hiperplasia- displasia severa	Cambio adenomatoso- displasia leve	Cambio adenomatoso- displasia severa
MORSON⁽⁶⁷⁾	Cambio inflamatorio- regenerativo	displasia leve	displasia moderada	displasia severa
MING⁽⁷³⁾	hiperplasia simple	hiperplasia atípica	displasia	posible carcinoma

2.- Factores Anatomopatológicos

Varios factores Macroscópicos y Microscópicos tienen una significación importante al evaluar la Anatomía Patológica.

2.1.- Datos Macroscópicos.

El CG no surge en todas las *localizaciones* del estómago con la misma frecuencia, asentando fundamentalmente en el antro y cuerpo gástrico. También es más frecuente su localización en la curvatura menor que en la curvatura mayor⁽⁷⁶⁾. En las últimas décadas se ha observado un aumento en la frecuencia de los CG situados en la unión esófago-gástrica⁽⁷⁷⁾. Se admite que los tumores de localización antral tendrían mejor pronóstico que los proximales⁽⁷⁸⁾.

Macroscópicamente se desarrollan en tres *formas*: Ulcerada, Vegetante e Infiltrante⁽⁷⁹⁾. Con cierta frecuencia se observan tipos mixtos, fundamentalmente en los casos avanzados. Se han propuesto diversas clasificaciones macroscópicas (Tabla I.II). Los tumores ulcerados son, a menudo, infiltrantes y su localización más frecuente es en el antro y en la curvatura menor, lugares donde asienta el CG con más frecuencia (60%). Los tumores vegetantes o polipoides se localizan preferentemente en el cardias, en la curvatura mayor y en la cara posterior del cuerpo gástrico. Representan el 20% de los adenocarcinomas aunque se observa una tendencia al aumento de frecuencia⁽⁸²⁾. Serían los tumores de mejor pronóstico, ya que tienen crecimiento lento y desarrollo tardío de metástasis⁽⁸³⁾.

El tipo Infiltrante aparece como lesión aplanada con engrosamiento de pliegues. En estadios avanzados afecta a toda la pared denominándose "Linitis Plástica". Se trata de tumores de mal pronóstico por la dificultad de diagnóstico en etapas iniciales y las limitaciones del tratamiento quirúrgico.

TABLA I.II

Autores	Tipos macroscópicos				
Borrmann (1925)⁽⁷⁹⁾	Tipo I ó Polipoide circunscrito	Tipo II o Ulcerado bien delimitado	Tipo III ó Ulcerado con extensión superficial		Tipo IV ó difuso
Stout⁽⁸⁰⁾ (1943)	Polipoide	Ulcerado (ulcus cáncer)	Extensión superficial		Difuso (Linitis plástica)
Ming⁽⁸¹⁾ (1973)	Polipoide	Ulcerado infiltrante (ulcus Cáncer)	Fungoso	Extensión superficial	Infiltrante difuso (linitis Plástica)

El *tamaño* de los tumores es muy variable. En las series occidentales, el mayor porcentaje de casos se sitúa entre los 3 y los 8 cm.⁽⁸³⁾ En los casos de CG precoz el tamaño es menor y suele oscilar alrededor de los 2 cm.⁽⁸⁴⁾ Parece que el tamaño tumoral tiene influencia en el pronóstico, lo que guardaría relación con la profundidad de invasión⁽⁸⁵⁾.

2.2.- Datos Microscópicos

Múltiples aspectos microscópicos tienen importancia en la evolución del CG. Los más frecuentemente empleados son el *Grado de diferenciación*, el *Tipo Histológico* y la magnitud de la *Extensión*.

Dependiendo del grado de formación de glándulas y la capacidad de producir moco se pueden diferenciar tres grupos:

* Adenocarcinoma Bien diferenciado: constituido por glándulas atípicas que recuerdan a las normales.

* Moderadamente diferenciado: las glándulas presentan mayor distorsión con luces muy pequeñas.

* Pobremente diferenciado: las glándulas se reconocen con dificultad.

Las formas menos diferenciadas son las más frecuentes y parecen asociarse con un peor pronóstico^(86,87). No obstante, los criterios de valoración del grado de diferenciación tumoral son de tipo subjetivo y, por tanto, pueden existir diferencias en su valoración en función de la experiencia del patólogo. Las clasificaciones histológicas más utilizadas son las de W.H.O.(World Health Organisation), J.S.G.C.(Japanesse Society of Gastric Cáncer), Ming y Lauren (Tabla I.III).

TABLA I.III

Autores	Clasificación Histológica				
Lauren (1965)⁽⁸⁸⁾	Intestinal		Difuso		
W.H.O. (1976)⁽⁸⁹⁾	Papilar	Tubular	Mucinoso	Células en anillo de sello	
Ming⁽⁸¹⁾ (1977)	Expansivo		Infiltrante		
J.S.G.C. (1981)⁽⁹⁰⁾	Papilar	Tubular	Poco diferenciado	Mucinoso	Células en anillo de sello

La *clasificación de Lauren* reviste especial interés por sus implicaciones clínicas y pronósticas (Tabla I.IV). El tipo intestinal estaría formado por células que se adhieren unas a otras y forman glándulas recordando a la mucosa intestinal. Se asocia con un mejor pronóstico, afectando preferentemente a pacientes de edad avanzada con predominio del sexo masculino y a tumores localizados en estómago distal⁽⁹¹⁾.

En el carcinoma de tipo difuso las células carecen de uniones intercelulares, no forman glándulas y tienden a infiltrar la pared. A veces las células adquieren configuración en "anillo de sello" por acúmulo de moco citoplasmático. Estaría asociado con mayor agresividad y es más común en el sexo femenino y en pacientes de menor edad⁽⁹²⁾. Desde el punto de vista epidemiológico se cree que la disminución global de mortalidad por CG es debida al aumento de la frecuencia de carcinoma de tipo intestinal y a la estabilización de los de tipo difuso⁽⁹³⁾.

TABLA I.IV

	TIPO INTESTINAL	TIPO DIFUSO
HISTOGENESIS	METAPLASIA INTESTINAL	EPITELIO GÁSTRICO
EDAD	> 60 AÑOS	< 50 AÑOS
SEXO V/M	2/1	1/1
EPIDEMICO	SI	NO
GRUPO SANG. "A"	20%	50%
DISEMINACION	PERITONEAL INFRECUENTE	PERITONEAL FRECUENTE
SUPERVIVENCIA	MEJOR	PEOR

2.3.- Modos de Extensión del Carcinoma Gástrico

La progresión del CG se hace por *extensión directa*, por *contigüidad*, por *vía linfática*, por *vía hematológica* y por *vía peritoneal*.

. **Extensión directa:** Se produce crecimiento tumoral en la propia pared gástrica en profundidad y también en dirección lateral. Los tumores de tipo difuso pueden extenderse por la submucosa y muscular propia a varios centímetros del tumor principal, mientras que los tumores de tipo intestinal progresarían escasamente en dirección lateral⁽⁸⁸⁾. Por otra parte, puede producirse extensión hacia esófago y duodeno.

La profundidad de invasión del tumor es uno de los factores pronósticos de más peso, teniendo un valor predictivo importante, incluso independiente de la presencia de metástasis ganglionares. La supervivencia disminuye a medida que el tumor va invadiendo en profundidad mucosa, muscular y serosa^(83,85,86,87). Incluso se señala que la invasión serosa localizada, superficie serosa afectada menor de 4cm², tiene mejor pronóstico que la afectación más extensa⁽⁹⁴⁾.

. **Contigüidad:** La extensión transparietal puede afectar a los distintos órganos vecinos, dependiendo de la localización del tumor. Así no es rara la afectación de páncreas, colon, hígado, vesícula biliar, epíplon mayor y menor.

. **Vía Linfática:** La invasión linfática es precoz y se produce en el territorio ganglionar del tumor en función de la localización, progresando posteriormente a las grandes cadenas abdominales. Es posible, sin embargo, la afectación de territorios más lejanos sin que lo hagan los cercanos al tumor. Así, pueden afectarse los ganglios supraclaviculares o los axilares izquierdos.

Si bien el drenaje linfático del estómago comienza a estudiarse en 1907⁽⁹⁶⁾, es en 1962 cuando la J.R.S.G.C.(Japanesse Research Society for Gastric Cancer) estudia las áreas de drenaje con un objetivo clínico-terapéutico y las divide en 4 grupos con 16 estaciones ganglionares, de N1 a N4, sentando las

bases anatómicas para la linfadenectomía quirúrgica⁽⁹⁷⁾.

Según este análisis, N1 son los ganglios perigástricos; N2 los ganglios del tronco celíaco y a lo largo de las arterias hepática, esplénica y coronaria estomacal; N3 los ganglios retropancreáticos, del ligamento hepatoduodenal, diafragmáticos y de la raíz del mesenterio; N4 los ganglios paraaórticos y de la arteria cólica media. La presencia de adenopatías tumorales N3 ó N4 se considera como metástasis a distancia. (Figura I.1)

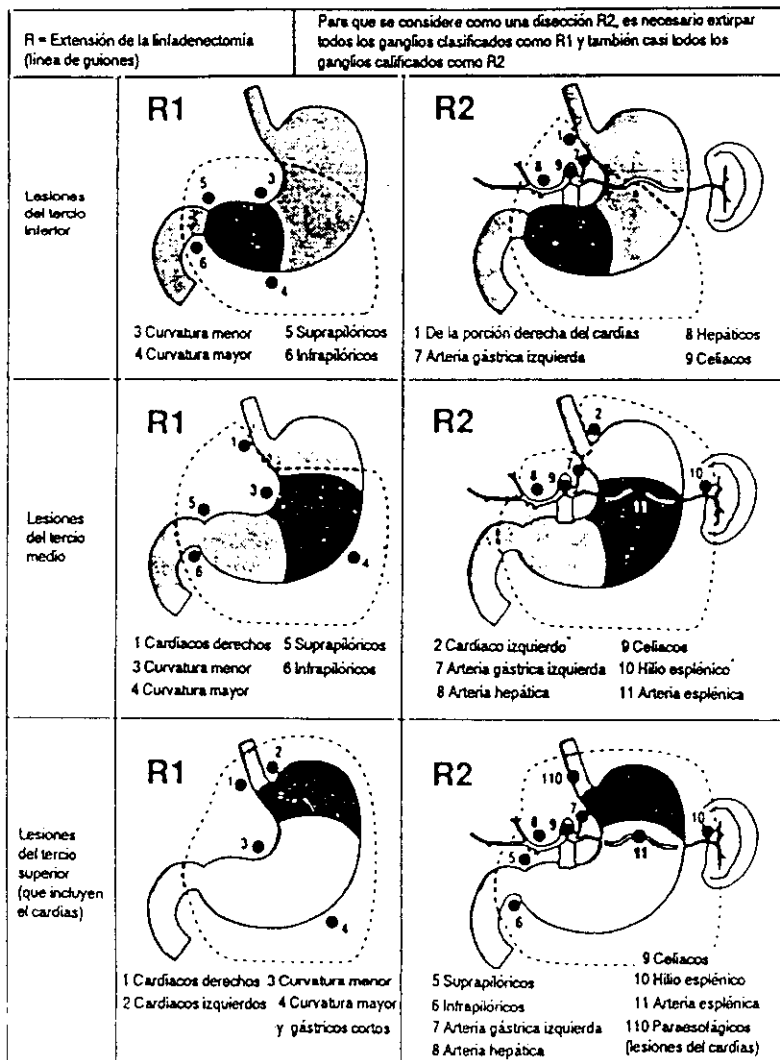


Figura I.1.- Distribución ganglionar y extensión de la linfadenectomía, en función de la localización tumoral. Tomado de Gutiérrez Calvo A., en "Inmunoquimiocirugía en Cáncer Gástrico curable". Madrid, 1994.

La presencia de metástasis linfáticas y su número, así como la proporción entre el número total de ganglios resecaados con respecto a los afectados⁽⁹⁶⁾, y la distancia de las adenopatías con respecto al tumor, es uno de los factores que más influyen en el pronóstico del Cáncer Gástrico.

. **Vía Hematógena:** La invasión sanguínea induce la afectación, en orden decreciente, del hígado, el pulmón, la suprarrenal, el hueso y la piel⁽⁹⁸⁾.

. **Vía peritoneal:** la difusión peritoneal es frecuente por descamación de las células tumorales, siendo clásica la descripción de afectación ovárica en el sexo femenino (tumor de Krukenberg). Tanto la presencia de metástasis a distancia como peritoneales, se consideran un elemento de valor pronóstico fundamental.

2.4.- Estadiaje

El estadio tumoral se considera uno de los elementos de mayor valor pronóstico en el CG. A lo largo de la historia se han descrito diversos sistemas, siendo sin embargo el más utilizado y aceptado el TNM, propuesto por la Unión Internacional Contra el Cáncer (U.I.C.C.)⁽⁹⁹⁾ modificado por la A.J.C.C. (American Joint Committee on Cancer) y por la J.R.S.G.C.⁽⁹⁷⁾. En él los tumores se clasifican en función de tres parámetros: El tumor, la invasión ganglionar y la afectación a distancia.

T - Tumor primario

TX= No puede determinarse la existencia de tumor primario.

T0= No evidencia de tumor primario.

T_{is}= Carcinoma in situ: tumor intraepitelial sin invasión de la lámina propia.

T1= Tumor que invade la lámina propia o la submucosa.

T2= Tumor que invade capa muscular.

T3= Tumor que invade capa serosa.

T4= Tumor que invade estructuras vecinas.

N - Ganglios Linfáticos

NX= No puede determinarse la existencia de adenopatías.

N0= Sin afectación ganglionar.

N1= Afectación de ganglios perigástricos a menos de 3cm. del tumor.

N2= Afectación de ganglios a más de 3cm. del tumor, o de ganglios a lo largo de las arterias gástrica izquierda, hepática común, esplénica o tronco celíaco.

M - Metástasis a Distancia

MX= No puede determinarse la existencia de metástasis a distancia.

M0= Sin metástasis a distancia.

M1= Con metástasis a distancia.

Posteriormente se procede a la agrupación de los datos T, N, M y al establecimiento de cuatro estadios tumorales (Tabla I.V).

TABLA I.V

ESTADIAJE. CLASIFICACION T.N.M.

Estadio 0	T _{is}	N0	M0
Estadio Ia	T1	N0	M0
Estadio Ib	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
Estadio II	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIa	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
Estadio IIIb	T3	N2	M0
	T4	N1	M0
Estadio IV	T4	N2	M0
	T	N	M1

El estadio evolutivo es otra de las variables que mayor influencia tiene en el pronóstico. En el CG avanzado la supervivencia media a los cinco años no sobrepasa el 20-30%, mientras que en el CG precoz las cifras alcanzarían el 90-94%^(85,86,87). Expresado en estadios, los pacientes con tumores en estadio I y II tienen mucho mejor pronóstico que los pacientes con tumores en estadios III y IV.

2.5.- Carcinoma Gástrico precoz

El carcinoma gástrico precoz fue definido en 1962 por la Sociedad Japonesa de Gastroenterología y Endoscopia⁽¹⁰⁰⁾ como aquel adenocarcinoma gástrico localizado en la mucosa o mucosa y submucosa, independientemente de su extensión superficial y de la presencia de metástasis. La importancia clínica de este concepto se basa en que los pacientes con diagnóstico de Cáncer Gástrico Precoz sometidos a un tratamiento quirúrgico adecuado, tienen una tasa de curación a los 5 años del 90%⁽¹⁰¹⁾.

El CG precoz se ha clasificado en tres tipos: polipoide, superficial y excavado. El tipo superficial se subdivide a su vez en elevado, plano y deprimido. Existen formas combinadas⁽¹⁰²⁾. La localización más habitual es en la región antro-pilórica y la presencia de metástasis linfáticas alcanza entre el 8% y el 15% en función de la profundidad de invasión⁽¹⁰³⁾. Tienen una cierta tendencia a ser multicéntricos⁽¹⁰⁴⁾ y a desarrollar un segundo tumor, sobre todo en la mama y en el colon⁽¹⁰⁵⁾.

3.- Factores Clínicos Y Diagnósticos

La *edad* de los pacientes en el momento del diagnóstico presenta un pico máximo de frecuencia entre 50 y 70 años, y no parece influir en la supervivencia a largo plazo⁽¹⁰⁹⁾, aunque algunos autores señalan que los pacientes menores de 40 años tienen peor pronóstico⁽¹¹⁰⁾.

La frecuencia de aparición de CG es aproximadamente doble en el sexo masculino con respecto al sexo femenino. El sexo tampoco parece influir en el pronóstico de forma significativa⁽⁸⁵⁾, si bien se discute su influencia en la supervivencia en función del predominio en la localización tumoral para un sexo u otro.

El CG precoz suele ser totalmente asintomático. Muchos pacientes con CG avanzado presentan sólo sintomatología abdominal vaga, dispepsia o pérdida de apetito. Los síntomas habituales del CG, en orden decreciente serían; dolor epigástrico o pseudoulceroso, vómitos, disfagia, anemia y hemorragia digestiva. En ocasiones puede manifestarse como estenosis pilórica o perforación gástrica⁽¹⁰⁶⁾. En general, no parece haber una relación entre un síntoma en particular y el pronóstico, aunque algunos hallazgos, como por ejemplo la existencia de una masa palpable, hacen pensar en una menor posibilidad de realizar una resección radical.

El *tiempo de evolución* desde la aparición de la sintomatología hasta el momento del diagnóstico es muy variable, y tiene una influencia controvertida en el pronóstico. Se pensó que a mayor tiempo de evolución habría una menor supervivencia⁽¹⁰⁷⁾, pero algunos estudios han mostrado peor supervivencia con tiempos de evolución cortos⁽¹⁰⁸⁾ y otros no encuentran relación alguna⁽¹⁰⁹⁾.

Como método diagnóstico tradicional del CG, se ha utilizado la *Radiología* esófago-gastro-duodenal con contraste. Se han definido con claridad las características de las lesiones tumorales: rigidez y engrosamiento parietal gástrico, defectos de replección, pliegues prominentes e irregulares, grandes

úlceras con márgenes nodulares irregulares y úlceras con bordes elevados⁽¹¹¹⁾. Sin embargo con esta técnica pueden pasar inadvertidos hasta un 14% de tumores avanzados⁽¹¹²⁾. Se ha propuesto la utilización del doble contraste que permite examinar con mayor detalle la mucosa y facilita el diagnóstico de lesiones precoces. No obstante, se han descrito tanto falsos positivos⁽¹¹³⁾, como falsos negativos⁽¹¹⁴⁾. En cualquier caso la radiología esófago-gastro-duodenal con doble contraste es un método diagnóstico inicial más adecuado en el CG, en especial para pequeñas lesiones precoces que alerten sobre la necesidad realizar otras técnicas diagnósticas.

La *Fibroendoscopia* flexible es hoy día la técnica diagnóstica fundamental. Permite la visualización de los tumores gástricos desde su fase más precoz hasta la más avanzada, y la realización de citología y biopsias para la confirmación histológica. No toda la superficie gástrica tiene la misma accesibilidad, siendo más difícil la toma de especímenes en los tumores de fundus-cardias y los situados por debajo de la incisura angularis. En estos casos las tomas de biopsia pueden ser tangenciales y por lo tanto no representativas, debiendo realizarse citología por cepillado para mayor seguridad diagnóstica⁽¹¹⁵⁾.

El número de biopsias tomado aumenta la seguridad en el diagnóstico, de forma que la fiabilidad alcanza el 95% cuando se realizan entre 4 y 8 biopsias⁽¹¹⁶⁾. En los tumores submucosos se ha utilizado la técnica de punción-aspiración con aguja fina, obteniéndose una seguridad diagnóstica del 75%⁽¹¹⁷⁾.

En algunos centros existe una tendencia a sustituir la radiología por la endoscopia como primer método de evaluación de pacientes con síntomas abdominales compatibles con patología gástrica. Sin embargo, se ha comprobado que en el carcinoma de tipo infiltrante la endoscopia aislada puede dejar hasta un 30% de casos sin diagnosticar. Por otra parte se descubre hasta un 2% de casos de adenocarcinoma en pacientes con una radiología normal. Por ello, parece aconsejable la realización de ambas técnicas, ya que combinando la radiología con endoscopia asociada a citología y biopsia se obtiene una

fiabilidad diagnóstica superior al 95%⁽¹¹⁸⁾.

En la evaluación preoperatoria debe incluirse una cuidadosa exploración clínica y test bioquímicos. La radiografía de tórax, ecografía o TAC abdominal permiten realizar un estudio de extensión. La utilización de TAC permite descubrir la presencia de tumor en el estómago así como la afectación de órganos vecinos, presencia de adenopatías tumorales y depósitos metastásicos a distancia (hígado, suprarrenal etc.)⁽¹¹⁹⁾. Sin embargo, su valor en cuanto a la resecabilidad, está sujeto a falsos resultados ya que los ganglios detectados pueden ser hiperplásicos, las lesiones hepáticas pueden ser hemangiomas o nódulos cirróticos y la desaparición de los planos grasos entre los órganos vecinos puede ser debida a la desnutrición y no a la afectación tumoral⁽¹²⁰⁾. Como información más segura de extensión local, se describe la ecografía endoscópica de tiempo real que revela el grado de afectación de la pared gástrica, la invasión de órganos vecinos y la presencia de afectación ganglionar⁽¹²¹⁾.

4.- Marcadores Tumorales

Existen múltiples marcadores tumorales asociados con el cáncer del aparato digestivo, pero hasta el momento no se ha hallado ningún marcador diagnóstico, de estadio o pronóstico de probada eficacia en el cáncer gástrico. Ello podría explicarse por la peculiar dinámica celular de estos tumores especialmente en relación con la heterogeneidad celular. La existencia de varias subpoblaciones clonales en el mismo tumor, supone una serie de condiciones bioquímicas ligadas a ellas que justificarían que el comportamiento biológico pueda ser totalmente diferente de unos clones a otros⁽¹²²⁾.

Entre los marcadores más utilizados y estudiados estaría el Antígeno Carcinoembrionario (CEA), que es un antígeno de superficie asociado al tumor. Se han observado niveles elevados de CEA en el 32% de los casos de carcinoma gástrico, alcanzando hasta el 85% en caso de diseminación metastásica⁽¹²³⁾. Sin embargo, niveles preoperatorios elevados de CEA no pueden predecir la reseccabilidad ni la supervivencia⁽¹²⁴⁾. De la misma manera, su monitorización tampoco permite predecir la recurrencia⁽¹²⁵⁾. Combinando su uso con los antígenos CA-19.9 y CA-50 la sensibilidad en los casos avanzados ha aumentado hasta un 70%⁽¹²⁶⁾.

La glucoproteína TAG72, detectable por los anticuerpos monoclonales B72.3 y CA72-4, se encuentra en el 59% de pacientes con cáncer gástrico localizado, pero no en pacientes con úlcera o gastritis⁽¹²⁷⁾. En un estudio prospectivo reciente, se afirma que la proteína TAG-72 tiene una elevada significación pronóstica en el cáncer gástrico, con alta sensibilidad y especificidad, sin falsos negativos e independiente del estadio tumoral⁽¹²⁸⁾.

Nomura ha estudiado la presencia de niveles bajos de Pepsinógeno I en pacientes con Gastritis Crónica y Metaplasia Intestinal como predictor de la aparición de CG⁽¹²⁹⁾.

Hackkinem⁽¹³⁰⁾ ha comunicado la elevación de la sulfoglicoproteína fetal en

jugo gástrico de pacientes con CG, pero encuentra hasta un 15% de casos con procesos benignos en los que la sulfoproteína está también elevada.

Recientemente se ha comunicado el valor pronóstico de la determinación preoperatoria del antígeno Sialil Tn en el CG, correspondiendo los valores altos del citado antígeno con estadíos más avanzados del tumor y peor pronóstico⁽¹³¹⁾.

Se han investigado también Antígenos relacionados con la proliferación celular; pcna⁽¹³²⁾, ki67⁽¹³³⁾, p105⁽¹³⁴⁾. Valoran las células en ciclo celular activo, mediante la utilización de Anticuerpos monoclonales y medición por Citometría de Flujo. Se sugiere una relación con el pronóstico.

En los últimos años el desarrollo de las técnicas de Citometría de Flujo (CMF) ha permitido conocer el contenido en DNA de los tumores y su ciclo celular, proporcionando información pronóstica independiente del estadío⁽¹³⁶⁾.

5.- Factores Terapeuticos

5.1.- Tratamiento Quirúrgico

El tratamiento quirúrgico es actualmente el único método terapéutico curativo para el CG. Su objetivo es la exéresis completa del tumor y de sus territorios ganglionares. La resección del CG requiere un amplio margen de estómago normal más allá del límite macroscópico del tumor debido a la extensión microscópica a mucosa y submucosa. La cirugía del CG se basa esquemáticamente, en el empleo de la **Gastrectomía** y de la **Linfadenectomía**.

Los tipos de Gastrectomía que se realizan son, fundamentalmente cuatro:

- * *gastrectomía subtotal*
- * *gastrectomía total*
- * *gastrectomía proximal subtotal*
- * *gastrectomía ampliada*

La *gastrectomía subtotal* supone la exéresis de las 3/4 partes del estómago con sus correspondientes epiplones y los primeros centímetros del duodeno. Permite una resección suficientemente amplia en la mayoría de los carcinomas gástricos situados en la región antropilórica y los pequeños tumores del cuerpo gástrico^(136,137), así como tumores de tipo intestinal⁽¹³⁸⁾. Si bien, los métodos de reconstrucción después de gastrectomía no están estandarizados, tras una *gastrectomía subtotal* la mayoría de los cirujanos realizan una anastomosis gastroyeyunal Bilioth II.

La *gastrectomía total* es necesaria en los grandes tumores de cuerpo gástrico y aquellos situados en el fundus. También los tumores de cardias pueden tratarse por gastrectomía total con excisión de los últimos 10 cm. del esófago. Supone la exéresis completa del estómago. La gastrectomía total ha sido propuesta por algunos grupos como técnica quirúrgica estándar con el fin de

obtener una mayor radicalidad. No obstante, no se ha demostrado de manera absoluta y para todos los casos, su superioridad en cuanto a supervivencia⁽¹³⁹⁾. De hecho la resección subtotal puede ser tan curativa como la resección total en determinados casos⁽¹⁴⁰⁾.

La reconstrucción después de una *gastrectomía total* permite diversas opciones siendo las más utilizadas; esófago-yeyunostomía en Y de Roux, esófago-yeyunostomía en omega de Brown y la interposición yeyunal de Hemley.

La *gastrectomía subtotal proximal* supone la resección de la mitad proximal del estómago y del 1/3 inferior de esófago, siendo adecuada para tumores de fundus y cardias en los que se considera necesario un margen de unos 6-8 cm. Requiere anastomosis del remanente gástrico con el esófago, que se realiza a nivel abdominal o torácico dependiendo de la altura de la transección esofágica. La mayoría de los cirujanos añaden una piloroplastia o piloromiotomía para evitar problemas de vaciamiento gástrico post-operatorio. Así mismo puede añadirse algún gesto quirúrgico para prevenir el reflujo biliar.

A veces, es necesaria la extirpación en bloque de estructuras adheridas al tumor o invadidas por el proceso neoplásico procedimiento que recibe la denominación de *gastrectomía ampliada*; los tumores de cara posterior afectarían a la cola del páncreas, requiriendo esplenectomía y pancreatectomía distal. El caso de la *gastrectomía ampliada* con espleno-pancreatectomía distal es justificado por algunos autores para la extirpación de los ganglios de la arteria e hilio esplénico⁽¹⁴¹⁾.

El colon transversal y lóbulo izquierdo hepático pueden resultar igualmente afectados, precisando su exéresis. Este tipo de resecciones puede considerarse como paliativa, aunque en un 50% de casos la infiltración resulta ser inflamatoria⁽¹⁴²⁾.

Aunque el tratamiento quirúrgico no puede considerarse como un factor independiente, pues puede verse determinado por las características del tumor

o por los hallazgos operatorios e incluso por la morbi-mortalidad de cada técnica quirúrgica, se ha discutido la influencia que la extensión de la resección tiene en la supervivencia. Así, unos grupos encuentran mayor supervivencia tras gastrectomía total de principio^(86,143) mientras que otros tienen mejor resultado realizando gastrectomía subtotal^(78,144). Finalmente algunos no encuentran diferencias entre las dos técnicas de resección⁽¹⁴⁵⁾. Actualmente se considera que ambas técnicas tienen parecida morbimortalidad operatoria, con la única desventaja de un peor estado nutricional del paciente sometido a gastrectomía total, e iguales cifras de supervivencia en el caso de tumores distales⁽¹⁴⁶⁾.

La invasión del borde de resección ensombrece el pronóstico de forma significativa, dentro del contexto de las resecciones no curativas⁽¹⁴⁷⁾. También, se ha señalado la influencia de la resección esplénica asociada a la gastrectomía en la supervivencia, aunque los resultados no son claros. Shehiro afirma que la resección esplénica no aporta nada en aquellos casos sin afectación de los ganglios de la arteria o del hilio esplénico⁽¹⁴⁸⁾. Sin embargo, Kishimoto, en un estudio prospectivo, obtiene mejores supervivencias en el grupo de tumores avanzados sometidos a esplenectomía⁽¹⁴⁹⁾. Finalmente, Coit y Brennan afirman que la esplenectomía juega un papel en el diagnóstico de extensión y pronóstico y no en el plano terapéutico⁽¹⁰⁴⁾.

El papel de la *linfadenectomía* y de su extensión en el tratamiento quirúrgico del CG potencialmente curable continúa siendo controvertido. Los que se oponen a ella, consideran que la presencia de metástasis en ganglios regionales supone la extensión a sitios más distantes, y por tanto enfermedad generalizada⁽¹⁵⁰⁾. Los defensores, argumentan que muchos pacientes con ganglios afectados no tienen otros depósitos metastásicos y son potencialmente curables por linfadenectomía^(151,152,153).

Para ser efectiva, la linfadenectomía debe incluir al menos un escalón ganglionar más allá del afectado. Para un cáncer antral debe incluir los ganglios de curvatura mayor y menor, supra e infra pilóricos (N1) así como los territorios

de la arteria hepática común, coronaria estomáquica y tronco celíaco (N2). Para los tumores de cuerpo y proximales debe incluir ganglios paracardiales derechos e izquierdos y ambas curvaduras (N1), los territorios de las arterias hepática, coronaria, esplénica, tronco celíaco y ganglios del hilio esplénico (N2). La extensión de la linfadenectomía se denominaría R1 si extirpa los ganglios N1, y R2 si se extirpan los ganglios N1 y N2⁽⁹⁷⁾.

Según Maruyama⁽¹⁵¹⁾, tras el estudio informatizado de más de 20.000 pacientes, la resección R2 mejora la supervivencia de los pacientes con enfermedad nodal N1 ó N2. Además, en las resecciones de tipo R2, se obtienen un número mayor de adenopatías y más pacientes con ganglios afectados que de otra forma hubiesen sido considerados N0⁽¹⁵³⁾. Por otro lado, la realización de la linfadenectomía radical conlleva un tiempo quirúrgico adicional, pero causa muy poca morbilidad post-operatoria excepto un período más prolongado de ileo adinámico⁽¹⁵⁴⁾.

El problema de la resección radical R2, es si mejora la supervivencia por su capacidad terapéutica o pronóstica. Kodama comprueba el efecto beneficioso de la linfadenectomía R2 para aquellos pacientes con invasión serosa localizada y adenopatías positivas⁽¹⁵²⁾.

Esta filosofía no es ampliamente compartida por los cirujanos occidentales que obtienen, sin embargo, peores resultados. Las razones de esta discrepancia se encontrarían en la mayor tasa de diagnóstico precoz en Japón que en EEUU (30% frente a 5%) y en el mejor estadiaje realizado. El número de ganglios estudiados en los especímenes de resección en Japón es hasta 6 veces superior y se examinan ganglios de un tamaño hasta 5 mm., práctica que no se lleva a cabo en la mayoría de los centros occidentales⁽¹⁵⁵⁾. En 1991 grupos Alemanes han estudiado el número de ganglios obtenidos tras resecciones realizadas siguiendo las normas japonesas, de manera que deben obtenerse al menos 25 ganglios para considerar una resección R2 y menos de 25 para las R1⁽¹⁵⁶⁾.

El German Gastric Cancer Study Group publica el primer estudio prospectivo Europeo incluyendo gran número de pacientes, observando que la resección radical R2 mejora el pronóstico en tumores estadio II y IIIa, explicando este beneficio en función del mayor número de resecciones curativas absolutas⁽¹⁵⁷⁾.

La linfadenectomía sería pues una forma de obtener mayor información pronóstica, valoración de tratamientos coadyuvantes y, para algunos casos, se obtendría un beneficio en la supervivencia.

En el CG precoz, la localización y extensión de la lesión determinan el tipo de resección a realizar. Si bien es considerado altamente curable, con frecuencia no despreciable presenta afectación ganglionar que llega al 0.6-11% para los cánceres de la mucosa y 14-26% en los cánceres de la submucosa ⁽¹⁵⁸⁾. Por este motivo, la Japanese Research Society for Gastric Cancer⁽⁹⁷⁾ recomienda la realización de gastrectomía tipo R1 ó R2 como técnica estándar, lo que implica gastrectomía subtotal con disección en bloque de ganglios linfáticos hasta nivel 2. En los casos con afectación submucosa, estaría plenamente justificada la técnica R2, puesto que los resultados son mejores que con la resección R1 ⁽¹⁵⁹⁾.

La resección endoscópica para el CG precoz desarrollada en Japón en los últimos años, es factible siempre que cumpla los siguientes criterios: lesión limitada a la mucosa, tamaño menor de 1.5-2 cm., macroscópicamente polipoides e histológicamente diferenciado. Los resultados iniciales son prometedores, aunque actualmente solo se está aplicando a pacientes con elevado riesgo quirúrgico^(160,161).

5.2.- Tratamiento Coadyuvante

El empleo del tratamiento coadyuvante va enfocado hacia la destrucción de micrometástasis no detectadas en el momento del acto quirúrgico intentando disminuir o retrasar la aparición de recurrencias⁽¹⁶²⁾. Se basa en el empleo de *Quimioterapia, Inmunoterapia y Radioterapia*.

La utilización de *quimioterapia* después de resección curativa del carcinoma gástrico no ha demostrado mejoras en la supervivencia. Aunque algunas series mostraron buenos resultados iniciales con 5-Fluoracilo o Mitomicina C y Ptorafur⁽¹⁶³⁾, otros grupos no han podido obtener los mismos resultados⁽¹⁶⁴⁾.

Dos trabajos randomizados publicados han señalado resultados alentadores que mostraban alguna ventaja notable del tratamiento adyuvante sobre la cirugía aislada⁽¹⁶⁵⁾. En el trabajo de Estapé y cols., en el que se administra Mitomicina C en cuatro ciclos, se obtiene una supervivencia significativamente mayor para el grupo de pacientes tratados, con seguimientos superiores a diez años⁽¹⁶⁶⁾.

Actualmente la quimioterapia adyuvante en el carcinoma gástrico se encuentra en fase de investigación y no puede pensarse en ella como tratamiento habitual en la clínica, aunque se aconseja la introducción de pacientes de alto riesgo en ensayos clínicos prospectivos⁽¹⁶⁷⁾.

Otro camino terapéutico adyuvante en el cáncer gástrico es la utilización de *inmunomoduladores*. El estado inmunitario de los pacientes con cáncer suele estar deprimido en relación a la influencia de factores asociados a la presencia de células tumorales, a la propia agresión quirúrgica y a la posible desnutrición previa. Se afectarían los mecanismos de la inmunidad celular provocando un exceso de función de las células supresoras⁽¹⁶⁸⁾.

La inmunoterapia persigue una reducción o eliminación de los factores supresores y la recuperación de los sistemas biológicos de defensa. Para ello se administran inmunopotenciadores o moduladores como Levamisole, PSK (preparado de Estafilococo), BCG, OK-432 (extracto de *Coriolus versicolor*), Interleuquina-2, TP-1 e Interferon⁽¹⁶⁹⁾. Suga⁽¹⁷⁰⁾ y Niimoto⁽¹⁷¹⁾ publican estudios en los que la utilización de OK-432 y Levamisole asociados a quimioterapia mejora la supervivencia a largo plazo y el período libre de recidiva. No hay criterio definido sobre los agentes a utilizar, por que vía y durante cuanto tiempo⁽¹⁷²⁾.

La *radioterapia* tampoco ha conseguido la curación de estos pacientes aunque puede ofrecer ocasionalmente paliación sintomática así como un menor número de recidivas locales⁽¹⁷³⁾. Actualmente el interés se centra en la radioterapia intraoperatoria y en la combinación quimioterapia-radioterapia.

La radioterapia intraoperatoria ha sido utilizada por Abe et al. en un estudio no randomizado que muestra la mejora de la supervivencia para el grupo tratado⁽¹⁷⁴⁾. Son necesarios estudios prospectivos randomizados para la evaluación de la eficacia de la radioterapia. El Gastrointestinal Tumor Study Group ha publicado algunos trabajos utilizando radioterapia potenciada con 5-Fluoracilo, seguido por quimioterapia con Doxorubicina y Nitrosureas. No se encontró beneficio para los pacientes tratados en términos de supervivencia⁽¹⁷⁵⁾.

B.- CITOMETRIA DE FLUJO.

1.- Concepto.

La citometría de flujo (CMF) es un método de análisis automatizado en el que células individuales, u otras partículas biológicas, inmersas en una corriente fluídica, son sometidas a un haz lumínico y examinadas por sensores, que miden sus características físicas o químicas⁽¹⁷⁶⁾. Así, pueden estudiarse grandes poblaciones celulares midiendo su contenido en ácidos nucleicos, su actividad enzimática, determinar subpoblaciones en función de antígenos de superficie etc.. Todo ello proporciona una confirmación objetiva de los datos morfológicos que tiene significación diagnóstica y pronóstica en muchos casos. Mediante esta técnica pueden detectarse de forma automatizada células neoplásicas entre una gran población de células normales.

Algunas de las aplicaciones clínicas específicas de la CMF incluyen la determinación de subpoblaciones linfocitarias, la detección de anticuerpos antiplaquetas, el análisis de receptores hormonales, la valoración de los efectos de los agentes quimioterápicos y el análisis del contenido en ADN-ARN. A su desarrollo han contribuido numerosos campos de la ciencia, como la hidrodinámica, la óptica, los ordenadores de alta velocidad, la gran disponibilidad de fluorocromos y la producción de Anticuerpos Monoclonales.

El desarrollo de la primera máquina comercialmente disponible para CMF, Cytofluorograf, se basó en las ideas de Derman y Hoffer (1960), que proponían un sistema automatizado de análisis celular partiendo de las observaciones de Caspersson et al. sobre la fluorescencia de los ácidos nucleicos⁽¹⁷⁷⁾. Si bien inicialmente fue aplicado a un modelo estático, Karmentsky^(178,179) introduce el sistema de flujo permitiendo estudiar grandes poblaciones celulares. Coons⁽¹⁸⁰⁾ describió el método de los anticuerpos marcados con fluoresceína y Coulter⁽¹⁸¹⁾ desarrolló el aparataje que permitía el recuento y medición de las células suspendidas en un medio salino.

En los años setenta la atención se centró en determinar parámetros funcionales celulares, como la concentración de Ca^{2+} intracelular, pH y potencial de membrana⁽¹⁸²⁾. Todas ellas son determinaciones útiles para el análisis de activación celular pero con relevancia únicamente en células vivas, lo cual limita su utilidad clínica. Además, pueden determinarse parámetros de la propia célula como tamaño y granularidad, útiles en la selección de poblaciones celulares⁽¹⁸³⁾.

Las mayores áreas de aplicación clínica de la CMF son la identificación de fenotipos inmunológicos-antígenos celulares y el análisis de ADN, aunque se extiende continuamente su utilización con propósitos de investigación y clínicos⁽¹⁸⁴⁾.

2.- Principios técnicos. Soporte Instrumental.

Los componentes básicos de un citómetro de flujo incluyen (Fig.1.2):

A) Colector-transportador de muestras.

La suspensión celular depositada es impelida por una corriente de aire hacia la cámara de flujo o compartimento fluídico.

B) Compartimento fluídico.

En él, las partículas a analizar son introducidas en el centro de un flujo de

líquido isotónico, que a gran velocidad es impulsado a través de un estrecho orificio. Se constituye así un flujo laminar en el que las células han de mantenerse en el centro de la corriente regulando para ello la diferencia de presión entre la parte interna o central del flujo (muestra a analizar) y la parte periférica (líquido isotónico).

La velocidad de paso de las células individuales ha de ser la adecuada y, al mismo tiempo, no han de alterarse las características físico-químicas o morfológicas de la muestra. La velocidad de análisis se sitúa como media en 5.000 células por segundo. De esta manera las células son conducidas de una en una hacia la fuente lumínica.

C) Fuente lumínica.

La medida de las propiedades de las partículas requiere iluminación por una fuente de gran intensidad. Las células interaccionan con el haz luminoso emitiendo una señal que es detectada y recogida. Habitualmente, se utiliza una fuente láser de argón, enfriado por aire o por agua, con unas longitudes de onda entre 450 nm. y 515 nm., que es suficiente para excitar la absorción máxima de los colorantes utilizados habitualmente. Esta fuente lumínica proporciona un haz de luz de gran potencia, estable y monocromática.

D) Sistema de detección.

Se basa en las propiedades de un flujo de partículas: la conductancia eléctrica de la corriente, que se modifica localmente de manera proporcional al volumen de las partículas, y la dispersión de la luz y fluorescencia. Al incidir la luz sobre la partícula en estudio, se produce una dispersión cuya intensidad y distribución espacial está relacionada con el tamaño, forma y características eléctricas de las partículas. Además, las partículas o células teñidas por un colorante fluorescente, son excitadas por el haz luminoso y emiten fluorescencia, es decir, absorben y emiten fotones.

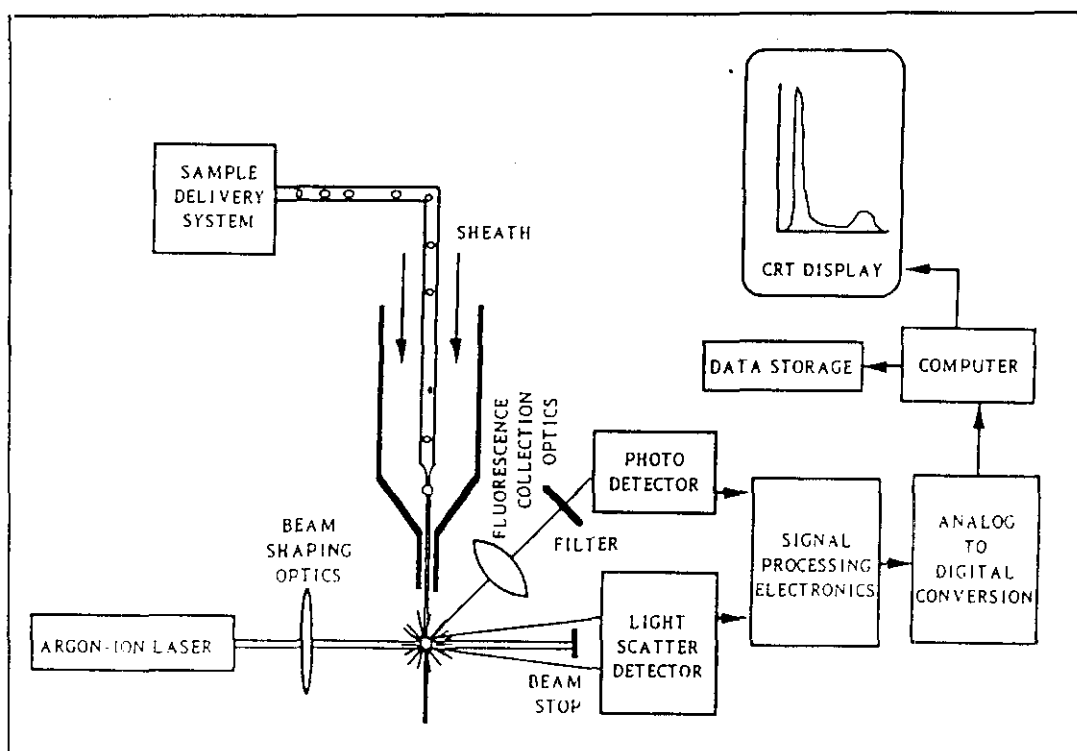


Figura 1.2.- Diagrama esquemático de un citómetro de flujo. Tomado de Riley R.S. y Mahin EJ. en "Clinical Applications of flow cytometry", Las Vegas, Nevada, 1988.

Las tinciones histopatológicas clásicas, como hematoxilina-eosina, no ofrecen buenos resultados para el análisis de los ácidos nucleicos, pues no se ligan a ellos de forma estequiométrica, es decir molécula a molécula. Los fluorocromos utilizados en la citometría de flujo se ligan a los ácidos nucleicos de manera que la unión al colorante es directamente proporcional al contenido en ADN.

Una serie de lentes colocadas alrededor de la zona de detección, filtran la señal luminosa y la dirigen hacia un sistema de tubos fotomultiplicadores que convierten dicha señal en un pulso eléctrico.

E) Sistema electrónico.

Tiene como función la amplificación de las señales eléctricas analógicas producidas y su digitalización mediante transformadores, atribuyendo de forma inequívoca los parámetros correspondientes a las partículas en estudio.

F) Soporte informático.

Los impulsos digitales necesitan ser almacenados y analizados en un ordenador con potentes programas de software que expongan la información en forma de listados de parámetros o en forma de histogramas. La amplitud del pico, el ancho y área se convierten también en señales digitales⁽¹⁸⁵⁾. La mayoría de los aparatos utilizados son multiparamétricos, permitiendo el uso de diversos colorantes y la determinación de múltiples parámetros celulares⁽¹⁸⁶⁾.

Los datos obtenidos del análisis por CMF, son representados en dos dimensiones: la frecuencia en el eje de ordenadas y la magnitud de la variable en el eje de abscisas (Fig.1.3).

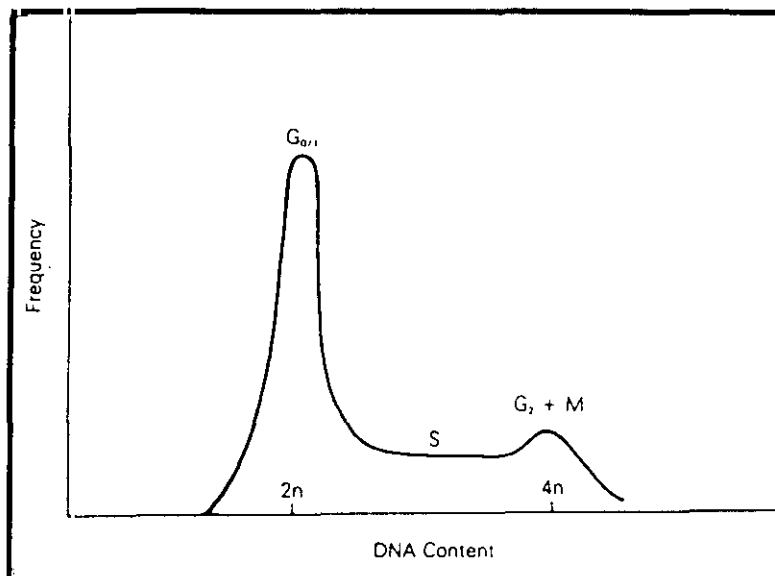


Figura 1.3.- Representación del análisis de ADN. Tomado de Riley R.S. y Mahin EJ. en "Clinical Applications of flow cytometry", Las Vegas, Nevada, 1988.

Las unidades de la magnitud del eje de abscisas se denominan "canales" de fluorescencia. El histograma expone el número relativo de células que corresponden a cada canal, representando diferentes intensidades de señal. Otro parámetro que describe la distribución es el Coeficiente de Variación, que puede definirse como la distancia entre los extremos del pico y la mediana del mismo. El coeficiente de variación es constante en todos los canales, de forma que se utiliza como medida de calidad del procesamiento de las muestras y de la instrumentación.

3.- Preparación de suspensiones Nucleares

La preparación de suspensiones nucleares puede realizarse por métodos mecánicos, químicos y enzimáticos.

Los métodos enzimáticos son los más utilizados, empleando enzimas como la tripsina, la pepsina, la colagenasa, la papaína, la pronasa, la elastasa y la hialuronidasa, que degradan selectivamente el tejido conectivo. La ruptura de la membrana celular puede conseguirse mediante soluciones de pH bajo o alto, o mediante el uso de detergentes no iónicos como el Triton X-100, Nonidet P-40 y Tween 20-80.

Los primeros estudios de citometría de flujo se realizaban con componentes hematológicos, ya que en los tumores sólidos la dificultad evidente era obtener una suspensión de células individuales. Para estudiar los tumores sólidos es conveniente utilizar métodos de disgregación mecánica y enzimáticos, realizando la lisis de la membrana celular con detergentes no iónicos. Los agregados nucleares y los desechos residuales se eliminan mediante filtrado con malla de nylon.

4.- Tinción del ADN.

Para la tinción del ADN se utilizan varios tipos de colorantes: intercalantes y no intercalantes. Entre los intercalantes los más utilizados son el Ioduro de

Propidio y el Bromuro de Etidio. Entre los no intercalantes se usan el 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), Hoechsts 33342 y 33258 y otros como mitramicina, cromomicina, etc. El de uso más extendido es el Ioduro de Propidio⁽¹⁹²⁾ por los siguientes motivos:

- * Es muy estable y puede ser excitado por un láser argon convencional.
- * Produce histogramas con bajo coeficiente de variación y permite el cálculo de la actividad proliferativa.
- * Se une estequiométricamente a las bases del ADN.
- * Permite el análisis simultáneo de ADN y Antígenos celulares.

Crissman y Steinkamp fueron los primeros en describir un procedimiento de tinción usando el ioduro de propidio⁽¹⁸⁷⁾. En 1975 Krishnan⁽¹⁸⁸⁾ describió un método de tinción simplificado, en el que las células enteras se suspendían en una suspensión hipotónica que contenía 0.1% de citrato sódico y 0.05% de ioduro de propidio. Fried⁽¹⁸⁹⁾ añadió a este procedimiento 0.1% de detergente no iónico (Triton X-100). Vindelov⁽¹⁹⁰⁾ describió un método muy efectivo utilizando una tinción de ioduro de propidio sobre la muestra tratada con detergente y tripsina, añadiendo espermina. Taylor⁽¹⁹¹⁾ utilizó una técnica rápida de tinción en un solo paso, que requería menos de diez minutos de incubación celular con varios fluorocromos en una solución que contenía 0.1% de Triton X-100 con RNAasa para eliminar la fluorescencia no específica del ARN.

5.- Aplicación de la CMF al estudio de muestras tumorales.

La citometría de flujo de los tumores consiste fundamentalmente en el estudio del **contenido en ADN** y del **ciclo celular**.

5.1.- Contenido en ADN

Las células normales son estables en su contenido en ADN y organización cromosómica. Por el contrario, las células malignas tienen una gran variabilidad

genética que puede aparecer en diferentes niveles y puede incluir cambios en el contenido genómico del ADN.

Una muestra se considera **diploide o euploide** cuando su contenido en ADN es de $2n$ (número normal de cromosomas de la célula en reposo), comparando para ello la muestra problema con una población control normal.

Una muestra se considera **aneuploide** cuando presenta contenidos en ADN diferentes de $2n$, es decir menor que $2n$ (**hipodiploide**), o mayor (**hiperdiploide**), lo cual numéricamente se expresa como Índice de ADN. Un índice de 1 corresponde a una muestra diploide y un índice diferente de 1 corresponde a una muestra aneuploide. La aneuploidía sería pues una desviación del contenido diploide de las células en la fase G0G1.

El término aneuploidía de ADN reflejaría mejor las alteraciones observadas en el análisis cuantitativo realizado por CMF, ya que las alteraciones cromosómicas específicas son valoradas por estudios de cariotipo⁽¹⁹⁴⁾. Desde el punto de vista clínico, la presencia de aneuploidía es el parámetro más utilizado. Es el valor que tiene mejor reproductibilidad en los distintos laboratorios y la característica que más se ha estudiado en los tumores sólidos^(195,196).

Otro de los parámetros que se estudia a la vez que el contenido en ADN, es el ciclo celular aplicando el programa citológico del citómetro. El número de células en cada compartimento (G0/G1, S, G2/M) es determinado valorando la distribución del ADN en cada fase.

El ciclo celular se divide en 4 fases:

G₀-G₁: es la fase de reposo celular o de latencia antes de la replicación del ADN. Se produce la síntesis de ARN y proteínas. Representa el 85-90% de las células.

S: es la fase de síntesis de ADN, donde tiene lugar la duplicación.

G₂: es una fase latente antes de la mitosis, no cambiando el contenido de ADN.

M: es la fase de mitosis. Las células sufren la división mitótica, volviendo las células hijas a la fase inicial G₀-G₁.

La fase S indica la fracción de células que sintetizan ADN antes de la mitosis y proporciona otro factor pronóstico en el estudio de los tumores: el porcentaje de Fase S o de proliferación celular que guarda una relación directa con la agresividad tumoral⁽¹⁹³⁾.

En resumen, el histograma de ADN informaría sobre:

- * La presencia o ausencia de una población celular aneuploide.
- * El contenido relativo de ADN expresado como índice de ADN.
- * La fracción proliferativa de la población celular en estudio.

6.- Importancia Pronóstica

El estudio de la ploidía en tumores sólidos ha demostrado ser un factor pronóstico en determinadas patologías, mientras que su significado es discutible en otras. Así se ha señalado que el pronóstico de un tumor aneuploide es peor que el de un tumor diploide, en los siguientes tumores⁽¹⁸⁶⁾: Carcinoma de mama, Carcinoma de próstata, Carcinoma de vejiga, Carcinoma de ovario, Carcinoma de endometrio y Carcinoma de pulmón. En el caso de los tumores de contenido de ADN normal, es decir diploides, los de peor pronóstico son aquellos que tienen una fase de proliferación (fase S) más alta⁽¹⁹⁷⁾.

En el campo de los tumores digestivos existe experiencia en el Hepatocarcinoma⁽¹⁹⁸⁾ y muy amplia en el carcinoma de Colon, considerando en algunos trabajos que el contenido en ADN sería el factor pronóstico independiente más importante⁽¹⁹⁹⁾.

En el caso del carcinoma gástrico existen datos contradictorios. Se han encontrado incidencias de aneuploidía muy variables, siendo más bajas en el caso del cáncer precoz. Hattori⁽²⁰⁰⁾ y Macartney⁽²⁰¹⁾ encuentran correlación entre el estadio tumoral y la ploidía aunque no con el grado de diferenciación. Sin embargo Danova⁽²⁰²⁾ observa tendencia a la aneuploidía en los tumores bien diferenciados y Korenaga⁽²⁰³⁾ afirma que los tumores diferenciados con perfil aneuploide están asociados con afectación ganglionar y metástasis a distancia , incluso en estadios precoces, existiendo correlación significativa entre el pronóstico y la ploidía.

Tosi⁽²⁰⁴⁾ objetiva una peor supervivencia para los tumores aneuploides y Danova⁽²⁰²⁾ observa una mejor supervivencia para los tumores diploides solo en algunos estadios. Por el contrario Filipe⁽²⁰⁵⁾ no puede demostrar correlación significativa entre la ploidía y la supervivencia, aunque si una tendencia a peor pronóstico para los casos con un índice de ADN muy elevado.

El interés de la determinación del contenido en ADN de los tumores gástricos es, también, terapéutico ya que el posible mayor riesgo de metástasis linfáticas y hematógenas en los casos con mayor aneuploidía, podría conllevar un determinado tipo de tratamiento.

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

La importancia clínica y epidemiológica del Carcinoma Gástrico y sus limitados niveles de supervivencia tardía, justifican los esfuerzos para realizar un diagnóstico precoz. Por otro lado es importante conocer los grupos de pacientes que puedan beneficiarse de determinados gestos terapéuticos, quirúrgicos o coadyuvantes, y detectar precozmente la aparición de recidiva o de metástasis en un momento en que sean susceptibles de tratamiento.

Todos estos datos justifican la importancia del conocimiento de los factores que influyen en el pronóstico de estos pacientes. Desgraciadamente los resultados publicados no son, en absoluto, homogéneos ni concluyentes. Por otra parte, en los últimos años se están determinando otros elementos como los marcadores tumorales, los oncogenes, o parámetros relacionados con las características del tumor, que se consideran de valor pronóstico. La experiencia es, sin embargo, limitada y los resultados publicados no están suficientemente claros.

Todas estas consideraciones han justificado el análisis de los factores que modifican el pronóstico del Carcinoma Gástrico, persiguiendo los siguientes **Objetivos:**

- 1.- Determinar el valor pronóstico de los datos clínicos y patológicos.
- 2.- Cuantificar el contenido en ADN y de la fase celular proliferativa de los tumores mediante Citometría de flujo.
- 3.- Correlacionar el contenido en ADN y la fase proliferativa con los datos clínico patológicos.
- 4.- Determinar el valor pronóstico del contenido en ADN y la fase proliferativa en el adenocarcinoma gástrico.

MATERIAL Y METODOS

1.- Material Clínico

Se ha realizado un estudio de todos los pacientes portadores de Adenocarcinoma gástrico intervenidos quirúrgicamente entre los años 1986 a 1992 en el Servicio de Cirugía del Hospital General de Segovia. Este centro, atiende una población de unos 150.000 habitantes. Los pacientes estudiados procedían del Servicio de Medicina Interna y de nuestras Consultas externas.

Selección de pacientes

Para la inclusión en este protocolo se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de selección: *documentación clínica completa, tratamiento quirúrgico con intención curativa, estudio anatomopatológico detallado y datos pormenorizados de seguimiento.*

Se consideró que la *documentación clínica* era completa cuando constaba de una anamnesis y exploración física detalladas, exploraciones radiológicas, endoscópicas y biópsicas determinando el diagnóstico de adenocarcinoma gástrico y, finalmente, estudio analítico básico, radiología de tórax y ecografía abdominal para la identificación de enfermedad metastásica. Todos los pacientes fueron diagnosticados de Adenocarcinoma gástrico previamente a la intervención quirúrgica excepto un caso que debutó como abdomen agudo por perforación gástrica.

Se consideró la cirugía como de *intención curativa* cuando la resección gástrica se había realizado sin evidencia de metástasis a distancia, de afectación peritoneal o de los órganos vecinos, cuando los bordes de resección estaban libres de tumor y cuando no existía tumor residual macroscópico a juicio del cirujano.

La elección del tipo de resección quirúrgica se realizó de acuerdo a los criterios definidos por el Servicio. En general, se utilizó la gastrectomía subtotal para los tumores distales y la gastrectomía total en los tumores proximales o en los del cuerpo gástrico que requerían dicha resección para lograr márgenes quirúrgicos libres de tumor. En los tumores de la unión gastroesofágica, se realizó esófagogastrectomía polar superior por doble vía abdominotorácica, o bien gastrectomía total con esofagectomía distal por vía abdominal, según el criterio del cirujano y los hallazgos operatorios.

En todos los casos se llevó a cabo una linfadenectomía de nivel R1. La reconstrucción de la continuidad digestiva se realizó mediante la anastomosis gastroyeyunal a lo Billroth II o la esófago-yeyunostomía en Y de Roux o en omega de Brown, en función del tipo de resección gástrica.

Todas las piezas de resección fueron estudiadas por el Servicio de *Anatomía Patológica*, contando con una detallada descripción macro y microscópica.

El manejo habitual de los estómagos resecados fue el siguiente: apertura de la pieza y fijación con formol al 10% durante 24 horas; procesamiento de la pieza y obtención de bloques parafinados de la tumoración, de los bordes quirúrgicos y de los territorios ganglionares; cortado de los bloques con microtomo (4-6 μ); tinción con hematoxilina-eosina y finalmente, estudio histológico microscópico.

En el momento de iniciar este protocolo, se consideró, de acuerdo a los resultados de las series Europeas, que el tratamiento estándar del CG era la

resección quirúrgica y la observación posterior, asociando el tratamiento quimioterápico sólo en centros con protocolos establecidos prospectivos y estandarizados^(165,167).

El *Seguimiento* de los pacientes se llevó a cabo en la Consulta externa del Servicio de Cirugía del Hospital General de Segovia según un protocolo previamente establecido. Tras una visita inicial al mes de la intervención quirúrgica, se han realizado revisiones periódicas con intervalos iniciales de 6 meses y posteriormente de forma anual. El seguimiento mínimo ha sido de 24 meses.

Cada control incluía anamnesis, exploración clínica, analítica general y radiología torácica y gastroduodenal. A partir del año 1990 se incluyó la ecografía abdominal. Los datos relativos a la supervivencia se actualizaron hasta Diciembre de 1994. Los pacientes con un periodo de seguimiento inferior a los dos años fueron excluidos.

En resumen, se revisaron un total de 280 historias clínicas. De ellas, el 8% (22 casos) resultaron ser tumores inoperables en base a los estudios preoperatorios. El 12% (34 casos) fueron irresecables de acuerdo a la descripción y a los hallazgos operatorios. El 80% (224 casos) pudieron ser resecaados, si bien solo se consideraron resecciones con intención curativa el 32.5% (91 casos).

De los 91 casos se excluyeron 3 por muerte post-operatoria, 4 por dificultades en el seguimiento y 6 por fallecimiento por causa distinta al CG. En total se consideraron válidos para el estudio 78 pacientes.

2.- Citometría de Flujo

Se llevó a cabo estudio del contenido en ADN en todos los casos, utilizando las piezas almacenadas en soporte de parafina. Previo a su procesado, se seleccionaron los bloques parafinados que contenían tumor, desechándose la parte no tumoral. Este proceso fue realizado por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen de La Salud de Toledo tras el estudio con cortes de control teñidos con hematoxilina-eosina.

La técnica utilizada para el procesamiento de las muestras corresponde a la descrita por Hedley⁽²⁰⁶⁾, modificada por García Delgado⁽²⁰⁷⁾. Esquemáticamente consta de las siguientes etapas:

2.a.- Proceso de desparafinización e hidratación.

1.- Selección de cortes de 50 μ de espesor, que se mantuvieron en suspensión en Xilol (Merck), desde un mínimo de una hora hasta un máximo de 12 horas para lograr una completa desparafinización.

2.- Lavado con etanol al 100% durante diez minutos para eliminar el xilol y proceder a la hidratación con los alcoholes.

3.- Decantación del etanol y administración de etanol al 95% actuando durante diez minutos a temperatura ambiente.

4.- Decantación y lavado del tejido en pasos sucesivos en alcoholes de 70% y de 50%, manteniéndolo diez minutos a temperatura ambiente en cada paso.

5.- Lavado con agua destilada dos veces, terminando el proceso de hidratación.

2.b.- Obtención de la suspensión celular.

1.- Se realiza la disgregación mecánica de los cortes con bisturí.

2.- Digestión de la muestra. En 2 ml. de Pepsina (Sigma) al 0,5%, en una solución 0,9% ClNa a pH 1,5 se incuba durante treinta minutos a 37°C con agitación ocasional para obtener la suspensión celular.

2.- Detención de la reacción enzimática añadiendo Tris 1M a pH 11, elevando el pH de la solución hasta valores 7-8. Se añade medio de cultivo RPMI-1640 (Boehringer Ingelheim) para diluir la concentración del enzima. La muestra se mantiene en hielo durante 30 minutos, con agitación manual ocasional.

3.- Filtración del tejido digerido con malla de poro inferior a 5 μ y centrifugado a 450 g. durante 5 minutos.

4.- Decantación del sobrenadante y resuspensión del botón celular en medio de cultivo RPMI-1640.

5.- Contaje de las células en cámara de Neubauer y medición de su viabilidad por tinción con azul Tripan.

6.- Corrección de la concentración de la suspensión celular así obtenida con PBS (solución buffer fosfato) de forma que contenga 1×10^6 células/ml.

2.c.- Tinción del ADN.

1.- Lavado repetido dos veces de 1 ml. de la suspensión celular conteniendo 1×10^6 células, con solución salina y tratamiento con 10 μ gr/ml de RNasa (Sigma), para romper el RNA y evitar su unión al colorante. Incubación durante 30 minutos a 37°C con agitación mecánica.

2.- Lavado de la suspensión celular 2 veces con solución salina y tinción con Ioduro de Propidio (Sigma), en una mezcla compuesta por Ioduro de Propidio 100 μ gr/ml. y Nonidet P-40 (Sigma) al 0,05% en solución salina. El Nonidet es un detergente no iónico que permeabiliza la membrana nuclear para la accesibilidad del colorante al ADN. Agitación de las células y almacenamiento en frío y

oscuridad hasta su lectura 30 min. y 24 horas después.

La lectura se realiza en un citómetro de flujo EPICS-C (Coulter), dotado con láser de Argon de 2 watios de potencia, que ha sido ajustado para fluorescencia, tamaño y complejidad mediante esferas fluoresceinadas (DNA-check Coulter). Como control normal interno de ploidía se emplea una preparación de linfocitos de sangre periférica. Una vez obtenidos los datos relativos a 5.000 células se aplica el programa PARA-1 del citómetro para la obtención del ciclo celular.

2.d.- Valoración de los resultados

Para la valoración de los resultados se han estudiado 6 controles de mucosa gástrica normal parafinada, realizándose el ciclo celular y el Índice de ADN. Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

- $G_0-G_1 = 75.1 \pm 10.7$

- $G_2+M = 7.8 \pm 5.3$

- $S = 16.1 \pm 6.8$

- $CV = 7.8 \pm 2.3$

- $IDNA = 1.01 \pm 0.12$

Según estos resultados, se consideró:

- **Muestra Diploide** cuando tenía un pico simétrico único y el índice de ADN estaba comprendido entre 0.9 y 1.2. (Figura III.1). El valor normal de la Fase Proliferativa se consideró hasta un 22%, de forma que los tumores diploides con **fase "S" elevada**, serán aquellos con un valor de esta fase superior al 22%.(Figura III.2).

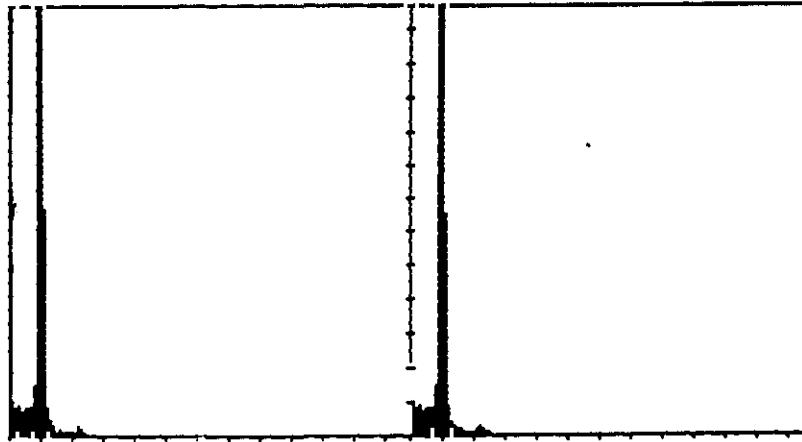


Figura III.1.- Gráfica correspondiente a un tumor Diploide.

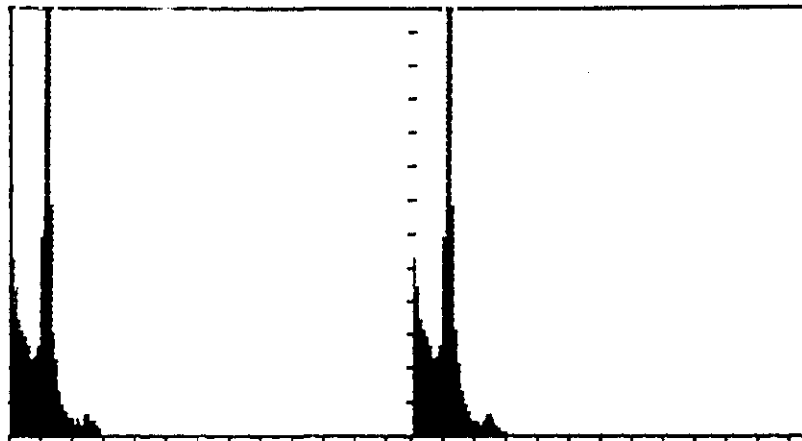


Figura III.2.- Gráfica correspondiente a un tumor Diploide con fase S elevada.

- Muestra **Aneuploide** cuando había más de un pico separado del G_0-G_1 y el índice de ADN es menor de 0.9 y mayor de 1.2.(Figura III.3)

- Las muestras "casi diploides", es decir , aquellas con índices de ADN cercanos a los valores normales citados, se han incluido dentro del grupo de Diploides.

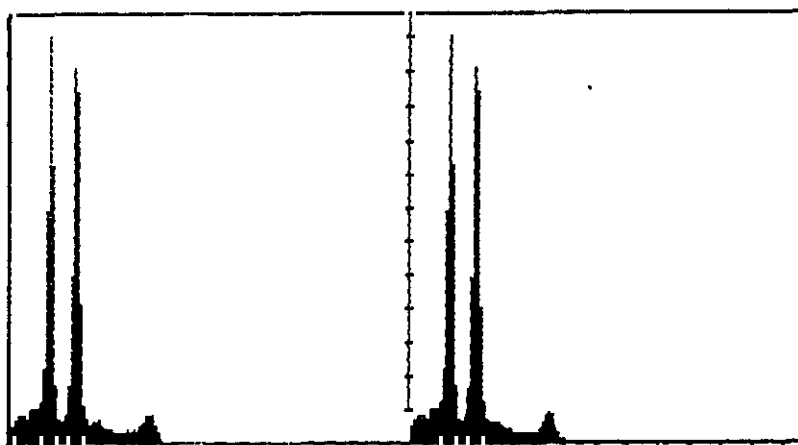


Figura III.3.- Gráfica correspondiente a un tumor Aneuploide.

Se procedió al nuevo procesamiento de las muestras en aquellos casos en los que el coeficiente de variación era elevado o existía discordancia entre los hallazgos citométricos y la supervivencia.

3.- DATOS ANALIZADOS

Todos los datos objetivos de cada paciente fueron recogidos en un protocolo informatizado compuesto por un total de 50 variables en el que se incluían:

3.a.- Datos administrativos

3.b.- Datos relativos a la Clínica:

- edad
- sexo
- síntoma predominante: dispepsia, dolor epigástrico, anemia, hemorragia.
- tiempo de evolución

3.c.- Datos relativos al Tratamiento Quirúrgico

- gastrectomía subtotal
- gastrectomía total
- gastrectomía total con esofaguectomía distal
- esofagogastrectomía polar superior

3.c.- Datos Anatomopatológicos

Se valoraron las Características Macroscópicas del tumor:

- localización: proximal (fundus-cardias), media (cuerpo gástrico), y distal (antro gástrico).
- tamaño del tumor. Se agruparon en función del tamaño mayor o menor que la media.
- tipo macroscópico: ulcerado, vegetante e infiltrante. Se valoró el tipo predominante, no teniendo en cuenta los tipos mixtos.

Los datos Histológicos:

- Clasificación de Lauren: tipo intestinal o difuso
- Grado de diferenciación: bien, moderadamente o poco diferenciados.
- Infiltración de la pared gástrica: T1, T2, T3.
- Afectación de Ganglios Linfáticos y número de ganglios afectados.
- Estadío tumoral: I, II, III.

3.d.- Datos relativos al seguimiento.

- Tiempo de supervivencia

3.e.- Datos de la Citometría de Flujo

- Tumores Diploides

- Tumores Aneuploides

- Fase S. Con arreglo a sus valores se dividió el grupo de los tumores Diploides en Diploides normales y Diploides con fase S elevada. La fase S de los tumores Aneuploides no se consideró por las dificultades de valoración en un porcentaje alto de los casos.

- Se estudió la correlación entre la ploidía y la fase S, con los datos clínico patológicos. Asimismo se determinó la supervivencia en función de la ploidía y fase S.

4.- Estudio Estadístico

Se realizaron análisis descriptivos de las variables cuantitativas estudiando la media y la desviación estándar y la frecuencia/proporción en las variables cualitativas. Para la valoración de las diferencias entre las medias de las variables fue utilizado el test de Student para datos independientes en las variables cuantitativas y la prueba de Chi^2 para las variables cualitativas. La estimación de la probabilidad de supervivencia se ha llevado a cabo mediante el test de Kaplan y Meier. Los análisis de las diferencias en la probabilidad de supervivencia se estudiaron mediante el test log-rank.

Para valorar el efecto de las variables en estudio independientemente de las variables confusoras, se han llevado a cabo diversos modelos de regresión (Cox), considerando estas variables como covariantes tiempo independientes.

En todos los casos se han rechazado las hipótesis nulas cuando su probabilidad de ser ciertas es $< 0,05$ ($p < 0,05$) siendo este por tanto el umbral de significación. En algunos casos se han valorado como casi significativos valores de p entre 0,05 y 0,10.

Todos los cálculos han sido realizados por el paquete SPSS para Windows, versión 6.0.1., SPSS Inc. 1993, en la Unidad de Investigación del Hospital de La Princesa de Madrid.

RESULTADOS

1.- Resultados Clínicos Y Terapéuticos

Los datos individualizados de cada paciente se señalan en el Anexo 1.

Edad Y Sexo

Las edades de los pacientes estuvieron comprendidas entre los 36 y los 91 años, con una edad media de 67.2 ± 10.7 años. Cincuenta pacientes eran varones (64.1%), con edades entre los 36 y 91 años, una edad media de 65 ± 10.9 años; veintiocho eran mujeres (35.9%), con edades comprendidas entre 45 y 82 años, una edad media de 71.2 ± 9.2 años. La relación varón/mujer se sitúa en 1.8/1.

Enfermedades Asociadas

Cuarenta y dos pacientes presentaban patología asociada: 9 pacientes Hipertensión esencial, 4 Diabetes, 8 Broncopatía Crónica, 5 Cardiopatía, 5 Síndrome Prostático, 3 A.C.V.A. con secuelas, 3 con trastornos Psiquiátricos, 3 Pancreatitis Crónica, 1 Hepatitis Crónica y 1 paciente con Carcinoma de mama sincrónico.

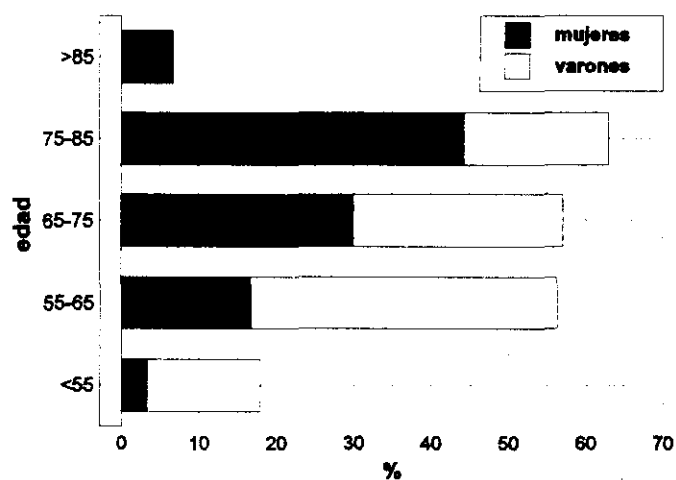


Figura IV.1.- Distribución según edad/sexo.

Síntomas Clínicos

Sesenta y seis pacientes presentaron síntomas digestivos (84.7%) y 12 Síndrome Anémico como única manifestación (15.3%). La figura IV.2 muestra la distribución de la sintomatología.

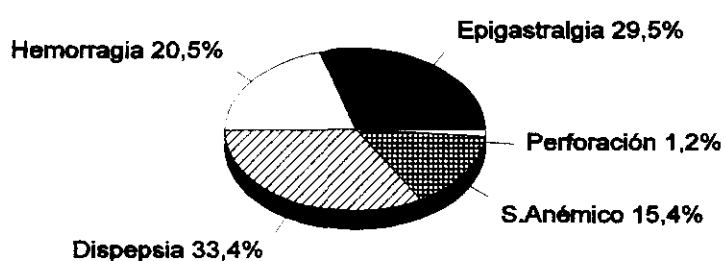


Figura IV.2.- Sintomatología.

Tiempo de Evolución

El tiempo de evolución entre la aparición de la sintomatología y el momento del diagnóstico fue de 5.1 ± 4.3 meses, con unos límites entre 0 y 18 meses. Casi el 80% de los casos fueron diagnosticados en los seis meses siguientes al inicio de la sintomatología.

Nº MESES	Nº CASOS	PORCENTAJE
0-3	30	38,5%
4-6	31	39,7%
7 ó MAS	17	21,8%

- Resultados del Tratamiento

Se llevó a cabo Gastrectomía subtotal radical en 53 casos (68%), correspondiendo 50 casos a tumores antrales y 3 a tumores de cuerpo gástrico. En 19 casos se realizó Gastrectomía total (24.3%), sobre 14 tumores situados en cuerpo gástrico y 5 en la región fúndica. En 5 pacientes se llevó a cabo esófago-gastrectomía total (6.5%) y en uno gastrectomía polar superior con esofagectomía distal (1.2%), estando situada la tumoración en la zona proximal del estómago (cardias-fundus).

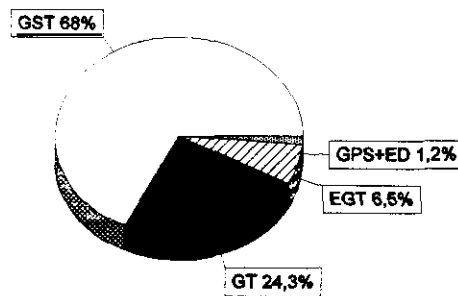


Figura IV.3.- Tipo de resección gástrica

2.- Resultados Anatomopatológicos

2.1.-Macroscópicos

a) **Localización tumoral.** El mayor porcentaje de casos asentó en el antro gástrico (62.8%) y solo un 14,2% se localizaron en la región proximal.

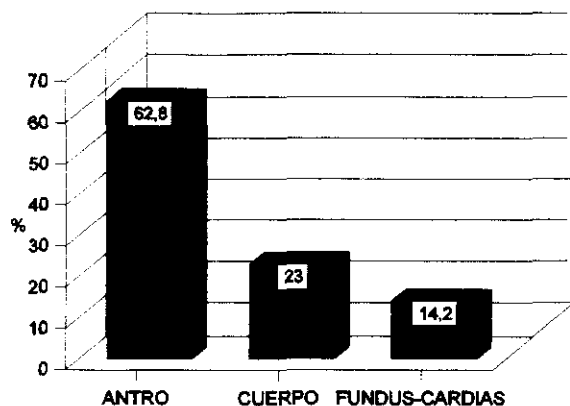


Figura IV.4.- Localización tumoral.

c) Tamaño tumoral.

El tamaño tumoral medio fue de 5.15 ± 0.2 cm. El tumor más pequeño midió 1 cm. y el más grande 9.5 cm.. El 75% de los tumores fue mayor de 4cm., presentándose el 67.4% con adenopatías afectadas y el 100% con afectación de la serosa.

Tamaño cms.	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10
% casos	7,6	18	29,5	23,1	21,8

b) Tipo tumoral. La distribución según la clasificación de Borrmann mostró un predominio de los tumores ulcerados, seguido por los vegetantes e infiltrantes.

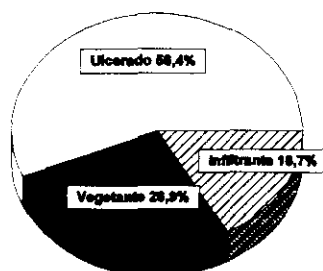


Figura IV.5.- Tipo tumoral.

2.2.- Microscópicos

a) Grado de diferenciación. Los tumores moderadamente (47,4%) y poco (36%) diferenciados fueron los más frecuentes.

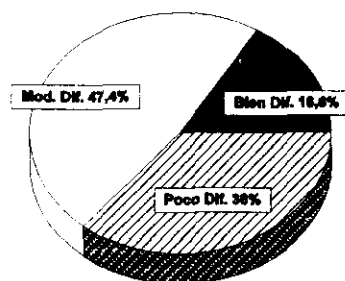


Figura IV.6.- Grado de diferenciación.

b) Clasificación de Lauren

Los tumores de tipo Intestinal fueron los más frecuentes: 53 casos (67.9%), frente al tipo Difuso: 25 casos (32.1%). El tipo difuso fue más frecuente en estadio III, 40.4%, que en estadios I, 16.6% ó II, 25%. El 72.6% de los tumores difusos fueron poco diferenciados, frente al 18.7% de los intestinales.

c) Infiltración

En el 79.5% de los casos la tumoración alcanzó la capa serosa (T3), en el 11.5% afectó la capa muscular (T2) y solo en el 9% la afectación no sobrepasó la submucosa (T1).

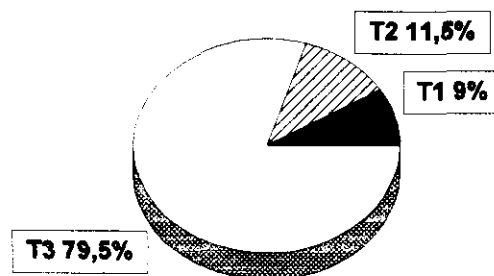


Figura IV.7.- Nivel de Infiltración(T).

d) Metástasis ganglionares

Los casos con ausencia de ganglios metastásicos(N0), fueron 32 (41%) y aquellos con presencia de ganglios metastásicos(N+) 46 casos (59%). El número de ganglios afectados osciló entre 1 y 16, siendo el número máximo de ganglios aislado de 20. La media de ganglios afectados fue de 4.8 ± 3.5 . De los 46 casos N+, 27(63%) tuvieron 4 ó más adenopatías y 17(37%) entre 1 y 3 adenopatías.

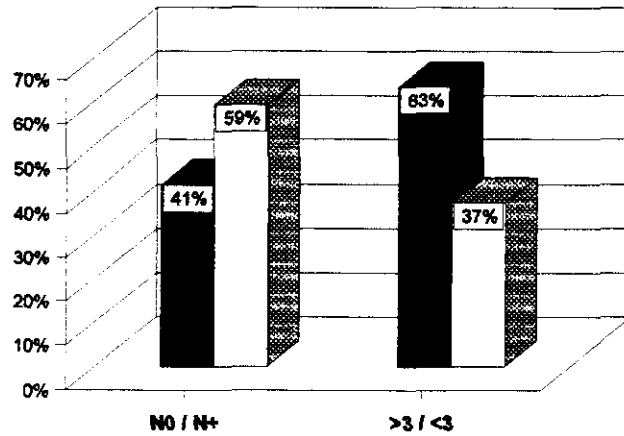


Figura IV.8.- Adenopatías y número.

La frecuencia de afectación ganglionar según la infiltración de la pared fue de 14.3%, 44.5% y 66.1% para los casos T1, T2, y T3 respectivamente.

e) Estadío Tumoral

El estadío tumoral T.N.M. se distribuyó de forma que la mayoría de los casos (53.8%) se presentaron en Estadío III. El 30.8% fueron Estadío II y sólo el 15.4% fueron Estadío I.

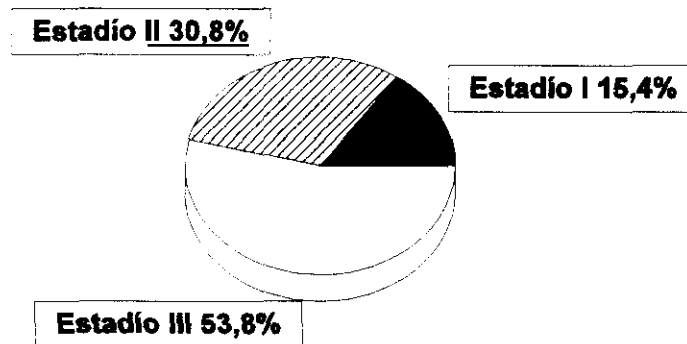


Figura IV.9.- Estadío Tumoral T.N.M.

3.- Supervivencia Y Pronóstico

La supervivencia global de la serie fue del 45.86% a los cinco años. A los 12 meses la supervivencia fue del 79.48%, cayendo a los 24 meses al 61.54%. Posteriormente el descenso fue más gradual.

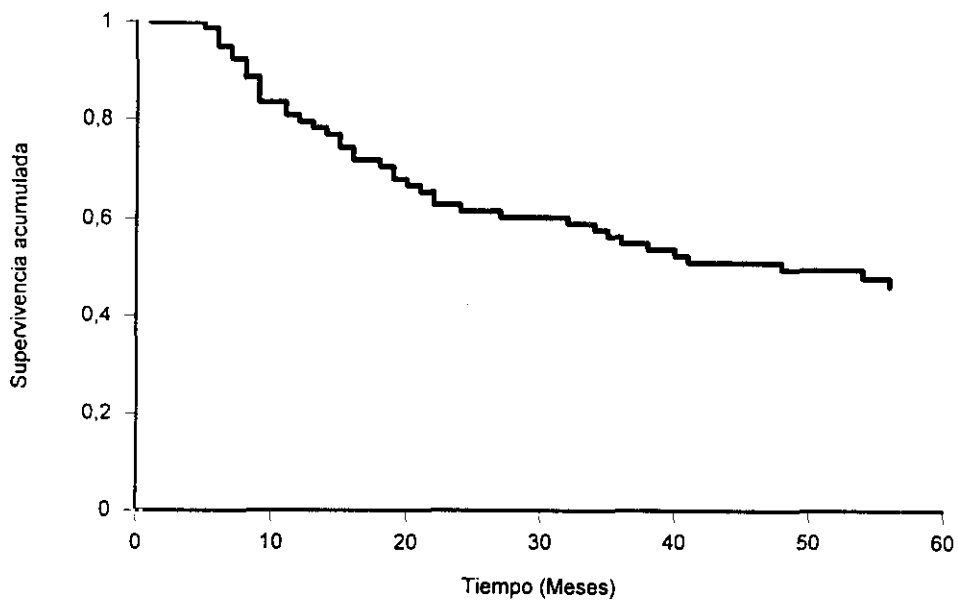


Figura IV.10. Supervivencia global.

La supervivencia en función de las variables analizadas arrojó los siguientes resultados:

- Supervivencia en función del sexo.

No hubo diferencia significativa en la supervivencia ($p= 0.6$). A los cinco años la supervivencia fue de 42.9% para los varones y de 51.9% para las mujeres.

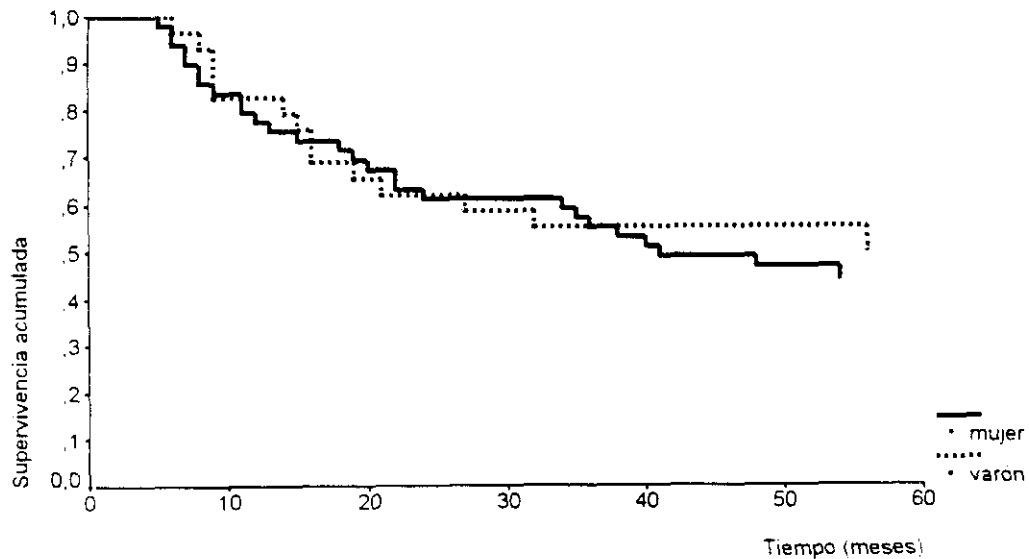


Figura IV.11. Supervivencia según sexo.

- Supervivencia en función de la edad.

No hubo diferencia significativa en la supervivencia ($p= 0.43$). Sin embargo, los pacientes menores de 65 años tuvieron una supervivencia del 68,57% a los dos años y del 50.6% a los cinco años, mientras que aquellos mayores de 65 años tuvieron supervivencias del 56.75% y del 40.49% a los dos y cinco años respectivamente. (Fig. IV.12)

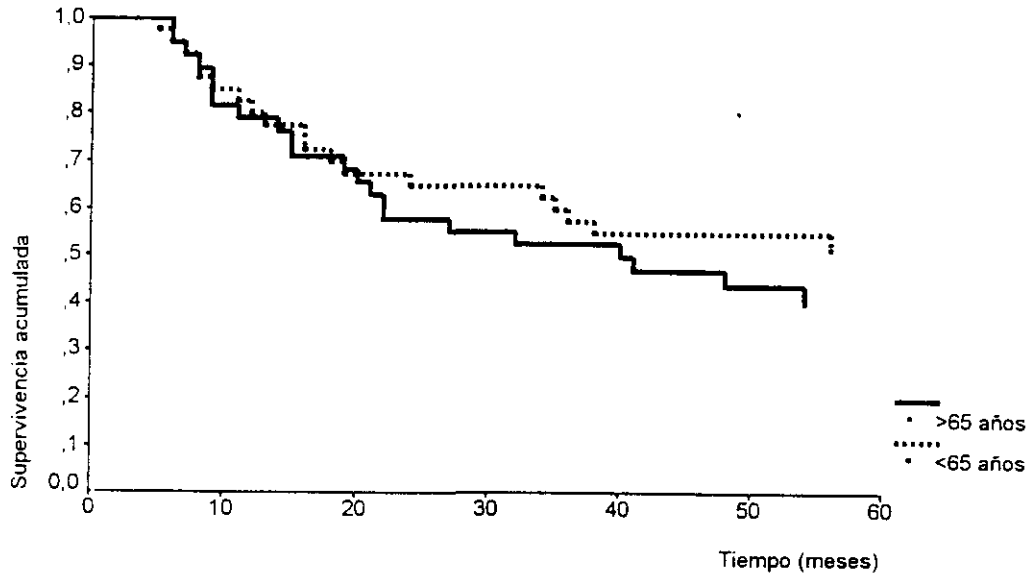


Figura IV.12. Supervivencia según edad.

- Supervivencia en función del tiempo de evolución.

No se encontró relación entre esta variable y la supervivencia ($p= 0.9$).

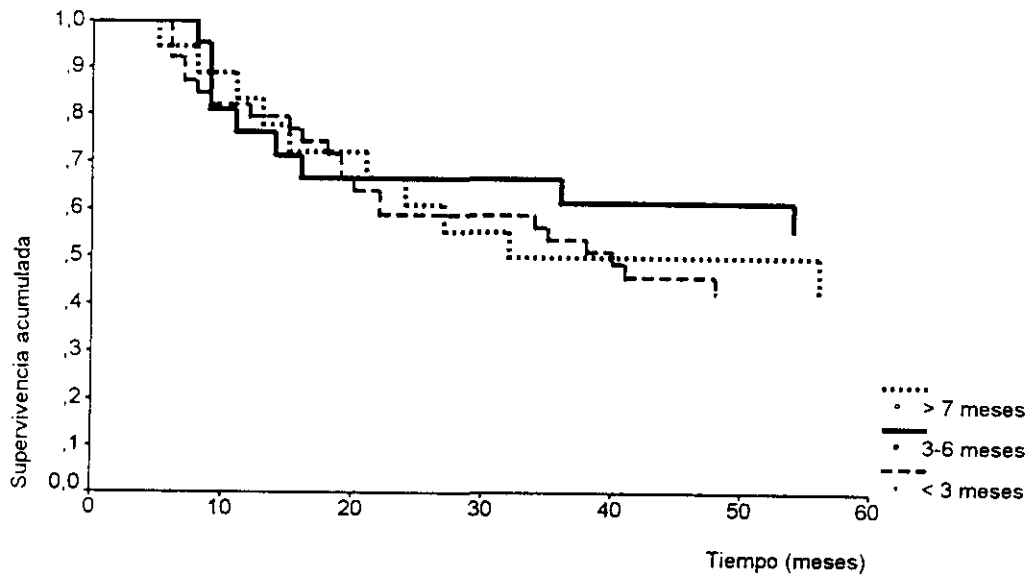


Figura IV.13. Supervivencia y tiempo de evolución.

- Supervivencia en función de la sintomatología.

No se encontró diferencia significativa entre los síntomas clínicos y la supervivencia ($p= 0.6$). No obstante, aquellos pacientes con dolor como sintoma predominante tuvieron una supervivencia a los cinco años del 58.3%, superior a los casos con dispepsia que tuvieron una supervivencia del 46.15%, los casos con hemorragia un 43.75% y aquellos con anemia un 33.3%.

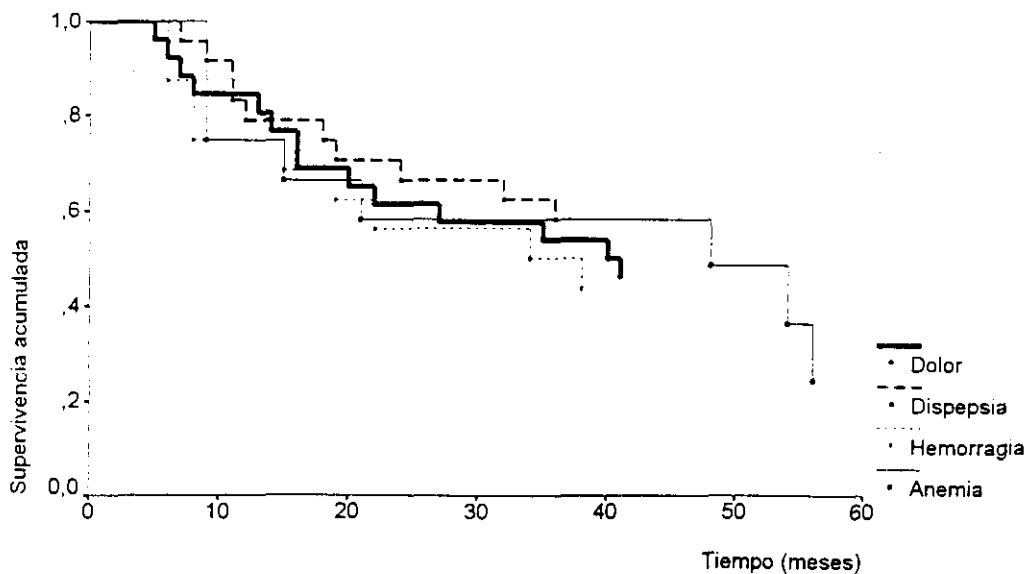


Figura IV.14. Supervivencia según clínica.

- Supervivencia en función de la localización tumoral.

La supervivencia fue mayor para los tumores distales, con significación estadística $p= 0.05$. Al final del estudio permanecían vivos el 55.1% de los pacientes con tumores situados en antro, el 33.3% de los situados en cuerpo gástrico y el 36.3% de los situados en cardias-fundus.

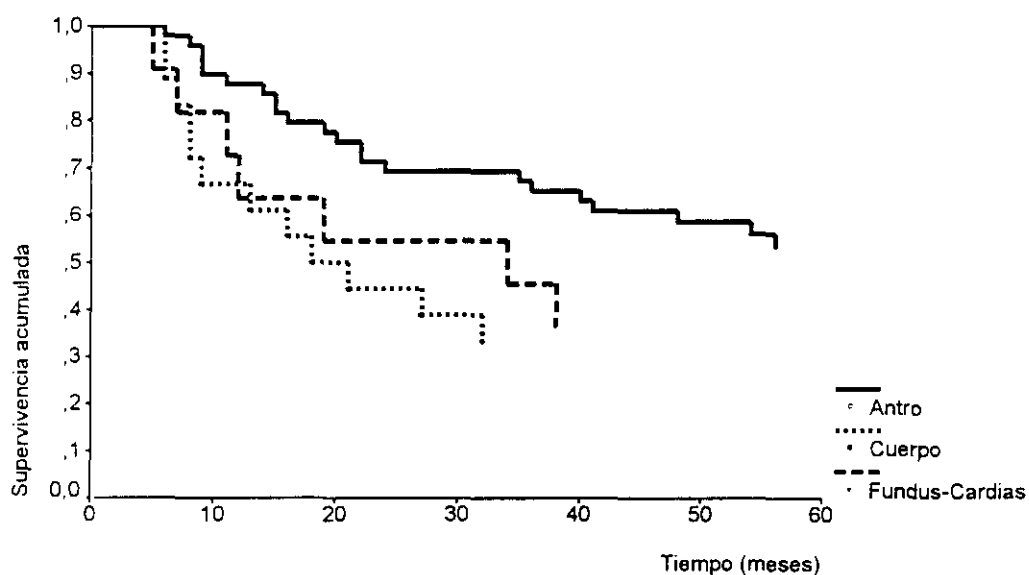


Figura IV.15. Supervivencia y localización tumoral.

- Supervivencia en función del tamaño tumoral.

Los tumores de mayor tamaño tuvieron menor supervivencia, de forma significativa ($p=0,001$). A los 24 meses, la supervivencia fue del 84.8% para los pacientes con tumores menores de 4 cm. y del 43.1% para aquellos con tumores mayores de 4 cm. Al final del estudio permanecían vivos el 66.67% y el 34.09%, respectivamente.

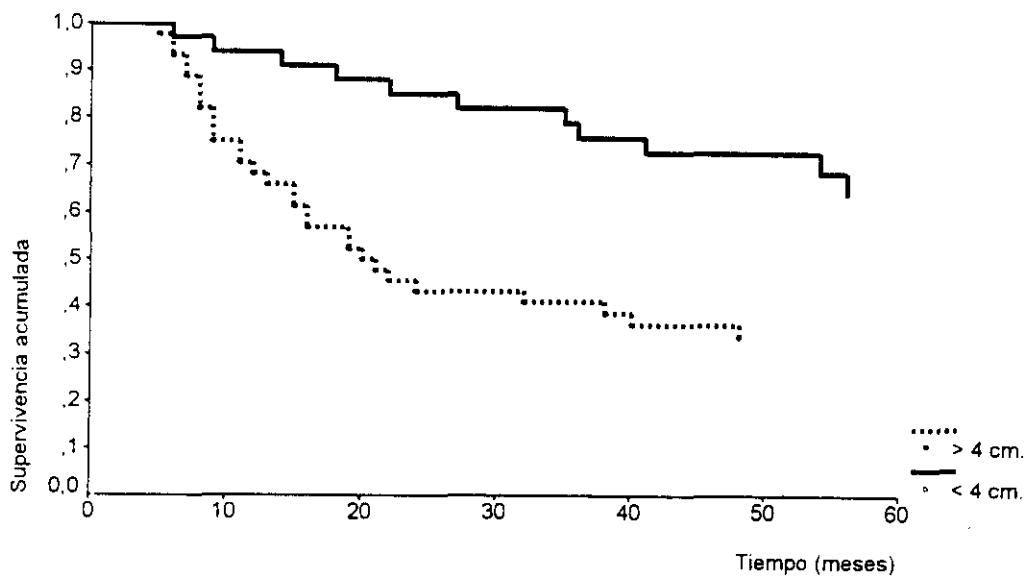


Figura IV.16. Supervivencia y tamaño tumoral.

- Supervivencia en función del tipo macroscópico tumoral.

No hubo diferencias significativas de la supervivencia ($p=0.35$). La mayor supervivencia fue para los tumores ulcerados.

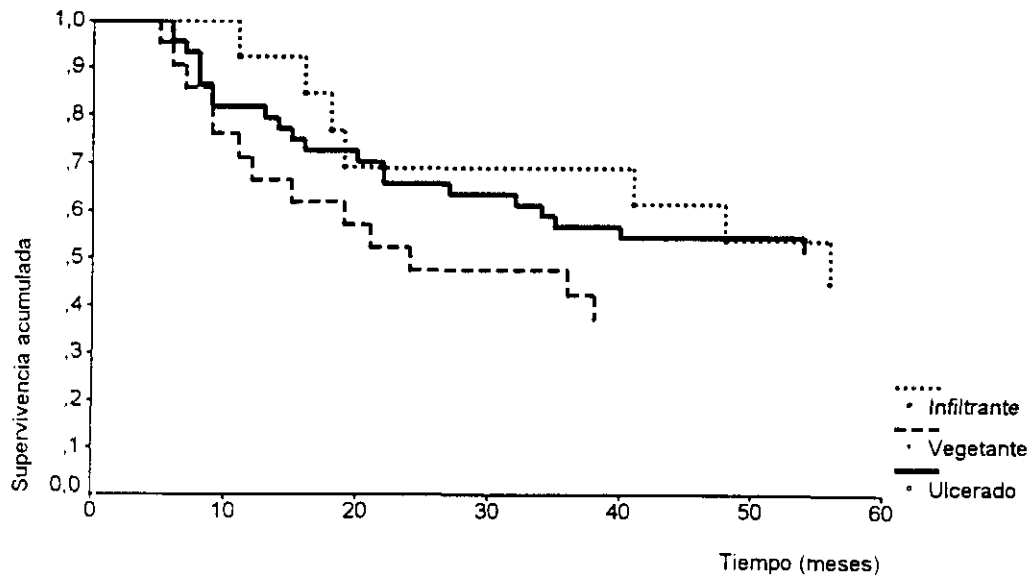


Figura IV.17. Supervivencia y tipo tumoral.

- Supervivencia en función del grado de diferenciación.

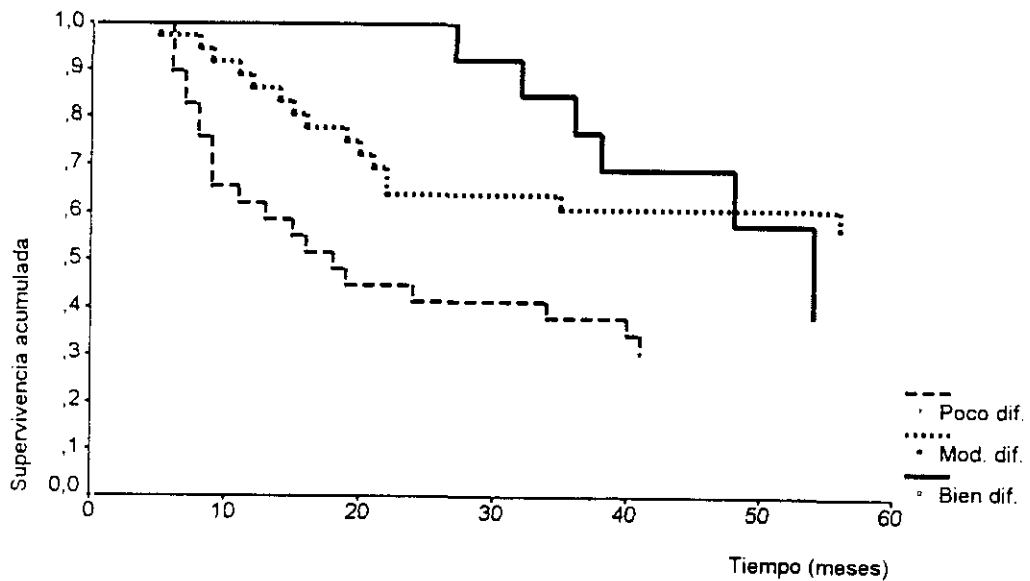


Figura IV.18. Supervivencia y diferenciación.

La supervivencia fue peor para los casos poco diferenciados, de forma significativa ($p=0,02$), con una supervivencia del 32.14% al final del estudio, frente a un 38.5% para los bien diferenciados. y un 55.62% para los moderadamente diferenciados.

- Supervivencia en función de la clasificación de Lauren.

La supervivencia fue significativamente mayor para los casos de tipo intestinal ($p=0.01$). La supervivencia al final del estudio fue de 57.41% para los casos de tipo intestinal y del 25% para los de tipo difuso.

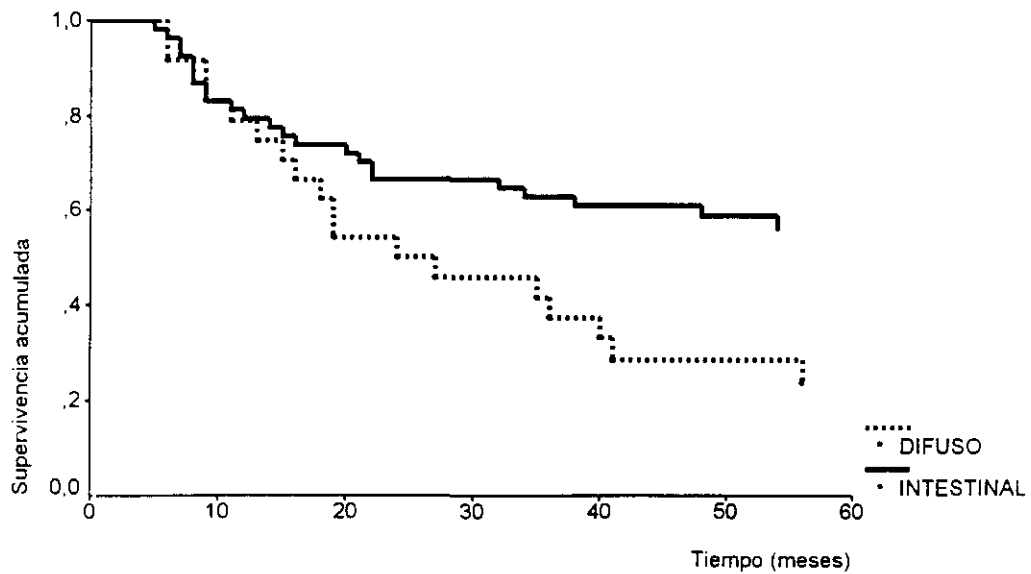


Figura IV.19. Supervivencia y clasificación de Lauren.

- Supervivencia en función de la infiltración tumoral.

Los casos con afectación de la capa serosa tuvieron peor pronóstico de forma significativa ($p=0,001$). Los casos T1 tuvieron una supervivencia al final del estudio del 100%, los T2 del 80% y los T3 del 36.07%. Las supervivencias a los 24 meses fueron del 100% para los T1 y los T2, y del 50.8% para los T3.

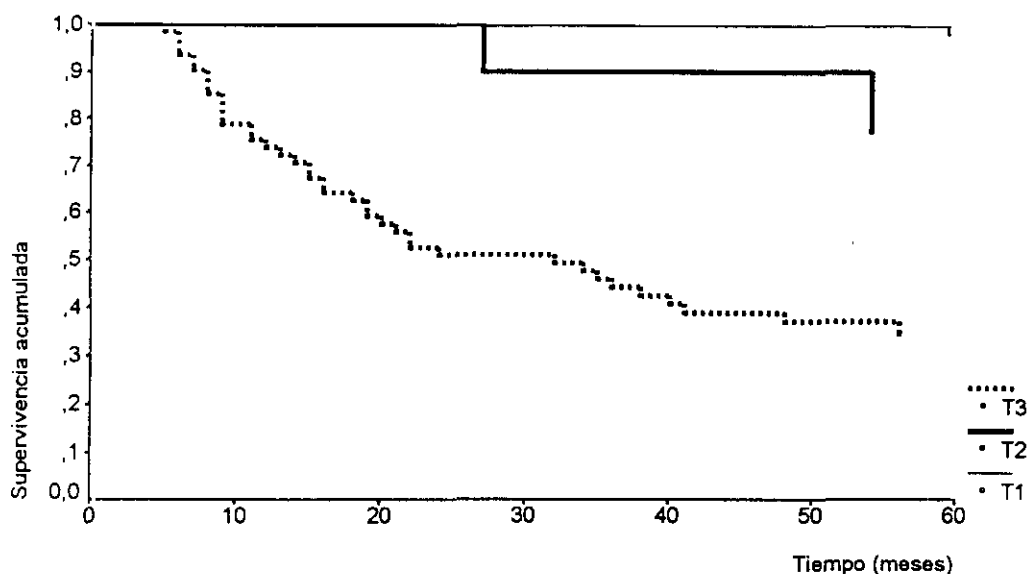


Figura IV.20. Supervivencia e infiltración parietal (T).

- Supervivencia en función de la presencia de adenopatías tumorales.

La presencia de adenopatías tumorales disminuyó la supervivencia de forma altamente significativa ($p=0,0000$). Por otra parte, los casos con más de tres adenopatías afectadas tuvieron menor supervivencia que aquellos casos con menos de tres adenopatías afectadas, de forma significativa ($p=0,01$).

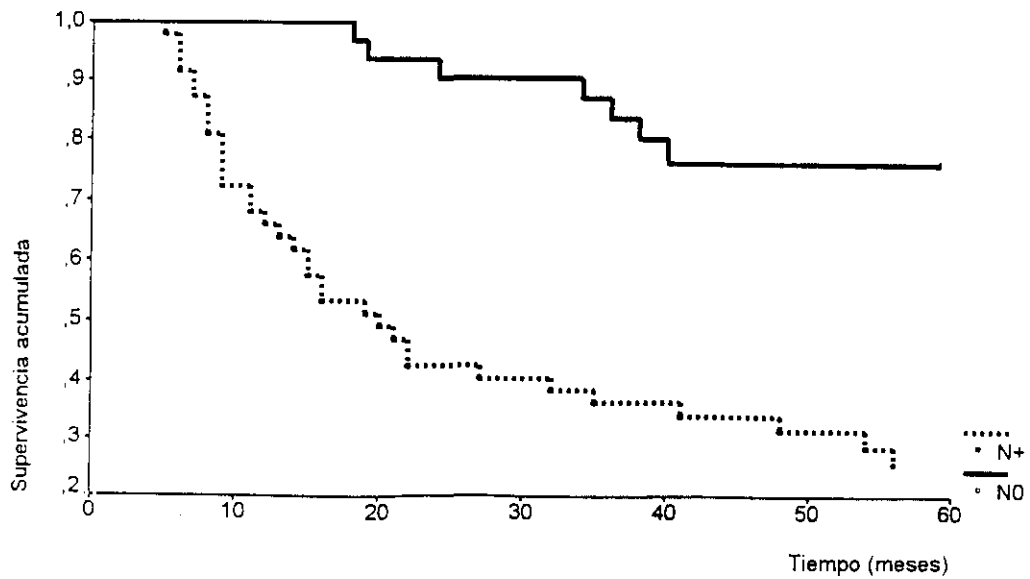


Figura IV.21. Supervivencia y Adenopatías.

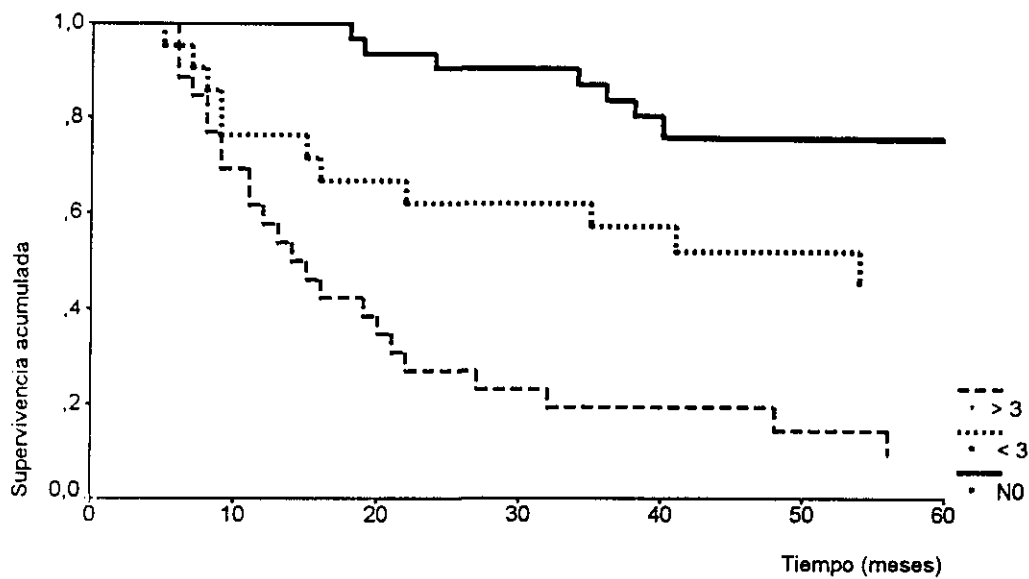


Figura IV.22. Supervivencia y número de Ganglios.

- Supervivencia en función del Estadío tumoral.

Los casos en estadíos más avanzados tuvieron peor pronóstico de forma altamente significativa ($p=0,0000$). Los casos en estadío I tuvieron una supervivencia al final del estudio del 100%, en estadío II del 62.5% y en estadío III del 23.81%. A los 24 meses las supervivencias fueron del 100%, 87.5% y 35.71% para los estadíos I, II y III respectivamente

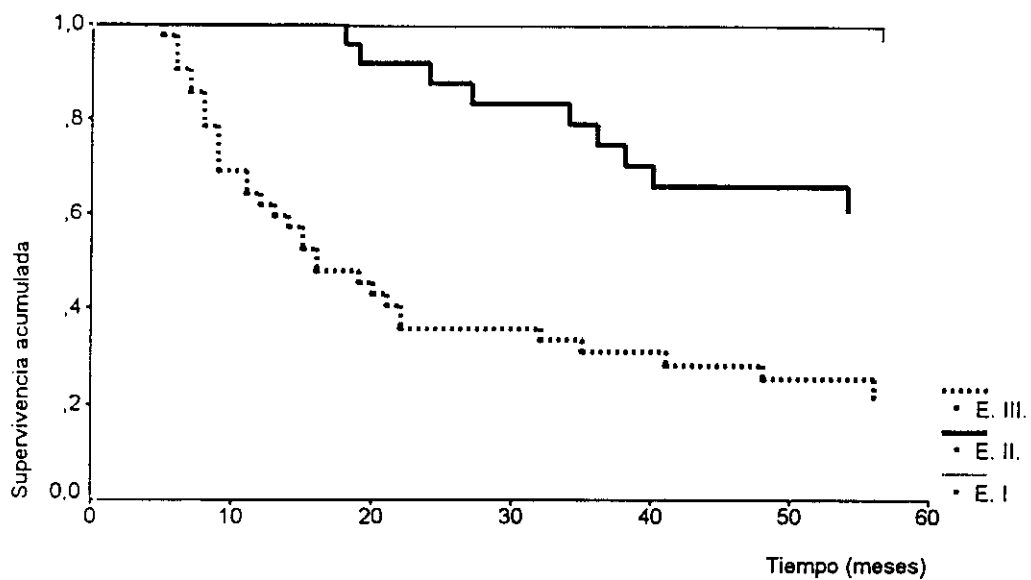


Figura IV.23. Supervivencia y Estadío.

- Supervivencia en función de la técnica quirúrgica.

Las diferencias de supervivencia para gastrectomía subtotal y gastrectomía total no fueron significativas ($p=0.3$). La supervivencia para las gastrectomías polar superior o esófagogastrectomía fue significativamente menor que para las otras técnicas ($p=0.04$). (Fig. IV.24)

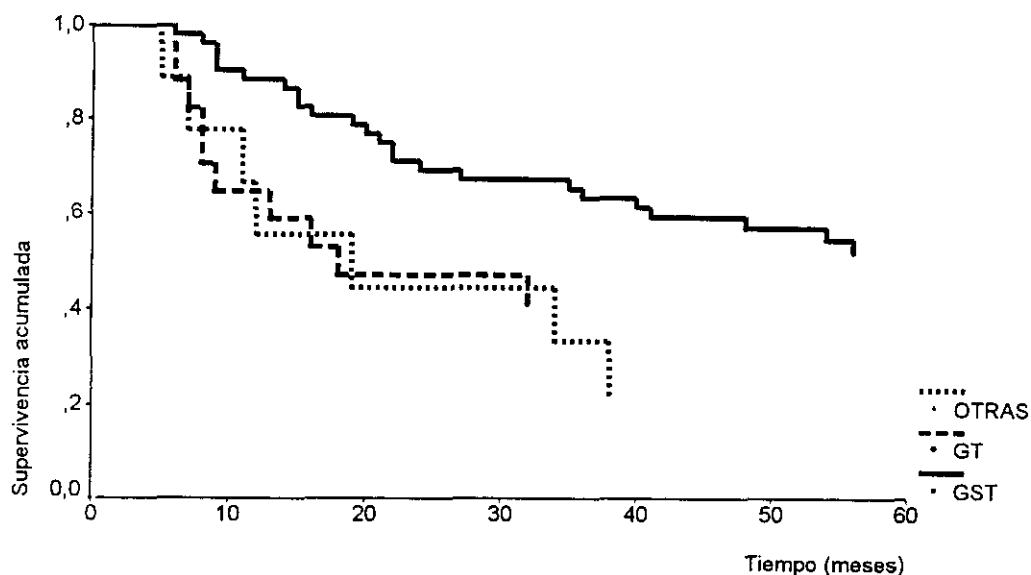


Figura IV.24. Supervivencia según tipo de resección.

4.- Resultados de la Citometría de Flujo

4.1.- Ploidía, Fase Proliferativa

Tumores Diploides: treinta y nueve casos (50%) tenían histogramas que fueron valorados como diploides. Se dividieron en dos grupos (Fig.IV.25):

- Tumores Diploides con Fase proliferativa normal:

Los tumores valorados como diploides normales fueron 23 casos (29.48%). La media del índice de ADN fue de 1.06 ± 0.12 . La media de la fase S fue de $14.6 \pm 1\%$ y la del coeficiente de variación de 8.5 ± 2.9 .

- Tumores Diploides con Fase proliferativa alta:

Los histogramas diploides con fase proliferativa alta fueron 16 casos (20,51%). La media del índice de ADN fue de 1.02 ± 0.10 . La media del coeficiente de variación fue de 7.7 ± 1.7 . La media de la fase S fue de $30.8 \pm 1.3\%$.

. Tumores Aneuploides

Los histogramas aneuploides fueron 39 casos (50%). La media del índice de ADN ha sido de 1.6 ± 0.5 . La media de los coeficientes de variación fue de 8.4 ± 3.6 .

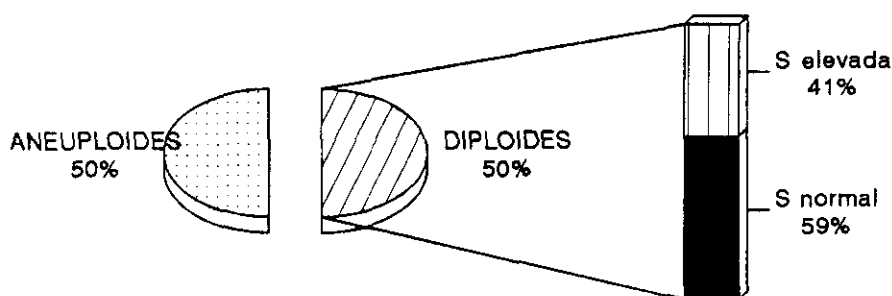


Figura IV.25.

4.2.- Correlación de la Ploidía con los Datos Clinicopatológicos.

Los datos correlativos se muestran en la Tabla III. La edad ($p=0.3$), tiempo de evolución ($p=0.24$) o síntomas clínicos ($p=0.5$), no se asociaron con el contenido en ADN. El sexo de los pacientes tampoco mostró diferencias significativas en relación a la ploidía, aunque las mujeres tuvieron tumores aneuploides en un 60.7% y los varones en un 44%.

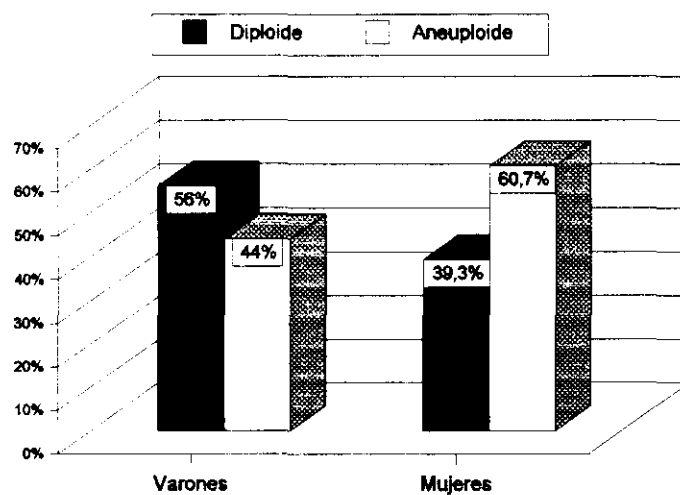


Figura IV.26.- Distribución Ploidía-Sexo.

TABLA III

VALORACION DE LA PLOIDIA

FACTORES	Diploides (%)	Aneuploides (%)	p	Significación
Edad <65 >65	47 53.3	53 46.7	0.3	n.s.
Sexo V M	56 39.3	44 60.7	0.23	n.s.
Loc. Tumoral Prox. Med. Distal	54.5 39 53	45.5 61 47	0.5	n.s.
Tamaño Tumor <4 cm. >4 cm.	40 54.3	60 45.7	0.3	n.s.
Tipo Macrosc. Ulcerado Vegetante Infiltrante	40 67 58.3	60 38 41.7	0.1	n.s.
Diferenciación Bien Moderada Poca	38.5 56.7 46.4	61.5 43.3 53.6	0.4	n.s.
Lauren Intestinal Difuso	52.8 44	47.2 56	0.6	n.s.
Infiltración T1 T2 T3	57 44.4 50	43 55.6 50	0.8	n.s.
Adenopatías No Sí	62.5 41.3	37.5 58.7	0.07	m.s.
Estadío I II III	50 62.5 42.9	50 37.5 57.1	0.3	n.s.

Desde el punto de vista macroscópico, ni el tamaño del tumor ($p=0.3$), ni la localización tumoral ($p=0.3$), se relacionaron con la ploidía de forma significativa, aunque los tumores localizados en el cuerpo gástrico, fueron con más frecuencia aneuploides (Fig. IV.27).

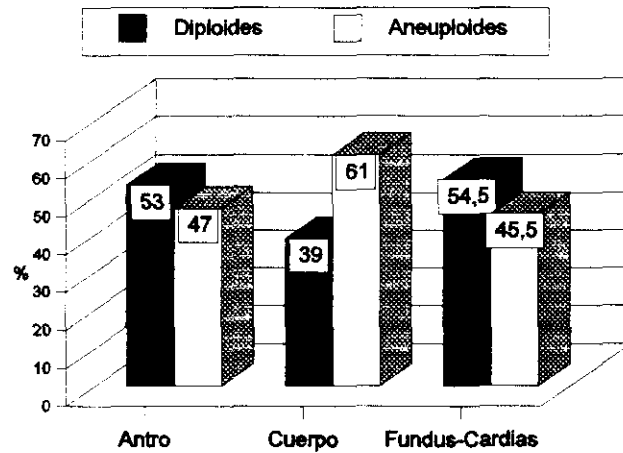


Figura IV.27.- Localización tumoral y Ploidía.

No se encontró una correlación significativa entre el tipo tumoral y la ploidía ($p=0.1$), aunque los tumores vegetantes mostraron escasa tendencia a la aneuploidía (33.3%), frente a los ulcerados (60%) e infiltrantes (41.7%).(Fig. IV.28).

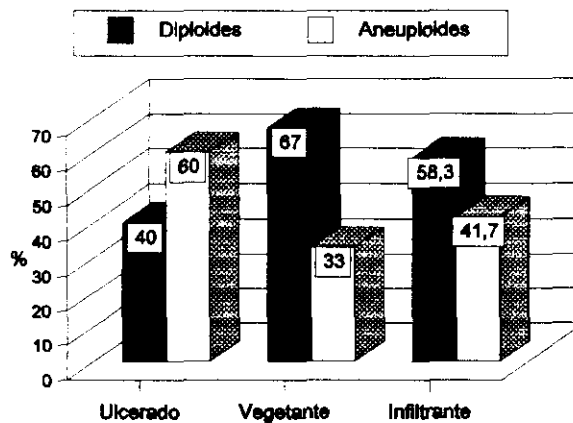


Figura IV.28.- Tipo tumoral y Ploidía.

Los tumores bien diferenciados fueron con mayor frecuencia aneuploides (61.5%) que los poco diferenciados (53.6%), pero no hubo diferencias significativas ($p=0.4$), como se representa en la figura IV.29.

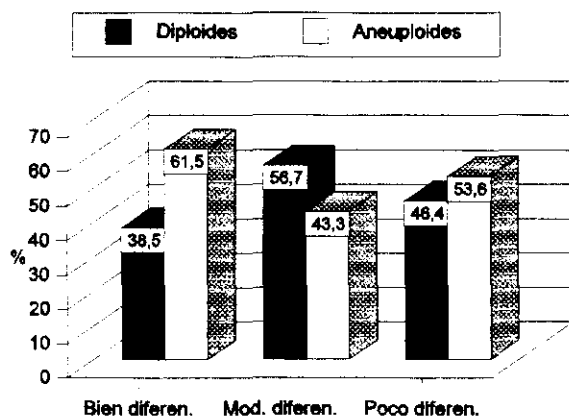


Figura IV.29.- Grado de diferenciación y Ploidía.

La clasificación de Lauren ($p=0.6$), el grado de infiltración tumoral ($p=0.8$) y el estadio tumoral ($p=0.3$) no guardaron correlación con la ploidía.

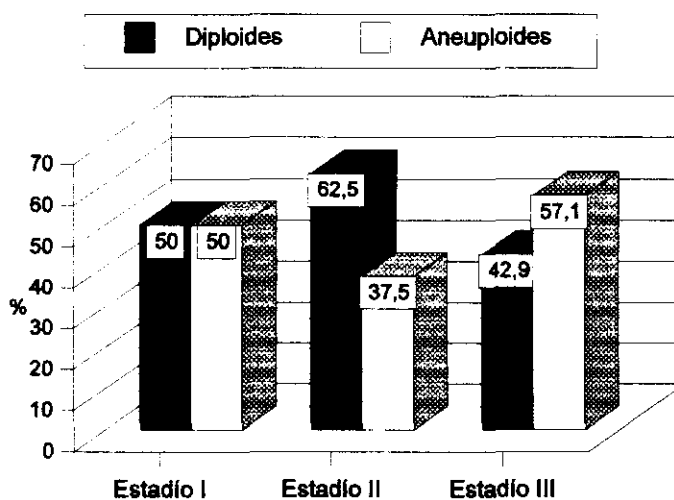


Figura IV.30.- Estadio T.N.M. y Ploidía.

La afectación ganglionar se asoció con mayor grado de aneuploidía de manera casi significativa ($p=0.07$). Así las muestras con afectación ganglionar fueron aneuploides en un 58.74%, y las muestras sin afectación ganglionar lo fueron en un 37.5%, como se representa en la Figura IV.31. El número de ganglios afectados no se relacionó con la ploidía ($p=0.6$).

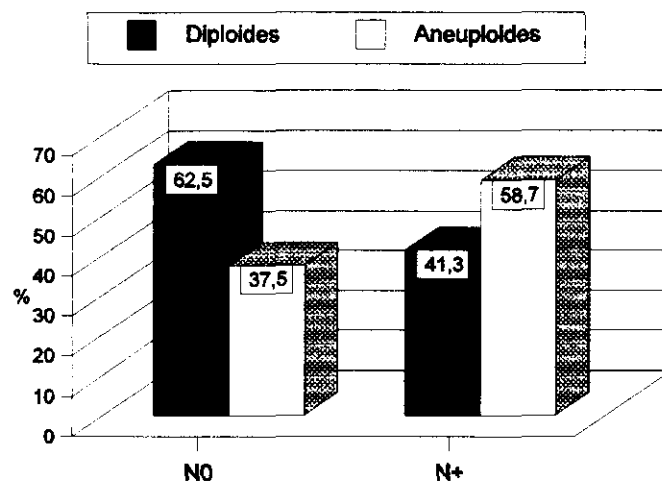


Figura IV.31.- Adenopatías y Ploidía.

4.3.- Correlación de la Fase "S" con los Datos Clínicos y Patológicos

Con respecto a la fase proliferativa, los tumores diploides localizados en el cuerpo gástrico, mostraron con mayor frecuencia una fase S elevada en relación a los situados en los tercios proximal o distal con significación $p=0,01$.(Figura IV.32)

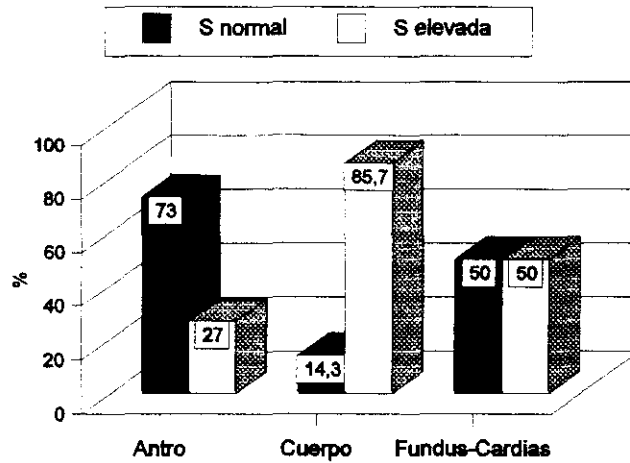


Figura IV.32.-Localización tumoral y fase S.

Los tumores de mayor tamaño mostraron una fase S elevada con mayor frecuencia que los más pequeños, de forma significativa ($p=0,01$). El resto de las variables no se asoció de forma significativa con la presencia de una fase S elevada (Tabla IV). La fase proliferativa de los tumores ($21,6 \pm 1,1\%$) fue más alta que la de los controles no tumorales ($16,6 \pm 2,8\%$).

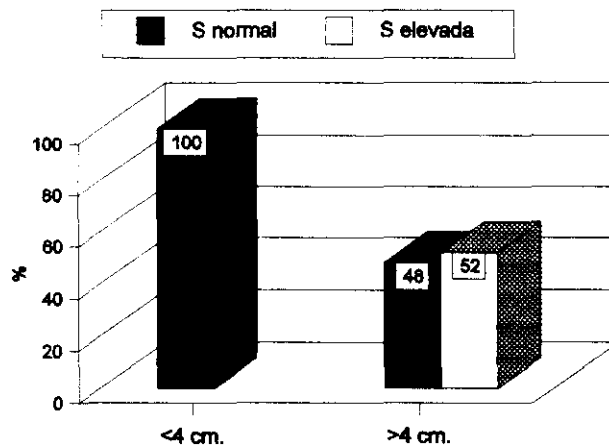


Figura IV.33.- Tamaño tumoral y fase S.

TABLA IV

VALORACION DE LA FASE PROLIFERATIVA "S"

VARIABLES	p	
EDAD	0.6	n.s.
SEXO	0.5	n.s.
TAMAÑO TUMOR	0.01	
LOCALIZACION	0.01	
DIFERENCIACION	0.6	n.s.
INFILTRACION	0.6	n.s.
ADENOPATÍAS	0.8	n.s.
LAUREN	0.9	n.s.
SUPERVIVENCIA	0.4	n.s.

4.4.- Supervivencia Y Pronóstico

La supervivencia para los pacientes con tumores aneuploides fue significativamente menor que para los casos diploides ($p=0.04$). Actualmente permanecen vivos el 35,9% de los casos aneuploides y el 58,9% de los casos diploides. A los 24 meses la supervivencia fue del 69.23% para los casos diploides y del 53.85% para los casos aneuploides.

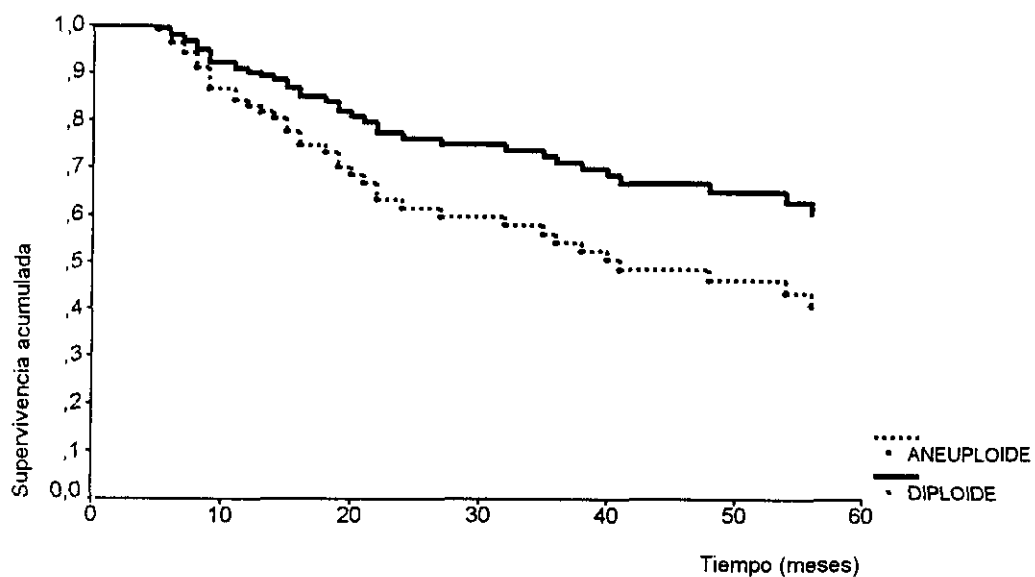


Figura IV.34.- Supervivencia y ploidía.

Al analizar la supervivencia de los tumores distales en función de la ploidía, se observa una diferencia significativa ($p=0.03$). Los tumores distales de tipo diploide tuvieron mejor supervivencia que los aneuploides de la misma localización.(Fig. IV.35)

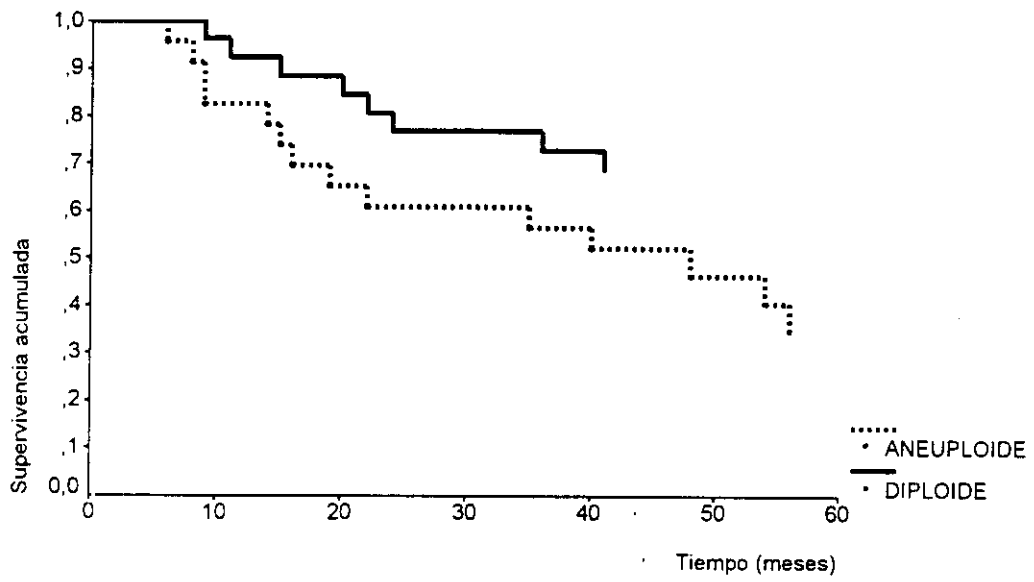


Figura IV.35. Supervivencia y ploidía, para tumores distales.

La supervivencia para los tumores diploides en función del valor de la fase S no mostró diferencias significativas ($p= 0.5$).

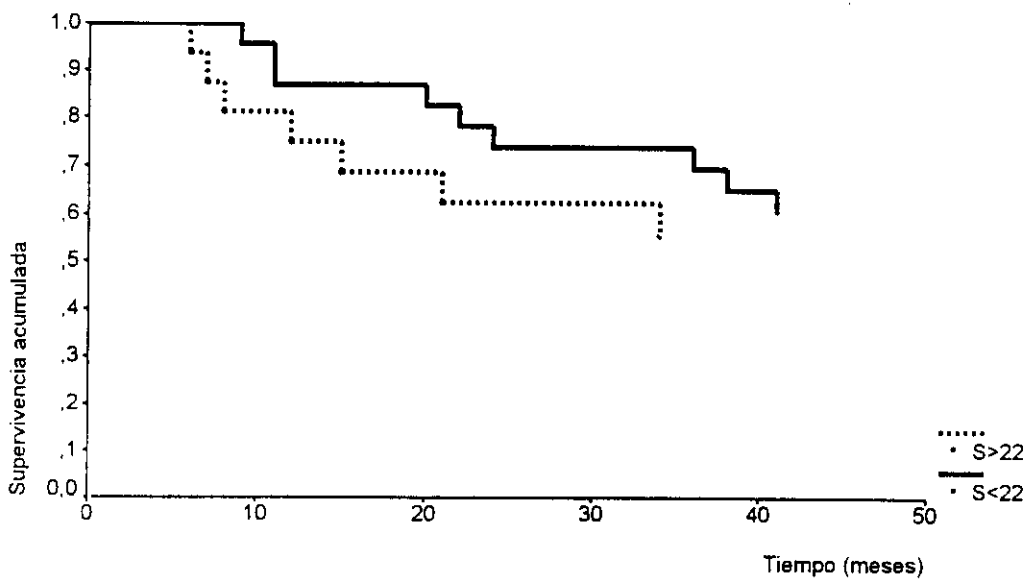


Figura IV.36. Supervivencia y fase S.

5.- Análisis Multivariado

En los análisis estadísticos se observa una estrecha relación de la supervivencia con el estadio tumoral ($p=0.0000$), la presencia de adenopatías tumorales ($p=0.0000$) y número de ganglios afectados ($p=0.01$), la afectación de la capa serosa ($p=0.001$), el tamaño tumoral ($p=0.001$), el grado de diferenciación ($p=0.02$), la clasificación de Lauren ($p = 0,01$), el tipo de resección gástrica ($p=0.04$), la ploidía ($p=0.04$) y, finalmente, la localización tumoral ($p=0.05$). En el análisis multivariado, el estadio tumoral ($p=0.0009$), la presencia de adenopatías ($p=0.01$) y la ploidía ($p=0.08$) son las variables que tienen más influencia sobre la supervivencia (TABLA V).

TABLA V
SUPERVIVENCIA.

Variables	Probabilidad (Univariado)
Estadio tumoral	0.0000
Presencia de adenopatías	0.0000
Número de adenopatías	0.01
Infiltración (T)	0.001
Tamaño tumoral	0.001
Clasificación de Lauren	0.01
Grado de diferenciación	0.02
Ploidía	0.04
Tipo de resección gástrica	0.04
Localización tumoral	0.05
Variables	Probabilidad (Multivariado)
Estadio	0.0009
Presencia de adenopatías	0.01
Ploidía	0.08

DISCUSSION

En las últimas décadas se ha producido una disminución en la incidencia de CG a escala mundial si bien las cifras de supervivencia han variado muy poco (206,207). De ahí que se sigan investigando los factores que intervienen en el pronóstico. Durante estos años se han analizado un gran número de factores clínicos, patológicos y terapéuticos, buscando determinar su influencia en el pronóstico del cáncer gástrico. Hasta el momento, los resultados de estos estudios, sin duda abundantes, no son totalmente homogéneos y, frecuentemente, son contradictorios, tanto cuando se comparan unos con otros, como cuando se comparan entre sí.

Los factores más frecuentemente analizados son: la edad y el sexo, la clínica y el tiempo de evolución, la localización y el tamaño tumoral, el tipo histológico y el grado de diferenciación celular, el estadio y, finalmente, la actitud terapéutica, tanto en relación a la técnica quirúrgica como a la asociación de tratamientos coadyuvantes.

En este estudio, se ha pretendido determinar la importancia pronóstica de estos factores sobre un grupo de pacientes con carcinoma gástrico intervenidos con intención curativa entre 1986 y 1992. Además, hemos estudiado la importancia de la determinación, mediante Citometría de flujo, del ADN tumoral y la fase proliferativa "S", correlacionando los datos con los otros factores pronósticos. Finalmente, hemos intentado, mediante el uso de test estadísticos multivariados, conocer la importancia pronóstica de los distintos factores.

En la discusión de nuestros resultados seguiremos, por tanto, este esquema de exposición.

A.- Discusión general de la serie

Los **datos descriptivos** de nuestra serie, son semejantes a los referidos en otros trabajos. En cuanto a la edad del diagnóstico, se observa que actualmente es superior a la referida en la década 1940-1950 ⁽²⁰⁸⁾, siendo en nuestros pacientes de 67.2 años. La distribución por sexo muestra una preponderancia del sexo masculino con una relación de 1.8:1 con respecto al sexo femenino, como ya ha sido publicado⁽⁸⁵⁾.

La sintomatología clínica se ha manifestado fundamentalmente como dolor abdominal o dispepsia inespecífica, siendo menos frecuente la anemia o hemorragia como muestran otras series ^(106,209,210). Casi el 80% de nuestros pacientes fueron diagnosticados antes de 6 meses del inicio de la sintomatología.

La localización tumoral ha seguido una distribución con predominio antral (62.8%) pero con una frecuencia de situación corporal del 26.9% y en cardias-fundus del 16.7%. Estos datos son concordantes con otras publicaciones en la que se pone de manifiesto un aumento de frecuencia para los tumores situados en la porción proximal del estómago^(77,211). El tamaño tumoral medio de nuestra serie fue de 5 cm, observando que estaba en relación con la profundidad de invasión, la presencia de adenopatías y el estadio tumoral.

El tipo tumoral según la clasificación de Borrmann⁽⁷⁹⁾, ha mostrado un predominio de los tumores ulcerados seguido por los de tipo polipoide e infiltrante coincidiendo con otros datos ya publicados^(82,212).

Para el estudio histológico se ha seguido la clasificación de Lauren⁽⁸⁸⁾ (intestinal y difuso), que sirve de base a la mayoría de los trabajos, debido a la buena correlación con la diferenciación y con el pronóstico. Así, el tipo intestinal suele asociarse con buena diferenciación y el difuso con los mal diferenciados⁽²¹³⁾. En esta serie se encuentran un 67.9% de tipo intestinal y un 32.1% de tipo difuso, con un 64% de tumores moderadamente o bien diferenciados y un 36% de tumores poco diferenciados. Estos datos contrastan con los de Armstrong y Elias, que muestran una mayor incidencia de las formas menos diferenciadas^(86,87).

Respecto al grado de infiltración tumoral, encontramos 62 casos (79.5%) con afectación de la serosa, 9 casos con infiltración hasta la capa muscular (11.5%) y 7 limitados a la mucosa (8.9%). El número de pacientes con metástasis ganglionares fue de 47 (60.2%). De acuerdo al estadiaje según la clasificación T.N.M.⁽⁹⁹⁾, el 15.4% de nuestros pacientes estaba en estadio I, el 30.8% en estadio II y el 53.8% en estadio III, encontrándose estas cifras dentro de los límites de las series publicadas en Occidente^(214,215,216). En las series Japonesas, sin embargo, predominan los casos menos avanzados, llegando el número de pacientes con cáncer gástrico precoz hasta un 40-60%⁽²¹⁷⁾.

Al analizar la **supervivencia de nuestra serie** en función de los datos recogidos, no hemos encontrado diferencia entre los grupos de mayor o menor **edad** ($p=0.43$), aún cuando los pacientes menores de 65 años tuvieron mejor supervivencia que los mayores de 65 años. La literatura muestra controversia al respecto. Se ha afirmado que: la edad no tiene influencia en el pronóstico del CG^(109,218), que la supervivencia es menor en pacientes jóvenes que en ancianos⁽¹¹⁰⁾ y también lo contrario⁽¹⁴⁵⁾. En nuestra casuística había solamente cinco pacientes menores de 50 años, lo que podría explicar la falta de diferencia en la supervivencia.

En relación al **sexo** no hemos recogido diferencia de comportamiento pronóstico. Un estudio de Armstrong⁽⁸⁶⁾ muestra mayor supervivencia, de forma significativa, entre las mujeres, mientras que el trabajo de Moertel refleja unos mejores resultados en los varones⁽²¹⁹⁾. Finalmente, otros trabajos no describen diferencias de la supervivencia en relación al sexo^(85,145,218).

En cuanto al **tiempo de evolución** de la sintomatología, su influencia en el pronóstico es controvertida. Barber observa mayor sobrevida en pacientes con sintomatología superior a seis meses⁽²²⁰⁾ y Meyers⁽⁷⁷⁾ y Holburt⁽¹⁰⁷⁾, por el contrario, encuentran peor pronóstico. En nuestra serie coincidimos con los grupos que no señalan diferencias en relación con el tiempo de evolución^(85,109,173).

Respecto a la **sintomatología**, tampoco hemos observado diferencias evolutivas, si bien los portadores de dolor como síntoma predominante, tuvieron mayor supervivencia, como ya se ha señalado⁽¹⁰⁶⁾.

Los **factores relacionados con el tumor** son los de mayor importancia pronóstica, especialmente en relación a la **localización, el tamaño, el tipo tumoral, el grado de diferenciación, el tipo histológico, la invasión parietal, la presencia de adenopatías y su número y el estadio tumoral**.

La **localización tumoral** en el antro gástrico supone una mejor supervivencia de forma significativa, como recogen las series de Delgado⁽⁷⁸⁾, Calpena⁽⁸⁵⁾, Diehl⁽²¹⁴⁾, Moreno⁽²²¹⁾ y Lavin⁽²²²⁾. Nuestros datos mostraron el mismo resultado. Algunos autores han explicado este hallazgo en base a que los tumores distales tendrían una sintomatología más precoz, o bien a la mayor facilidad para la extensión linfática de los tumores más proximales^(78,85,223).

El **tamaño tumoral** medio de esta serie fue de 5 cm.. Hemos encontrado peores índices de supervivencia, de forma significativa, para los tumores mayores de esta cifra ($p=0.001$). Las series consultadas señalan una relación inversa, estadísticamente significativa, entre el tamaño tumoral y la supervivencia. Sin

embargo, hay grandes diferencias respecto a los intervalos de medida que marcan la diferencia pronóstica. Así, Maruyama⁽²²⁴⁾ lo señala para los tumores menores de 2 cm. con respecto a los mayores de 4 cm., y Baba⁽²²⁵⁾ para los tumores hasta 8 cm. y mayores de 12 cm. Sin embargo, otros estudios no encuentran relación del tamaño tumoral con la supervivencia^(78,234). El tamaño del tumor está en relación con la profundidad de la invasión y con la posibilidad de metástasis linfáticas. Así, en nuestra serie, el 100% de los tumores mayores de 4 cm. eran T3 y el 67.4% tenían adenopatías positivas.

En cuanto al **tipo macroscópico de tumor**, en general se describe una mayor supervivencia en los tumores ulcerados y vegetantes, respecto a los de tipo infiltrante^(227,228). No obstante, las series de Delgado Gomis⁽⁷⁸⁾ y Arveux⁽²²⁹⁾ no encuentran influencia del tipo tumoral sobre el pronóstico. En nuestra serie no se han constatado diferencias significativas de la supervivencia en relación al tipo tumoral. Es importante señalar que en nuestra casuística fueron excluidos los pacientes con tumores grado IV de Borrmann por considerar que no se realizaba exéresis con intención curativa. Este dato, podría variar la influencia de los tumores infiltrantes en el pronóstico.

En relación al **grado de diferenciación tumoral**, encontramos una supervivencia significativamente mayor en los tumores bien diferenciados con respecto a los poco diferenciados ($p=0.02$), al igual que otros autores^(78,86,87,144). No obstante, otras publicaciones no muestran influencia significativa del grado de diferenciación^(85,109). El factor subjetivo que caracteriza a estos criterios, podría influir en los resultados. De hecho, el hallazgo en nuestra serie de mejores índices de supervivencia en los casos moderadamente diferenciados sobre los bien diferenciados, podría ser explicado de esta manera.

La supervivencia para los pacientes con tumores de tipo intestinal en la **clasificación de Lauren**⁽⁸⁸⁾, fue significativamente mayor que para los de tipo difuso ($p=0.01$), como muestran las series de Muñoz^(91,92), Davessar⁽²³⁰⁾ y Hermanek⁽²³¹⁾. Este último autor, encuentra que la influencia pronóstica de la

clasificación de Lauren es mayor en los casos más avanzados. En nuestra serie, la mayor frecuencia del tipo difuso (40.4%) fue para los tumores en estadio III, frente al 16.7% para el estadio I. Dato semejante al señalado por Iriyama⁽²³²⁾, que sugiere que el carcinoma gástrico de tipo difuso es una forma avanzada de enfermedad, relacionada con la profundidad de la invasión de la pared. Algunos estudios no han encontrado valor pronóstico a la clasificación de Lauren, justificando este hecho por que la utilización de amplios márgenes de resección quirúrgica en los tumores difusos supondría el control local del proceso^(233,234).

También, hemos encontrado una clara relación entre la clasificación de Lauren y el grado de diferenciación tumoral, al igual que Yu⁽⁸³⁾ y Haugstvedt⁽²²⁷⁾, de tal forma que el 72.6% de los tumores difusos eran poco diferenciados, mientras que solo lo fueron el 18.7% de los intestinales. Estos hallazgos explicarían también las diferencias de supervivencia encontradas.

La **invasión en profundidad** de la pared gástrica es un factor pronóstico de primer orden. En nuestra serie, hemos obtenido una significativa relación entre la supervivencia y el grado de crecimiento parietal ($p=0.001$), al igual que han señalado otros autores^(79,85,86,87,229,234,235,236,237,238). De la misma manera, la **afectación ganglionar** se acompaña del máximo valor pronóstico ($p=0.0000$), como señalan las series citadas. Existe también una significativa relación pronóstica en función del número de ganglios afectados ($p=0.01$), de tal manera que la supervivencia tardía pasa del 45 al 10% en función de que el número de ganglios afectados sea menor o mayor que tres. Otros autores han obtenido los mismos hallazgos^(78,86,229). Mendes de Almeida⁽²³³⁾ publica, recientemente, un trabajo en el que propone grupos de diferente pronóstico en función del número de ganglios afectados y de la proporción ganglios totales/ganglios afectados, independientemente de la localización de las adenopatías.

Finalmente, como consecuencia de los datos antes referidos, el **estadio tumoral**, de acuerdo a la clasificación T.N.M., es un criterio de valor pronóstico

absoluto ($p=0.0000$), coincidiendo nuestros resultados con los descritos en otros estudios^(79,85,86,87,229,234,235,236,237,238).

La **técnica quirúrgica** ha obtenido también valor pronóstico en este estudio ($p=0.04$). Al igual que otros autores^(87,109,147,226) hemos obtenido una supervivencia claramente superior en el grupo de los pacientes tratados con gastrectomía subtotal, que en su mayoría corresponden a portadores de tumores localizados a nivel antral.

2.- Discusión de la Citometría de Flujo

En los últimos años se vienen realizando numerosos estudios de citometría sobre tumores sólidos como herramienta para detección y como potencial indicador del pronóstico⁽²³⁹⁾. La principal aplicación clínica de la citometría en el campo de los tumores sólidos, es el estudio del contenido de ADN y el ciclo celular, relacionando la aneuploidía y la presencia de una fase proliferativa "S" elevada con una supervivencia pobre, mayor riesgo de recidiva y menor intervalo libre de enfermedad⁽¹⁸⁵⁾. Así, se ha confirmado para el carcinoma colorectal⁽²⁴⁰⁾, de mama⁽²⁴¹⁾, de vejiga⁽²⁴²⁾, de próstata⁽²⁴³⁾, el melanoma⁽²⁴⁴⁾, de ovario y de endometrio⁽²⁴⁵⁾. Parece haber una correlación más débil, que se continúa estudiando, en los tumores del sistema nervioso⁽²⁴⁶⁾, de pulmón⁽²⁴⁷⁾, de tiroides⁽²⁴⁸⁾, de páncreas⁽²⁴⁹⁾ y otros.

En cuanto al carcinoma gástrico, hay datos contradictorios en las series publicadas respecto a la correlación entre los datos anatomopatológicos, la supervivencia y el análisis del contenido de ADN y fase S^(201,205,250,251,262,253).

En los estudios publicados se ha puesto de manifiesto una cierta falta de acuerdo en cuanto a la metodología y a la interpretación de los histogramas, lo que puede suponer un impedimento para un amplio uso de la citometría de flujo⁽²⁵⁴⁾. En los últimos años se trabaja en la dirección de la unificación de criterios y aplicación de controles de calidad estándar⁽²⁵⁵⁾, habiéndose llevado a cabo Conferencias de consenso para algunas patologías^(266,267).

Quizás los aspectos más importantes se refieran al uso de **material fresco o parafinado, a la técnica de laboratorio, a la interpretación de los histogramas y al uso de técnicas estáticas o dinámicas** para el estudio celular.

El **tipo de material tumoral**, fresco o parafinado, ha sido objeto de discusión, por el riesgo de que la mayor cantidad de detritus celulares pudiera alterar el histograma y el valor de la fase proliferativa. Sin embargo, los trabajos de Hedley demostraron la viabilidad de las muestras parafinadas solucionando el problema de los detritus celulares^(264,265). La utilización de material parafinado permitiría el estudio de grandes series de pacientes con características clínicas, histológicas y evolutivas conocidas. Este dato tiene gran importancia en el estudio de tumores poco frecuentes, en los que es difícil reunir un grupo de pacientes suficientemente numeroso para ser estudiado de forma prospectiva con CMF ⁽²⁶⁶⁾.

La selección del tejido parafinado a analizar puede realizarse tras la evaluación histológica de los bloques seleccionados. Así, es posible escoger las mejores áreas de la muestra tumoral⁽²⁵⁴⁾. Se ha comprobado la buena preservación morfológica de los núcleos obtenidos de material parafinado, mediante centrifugado de la suspensión nuclear⁽²⁶⁷⁾.

En el caso de muestras en fresco, la biopsia puede ser demasiado pequeña o no representativa y el patólogo puede no estar seguro de que el material elegido contenga células tumorales con relevancia diagnóstica⁽²⁶⁷⁾. Sin embargo, el uso de material parafinado tiene también algunas limitaciones. La fijación con formol disminuye la fluorescencia del ADN nuclear, pudiendo dificultar la obtención del estándar diploide⁽²⁶⁸⁾. Los coeficientes de variación de los histogramas pueden ser algo mayores que los obtenidos utilizando material en fresco, haciendo el estudio del ciclo celular menos preciso⁽²⁶⁵⁾. El citoplasma y la membrana celular se pierden durante la preparación, limitando las características celulares que pueden ser evaluadas⁽²⁶⁶⁾.

Pese a estas limitaciones, los estudios comparando resultados del análisis de muestras pareadas, utilizando material parafinado frente a material en fresco, han obtenido resultados equivalentes para ambos tipos de muestra^(269,270). Recientemente Dressler ha comprobado la concordancia del contenido de ADN de muestras parafinadas estudiadas por citometría de flujo, con la técnica de Hedley, con el análisis citogenético⁽²⁷¹⁾.

El análisis de muestras en fresco parece proveer de mayores posibilidades de estudio utilizando marcadores bioquímicos y superioridad en la valoración de la fase S⁽²⁷²⁾.

Un tema controvertido es la elección del **método de laboratorio** para el manejo de las muestras tumorales. Vindelov⁽¹⁹⁰⁾ mejoró la técnica de material en fresco evitando la fijación en etanol y utilizando espermina y dimetilsulfóxido que permiten la congelación de las muestras a -80°C. Recientemente se ha descrito un método que utiliza formol y subtilisina-Calsberg sin desagregación ni centrifugación que parece obtener mejores resultados en la medición de la fase S y en la detección de aneuploidías⁽²⁷³⁾.

El método de Hedley supone la utilización de pepsina para **digestión enzimática**, afirmando algunos autores que la tripsina obtiene menor presencia de detritus celulares⁽²⁷⁴⁾. En este trabajo se ha utilizado el método de Hedley modificado por García R. et al⁽²⁷⁵⁾.

Como colorante para la **tinción del ADN** se utilizó Ioduro de Propidio, procedimiento descrito inicialmente por Crissman y Steinkamp⁽¹⁸⁷⁾ y que con diversas modificaciones se ha convertido en el fluorocromo más utilizado en todos los trabajos⁽¹⁹²⁾. Entre sus ventajas se encuentran su gran estabilidad, su excitabilidad por un láser de argón estándar y la producción de histogramas con bajo coeficiente de variación. Se han utilizado también el bromuro de etidio y el naranja de acridina, entre los fluorocromos intercalantes. Entre los no intercalantes, se han descrito procedimientos que usan la Mitramicina,

Chromomicina, Hoechst 33342, DAPI y otros⁽²⁷⁶⁾.

Se ha discutido el **tipo de fijador** y el **tiempo de fijación** de las muestras, puesto que una mala fijación puede acarrear alteraciones en el ADN. Wresto afirma que el mejor fijador es el formol frente a la solución Bouin o B5⁽²⁷⁷⁾. Esteban⁽²⁷⁸⁾ describe menos alteraciones en la muestra si el tiempo de fijación es menor de 24 horas. En el presente estudio se ha utilizado formol como fijador durante 24 horas al tratarse de piezas de resección quirúrgica. Se comprobó la presencia de células tumorales mediante citoespín y la preservación nuclear mediante tinción con azul Tripán.

La definición de **critérios para la interpretación de los histogramas** es objeto de continua discusión en función de la terminología utilizada por cada laboratorio o grupo y la variabilidad de los valores normales⁽¹⁹⁶⁾.

En 1984 Hiddeman y cols. definieron el Índice de ADN como el resultado de dividir el valor del pico G0-G1 de la muestra y el valor del pico G0-G1 del caso control⁽²⁸⁴⁾. Los índices de ADN iguales a 1, reflejarían muestras diploides y los distintos de 1, muestras aneuploides. Pese a la claridad de este criterio, se ha observado una no despreciable variabilidad interlaboratorios en la valoración numérica⁽¹⁹⁶⁾. Algunos autores han sugerido el uso de otros conceptos de tipo citogenético, como los de hipo o hiperploidía, para la mejor comprensión del histograma. Sin embargo Shankey⁽²⁶⁴⁾ desaconseja el empleo de estos términos.

El problema de la variabilidad de resultados en función de la heterogeneidad intratumoral, ha sido estudiado particularmente en el cáncer de mama⁽²⁷⁹⁾. En el cáncer gástrico^(280,281), se ha observado que la mayor variabilidad celular estaría presente en los tumores avanzados y, sobre todo en las capas profundas. En consecuencia, se ha sugerido que las muestras superficiales deben ser evaluadas cuidadosamente y se haría necesaria la utilización de muestras múltiples para evitar pasar por alto poblaciones aneuploides⁽²⁸²⁾. El problema se acentúa, al comprobar que no existe concordancia de la

heterogeneidad histológica con la del ADN nuclear⁽¹²²⁾, siendo por tanto difícil la valoración morfológica de la muestra.

Para obviar estos inconvenientes, en el presente trabajo se han practicado, por un lado, el análisis repetido de las muestras (8 casos) comprobando la concordancia de los resultados y la reproductibilidad del método y, por el otro, se han utilizado controles de mucosa gástrica normal, como recomienda Shankey⁽²⁵⁴⁾ y como control interno de ploidía se utilizaron linfocitos normales⁽²⁸³⁾.

Para el estudio de nuestra serie se han establecido los siguientes criterios:

a.- Índices de ADN entre 0,9 y 1,2 se han considerado diploides, ya que cuando se mezclan estas muestras con los controles, el pico diploide se obtiene en el mismo canal. La variación de canal de una misma muestra oscila en torno al 10%.

Las muestras con índices de ADN de 1.1 pero con dos picos separados G0/G1, fueron considerados aneuploides⁽²⁷⁵⁾. Con este criterio se obvian las muestras "casi diploides" que en el presente trabajo se agrupan dentro de las diploides.

b.- El coeficiente de variación de las muestras diploides normales se sitúa, como media, alrededor del 8%, coincidiendo con los valores recomendados en la literatura⁽²⁸⁵⁾. Los coeficientes de variación altos pueden afectar la valoración de la fase S y del pico G0-G1. Las muestras tumorales pueden tener coeficientes de variación mayores por la presencia de varias poblaciones celulares. En los casos con coeficiente de variación elevado se procedió a repetir la muestra, desechando el caso si no hubiese material suficiente para la repetición. Si se observan dos picos claramente diferenciados objetivamente, el histograma se considera valorable a pesar del coeficiente de variación elevado.

Otra cuestión controvertida, se refiere a la elección entre la citometría estática, en la que se examina un pequeño número de células con tinción de Feulgen, y la citometría dinámica. Algunos estudios publicados sobre carcinoma gástrico realizados mediante citometría estática^(258,259,260,261,262), que han comparado sus resultados con la citometría de flujo, muestran resultados semejantes⁽²⁶³⁾.

Aplicando los criterios expuestos anteriormente, se obtuvieron 39 muestras aneuploides (50%) y 39 diploides (50%). Los casos diploides se agruparon en diploides con fase S normal, 23 casos (29.5%) y diploides con fase S elevada, 15 casos (19.2%). Las cifras de aneuploidía para material parafinado oscilan en las series publicadas entre el 34 ⁽²⁶²⁾ y el 72% ⁽²⁰²⁾.

En cuanto a la correlación de las características macroscópicas e histológicas del tumor con la ploidía o la actividad proliferativa, existen datos contradictorios.

La localización del tumor en las zonas proximal, media o distal del estómago no guarda relación con la ploidía según Filipe⁽²⁰⁵⁾ y Lee⁽²⁸⁶⁾. Otros autores sí encuentran correlación entre la localización proximal y un mayor grado de aneuploidía (Nanus⁽²⁶³⁾, Baretton⁽²⁵²⁾, Tsushima⁽²⁸⁷⁾). En la presente serie, no se encontró asociación significativa entre localización tumoral y ploidía, si bien los tumores proximales fueron con más frecuencia aneuploides. Hemos observado que los tumores distales diploides tuvieron una supervivencia significativamente mayor que los aneuploides. Nanus describe los mismos hallazgos⁽²⁶³⁾ en una serie de 27 pacientes, sugiriendo distinta actitud terapéutica para los tumores distales aneuploides.

Los tumores de tipo vegetante tuvieron menor tendencia a la aneuploidía que los infiltrantes o ulcerados, aunque no de forma significativa. Pocos autores estudian el tipo macroscópico como variable. Únicamente Tsushima⁽²⁸⁷⁾ ha

observado, como nosotros, que los tumores ulcerados son con mayor frecuencia aneuploides.

No hubo correlación de la ploidía con los tipos intestinal y difuso de la clasificación de Lauren. Filipe⁽²⁰⁶⁾ y Baretton⁽²⁵²⁾ constatan aneuploidía significativamente mayor en los tumores de tipo intestinal que en los difusos. Petrova y Wyatt⁽²⁵¹⁾ reportan datos similares pero no significativos, y Ballantyne⁽²⁵⁰⁾, Tosi⁽²⁰⁴⁾ y Suh⁽²⁸⁸⁾ no refieren ninguna correlación con el tipo histológico.

Los datos relativos al grado de diferenciación no revelaron la presencia de una asociación significativa con el contenido de ADN, aunque los tumores bien diferenciados tuvieron mayor tendencia a la aneuploidía. En sus respectivas series, Korenaga⁽²⁶²⁾, Filipe⁽²⁰⁶⁾ y Lee⁽²⁸⁶⁾ encuentran que los tumores moderadamente y bien diferenciados tienen mayor tendencia a la aneuploidía. Por el contrario Suh⁽²⁸⁸⁾ observa mayor aneuploidía en los tumores poco diferenciados y Baretton⁽²⁵²⁾ no encuentra correlación entre la ploidía y el grado histológico.

Con respecto a la profundidad de infiltración tumoral, Lee⁽²⁸⁶⁾ y McCartney⁽²⁰¹⁾ no observan correlación significativa con la ploidía mientras que Rugge⁽²⁸⁹⁾ y Kimura⁽²⁹⁰⁾ relacionan la aneuploidía con mayor infiltración y un estadio más avanzado. Nuestros resultados no mostraron correlación del grado de invasión parietal con la ploidía.

La presencia de adenopatías tumorales se asoció en nuestros pacientes, con un elevado grado de aneuploidía, de manera casi significativa ($p = 0.07$), con respecto a los tumores sin invasión ganglionar. Nanus⁽²⁶³⁾, Kimura⁽²⁹⁰⁾ y Yonemura⁽²⁹¹⁾ obtienen en sus series los mismos resultados, mientras que Lee⁽²⁸⁶⁾ y McCartney⁽²⁰¹⁾ no encuentran ninguna correlación entre la ploidía y la afectación ganglionar.

Finalmente, no hemos comprobado que exista relación significativa entre la ploidía y el estadiaje tumoral, como ha sido comunicado en otras series^(201,202,250).

La valoración de la **fase proliferativa "s"** en el cáncer gástrico, está sujeta a controversia. Se ha publicado la superioridad de las muestras en fresco, para la valoración del porcentaje de células en fase proliferativa⁽²⁷²⁾, debido a la menor presencia de detritus celulares. También, se ha discutido la dificultad de la valoración de la fase "S" en los tumores aneuploides en función de la existencia de una gran población aneuploide en la fase G0/G1 cuyo pico citométrico habitualmente se solapa con la fase S del pico diploide. Por otra parte, la presencia de coeficientes de variación anchos puede enmascarar un pico aneuploide de poca magnitud en la fase S del primer pico⁽²⁹²⁾.

Shankey propone que, dada la gran variabilidad que se observa en los diferentes laboratorios, se especifiquen claramente las técnicas utilizadas y los valores normales, medios y altos de la fase S para los tumores diploides y aneuploides⁽²⁶⁴⁾.

En nuestra serie, se obtuvo un valor de la fase "S" de $16.6 \pm 2.8\%$ para los controles de mucosa gástrica normal, y de $21.6 \pm 1.1\%$ para la totalidad de los tumores. El valor más alto se obtuvo para los tumores diploides con fase "S" elevada ($30.7 \pm 1.3\%$) con diferencias significativas respecto al grupo control y al grupo de tumores diploides con fase "S" normal ($p < 0.001$). Iguales resultados obtiene Danova en una serie de 42 casos de CG realizados con material parafinado⁽²⁰²⁾.

Al examinar los valores de la fase "S" de los tumores diploides, hemos observado que los tumores situados en la porción distal del estómago tienen los menores valores, con diferencias significativas respecto a los situados en la porción proximal, o en la porción media. Así mismo, se ha encontrado una diferencia significativa de los valores de la fase "S" en los tumores con tamaño

mayor de 4 cm. con respecto a los menores de 4 cm. ($p < 0.01$). Sin embargo, no se ha encontrado relación con otras características histológicas ni con la supervivencia. Estos resultados parecen entrar en contradicción con los datos previamente referidos, en los que se ha encontrado una relación clara de la supervivencia con el tamaño y la localización tumorales. Creemos que podría explicarse por la metodología empleada, así como por el número de casos analizados. Otros autores reflejan estas mismas contradicciones.

Filipe⁽²⁰⁵⁾ en una serie de 116 casos de CG con material parafinado, no estudia la relación de la fase "S" con las características histológicas y no encuentra relación con la supervivencia.

Danova⁽²⁵²⁾ tampoco observa relación de la fase "S" con las características histológicas o con la supervivencia, aunque sí aprecia una tendencia de los tumores con mayor diferenciación a menores valores de la fase proliferativa.

Lee⁽²⁸⁶⁾ en una serie de 165 tumores, estudiados en fresco, encuentra una correlación significativa de la fase "S" con el grado de diferenciación y con la supervivencia. Sugiere un comportamiento clínico más agresivo de los tumores con fase proliferativa elevada.

Ante la dificultad de valoración de la fase "S", se han realizado varios estudios utilizando técnicas diversas asociadas al análisis por citometría de flujo. Yonemura⁽²⁹¹⁾ utiliza la incorporación "in vivo" de Bromo-Desoxi-Uridina para valorar la fase "S" junto con el contenido en ADN. Concluye que los mayores valores de la fase proliferativa y la presencia de aneuploidía, son indicadores significativos del pronóstico y que la valoración de la fase "S" por medio de la incorporación de BrdUrd es superior a la obtenida por CMF.

Varios autores han comunicado la utilización de Antígeno de Proliferación Celular Nuclear (PCNA) como medida más exacta de la proliferación celular^(132,133,293,294). En estos trabajos se relaciona la proliferación celular con la profundidad de invasión, el comportamiento metastásico y el pronóstico:

los tumores con un índice más elevado, serían los menos diferenciados, afectarían más en profundidad la pared gástrica y tendrían mayor posibilidad de metástasis linfáticas. Igualmente, se ha utilizado el anticuerpo monoclonal Ki-67 para medir la proliferación nuclear⁽¹³⁴⁾, aunque su eficacia parece menor que la obtenida con PCNA y no puede usarse con material parafinado⁽¹³³⁾.

Serían necesarias nuevas y más amplias investigaciones en este campo para aclarar el significado de la proliferación celular en el campo de los tumores sólidos y valorar los métodos más fiables, reproducibles y eficaces para su valoración.

Las alteraciones del contenido de ADN celular, parece influir significativamente en el pronóstico. Así, los casos diploides tuvieron una mayor **supervivencia** que los aneuploides de forma estadísticamente significativa ($p=0.04$). Encontramos una supervivencia más alta para los tumores distales de tipo diploide con respecto a los aneuploides con significación $p=0.03$. Estos datos coinciden con los de Nanus⁽²⁵³⁾ en una serie de 50 pacientes con cáncer gástrico operable, empleando material en fresco. A la vista de sus resultados, sugiere distintas actitudes terapéuticas para los tumores distales en función de la ploidía.

En las series de Suh⁽²⁸⁸⁾, Tsushima⁽²⁸⁷⁾, Yonemura⁽²⁹¹⁾, Haraguchi⁽²⁹⁵⁾, y Kimura⁽²⁹⁰⁾, utilizando microespectrofotometría, se obtiene una mejor supervivencia para los tumores diploides. En las series Europeas, por contra, no encuentran una relación significativa: Filipe en una serie de 116 casos, Ballantyne⁽²⁶⁰⁾ 56 casos, Macartney⁽²⁰¹⁾ 56 casos. Stipa⁽²⁹⁶⁾ considera que el contenido en ADN puede ser un marcador de enfermedad avanzada, pero no existe evidencia de su valor pronóstico significativo como predictor de supervivencia a largo plazo en pacientes que han recibido una resección radical. Obtiene una significación marginal al relacionar la ploidía con la supervivencia, sobre todo en los tumores distales.

Otros autores europeos como Ruggie⁽²⁸⁹⁾ o Tossi⁽²⁹⁷⁾, sí han encontrado relación entre la ploidía y la supervivencia, aunque sólo en algunos estadios. Baretton⁽²⁵²⁾ encuentra peor supervivencia para los tumores aneuploides sólo en los casos avanzados con metástasis linfáticas, pero no especifica si se realizó exéresis curativa. Danova⁽²⁰²⁾, tampoco especifica si se realizó cirugía curativa en su serie de 42 casos, aunque encuentra peor supervivencia para los tumores aneuploides.

En el caso del CG precoz, parece más clara la influencia de la ploidía en la supervivencia según algunos autores^(202,298,299), mientras que otros solo la relacionan con algunos tipos específicos de tumor^(252,300).

Con arreglo a los datos obtenidos del **estudio estadístico multivariado**, realizado con las variables que habían resultado estadísticamente significativas en el estudio univariado, las únicas variables con significación pronóstica fueron: el estadio tumoral, la presencia de adenopatías metastásicas y la ploidía, si bien la significación de ésta última se encuentra dentro de los límites marginales ($p=0.08$). Sin embargo, ninguna otra de las variables estudiadas alcanzó ese p valor.

Wyatt⁽²⁵¹⁾ encuentra que la ploidía influye en la supervivencia de forma significativa en el análisis univariado, pero no en los modelos múltiples de Cox, donde la presencia de adenopatías y la afectación del margen de resección fueron las únicas variables significativas.

Stipa⁽²⁹⁶⁾, que obtiene una significación $p=0.08$ para la ploidía en el análisis univariado de la supervivencia, observa en el estudio multivariado que el único factor independiente significativo es el estadio tumoral.

Korenaga⁽²⁶²⁾ estudia el contenido en ADN de los carcinomas gástricos por microespectrofotometría, y concluye, tras el análisis multivariado de la supervivencia, que la ploidía es un factor pronóstico de primer orden junto a la profundidad de invasión tumoral y la presencia de adenopatías. Yonemura⁽²⁹¹⁾

llega a la misma conclusión utilizando citometría de flujo con incorporación de bromodesoxiuridina.

En resumen, en nuestro estudio, realizado sobre pacientes con cáncer gástrico sometidos a cirugía curativa, hemos encontrado que los factores pronósticos más importantes son el estadio tumoral, la presencia de adenopatías metastásicas, el nivel de afectación parietal, el tamaño tumoral, la clasificación de Lauren, el grado de diferenciación tumoral, la ploidía, el tipo de resección gástrica y la localización tumoral. En el estudio estadístico multivariado las variables significativas fueron el estadio tumoral, la presencia de adenopatías y, marginalmente, la ploidía. Por tanto, los parámetros morfológicos usados para valorar el comportamiento del tumor que son de naturaleza subjetiva y cualitativa, como el grado de diferenciación, Lauren etc., no son factores pronósticos independientes, como ya ha sido publicado⁽³⁰³⁾.

En la valoración de la ploidía, hemos objetivado un 50% de casos aneuploides. Los casos diploides con fase "S" elevada han sido el 19,2% y aquellos con fase "S" normal, el 29.5%. Estos valores se encuentran en los rangos publicados por otros autores^(201,202,205,250).

La correlación de la ploidía con los datos clínico-patológicos, solo fue marginalmente significativa en relación con la presencia de adenopatías, aunque mostraron mayor tendencia a la aneuploidía los tumores diferenciados, ulcerados, de tipo intestinal y de localización proximal. El mal pronóstico de los tumores aneuploides que hemos obtenido, no estaría pues claramente relacionado con otros factores, sino en función de un comportamiento biológico diferente. Sin embargo, existe una gran variabilidad de datos en cuanto a la relación de la ploidía con los factores clínicos e histopatológicos^(201,202,204,205,250,252,253,286,287,288).

La valoración de la fase "S", no ha permitido demostrar una relación con la supervivencia, y solo se ha asociado con la localización y el tamaño tumoral. Probablemente, la utilización de material en fresco y la aplicación de otras

técnicas (Brdu, PCNA, Ki 67 etc.) pueda conducir a una mejor comprensión del valor de la fase proliferativa como predictor evolutivo^(132,133,134).

La determinación de la ploidía tumoral, aportaría una información de tipo biológico que podría ayudar a explicar las diferencias de comportamiento evolutivo de tumores con idénticas características clínico-patológicas⁽²⁶⁶⁾. Así, en nuestra serie, los tumores de localización distal tuvieron mejor pronóstico si eran de tipo diploide.

A pesar de los datos contradictorios, ponemos de manifiesto la posible utilidad del estudio de la ploidía con vistas al tratamiento quirúrgico y quimioterápico del cáncer gástrico: ayudaría a establecer que pacientes pueden beneficiarse de tratamientos coadyuvantes, de una cirugía más agresiva y de la disección ganglionar extensa que propugnan los autores Japoneses⁽³⁰¹⁾. Estudios de este tipo se han llevado a cabo para el cáncer de mama, intentando establecer que tipo de casos se beneficia de una disección ganglionar en función sus factores de riesgo incluyendo contenido en ADN y fase proliferativa⁽³⁰²⁾.

En cualquier caso, el uso del análisis de la ploidía tumoral en el CG, debe interpretarse dentro del contexto del estudio de los factores clínicos, diagnósticos e histopatológicos, al igual que sucede para la utilización de otras técnicas histoquímicas, ultraestructurales o inmunopatológicas⁽²⁶⁶⁾.

CONCLUSIONES

1.- En la serie de pacientes con Carcinoma Gástrico estudiada, ninguno de los datos clínicos analizados tiene valor pronóstico. El tipo de resección gástrica, influye en el pronóstico.

2.- Los factores anatomopatológicos con significación pronóstica estadística son: la localización y el tamaño tumorales, el grado de diferenciación, la clasificación de Lauren, el grado de afectación parietal, la presencia de adenopatías y su número y el estadio tumoral.

3.- En el análisis de ADN por citometría de flujo, un 50% de los tumores son diploides y un 50% aneuploides. Un 59% de los tumores diploides tienen una fase proliferativa "S" normal y un 41% elevada.

4.- Ninguno de los factores clínicos o patológicos estudiados se correlaciona significativamente con la ploidía. Únicamente, la presencia de adenopatías metastásicas alcanzó un cierto grado de significación estadística ($p=0.07$).

5.- La actividad proliferativa tumoral se relaciona con el tamaño y la localización del tumor ($p=0.01$).

6.- La presencia de aneuploidía se relaciona con una peor supervivencia de forma estadísticamente significativa ($p=0.04$).

7.- Los valores de la fase proliferativa "S" no influyen en la supervivencia.

8.- En el análisis multivariado de la supervivencia, las variables con mayor significación estadística son: el estadio tumoral ($p=0.0009$), la presencia de adenopatías ($p=0.01$) y, marginalmente, la ploidía ($p=0.08$).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- CRAANEN ME., DEKKER W., BLOK P. et al. Time trends in gastric carcinoma: changing patterns of type and location. **Am. J. Gastroenterol.** 87:572-77, 1992.
- 2.- PARKIN DM., STHERNSWARD J., MUIR CS. Estimates of worldwide frequency of 12 major cancers. **Bull. W.H.O.** 62:163-182, 1984.
- 3.- LOPEZ-ABENTE G., ESCOLAR A., ERREZOLA M. **Atlas del Cancer en España.** Graf. Santamaría, Vitoria Gasteiz. pp 37-44, 1984.
- 4.- PARKIN DM., LAARA E., MUIR CS. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major causes of cancers in 1980. **Int. J. Cancer** 41:184-91, 1988.
- 5.- MECKLIN JP., NORDLING S., SAARIO I. Carcinoma of the stomach and its heredity in young patients. **Scand. J. Gastroenterol.** 23: 307-11, 1988.
- 6.- POLLACK ES., HORN JW. Trends in Cancer incidence and mortality in the United States. **J. Natl. Cancer Inst.** 64:1969-76, 1980.
- 7.- HITAYAMA T. Epidemiology of cancer of the stomach with special reference to its recent decrease in Japan. **Cancer Res.** 35:3460-5, 1975.
- 8.- CORREA P. Epidemiology of gastric cancer. **World J. Surg.** 15:228-32, 1991.
- 9.- CORREA P. A human model of gastric carcinogenesis. **Cancer Res.** 48:1319-27, 1988.
- 10.- GRAHAM S., HAUGHEY B., MARSHALL J. et al. Diet epidemiology of gastric cancer. **Nutr. Cancer** 13:19-26, 1990.
- 11.- FLAMANT R., LASSERE O., LAZAR PH. et al. Differences in sex ratio according to cancer site and possible relationship with use of tobacco and alcohol. Review of 65.000 cases. **J. Natl. Cancer Inst.** 32:1309-14, 1964.

- 12.- SERRANO P., MEDRANO J. CALPENA R. et al. Epidemiología del cancer gástrico. En **Cancer Gástrico: estado actual**. Medrano J. y Calpena R. Eds. Alicante. pp 14, 1992.
- 13.- NOMURA A., GLOBER G., TERASAKI P., STEMMERMANN G.. HLA antigens in stomach cancer. **Int. J. Cancer** 25:195, 1980.
- 14.- AIRD I., BENTALL H., ROBERTS J.A.. A relationship between cancer of the stomach and the ABO blood groups. **Br. Med. J.** 1:799, 1953.
- 15.- BONNEY GE., ELSTON RC., CORREA P. et al. Genetic etiology of gastric carcinoma: II. Segregation analysis of gastric pH, nitrate and nitrite. **Genet. Epidemiol.** 4:103-111, 1992.
- 16.- BORCH K. Epidemiologic, clinicopathologic and economic aspects of gastroscopic screening of patients with pernicious anemia. **Scand. J. Gastroenterol.** 21:21, 1986.
- 17.- CWERN M., GARCIA R., DAVIDSON M.I., FRIEDMAN I.H.. Simultaneous occurrence of gastric cancer in identical twins. **Am. J. Gastroenterol.** 75:41, 1981.
- 18.- HAGY AW. A familial study of gastric carcinoma. **Am. J. Hum. Genet.** 6:434-441, 1954.
- 19.- ABARBANEL J., SHABTAI F., KYZER S. et al.. Cytogenetic studies in patients with gastric cancer. **World J. Surg.** 15:778-782, 1991.
- 20.- SANO T., TSUJINO T., YOSHIDA K. et al. Frequent loss of heterozigosity on chromosomes 1q, 5q and 17p in human gastric carcinomas. **Cancer** 51:2926-31, 1991.

- 21.- HORII A., NAKATSURU S., MIYOSHI Y. et al. The APC gene, responsible for familial adenomatous polyposis, is mutated in human gastric cancer. **Cancer Res.** 52:3231-35, 1992.
- 22.- TEH M., SUN LEE Y.. An immunohistochemical study of *ras* oncoprotein expression in gastric carcinoma. **Cancer** 72:1846-48, 1993.
- 23.- MARTIN HM., FILIPE MI., MORRIS RW. et al.. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. **Int. J. Cancer** 50:859-862, 1992.
- 24.- WRIGHT PA., WILLIAMS GT. Molecular biology and gastric carcinoma. **Gut** 34:145-7, 1993.
- 25.- NINOMIYA I., YONEMURA Y., MATSUMOTO H. et al.. Expression of c-myc gene product in gastric carcinoma. **Oncology** 48:149-156, 1990.
- 26.- JAIN S., FILIPE MI., GULLIK WJ. et al.. C-erb-2 proto-oncogene expression and its relationship to survival in gastric carcinoma: an immunohistochemical study on archival material. **Int. J. Cancer** 48:668-671, 1991.
- 27.- JAEHNE J., URMACHER C., THALER HT. et al.. Expression of Her2/neu oncogene product p185 in correlation to clinicopathological and prognostic factors of gastric carcinoma. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** 118:474-9, 1992.
- 28.- YONEMURA Y., NINOMIYA I., YAMAGUCHI A., et al.. Evaluation of immunoreactivity for erb-2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. **Cancer Res.** 51:1034, 1991.
- 29.- WARREN JR., MARSHALL BJ. Unidentified curved bacteria on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet** 1273, 1983.
- 30.- CORREA P., FOX J., FONTHAM E., RUIZ B. et al.. Helicobacter pylori and gastric carcinoma: serum antibody prevalence in populations with contrasting cancer risks. **Cancer** 66: 2569-74, 1990.

- 31.- FOX JG., CORREA P., TAYLOR NS. et al.. Campylobacter pylori associated gastritis and immune response in a population at increased risk of gastric carcinoma. **Am. J. Gastroenterol.** 84:775-783, 1989.
- 32.- PARSONNET J., FRIEDMAN GD., VANDERSTEEN DP. et al. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. **N. Engl. J. Med.** 325:1127-31, 1991.
- 33.- RECAVARREN-ARCE S., LEON-BARRUA R., COK J. et al. Helicobacter Pylori and progresive gastric pathology that predisposes to gastric cancer. **Scand. J. Gastroenterol.** 26(Suppl.181):51-56, 1991.
- 34.- PARSONNET J., VANDERSTEEN D., GOATES J. et al. Helicobacter pylori infection in intestinal and diffuse type gastric adenocarcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.** 83:640-6, 1991.
- 35.- FORMAN D., SITAS F., NEWELL DG. et al. Geographic association of helicobacter pylori antibody prevalence and gastric mortality in rural China. **Int. J. Cancer** 46:608-12, 1990.
- 36.- HOLCOMBE C. Helicobacter Pylori: the African enigma. **Gut** 33:429-432, 1992.
- 37.- INAMDAR NV., LEVIN B. The epidemiology and causes of gastric cancer. **Surg. Onc. Clin. North Am.** 2:333-345, 1993.
- 38.- SCHARSCHMIDT B.F.. The natural history of hypertrophic gastropathy (Menetrier disease). **Am. J. Med.** 63:644-647, 1977.
- 39.- DOMINGUEZ F., De VEGA DS., MARIN A. et al. Asociación de la enfermedad de Menetrier con úlceras pépticas. **Rev. Esp. Enf. Ap. Digest.** 55:77-84, 1979.

- 40.- TOMASULO J. Gastric polyps. Histologic types and their relationship to gastric carcinoma. **Cancer** 27:1346-54, 1971.
- 41.- HARJU E. Gastric polyposis and malignancy. **Br. J. Surg.** 73:532-540, 1986.
- 42.- MING SC. Classification and significance of gastric polyps. In YARDLEY JH., MORSON BM. (EDS). **The Gastrointestinal tract**. Baltimore, Williams & Wilkins p 149, 1977.
- 43.- KAMIYA T., MORISHITA T., ASAKURA H. et al. Long term follow up study on gastric adenoma and its relation to gastric protruded carcinoma. **Cancer** 50:2496-502, 1982.
- 44.- YAMAGATA S., HISAMICHI S.. Precancerous lesions of the stomach. **World J. Surg.** 3:671-673, 1979.
- 45.- LAXEN F., SIPPONEN P., IHAMAKI T. et al. Gastric polyps: their morphological and endoscopical characteristics and relation to gastric carcinoma. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.** 90:221, 1982.
- 46.- MING SC., GOLDMAN H. Gastric Polyps: a histogenetic classification and its relation to carcinoma. **Cancer** 18:721-726, 1965.
- 47.- GIARELLI L., MELATO M., SATNATA G., BUCCONI S. et al.. Gastric resection. A cause of high frequency of gastric carcinoma. **Cancer** 52:1113-1116, 1983
- 48.- ELDER JB., KNIGHT T. Surgical suppression of gastric acid secretion: lessons from long-term follow-up studies. **Scand. J. Gastroenterol.** 26(Supl 188):26-34, 1991.
- 49.- SHAFER L.W., LARSON D.E., MELTON L.J. et al.. The risk of gastric carcinoma after surgical treatment for benign ulcer disease. A population-based study in Olmsted county, Minnesota. **N. Engl. J. Med.** 309:1210-13, 1983.

- 50.- FISHER A.B., GRAEM N., JENSEN O.M.. Risk of gastric cancer after Bilroth II resection for duodenal ulcer. **Br. J. Surg.** 70:552, 1983.
- 51.- De VEGA DS., CALVO C., MAYORAL C., TAMAMES S. Carcinomas del muñón gástrico tras resección por enfermedad benigna. **Rev. Esp. Enf. Digest.** 77:327-331, 1990.
- 52.- CORREA P. Precursors of gastric and esophageal cancer. **Cancer** 50:2554-65, 1982.
- 53.- ELLIS DJ., KINGSTON R., BROOKES VS. et al. Gastric carcinoma and previous peptic ulceration. **Br. J. Surg.** 66:117-119, 1979.
- 54.- SIPPONEN P., KEKKI M., SIURALA M. Atrophic cronic gastritis and intestinal metaplasia in gastric carcinoma. **Cancer** 50:2854-8, 1982.
- 55.- ROLLAG A., JACOBSEN C.D.. Gastric ulcer and risk of cancer. A five year follow-up study. **Acta Med. Scand.** 216:105, 1984.
- 56.- CORREA P. The epidemiology and pathogenesis of cronic gastritis: three etiologic entities. **Front. Gastrointest. Res.** 6:98-108, 1980.
- 57.- SIURALA M., SALMI HJ.. Long term follow-up of subjects with superficial gastritis or a normal gastric mucosa. **Scand. J. Gastroenterol.** 6:459-463, 1971.
- 58.- IMAI T., KUBO T., WATNABE H.. Chronic gastritis in Japanese with reference to high incidence of gastric carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.** 47:179-195, 1971.
- 59.- WHITEHEAD R., TRUELOVE SC., GEAR MW.. The histological diagnosis of chronic gastritis in fiberoptic gastroscope biopsy specimens. **J. Clin. Pathol.** 25:1-11, 1972.
- 60.- STRICKLAND RG., MACKAY IR.. A reappraisal of the nature and significance of chronic atrophic gastritis. **Am. J. Dig. Dis.** 18:426-440, 1973.

- 61.- CORREA P..Chronic gastritis: A clinico-pathological classification. **Am. J. Gastroent.** 83:504-509, 1988.
- 62.- RUDELL WS., BONE ES., HILL MJ., WALTERS CL.. Pathogenesis of gastric cancer in pernicious anemia. **Lancet** 1:521-523, 1978.
- 63.- SAITO T., SASAKI O., MATSUKUCHI T. et al.. Experimental gastric cancer: Pathogenesis and clinico-histopathologic correlation. In Herfarth, C., and Schlag, P. (eds.): **Gastric Cancer**. New York. Springer Verlag, 1979, pp 22-31.
- 64.- LEI D.N., YU J.Y.. Types of mucosal metaplasia in relation to the histogenesis of gastric carcinoma. **Arch. Pathol. Lab. Med.** 108:220-224, 1984.
- 65.- MING S.C.. Pathological features and significance of gastric dysplasia in Ming SC (ed): **Precursors of gastric cancer**. New York. Praeger, 1984: pp 9-27.
- 66.- JASS JR., FILIPE MI.. The mucin profiles of normal gastric mucosa, intestinal metaplasia and its variants and gastric carcinoma. **Histochem. J.** 13:931-939, 1981.
- 67.- MORSON BC., SOBIN LH., GRUNDMANN E. et al. Precancerous conditions and epithelial dysplasia of the stomach. **J. Clin. Pathol.** 33:711-17, 1980.
- 68.- NAGAYO T. Gastric cancer preceded by severe dysplasia. **Histol. Histopathol.** 1:171-180,1986.
- 69.- GRUNDMANN E. Histologic types and possible initial stages in early gastric carcinoma. **Beitr. Pathol.** 154:256-62,1975.
- 70.- LANDSDOWN M., QUIRKE P., DIXON MF. et al. High grade dysplasia of the gastric mucosa: A marker for gastric carcinoma. **Gut** 31:977-981, 1990.
- 71.- OEHLERT W., KELLER P., HENKE M. et al. Gastric mucosal dysplasia: What is its clinical significance? **Front Gastrointest. Res.** 4:173-181, 1979.

- 72.- CUELLO C., CORREA P., ZARAMA G. et al. Histopathology of gastric dysplasias. Correlations with gastric juice chemistry. **Am. J. Surg. Pathol.** 3:491-500, 1979.
- 73.- MING SC., BATJAI A., CORREA P. et al. Gastric dysplasia. Significance and pathologic criteria. **Cancer** 54:1794-81, 1984.
- 74.- SARAGA E., GARDIOL D., COSTA J. Gastric dysplasia. A histological follow up study. **Am. J. Surg. Pathol.** 11:788-794, 1987.
- 75.- RUGGE M., FARINATI F., DiMARIO F. et al. Gastric epithelial dysplasia: A prospective multicenter follow up study from the Interdisciplinary group on Gastric epithelial Dysplasia. **Hum. Pathol.** 22:1002-9, 1992.
- 76.- BERKSON J.: Statistical summary. In REMINE JH., PRIESTLEY JT., BERKSON J. (eds.): **Cancer of the stomach**, p 207, Philadelphia, WB Saunders, 1964.
- 77.- MEYERS WC., DAMIANO RJ., POSTLETHWAIT RW. et al. Adenocarcinoma of the stomach. Changing patterns over the last 4 decades. **Ann. Surg.** 205:1-8, 1987.
- 78.- DELGADO F., ASENCIO F., CAMACHO J. et al. Factores pronósticos en el adenocarcinoma gástrico. **Cir. Esp.** 44:292-298, 1988.
- 79.- BORRMANN R. Geschwülste des magen und dudenums. In Henke F. Lubarsch O (eds): **Handsbuch der Spezieller Pathologischer Anatomie und Histologie**, vol. 4. Berlin, Springer, 1926, p 865.
- 80.- STOUT AP. The relationship of gastric ulcer to gastric carcinoma. **Cancer** 3:515-552, 1950.
- 81.- MING SC. Gastric carcinoma. A pathological classification. **Cancer** 39:2475-80, 1977.

- 82.- BLOT WJ., DEVESA SS., KNELLER RW. et al. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. **JAMA** 265:1287-93, 1991.
- 83.- YU CC-W., LEVISON DA., DUNN JA. et al. Pathological prognostic factors in the second British Stomach Cancer group trial of adjuvant therapy in resectable gastric cancer. **Br. J. Cancer** 71:1106-1110, 1995.
- 84.- IISHI H., TATSUTA M., OKUDA S. Endoscopic diagnosis of minute gastric cancer of less than 5mm. in diameter. **Cancer** 56:655-659, 1985.
- 85.- CALPENA R., MEDRANO J., DEL FRESNO J. et al. Factores que influyen en la supervivencia de los pacientes diagnosticados de cáncer gástrico. **Cir. Esp.** 43:560-566, 1988.
- 86.- ARMSTRONG CP., DENT DM. Factors influencing prognosis in carcinoma of the stomach. **Surg. Gynecol. Obstet.** 162:343-348, 1986.
- 87.- ELIAS D., LASSER PH., BOGNEL C. et al. Adénocarcinomes gastriques réséqués curativement. Analyse multifactorielle des facteurs pronostiques. **Gastronterol. Clin. Biol.** 12:729-735, 1988.
- 88.- LAUREN P. The two histologic main types of gastric carcinoma: Diffuse and the so-called intestinal type carcinoma. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.** 64:31-43, 1965.
- 89.- WATANABE H., JASS JR., SOBIN LH. Histological typing of gastric and oesophageal tumors. In **World Health Organization: International Classification of Tumors**, ed. 2. Berlin, Springer-Verlag, 1990.
- 90.- TAMAKI K. The general rules for the cancer gastric study in surgery and pathology. **Jpn. J. Surg.** 11:127-139, 1981.
- 91.- MUÑOZ N., ASVALL J. Time trends in intestinal and diffuse types of gastric cancer in Norway. **Int. J. Cancer** 8:144-149, 1971.

- 92.- MUÑOZ N., CORREA P, CUELLO C. et al. Histologic types of gastric carcinoma in high and low risk areas. **Int. J. Cancer** 3:809-17, 1968.
- 93.- MUÑOZ N., CONNELLY R. Time trends of intestinal and diffuse types of gastric cancer in the United States. **Int J. Cancer** 8:809-14, 1968.
- 94.- KAIBARA N., IITSUKA Y., KIMURA A. et al. Relationship between area of serosal invasion and prognosis in patients with gastric carcinoma. **Cancer** 60:136-139, 1987.
- 95.- OKUSA T., NAKANE Y., BOK T. et al. Quantitative analysis of nodal involvement with respect to survival rate after curative gastrectomy for carcinoma. **Surg. Gynecol. Obstet.** 170:488-493, 1990.
- 96.- JAMIESON JK., SOBSON SF. The lymphatic system of the stomach. **Lancet**, april 20, 1907.
- 97.- JAPANESE RESEARCH SOCIETY FOR GASTRIC CANCER. The general rules for the gastric cancer study in Surgery and Pathology. **Jpn. J. Surg.** 11:127-145, 1981.
- 98.- MACDONALD JS., COHN I., GUNDERSON JL. Cáncer de estómago. En De VITA V., HELLMAN S., ROSENBERG A.(Eds.). **Cáncer. Principios y práctica de Oncología.** Lippincott, Philadelphia, 1988.
- 99.- SPIESSL B., BEAHR'S OH., HERMANEK P. **TNM atlas in U.I.C.C.: Illustrated guide to the TNM/pTNM classification of malignant tumors**, ed 3. Berlin, Springer- Verlag, 1989.
- 100.- MURAKAMI T. Pathomorphological diagnosis. Definition and gross classification of early gastric cancer. **Gann Monographs on Cancer Research** 11:53-67, 1972.
- 101.- SOGA J., OHYAMA S., MIYASHITA K. et al. A statistical evaluation of

advancement in gastric cancer surgery with special reference to the significance of lymphadenectomy for cure. **World J. Surg.** 12:398-405, 1988.

102.- HERMANEK P., ROSCH W. Critical evaluation of the Japanese early gastric cancer classification. **Endoscopy** 5:220-225, 1973.

103.- HABU H., TAKESHITA K., SUNAGAWA M. et al. Lymph node metastasis in early gastric cancer. **Int. Surg.** 71:244-247, 1986.

104.- COIT DG., BRENNAN MF. Gastric neoplasms. In MOODY FG. ed. **Surgical treatment of digestive diseases**. Chicago: Year Book Medical Publisher, Inc., pp.215-16, 1990.

105.- GREEN P., O'TOLLE K., WEINBERG L. et al. Early gastric cancer. **Gastroenterology** 81:247-256, 1981.

106.- BORCH K., HAMMARSTROM LE., LIEDBERG G. Gastric cancer. Diagnosis, treatment and prognosis in clinical routine. **Acta Chir. Scand.** 148:517-523, 1982.

107.- HOLBURT E., FREEDMAN SI. Gastric carcinoma in patients younger than age 36 years. **Cancer** 60:1395-1399, 1987.

108.- MSIKA S., CHASTANG C., LACAINE F., HUGUIER M. Lymph node involvement as the only prognostic factor in curative resected gastric carcinoma: a multivariate analysis. **World. J. Surg.** 13:118-123, 1989.

109.- PARRILLA P., GARCÍA MARCILLA J., SANCHEZ BUENO F. et al. Valoración de factores pronósticos en el cáncer gástrico resecado (149 casos). **Cir. Esp.** 47:164-172, 1990.

110.- ZILIOOTTO A., KUNZLE JE., DE SOUZA A., COLICHIO-FILHO O. Evolutive and prognostic aspects in gastric cancer. Analysis of 189 cases. **Cancer** 59:811-817, 1987.

- 111.- FRIEDLAND SW.: Stomach. In SSTECKEL RJ., KAGAN AR. (Eds.): **Diagnosis and staging of Cancer, A radiological approach**. Philadelphia, WB Saunders, p 129-141, 1976.
- 112.- BARENTSZ JO., ROSEBUSCH GR., STRIJK SP. et al. Radiologic examination in gastric cancer. A retrospective study of 188 patients. **Acta Radiol.** 27:547-552, 1986.
- 113.- TSUCHIGAME T., OGATA Y., SUMI M. Differential diagnosis of gastric adenoma and type IIA early gastric carcinoma. **Acta Radiol.** 32:37-41, 1991.
- 114.- LEVINE MS., KONG V., RUBESEIN SE. et al. Scirrhus carcinoma of the stomach: Radiologic and endoscopic diagnosis. **Radiology** 175:151-160, 1990.
- 115.- WITZEL A., HALTER F., GRETILLAT PA. et al. Evaluation of specific value of endoscopic biopsies and brush cytology for malignancies of oesophagus and stomach. **Gut** 17:375-381, 1976.
- 116.- GRAHAM DY., SCHWARTZ JT., CAIN GD. et al. Prospective evaluation of biopsy numbers in the diagnosis of esophageal and gastric carcinoma. **Gastroenterology** 82:228-233, 1982.
- 117.- ISHI H., YAMAMOTO R., TATSUTA M. et al. Evaluation of fine needle aspiration biopsy under direct vision gastrofiberscopy in diagnosis of diffusely infiltrative carcinoma of the stomach. **Cancer** 57:1354-1360, 1986.
- 118.- MARUYAMA M. Comparison of radiology and endoscopy in the diagnosis of gastric cancer. In PREECE PE., CUSHIERI A., WELLWOOD IM.(eds): **Cancer of the stomach**. Orlando, Florida, Grune&stratton, p 123, 1986.
- 119.- MOSS AA., SCHYNDER P., GRANDARJIS G. et al. Computed tomography of benign and malignant gastric abnormalities. **J. Clin. Gastroenterol.** 2:401-410, 1980.

- 120.- RASCH L., BRONE J., OLESEN KP. Predictability of esophagus and cardia tumour resectability by preoperative computed tomography. **Eur. J. Radiol.** 11:42-47, 1990.
- 121.- FUJIMURA H., AIBE T., ITO T. et al. A study on the lymph node metastasis surrounding the gastric wall with gastric cancer by endoscopic ultrasonography. **Gastroenterol. Endosc.** 29:1123-29, 1987.
- 122.- ARETXABALA X., YONEMURA Y., SUGIYAMA K. et al. Gastric cancer heterogeneity. **Cancer** 63:791-798, 1989.
- 123.- BATES SE., LONGO DL. Use of serum tumours markers in cancer diagnosis and management. **Semin. Oncol.** 14:102-121, 1987.
- 124.- STTAB HJ., BRUMMENDORF T., HORNING A. et al. The clinical validity of circulating tumor-associated antigens CEA and CA 19-9 in primary diagnosis and follow up of patients with gastrointestinal malignancies. **Klin. Wochenschr.** 63:106-120, 1985.
- 125.- DITTRICH C., JAKES Z., HAVELEC L. et al. Carcinoembryonic antigen plasma levels in the management of gastric cancer patients. **Cancer Detect. Prev.** 8:181-192, 1985.
- 126.- DIEGO M.. Diagnóstico inmunológico del cancer gástrico, en Medrano J. y Calpena R. (eds): **Cancer Gástrico: estado actual**. Universidad de Alicante:pp. 42, 1992.
- 127.- PIANTINO P., RANDONE A., FUSARO A. et al. Ca 72-4, CA 195 and CA 19-9 as diagnostic aid in gastric carcinoma. **J. Nucl. Med. Allied Sci.** 34(Suppl. 4):103-111, 1990.
- 128.- GONZALEZ FERNANDEZ A. Comportamiento de la glucoproteína asociada a tumores (TAG-72) definida por el anticuerpo monoclonal B72.3 en neoplasias de origen digestivo. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, 1994.

- 129.- NOMURA A.M. et al. Serum pepsinogen I as a predictor of stomach cancer. **Ann. Intern. Med.** 93:537-540, 1980.
- 130.- HAKKINEM I., VIIKARI S.. Occurrence of fetal sulphoglycoprotein antigen in the gastric juice of patients with gastric diseases. **Ann. Surg.** 165:277-284, 1969.
- 131.- TAKAHASHI I., MAEHARA Y., KUSUMOTO T. et al.. Predictive value of preoperative serum Sialyl Tn antigen levels in prognosis of patients with gastric cancer. **Cancer** 72:1836-40, 1993.
- 132.- JAIN S., FILIPE MI., HALL PA. et al.. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. **J. Clin. Pathol.** 44:655-659, 1991.
- 133.- ROSA JC., MENDES R., FILIPE MI., MORRIS RW.. Measurement of cell proliferation in gastric carcinoma: comparative analysis of Ki-67 and proliferative cell nuclear antigen (PCNA). **Histochem. J.** 24:93-101, 1992.
- 134.- OHYAMA S., YONEMURA Y., KIMURA H. et al. Proliferation-associated nuclear antigen p105 as a marker for metastasis of human gastric cancer. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** 117:583-86, 1991.
- 135.- WILLIAMS N., DALY JM. Flow cytometry and prognostic implications in patients with solid tumors. **Surg. Gynecol. Obst.** 171:257-266, 1990.
- 136.- LONGMIRE WP. Gastric Carcinoma: Is radical gastrectomy worthwhile? **Ann. R. Coll. Surg.** 62:25-30, 1980.
- 137.- CADY B., RAMSDEN D., CHOE D. Treatment of gastric cancer. **Surg. Clin. North. Am.** 56:599-605, 1976.
- 138.- HORNIG D., HERMANEK P. AND GALL PF. The significance of the extent of proximal margins of clearance in Gastric Cancer surgery. **Scand. J. Gastroenterol.** 22(suppl. 133):69-71, 1987.

- 139.- GOUZI JL., HUGUIER M., FAGUIEZ MB. et al. Total versus subtotal gastrectomy for adenocarcinoma of the gastric antrum. **Ann. Surg.** 209:162-166, 1989.
- 140.- CUSHIERI A. Gastrectomy for gastric cancer: definitions and objectives. **Br. J. Surg.** 73:513-514, 1986.
- 141.- NOGUCHI Y., IMADA T., MATSUNOTO A. Radical Surgery for Gastric Cancer. **Cancer** 64:2053-2062, 1989.
- 142.- KOSAKI G., IWASE T. Stomach Cancer. **Surg. Therapy** 30:59-63, 1974.
- 143.- NAKAJIMA T, NISHI M. Surgery and adjuvant chemotherapy for gastric cancer. **Hepato-gastroenterol.** 36:79-85, 1989.
- 144.- SHIU MH., MOORE E., SANDERS M. et al. Influence of the extent of resection on survival after curative treatment of gastric carcinoma. A retrospective multivariate analysis. **Arch. Surg.** 122:1347-1351, 1987.
- 145.- WATERHOUSE JA. Regional variations and established prognostic factors in gastric cancer. In: **Gastric Cancer**. Edited by J.W. Fielding, C.E. Newman, C.H. Ford, b.G. Jones. Oxford: Pergamon Press, 1981.
- 146.- BOZZETTI F. Total versus subtotal gastrectomy in cancer of the distal stomach: facts and fantasy. **Eur. J. Surg. Oncol.** 18:572-579, 1992.
- 147.- SHIU MH., PERROTI M., BRENNAN MF. Adenocarcinoma of the stomach. A multivariate analysis of clinical, pathologic and treatment factors. **Hepato-gastroenterol.** 36:7-12, 1989.
- 148.- SHEHIRO S., NAGASUE N., OGAWA Y. et al. The negative effect of splenectomy on the prognosis of gastric cancer. **Am. J. Surg.** 148:645-648, 1984.

- 149.- KISHIMOTO H., TANAKA K., MAEDA M. et al. Evaluation of total and proximal gastrectomy combined with splenectomy or pancreaticosplenectomy in the treatment of gastric cancer. **Jpn. J. Gastronterol. Surg.** 12:971-975, 1979.
- 150.- HEYS SD., EREMIN O. The relevance of tumor draining lymph node in cancer. **Surg. Gynecol. Obstet.** 174:1357-1362, 1992.
- 151.- MARUYAMA K., GUNVEN P., OKABAYASI K. et al.. Lymph node metastasis of gastric cancer. **Ann. Surg.** 210:596-602, 1989.
- 152.- KODAMA Y., SUGIMACHI K., SOEJIMA K. et al. Evaluation of extensive lymph node dissection for carcinoma of the stomach. **World J. Surg.** 5:241-248, 1981.
- 153.- ARETXABALA X., KOMISHI K., YONEMURA Y. Node dissection in gastric cancer. **Br. J. Surg.** 74:770-773, 1987.
- 154.- JAEHNE J., MEYER MJ., MASCHEK M. et al. Lymphadenectomy in gastric carcinoma. **Arch. Surg.** 127:290-293, 1992.
- 155.- BRENNAN G. Lymphadenectomy in gastric cancer. **Cancer**, Editorial.64:2063, 1989.
- 156.- WAGNER PK., RAMASWANG A., RÜSCHOLL J. et al. Lymph node counts in the upper abdomen: anatomical basis for lymphadenectomy in gastric cancer. **Br. J. Surg.** 78:825-7, 1991.
- 157.- SIEWERT JR., BÓTTCHER K., RODER JD. et al. Prognostic relevance of systematic lymph node dissection in gastric carcinoma. **Br. J. Surg.** 80:1015-1018, 1993.
- 158.- HIOKI K., NAKANE Y., YAMAMOTO M. La estrategia quirúrgica en el cancer gástrico inicial. **Br. J. Surg.** 77:1330-34, 1990.

- 159.- SUZUKI M., OKUI K.** Long term results of operated early gastric cancer. **Jpn. Gastroenterol. Surg.** 17:571-576, 1984.
- 160.- KITAOKA H., YOSHIKAWA K., HIROTA T., ITABASHI M.** Surgical treatment of early gastric cancer. **Jpn. J. Clin. Oncol.** 14:283-293, 1984.
- 161.- SANO T., KOBORI O., MUTO T.** Metástasis del cancer gástrico incipiente en los ganglios linfáticos: resección endoscópica del tumor. **Br. J. Surg.** (Ed. esp.) 7:430-433, 1992.
- 162.- KELSEN D.** Adjuvant therapy of upper gastrointestinal tract cancers. **Seminars in Oncology** 18:543-559, 1991.
- 163.- NAKAJIMA T., TAKAHASI T., TAGIKI K. et al.** Comparison of 5-fluoracil with ftorafur in adjuvant chemoterapies with combined inductive and maintenance therapies for gastric cancer. **J. Clin. Oncol.** 12:1366-71, 1984.
- 164.- THE GASTROINTESTINAL TUMOR STUDY GROUP.** Controlled trial of adjuvant chemotherapy following curative resection of gastric cancer. **Cancer** 49:1116-22, 1982.
- 165.- SAINI A., WAXMAN J.** Chemotherapy for gastric cancer. **Gut** 33:1153-1154, 1992.
- 166.- ESTAPE J., GRAU JJ., ALCOBENDAS F. et al.** Mitomycin C as an adjuvant treatment to resected gastric cancer. A 10 year follow-up. **Ann. Surg.** 213:219-221, 1991.
- 167.- ALEXANDER HR., KELSEN DP., TEPPER JE.** Cancer of the stomach. En De VITA V., HELLMAN S., ROSENBERG SR. (eds.). **Cancer, Priciples and practice of Oncology.** Philadelphia: J.B. Lipincott, pp818-848, 1993.
- 168.- CHANG AE., GEIGER JD., SONDAK VK, SHU S.** Adoptive cellular therapy of malignancy. **Arch. Surg.** 128:1281-1290, 1993.

- 169.-** KIM JP., KWON OJ., OH ST., YANG HK. Results of surgery on 6589 gastric patients and Immunochemosurgery as the best treatment of advanced gastric cancer. **Ann. Surg.** 216:269-279, 1992.
- 170.-** SUGA S., TSUNEKAWA H., WASHIMO M. Treatment of gastric cancer, with special reference to the survivals of the cancer patients treated with multiple combination MFC therapy or immunochemotherapy of MFC plus OK-432. **Gastroenterol. Jpn.** 12:20-46, 1987.
- 171.-** NIIMOTO M., HATTORI T., ITO I. et al. Levamisole in post-operative adjuvant immunochemotherapy for gastric cancer. **Cancer Immunol. Immunother.** 18:13-18, 1984.
- 172.-** KYOTO RESEARCH GROUP FOR DIGESTIVE ORGAN SURGERY. A comprehensive multi-institutional study on postoperative adjuvant immunotherapy with oral streptococcal preparation OK-432 for patients after gastric cancer surgery. **Ann. Surg.** 216:44-54, 1992.
- 173.-** SINDELAR W., KINSELLA T., TEPPER J. et al. Randomized trial of intraoperative radiotherapy in carcinoma of the stomach. **Am. J. Surg.** 165:178-188, 1993.
- 174.-** ABE S., SHIBAMOTO Y., TAKAHASHI M et al. Intraoperative radiotherapy in carcinoma of the stomach and pancreas. **World. J. Surg.** 11:459-464, 1987.
- 175.-** THE GASTROINTESTINAL TUMOR STUDY GROUP. The concept of locally advanced gastric cancer, effect on treatment and outcome. **Cancer** 66:2324-2330, 1990.
- 176.-** SHAPIRO HM. Technical developments in flow cytometry. **Hum. Pathol.** 17:649-651, 1986.
- 177.-** CASPERSSON TO. (ed). **Cell growth and cell function.** New York, Norton, 1950.

- 178.- KARMENSKY LA., MELAMED MR., DERMAN H. Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis. **Science** 150:630-1, 1965.
- 179.- KARMENSKY LA., MELAMED MR. Spectrophotometric cell sorter. **Science** 156:1364-5, 1967.
- 180.- COON AH., CREECH HJ., JONES RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 47:200-202, 1941.
- 181.- COULTER WH. High speed automatic bloodcell counter and cell size analyzer. **Proc. Natl. Electronics Conf.** 12:1034-1042, 1956.
- 182.- FULWYLER MJ. Electronic separation of biological cells by volume. **Science** 150:910-911, 1965.
- 183.- KOSS LG. Automated cytology and histology: a historical perspective. **Anal. Qant. Cytol. Histol.** 9:369-374, 1987.
- 184.- RILEY RS., MAHIN EJ. **Clinical applications of flow cytometry**. A.S.C.P. Workshop. Las Vegas, Nevada, 1988.
- 185.- KOSS LG., CZERNIAK B., HERZ F., WERSTO R. Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: A critical appraisal. **Hum. Pathol.** 20:528-548, 1989.
- 186.- SHAPIRO HM. **Practical flow cytometry**. New York, Liss, 1985.
- 187.- CRISSMAN HA., STEINKAMP JA. Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. **J. Cell. Biol.** 59:766-761, 1973.
- 188.- KRISHNAN A. Rapid flow cytometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodine staining. **J. Cell. Biol.** 66:188-193, 1975.

- 189.-** FRIED J., PEREZ AG., CLARKSON BD. Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodine. **J. Cell. Biol.** 71:172-181, 1976.
- 190.-** VINDELOV LL., CHRISTENSEN IJ., NISSEN NI. A detergent-Trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. **Cytometry** 3:328-331, 1983.
- 191.-** TAYLOR IW. A rapid single step staining technique for DNA analysis by flow microfluorometry. **J. Histochem. Cytochem.** 28:1224-1228, 1980.
- 192.-** TAYLOR IW., MILTHORPE BK. An evaluation of DNA fluorochromes, staining techniques, and analysis for flow cytometry. **J. Histochem. Cytochem.** 28:1224-1228, 1980.
- 193.-** HEDLEY DW., RUGG CA., GELBER RD. Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. **Cancer Res.** 47:4729-4735, 1987.
- 194.-** COON JS. DNA flow cytometry of solids tumours. **Labmedica** 7:34-37, 1990.
- 195.-** COON JS., DEITCH AD., de VERE RW. et al. Interinstitutional Variability in DNA flow cytometric analysis of tumors. **Cancer** 61:126-130, 1988.
- 196.-** COON JS., PAXTON H., LUCY L., HOMBURGER H.. Interlaboratory variation in DNA flow cytometry. Results of the College of American Pathologists' survey. **Arch. Pathol. Lab. Med.** 118:681-685, 1994.
- 197.-** MAURO F., TEODORI L., SCHUMANN J., GOHDE W. Flow cytometry as a tool for the prognostic assesment of human neoplasia. **Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phis.** 12:625-636, 1986.

- 198.- CHIU JH., KAO HL., WU LH. et al. Prediction of relapse or survival after resection in human hepatomas by DNA flow cytometry. **J. Clin. Invest.** 89:539-45, 1992.
- 199.- KOKAL W., GARDINE RL., SHEIBANI K. et al. Tumour DNA content in resectable primary colorectal carcinoma. **Ann. Surg.** 209:188-193, 1989.
- 200.- HATTORI T., HOSOKAWA Y., SUGIHARA H., FUKUDA M. DNA content of diffusely infiltrative carcinomas of the stomach. **Path Res. Pract.** 180:615-618, 1985.
- 201.- MACARTNEY JC., CAMPLEJOHN RS., POWELL G. DNA flow cytometry of histological material from human gastric cancer. **J. Pathol.** 148:273-277, 1986.
- 202.- DANOVA M., RICCARDI A., MAZZINI G. et al. Flow cytometric analysis of paraffin-embedded material in human gastric cancer. **Anal. Quant. Cytol. Histol.** 10:200-206, 1988.
- 203.- KORENAGA D., HARAGUCHI M., OKAMURA T. et al. DNA ploidy and tumor invasion in human gastric cancer. **Arch. Surg.** 124:314-318, 1989.
- 204.- TOSI P., LEONCINI L., CINTORINO M. et al. Flow cytometric analysis of DNA ploidy pattern from deparaffinized formalin fixed gastric cancer tissue. **Int. J. Cancer** 42:868-871, 1988.
- 205.- FILIPE MI., ROSA J., SANDEY A., IMRIE PR., ORMEROD MG., MORRIS RW. Is DNA ploidy and proliferative activity of prognostic value in advanced gastric carcinoma?. **Hum. Pathol.** 22:373-378, 1991.
- 206.- DUPONT JB., LEE JR., BURTON GR. et al. Adenocarcinoma of the stomach. Review of 1497 cases. **Cancer** 41:941-945, 1978.
- 207.- CASSELL P. and ROBINSON JO. Cancer of the stomach: a review of 854 patients. **Br. J. Surg.** 63:606-607, 1976.

- 208.- BREAUX JR., BRINGAZE W., CHAPUIS and COHN I. Adenocarcinoma of the stomach: A review of 35 years and 1710 cases. **World J. Surg.** 14:580-586, 1990.
- 209.- MOLTO M., DIEGO M., MEDRANO J. et al. Clínica del cáncer gástrico en Medrano Heredia J., Calpena Rico R.(eds.) en **Cáncer Gástrico: Estado actual.** Alicante, 1992, pags. 25 a 29.
- 210.- ADASHEK K., SANGER J., LONGMIRE WP. Jr.. Cancer of the stomach: review of consecutive ten years intervals. **Ann. Surg.** 189:6-19, 1979.
- 211.- INGBER MV., HEINONEN R., RANTAKOKKO V. et al. Surgical treatment of gastric carcinoma: a regional study of 2590 patients over a 22 years period. **Arch. Surg.** 110:703-712, 1975.
- 212.- BATTEZZATI M., PERCIVAL P., BATTISTA G. et al. Gastric cancer: a review of 400 consecutive cases. **Int. Surg.** 71:726-735, 1986.
- 213.- RIBEIRO MM., SARMENTO JA., SOBRINHO MA. et al. Prognostic significance of Lauren and Ming classifications and other pathologic parameters in gastric carcinoma. **Cancer** 47:780-784, 1981.
- 214.- DIEHL JT., HERMANN RE., COOPERMAN AM. et al. Gastric carcinoma: a ten year review. **Ann. Surg.** 198:9-14, 1983.
- 215.- MORENO M., MORENO E., CALLE A. et al. Carcinoma gástrico: análisis de 445 casos. **Rev. Esp. Ap. Digest.** 61:279-85, 1982.
- 216.- DUPONT JB. Jr., COHN I. Jr.. Gastric adenocarcinoma. **Curr. Probl. Cancer** 4:25-45, 1980.
- 217.- NAGATA T., IKEDA M., NAKAYAMA F. Changing state of gastric cancer in Japan: histological perspective of the past 76 years. **Am. J. Surg.** 145:226-233, 1983.

- 218.- HOERR SO. Prognosis for carcinoma of the stomach. **Surg. Gynecol. Obstet.** 137:205-209, 1973.
- 219.- MOERTEL CH. Carcinoma of the stomach: Prognostic factors and criteria of response to therapy. In Staquet J.: **Cancer Therapy: Prognostic factors and criteria of response**. N.Y. Raven Press, pp229-235, 1975.
- 220.- BARBER KW. Jr, GAGE RP., PRIESTLEY JT. Significance and duration of symptoms and size of lesion in the prognosis of gastric carcinoma. **Surg. Gynecol. Obstet.** 113:673-676, 1961.
- 221.- MORENO GONZALEZ-BUENO C., VAZQUEZ ECHARRI J. Cáncer gástrico. Estudio de los factores pronósticos en la supervivencia. **Rev. Esp. Enf. Ap. Digest.** 70:214-222, 1986.
- 222.- LAVIN P., BRUCKNER H., PLAXE S. Studies in prognostic factors related to chemotherapy for advanced gastric cancer. **Cancer** 50:2016-2023, 1982.
- 223.- MARUYAMA K., OKABAYASHI K., KINOSHITA T. Progress in gastric cancer surgery in Japan and its limits of radicality. **World J. Surg.** 11:418-425, 1987.
- 224.- MARUYAMA K. Results of surgery correlated with staging, En: Cushieri A., Wellwood (Ed.). **Cancer of the stomach**. Grune and Stratton Ltd. London, pp. 145-164, 1986.
- 225.- BABA H., KORENAGA D., OKAMURA T. et al. Prognostic factors in gastric cancer with serosal invasion. **Arch. Surg.** 124:1061-64, 1989.
- 226.- TAMAMES S. **Gastrectomía total o subtotal**. XXXVIII Curso de Cirugía Abdominal. J. Puig Lacalle. Barcelona. JARPYO Eds. pp. 175-179, 1990.
- 227.- HAUGSTVEDT TK, VISTE A, EIDE GE. et al. Norwegian multicentre study of survival and prognostic factors in patients undergoing curative resection for

gastric carcinoma. **Br. J. Surg.** 80:475-478, 1993.

228.- OKADA M., KOJIMA S., MURIKAMI M. et al. Human gastric carcinoma: prognosis in relation to macroscopic and microscopic features of primary tumor. **J. Natl. Cancer Inst.** 71:275-279, 1983.

229.- ARVEUX P., FAIVRE J., BOUTRON MC. et al. Prognosis of gastric carcinoma after curative surgery. **Dig. Dis. Sci.** 37:757-763, 1992.

230.- DAVESSAR K., PEZZULO JC., KESSIMIAN N. et al. Gastric adenocarcinoma: Prognostic significance of several pathologic parameters and histologic classifications. **Hum. Pathol.** 21:325-332, 1990.

231.- HERMANEK P. Clinical significance of histological classification in accordance with Lauren classification as an addition to pTNM. **Scand. J. Gastroenterol.** 22(suppl. 33):31-32, 1987.

232.- IRIYAMA K., MIKI C., ILUNGA K. et al. Valor pronóstico del tipo histológico en el carcinoma gástrico con invasión limitada a la pared del estómago. **Br. J. Surg. (Ed. Esp)** 10:245-247, 1993.

233.- MENDES ALMEIDA JC., BETTENCOURT A., SANTOS COSTA C. et al.. Curative surgery for gastric cancer: study of 166 consecutive patients. **World J. Surg.** 18:889-895, 1994.

234.- RODER JD., BÖTTCHER K., SIEWERT JR. et al. Prognostic factors in gastric carcinoma: results of the German gastric carcinoma study 1992. **Cancer** 72:2089-2095, 1993.

235.- SAARIO I., SCHRÖDER T., LEMPINEN M. et al. Analysis of 58 patients surviving more than ten years after operative treatment of gastric cancer. **Arch. Surg.** 122:1052-1054, 1987.

- 236.- BOLLSCHWEILER E., BOETTCHER K., MARUYAMA K. et al. Is the prognosis for japanese and german patients with gastric cancer really different? **Cancer** 71:2920-2925, 1993.
- 237.- BOZZETTI F., BONFANTI G., MORABITO A. et al. A multifactorial approach for the prognosis of patients with carcinoma of the stomach after curative resection. **Surg. Gynecol. Obstet.** 162:229-234, 1986.
- 238.- MARUYAMA K. The most important prognostic factors for gastric cancer patients. A study using univariate and multivariate analysis. **Scand. J. Gastroenterol.** 22 (suppl. 133):63-68, 1987.
- 239.- BARLOGIE B., RABER MN., SCHUMANN J. et al. Flow cytometry in clinical cancer research. **Cancer Res.** 43:3982-3997, 1983.
- 240.- MERKEL D., McGUIRE WC. Ploidy, proliferative activity and prognosis. DNA flow cytometry of solid tumours. **Cancer** 65:1194-1205, 1990.
- 241.- ESKELINEN M., LIPONNEN P., PAPINAHO S. et al. DNA flow cytometry, nuclear morphometry, mitotic indices and steroid receptors as independent prognostic factors in female breast cancer. **Int. J. Cancer** 51:555-561, 1992.
- 242.- deVERE-WHITE RW., DEITCH AD. The role of flow cytometry in urological disease. **Sem. Urol.** 3:132-145, 1985.
- 243.- WINCKLER HZ. Stage D1 prostatic adenocarcinoma: significance of nuclear DNA ploidy patterns studied by flow cytometry. **Mayo Clin. Proc.** 63:103-112, 1988.
- 244.- Von ROENN JH., KHEIR SM., WOLTER JM., COON JS. Significance of DNA abnormalities in primary malignant melanoma and nevi. A retrospective flow cytometric study. **Cancer Res.** 46:3192-3195, 1986.

- 245.-** TROPE C., MAKAR A., KAERN J. DNA flow cytometry as a new prognostic factor in ovarian malignancies. A review. **Acta Obstet. Gynecol. Scand. Suppl.** 155:95-97, 1992.
- 246.-** ZAPRIANOV Z., CHRISTOV K. Histological grading, DNA content, cell proliferation and survival of patients with astroglial tumours. **Cytometry** 9:330-386, 1988.
- 247.-** ICHINOSE Y., HARA N., OHTA M. et al. DNA ploidy patterns of tumours diagnosed as metachronous or recurrent lung cancers. **Ann. Thorac. Surg.** 52:469-473, 1991.
- 248.-** BRONNER MP. flow cytometric analysis of DNA content in Hürthle cell adenomas and carcinomas of the thyroid. **Am. J. Clin. Pathol.** 89:764-769, 1988.
- 249.-** SCHLICHTING E., CLAUSEN OP., HANSSEN AS. et al. Ploidy and survival in resectable pancreatic cancers. A retrospective study over 9 years. **Eur. J. Surg.** 159:229-233, 1993.
- 250.-** BALLANTYNE KC., JAMES RD., ROBINS RA., BALDWIN RW. Flow cytometric analysis of the DNA content of gastric cancer. **Br. J. Cancer** 56:52-54, 1987.
- 251.-** WYATT J., QUIRKE P., WARD DC. et al. Comparison of histopathological and flow cytometric parameters in prediction of prognosis in gastric cancer. **J. Pathol.** 158:195-201, 1989.
- 252.-** BARETTON G., CARSTENSEN O., SCHARDEY M. AND LÖHRS U. DNA-ploidy and survival in gastric carcinomas: a flow-cytometric study. **Virchows Arch. Path. Anat.** 418:301-309, 1991.
- 253.-** NANUS DM., KELSEN DP., NIEDZWIECKI D. et al. Flow cytometry as a predictive indicator in patients with operable gastric cancer. **J. Clin. Oncol.** 7:1105-1112, 1989.

- 254.- SHANKEY TV., RABINOVITCH PS., BAGWELL B., BAUER KD., DUQUE RE., HEDLEY DW., MAYALL BH., WHEELS L. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. **Cytometry** 14:472-477, 1993.
- 255.- DANESI DT., SPANO M., ALTAVISTA P. Quality control study of the Italian group of cytometry in flow cytometry cellular content measurements. **Cytometry** 14:576-583, 1993.
- 256.- BAUER KD., BAGWELL CB., GIARETTI W. et al. Consensus review of the clinical utility of DNA flow cytometry in colorectal cancer. **Cytometry** 14:486-491, 1993.
- 257.- HEDLEY DW. DNA cytometry Consensus conference. DNA flow cytometry and breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.** 28:51-53, 1993.
- 258.- CZERNIAK B., HERZ F., KOSS L. DNA distribution patterns in early gastric carcinomas. **Cancer** 59:113-117, 1987.
- 259.- INOKUCHI K., KODAMA Y., SASAKI O. et al. Differentiation of growth patterns of early gastric carcinoma determined by cytomorphometric DNA analysis. **Cancer** 51:1138-1141, 1983.
- 260.- HATTORI T., HOKAWA Y., SUGIHARA H., OKAMURAT. DNA content of diffusely infiltrative crcinomas of the stomach. **Path. Res. Pract.** 180:615-618, 1985.
- 261.- ARETXABALA X., YONEMURA Y., SUGIYAMA K. et al. DNA ploidy in early gastric cancer and its relationship to prognosis. **Br. J. Cancer** 58:81-84, 1988.
- 262.- KORENAGA D., HARAGUCHI M., OKAMURA T. et al. DNA ploidy and tumor invasion in human gastric cancer. **Arch. Surg.** 124:314-318, 1989.
- 263.- BAUER TW., TUBBS R., EDINGER MG. et al. A prospective comparison of

DNA quantitation by image and flow cytometry. **Am. J. Clin Pathol.** 93:322-326, 1990.

264.- HEDLEY DW., FRIEDLANDER ML., TAYLOR IW. et al. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. **J. Histochem. Cytochem.** 31:1333-1335, 1985.

265.- HEDLEY DW., FRIEDLANDER ML., TAYLOR IW. Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. **Cytometry** 6:327-333, 1985.

266.- COON JS., WEINSTEIN RS. **Diagnostic flow cytometry. Techniques in Diagnostic Pathology.** Ed. Williams and Wilkins, 1991.

267.- OUD PS., HANSELAAR TGJM., REUBSAET-VELDHUIZEN JAM. et al. Extracction of nuclei from selected regions in paraffin-embedded tissue. **Cytometry** 7:595-600, 1986.

268.- ENSLEY JF., MACIOROWSKI Z., PIETRASZKEIWICZ H. Solid tumour preparation for clinical application of flow cytometry. **Cytometry** 8: 488-493, 1987.

269.- ALANEN KA., KLEMI PJ., JOENSSU H. et al. Comparison of fresh, ethanol-preserved, and paraffin-embedded samples in DNA flow cytometry. **Cytometry** 10:81-85, 1989.

270.- De VITA R., CALUGI A., ELEUTERI P. et al. Flow cytometric nuclear DNA content of fresh and paraffin-embedded tissues of breast carcinomas and fibroadenomas. **Eur. J. Basic Appl. Histochem.** 35:233-244, 1991.

271.- DRESSLER LJ., DUNCAN MH., VARSA EE., McCONNELL TS. DNA content measurement can be obtained using archival material for DNA flow cytometry. A comparison with cytogenetic analysis in 56 pediatric solid tumours. **Cancer** 72:2033-41, 1993.

- 272.-** VISSCHER DW., ZARBO RT., JACOBSEN G. et al. Multiparameter deoxyribonucleic acid and cell cycle analysis of breast carcinomas by flow cytometry: Clinicopathologic correlations. **Lab. Invest.** 62:370-378, 1990.
- 273.-** CASTRO J., HEIDEN T., WANG N., TRIBUKAIT B. Preparation of cell nuclei from fresh tissues for high-quality DNA flow cytometry. **Cytometry** 14:793-804, 1993.
- 274.-** TAGAWA Y., NAKAZAKI T., YASUTAKE T. Comparison of pepsin and trypsin digestion on paraffin-embedded tissue preparation for DNA flow cytometry. **Cytometry** 14:541-549, 1993.
- 275.-** GARCÍA R., BUENO A., ROBLEDO M. et al. DNA content in non-Hodgkin's lymphoma. Comparison between flow cytometry and cytogenetics in fresh and paraffin embedded tissue. **Acta. Oncol.** 33:621-625, 1994.
- 276.-** CIUDAD J., ORFAO A., LOPEZ A. et al. Flow cytometric DNA analysis:collection, storage and processing of samples. In "**DNA cytometric analysis**". SAMPEDRO A. Y ORFAO A.(EDS.). Universidad de Oviedo. 91-99. 1993.
- 277.-** WERSTO RP., LIBLIT RL., DEITCH D., KOSS LG. Flow cytometry DNA analysis of human solid tumours: a review of the interpretation of DNA histograms. **Hum. Pathol.** 22:1085-1098. 1991.
- 278.-** ESTEBAN JM., SHEIBANI K., OWENS M. et al. Effects of various fixatives and fixations conditions on DNA ploidy analysis. **Am. J. Clin. Pathol.** 95:460-466, 1991.
- 279.-** FUHR JE., FRYE A., KATTINE AA., Van METER S. Flow cytometric determination of breast tumour heterogeneity. **Cancer** 67:1401-1405, 1991.
- 280.-** SUGIHARA H., HATTORI T., FUJITA S. et al. Regional ploidy variations in signet ring cell carcinomas of the stomach. **Cancer** 65:122-129, 1990.

- 281.- SASAKI K., HASHIMOTO T., KAWACHINO K., TAKAHASI M. Intratumoral regional differences in DNA ploidy of gastrointestinal carcinomas. **Cancer** 62:2569-75, 1988.
- 282.- UMEHARA Y., KIMURA T., YOSHIDA M. et al. Heterogeneity in early and advanced gastric carcinomas by flow cytometric DNA analysis. **J. Surg. Oncol.** 52:97-100, 1993.
- 283.- RILEY RS., MAHIN EJ., PERFETTO S. Clinical applications of flow cytometry. En ASCP National meeting, Las Vegas (Nevada), 1988.
- 284.- HIDDEMANN W., SCHUMANN J., ANDREEF N. et al. Convention on nomenclature for DNA flow cytometry. **Cytometry** 5:445-6, 1984.
- 285.- KALLIONEMI OP., VISAKORPI T., HOLLI K. Improved prognostic impact of S-phase values from paraffin embedded breast and prostate carcinomas after correcting for nuclear slicing. **Cytometry** 12:413-421, 1991.
- 286.- LEE KH., LEE JS., SUH C. et al. DNA flow cytometry of stomach Cancer. Prospective correlation with clininopathologic findings. **Cancer** 72:1819-26, 1993.
- 287.- TSUSHIMA K., NAGORNEY DM., CHA SS., REIMAN HM. Correlation of DNA ploidy, histopathology, stage and clinical outcome in gastric carcinoma. **Surg. Oncol.** 1:17-25, 1992.
- 288.- SUH KS., MIN SK. Flow cytometric analysis of gastric cancer: correlation with histology and clinical outcome. **J. Korean. Med. Sci.** 8:348-354, 1993.
- 289.- RUGGE M., SONEGO F., PANOZZO BS. et al. Pathology and ploidy in the prognosis of gastric cancer with no extranodal metastasis. **Cancer** 73:1127-1132,1994.

- 290.-** KIMURA H., YONEMURA Y., IWASA K. et al. Flow cytometric analysis of DNA ploidy pattern in advanced gastric cancer and its relationship with prognosis. **Cancer** 67:2588-2593, 1991.
- 291.-** YONEMURA Y., OYAMA S., SUGIYAMA K. et al. Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA ploidy patterns and S-phase fraction in Gastric Carcinoma. **Cancer Res.** 50:509-514, 1990.
- 292.-** CUSICK EL., MILTON JI., EWEN SW. The resolution of aneuploid DNA stem lines by flow cytometry: limitations imposed by the coefficient of variation and the percentage of aneuploid nuclei. **Anal. Cell. Pathol.** 2:139-148, 1990.
- 293.-** NISHIDA T., TANAKA S., HARUMA K. et al. Histologic grade and cellular proliferation at the deepest invasive portion correlate with the high malignancy of submucosal invasive gastric carcinoma. **Oncology** 52:340-346, 1995.
- 294.-** MAEDA K., CHUNG YS., KUBO T. et al. Nuclear DNA ploidy and proliferating cell nuclear antigen labeling index in gastric cancer with mucosal involvement. **Gan-To-Kagaku-Ryoho** 21(suppl.I):58-61, 1994.
- 295.-** HARAGUCHI M., WATANABE A., MORIGUCHI S. et al. DNA ploidy is a major prognostic factor in advanced gastric carcinoma. **Surgery** 110:814-819, 1991.
- 296.-** STIPA S., DANESI DT., MODINI C. et al. The importance of heterogeneity and multiple site sampling in the prospective determination of desoxyribonucleic acid flow cytometry. **Surg. Gynecol. Obstet.** 176:427-434. 1993.
- 297.-** TOSSI P., LEONCINI L., CINTORINO M. et al. Flow cytometric analysis of DNA ploidy pattern from deparaffined formalin fixed gastric cancer tissue. **Int. J. Cancer** 42:868-871, 1988.

- 298.-** RODRIGUEZ MERLO R. Cáncer gástrico precoz: cambios morfológicos y valoración mediante Citometría de flujo. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 1992
- 299.-** ARETXABALA X., YONEMURA Y., SUGIYAMA K. et al. DNA ploidy in early gastric cancer and its relationship to prognosis. **Br. J. Cancer** 58:81-84, 1988.
- 300.-** BRITO MJ., FILIPE MI, WILLIAMS GT. et al. DNA ploidy in early gastric carcinoma; a Flow cytometric study of 100 European cases. **Gut** 34:230-234, 1993.
- 301.-** ADACHI Y., KAMAMURA T., MORI M. et al. Prognostic significance of the number of positive lymph nodes in gastric carcinoma. **Br. J. Surg.** 81:414-416. 1994.
- 302.-** RAVDIN PM., DE LAURENTIS M., VENDELY T., CLARK GM.. Prediction of axillary lymph node status in breast cancer patients by use of prognostic indicators. **J. Natl. Cancer Inst.** 86:1771-5, 1994.
- 303.-** RIBEIRO MM., SEIXAS M., SOBRINHO-SIMOES MA. Prognosis in gastric carcinoma. The preeminence of staging and the futility of histological classification, in WATANABE S., WOLFF M., SOMMERS S. (eds.): Digestive disease Pathology, vol. 1 Philadelphia,PA, Field & Wood, 1988.

ANEXO

CLINICA

Nº	CASO	EDAD	SEXO	CLINICA	Tº EVOL. (MESES)	SUPERV. (meses)	EXITUS
1	V.L.Y.	59	m	dispepsia	5	67	no
2	A.G.O.	79	v	dolor epig.	3	22	si
3	M.S.H.	75	m	dolor epig.	1	60	no
4	M.M.P.	67	v	dispepsia	18	53	no
5	G.H.R.	67	v	hemorragia	2	48	no
6	G.O.A.	81	m	dolor epig.	20	40	no
7	F.V.R.	68	m	anemia	6	63	no
8	M.G.S.	82	m	anemia	2	9	si
9	J.V.H.	43	v	hemorragia	3	34	si
10	M.R.E.	67	v	hemorragia	12	8	si
11	B.M.F.	59	v	hemorragia	2	41	no
12	E.D.B.	76	m	dispepsia	3	45	no
13	C.R.P.	72	v	hemorragia	3	39	no
14	R.L.P.	63	v	dispepsia	2	67	no
15	E.S.T.	56	v	dolor epig.	4	40	no
16	J.M.O.	48	v	dolor epig.	2	7	si
17	J.G.S.	72	m	anemia	4	20	no
18	M.G.M.	80	m	dolor epig.	2	51	no
19	J.M.G.	80	v	dolor epig.	2	12	si
20	R.G.S.	74	v	dolor epig.	2	40	si
21	L.G.G.	75	v	dolor epig.	2	48	no
22	I.B.B.	74	v	anemia	6	44	no
23	P.P.E.	85	v	dispepsia	4	50	no
24	E.R.M.	64	v	dispepsia	6	46	no
25	B.E.O.	61	v	dolor epig.	12	13	si
26	P.B.E.	60	m	dolor epig.	6	68	no

CLINICA

Nº	CASO	EDAD	SEXO	CLINICA	Tº EVOL. (MESES)	SUPERV. (MESES)	EXITUS
27	D.P.G.	75	m	dispepsia	1	19	si
28	S.G.G.	73	v	dolor epig.	2	41	si
29	A.A.C.	63	v	dolor epig.	2	35	si
30	R.M.S.	83	v	dolor epig.	3	65	no
31	B.H.H.	68	v	dispepsia	12	75	no
32	J.N.L.	76	m	dolor epig.	12	27	si
33	P.S.L.	65	m	dolor epig.	6	16	si
34	L.S.G.	64	m	dolor epig.	12	70	no
35	N.A.H.	63	v	dispepsia	8	84	no
36	V.G.F.	66	v	dispepsia	6	70	no
37	F.C.Z.	66	v	dolor epig.	20	70	no
38	F.H.A.	50	v	hemorragia	1	36	si
39	F.E.A.	53	v	hemorragia	4	72	no
40	A.R.S.	36	v	dispepsia	7	80	no
41	M.G.G.	64	v	hemorragia	1	8	si
42	L.G.G.	81	m	anemia	12	15	si
43	L.A.H.	56	m	dolor epig.	2	16	si
44	J.L.S.	49	v	dispepsia	1	18	si
45	F.G.L.	80	m	anemia	6	9	si
46	A.P.G.	57	v	hemorragia	1	19	si
47	O.M.V.	70	v	dispepsia	2	7	si
48	G.A.C.	91	v	hemorragia	1	15	si
49	C.D.G.	81	m	anemia	6	48	no
50	F.F.P.	60	v	dispepsia	4	36	si
51	M.M.T.	76	v	anemia	1	48	si
52	T.M.M.	61	v	dolor epig.	2	96	no

CLINICA

Nº	CASO	EDAD	SEXO	CLINICA	Tº EVOL. (MESES)	SUPERV. (MESES)	EXITUS
53	S.G.P.	45	m	anemia	20	56	si
54	C.A.S.	76	m	hemorragia	1	90	no
55	T.H.H.	56	v	anemia	4	84	no
56	E.B.N.	73	m	dispepsia	10	32	si
57	S.B.M.	62	v	dispepsia	1	48	no
58	E.M.G.	67	v	hemorragia	3	44	no
59	D.O.P.	73	m	dispepsia	3	40	no
60	V.S.S.	55	m	hemorragia	1	41	no
61	F.G.H.	56	v	dolor epig.	12	5	si
62	J.E.V.	54	v	dispepsia	2	94	no
63	A.H.F.	67	v	dispepsia	12	20	si
64	D.A.F.	76	m	dolor epig.	2	96	no
65	A.S.G.	61	v	dolor epig.	18	92	no
66	E.L.C.	75	v	hemorragia	3	22	si
67	C.F.M.	69	v	dispepsia	4	70	no
68	C.S.R.	72	m	anemia	12	21	si
69	J.M.R.	61	v	dispepsia	12	11	si
70	C.A.A.	81	v	hemorragia	2	6	si
71	I.V.P.	58	v	dispepsia	1	12	si
72	B.V.A.	79	m	dispepsia	5	9	si
73	E.V.C.	70	m	dolor epig.	4	14	si
74	M.M.M.	58	v	perforado	0	6	si
75	M.G.H.	74	m	hemorragia	1	6	si
76	E.H.V.	76	v	dispepsia	4	11	si
77	H.P.G.	66	v	anemia	6	9	si
78	F.F.G.	70	m	dolor epig.	5	7	si

MACROSCOPIA

	N° CASO	LOCALIZACION	TIPO MACROSC.	TAMAÑO (cm.)	CIRUGIA
1	V.L.Y.	distal	ulcerado	4	GST
2	A.G.O.	distal	ulcerado	5	GST
3	M.S.H.	distal	infiltrante	8	GST
4	M.M.P.	distal	ulcerado	2	GST
5	G.H.R.	distal	ulcerado	5	GST
6	G.O.A.	distal	ulcerado	2	GST
7	F.V.R.	distal	ulcerado	1	GST
8	M.G.S.	distal	vegetante	7	GST
9	V.G.H.	proximal	ulcerado	4.5	GT
10	M.R.E.	media	ulcerado	9	GT
11	B.M.F.	media	vegetante	3	GST
12	E.D.B.	proximal	ulcerado	1.2	GT
13	C.R.P.	proximal	vegetante	7	GT
14	R.L.P.	distal	ulcerado	6	GST
15	E.S.T.	media	ulcerado	5	GT
16	J.M.O.	media	ulcerado	9	GT
17	J.G.S.	distal	vegetante	9	GST
18	M.G.M.	distal	ulcerado	3	GST
19	J.M.G.	distal	ulcerado	6	GST
20	R.G.S.	distal	ulcerado	6	GST
21	L.G.G.	distal	ulcerado	8	GST
22	I.B.B.	distal	ulcerado	4	GST
23	P.P.E.	distal	ulcerado	6	GST
24	E.R.M.	media	ulcerado	6	GT
25	B.E.O.	media	ulcerado	9	GT

MACROSCOPIA

	Nº CASO	LOCALIZACION	TIPO MACROSC.	TAMAÑO (CM)	CIRUGIA
26	P.B.E.	distal	ulcerado	3.5	GST
27	D.P.G.	distal	infiltrante	5	GST
28	S.G.G.	distal	infiltrante	4	GST
29	A.A.C.	distal	ulcerado	3	GST
30	R.M.S.	distal	vegetante	4	GST
31	B.H.H.	distal	ulcerado	6.5	GST
32	J.N.L.	media	ulcerado	4	GST
33	P.S.L.	media	infiltrante	9	GT
34	L.S.G.	distal	ulcerado	4	GST
35	N.A.H.	media	infiltrante	2	GST
36	V.G.F.	distal	ulcerado	4	GST
37	F.C.Z.	distal	infiltrante	2	GST
38	F.H.A.	proximal	vegetante	9	EGT
39	F.E.A.	media	ulcerado	5.5	GT
40	A.R.S.	distal	ulcerado	1.5	GST
41	M.G.G.	distal	ulcerado	6	GST
42	L.G.G.	distal	vegetante	6	GST
43	L.A.H.	distal	ulcerado	6.5	GST
44	J.L.S.	media	infiltrante	2.5	GT
45	F.G.L.	distal	vegetante	7	GST
46	A.P.G.	proximal	vegetante	9	EGT
47	O.M.V.	proximal	vegetante	5	GPS
48	G.A.C.	distal	ulcerado	7	GST
49	G.D.C.	media	vegetante	4	GT
50	F.F.P.	distal	vegetante	3	GST
51	M.M.T.	distal	infiltrante	6	GST

MACROSCOPIA

	N° CASO	LOCALIZACION	TIPO MACROSC.	TAMAÑO (CM)	CIRUGIA
52	T.M.M.	distal	infiltrante	5	GST
53	S.G.P.	distal	infiltrante	4	GST
54	C.A.S.	distal	vegetante	5	GST
55	T.H.H.	distal	vegetante	9	GST
56	E.B.N.	media	ulcerado	9	GT
57	S.B.M.	proximal	infiltrante	2	GT
58	E.M.G.	distal	ulcerado	1.5	GST
59	D.O.P.	distal	ulcerado	4	GST
60	V.S.S.	proximal	vegetante	7	EGT
61	F.G.H.	proximal	vegetante	5	EGT
62	J.E.V.	distal	ulcerado	1	GST
63	A.H.F.	distal	vegetante	6	GST
64	D.A.F.	distal	infiltrante	3	GST
65	A.S.G.	distal	ulcerado	2	GST
66	E.L.C.	distal	ulcerado	4	GST
67	C.F.M.	distal	ulcerado	3	GST
68	C.S.R.	media	vegetante	6	GT
69	J.M.R.	proximal	vegetante	9	EGT
70	C.A.A.	media	vegetante	8	GT
71	I.V.P.	proximal	vegetante	7	EGT
72	B.V.A.	distal	ulcerado	9	GST
73	E.V.C.	distal	ulcerado	2	GST
74	M.M.C.	distal	ulcerado	1	GST
75	M.G.H.	media	ulcerado	7	GT
76	E.H.V.	distal	infiltrante	5	GST
77	H.P.G.	media	ulcerado	2	GT
78	F.F.G.	media	ulcerado	8	GT

HISTOLOGIA

	N° CASO	LAUREN	* DIFERENC.	INFILTRAC.	METAST. GANGLIOS	N° GANGLIOS
1	V.L.Y.	I	mod.	muscular	no	
2	A.G.O.	I	mod.	serosa	si	1
3	M.S.H.	I	mod.	serosa	no	
4	M.M.P.	I	bien	mucosa	no	
5	G.H.R.	I	mod.	serosa	no	
6	G.O.A.	I	bien	muscular	no	
7	F.V.R.	I	bien	serosa	no	
8	M.G.S.	I	mod.	serosa	si	1
9	J.V.H.	D	poco	serosa	no	
10	M.R.E.	I	poco	serosa	si	10
11	B.M.F.	I	bien	mucosa	no	
12	E.D.B.	I	mod.	mucosa	no	
13	C.R.P.	I	mod.	serosa	si	1
14	R.L.P.	I	mod.	serosa	no	
15	E.S.T.	D	poco	serosa	si	7
16	J.M.O.	I	poco	serosa	si	16
17	J.G.S.	I	mod.	serosa	no	
18	M.G.M.	I	mod.	serosa	no	
19	J.G.M.	I	mod.	serosa	si	5
20	R.G.S.	D	poco	serosa	no	
21	L.G.G.	I	mod.	serosa	no	
22	I.B.B.	I	mod.	muscular	si	2
23	P.P.E.	I	bien	serosa	si	2
24	E.R.M.	I	mod.	serosa	no	
25	B.E.O.	D	poco	serosa	si	5

HISTOLOGIA

	N° CASO	LAUREN	* DIFERENC.	INFILTRAC.	METAST. GANGLIOS	N° GANGLIOS
26	P.B.E.	I	poco	muscular	si	5
27	D.P.G.	D	mod.	serosa	no	
28	S.G.G.	D	mod.	serosa	si	2
29	A.A.C.	D	mod.	serosa	si	2
30	R.M.S.	I	mod.	serosa	no	
31	B.H.H.	I	mod.	serosa	no	
32	J.N.L.	D	bien	muscular	si	4
33	P.S.L.	D	poco	serosa	si	7
34	L.S.G.	I	mod.	muscular	no	
35	N.A.H.	I	bien	muscular	no	
36	V.G.F.	I	poco	serosa	si	1
37	F.C.Z.	I	mod.	muscular	si	3
38	F.H.A.	I	bien	serosa	no	
39	F.E.A.	I	poco	serosa	si	3
40	A.R.S.	D	poco	mucosa	no	
41	M.G.G.	I	poco	serosa	si	5
42	L.G.G.	I	poco	serosa	si	6
43	L.A.H.	I	mod.	serosa	si	3
44	J.L.S.	D	poco	serosa	no	
45	F.G.L.	I	poco	serosa	si	2
46	A.P.G.	D	poco	serosa	si	7
47	O.M.V.	I	poco	serosa	si	1
48	G.A.C.	D	mod.	serosa	si	1
49	G.D.C.	I	mod.	serosa	no	
50	F.F.P.	D	bien	serosa	no	
51	M.M.T.	I	bien	serosa	si	4

HISTOLOGIA

	Nº CASO	LAUREN	* DIFERENC.	INFILTRAC.	METAST. GANGLIOS	Nº GANGLIOS
52	T.M.M.	D	poco	serosa	si	2
53	S.G.P.	D	mod.	serosa	si	7
54	C.A.S.	I	mod.	serosa	no	
55	T.H.H.	I	poco	serosa	no	
56	E.B.N.	I	bien	serosa	si	5
57	S.B.M.	I	bien	serosa	si	1
58	E.M.G.	I	bien	muscular	no	
59	D.O.P.	I	mod.	serosa	si	2
60	V.S.S.	D	poco	serosa	si	4
61	F.G.H.	I	mod.	serosa	si	2
62	J.E.V.	I	mod.	mucosa	no	
63	A.H.F.	D	poco	serosa	no	
64	D.A.F.	D	mod.	serosa	si	1
65	A.S.G.	D	poco	mucosa	no	
66	E.L.C.	I	mod.	serosa	si	6
67	C.F.M.	I	mod.	mucosa	si	1
68	C.S.R.	I	mod.	serosa	si	5
69	J.M.R.	I	mod.	serosa	si	10
70	C.A.A.	D	poco	serosa	si	5
71	I.V.P.	I	mod.	serosa	si	4
72	B.V.A.	D	poco	serosa	si	11
73	E.V.C.	I	mod.	serosa	si	7
74	M.M.M.	D	poco	serosa	si	5
75	M.G.H.	I	poco	serosa	si	14
76	E.H.V.	D	poco	serosa	si	8
77	H.P.G.	D	poco	serosa	si	5
78	F.F.G.	I	mod.	serosa	si	14

CONTROLES

Nº CASO	G ₀ -G ₁	G ₂ +M	S	CV	I. ADN
1	61	13	26	7	1.04
2	87	3	10	8	1.04
3	80	3	16	11	0.87
4	77	4	18	5	1
5	63	15	20	6	0.95
6	83	9	7	10	1.16

DIPLOIDES NORMALES

Nº CASO	G₀-G₁	G₂+M	S	CV	I. ADN
3 M.S.H.	90	1	8	5	0.8
4 M.M.P.	91	2	6	6	0.8
5 G.H.R.	90	2	7	11	0.8
13 C.R.P.	73	4	22	12	0.8
14 R.L.P.	80	2	17	8	1.08
19 J.M.G.	77	5	18	17	0.8
26 P.B.E.	75	3	21	8	1
28 S.G.G.	79	1	20	5	1.1
30 R.M.S.	80	7	13	5	1.3
35 N.A.H.	80	10	10	9	1.2
36 V.G.F.	72	7	22	9	1.1
47 F.C.Z.	84	1	14	7	1.1
38 F.H.A.	72	9	17	6	1.1
50 F.F.P.	80	2	18	9	1
54 C.A.S.	75	2	22	6	1.08
62 J.E.V.	84	6	9	11	1.3
63 A.H.F.	85	4	10	9	1.3
64 D.A.F.	81	1	17	8	1.3
65 A.S.G.	85	2	12	7	1.2
66 E.L.C.	75	7	14	14	1.2
69 J.M.R.	80	6	12	10	0.8
72 B.V.A.	81	2	16	8	1.1
76 E.H.V.	86	3	11	6	1.1

DIPLOIDES CON FASE S ELEVADA

Nº CASO	G ₀ -G ₁	G ₂ +M	S	CV	I. ADN
V.L.Y.	70	4	25	7.7	1
J.V.H.	51	9	39	11	0.91
B.M.F.	55	10	33	8	1.08
E.S.T.	63	6	29	6	1.08
L.G.G.	71	3	25	10	1.1
P.P.E.	60	3	37	8	0.8
B.H.H.	63	5	32	7	1.04
O.M.V.	69	7	24	8	1.1
G.A.C.	59	6	35	11	1
C.D.G.	66	3	31	6	1.1
T.M.M.	62	10	27	6	1.1
C.S.R.	74	1	25	7	1.2
C.A.A.	64	3	32	6	1
I.V.P.	51	10	38	7	0.87
F.F.G.	66	4	29	7	0.8
J.G.S.	64	7	28	11	1.08

ANEUPLOIDES

Nº CASO	G ₀ -G ₁	G ₂ +M	S	CV	I. DNA
2 A.G.O.	65	24	9	5	1.35 2.2
6 G.O.A.	87	5	7	8	1.3
7 F.V.R.	69	5	25	9	0.83
8 M.G.S.	80	1	18	14	0.7
10 M.R.E.	50	12	37	15	0.9 1
12 E.D.B.	64	11	24	6	1.1 2.4
16 J.M.O.	71	11	16	5	1.37
18 M.G.M.	59	32	9	20	0.7 1.3
20 R.G.S.	72	7	19	16	0.6
22 I.B.B.	66	12	21	8	0.8 1.16
24 E.R.M.	57	7	34	9	1.2 1
25 B.E.O.	61	2	35	8	1.08 1.2
27 D.P.G.	64	20	16	5	1.1 1.7
29 A.A.C.	75	14	11	5	1.1 2.3
32 J.N.L.	68	2	30	7	1.08 2
33 P.S.L.	33	6	61	7	1.3 1.8
34 L.S.G.	47	22	31	8	1.4
39 F.E.A.	69	24	5	9	1.2 1.6
40 A.R.S.	68	23	9	6	0.9 1.4
41 M.G.G.	57	36	6	5	1.2 1.7
42 L.G.G.	73	6	21	8	0.9 1.8
43 L.A.H.	77	2	20	17	1.7

ANEUPLOIDES

Nº CASO	G₀-G₁	G₂+M	S	CV	I. DNA
44 J.L.S.	62	6	32	10	1.08 2.2
45 F.G.L.	60	8	32	9	1.1 2.2
46 A.P.G.	49	12	39	7	1 2.2
51 M.M.T.	72	6	22	9	1.2
53 S.G.P.	48	29	21	4	1.37 2.8
55 T.H.H.	34	49	16	5	1 1.5
56 E.B.N.	47	32	19	6	1.2 2.08
57 S.B.M.	62	23	14	6	1.4 2.2
58 E.M.G.	82	7	9	9	1.3
59 D.O.P.	75	3	21	8	1.2
60 V.S.S.	67	5	28	10	0.87
61 F.G.H.	74	12	13	6	1.07 2.2
67 C.F.M.	79	6	14	6	1.2 2.8
73 E.V.C.	77	14	10	6	1.1 1.5
74 M.M.M.	60	5	35	12	0.8
75 M.G.H.	36	1	62	6	1.4
77 H.P.G.	70	7	22	10	0.9 1.9