



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO, FACULTAD DE MEDICINA, ESCUELA DE
TECNOLOGÍA MÉDICA

Proyecto de Unidad de Investigación
“LESIONES PRENEOPLÁSICAS DE CÁNCER GÁSTRICO ALBERGAN CAMBIOS DE
EXPRESIÓN DE RPRM”

Estrella Aranda León
Natalia Ibáñez Mac-Hale

Sede república Julio 2018

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN	6
CAPÍTULO 1	9
1.1 Marco teórico.....	9
1.1.1 Incidencia Cáncer Gástrico.....	9
1.1.2 Generalidades Cáncer Gástrico.....	10
1.1.3 Factores de riesgo Cáncer Gástrico	11
1.1.4 Lesiones preneoplásicas de Cáncer Gástrico	12
1.1.5 Protocolo Sydney	14
1.1.6 OLGA	15
1.1.7 Marcadores de lesiones preneoplásicas	16
1.2 Hipótesis	18
1.3 Objetivo general	18
1.4 Objetivos específicos.....	18
CAPÍTULO 2	19
2.1 Metodología.....	19
2.1.1 Tipo de estudio y diseño general	19
2.1.2 Criterios de inclusión y exclusión.....	20
2.1.3 Variables a estudiar.....	20
2.1.4 Tamaño muestral.....	21
2.1.5 Procesamiento histológico de muestras endoscópicas.....	22
2.1.6 Inclusión y corte de muestras endoscópicas.	22
2.1.7 Tinción Hematoxilina/ Eosina (H/E).	23
2.1.8 Método de análisis de morfología gástrica.	23
2.1.9 Método de análisis estadios OLGA	24

2.1.10 Técnica Inmunohistoquímica (IHQ).....	26
2.1.11 Método cuantitativo de análisis IHQ	27
2.1.12 Método estadístico de análisis de la información.	29
CAPÍTULO 3	30
3.1 Resultados.....	30
CAPÍTULO 4	47
4.1 Discusión	47
CAPÍTULO 5	51
5.1 Conclusiones.....	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS.....	61
Anexo A. Técnica Methylight	61
Anexo B. Consentimiento informado.....	62
Anexo C. Protocolo de procesamiento histológico de muestras endoscópicas.	71
Anexo D. Protocolo tinción Hematoxilina/Eosina	72
Anexo E. Protocolo IHQ	74
Anexo F. Protocolo IHQ para control negativo.....	76
Anexo G. Tabla complementaria.....	78
Anexo H. Tabla complementaria.....	79
Anexo I. Tabla complementaria	80
Anexo J. Tabla complementaria	81

RESUMEN

El Cáncer Gástrico (CG), es la tercera causa de mortalidad por cáncer en el mundo y podría ser considerado como una patología curable si es detectado de forma temprana. Sin embargo, dado que no existen programas de detección precoz, la mayoría de los casos son diagnosticados en etapas avanzadas, lo que trae como consecuencia una sobrevida global baja. Por lo que se debe enfatizar en la prevención del CG, dando prioridad al estudio de lesiones precursoras de CG.

Con la intención de contribuir al estudio de estas lesiones, esta unidad de investigación se basó en el análisis de 40 biopsias gástricas de pacientes asintomáticos pertenecientes a la región del Maule, obtenidas del proyecto titulado “Caracterización y validación de marcadores de autofagia como determinantes terapéuticos y de pronóstico en lesiones tempranas de cáncer gástrico en la población de Molina”.

Las biopsias gástricas fueron procesadas y analizadas mediante tinción Hematoxilina/Eosina (H/E), para poder clasificar las lesiones preneoplásicas de CG en base a estadios OLGA. Posteriormente para poder evaluar la expresión de un potencial marcador gástrico, el gen supresor tumoral Reprimo (RPRM), se utilizó la técnica Inmunohistoquímica (IHQ) con el fin de demostrar los cambios de expresión a lo largo de la cascada de lesiones preneoplásica de CG.

La relación existente entre el marcador RPRM y los estadios OLGA fue evaluada mediante el método de análisis estadístico ANOVA, con el cual fue posible obtener resultados que describen a la población en estudio de manera heterogénea, con tendencias variables de expresión IHQ de RPRM, vinculadas principalmente al tamaño

muestral. Detectamos una fluctuación en el comportamiento de RPRM en los estadios OLGA, y permitiendo sugerir a la metaplasia intestinal (MI) como uno de los factores influyentes en su detección en la cascada preneoplásica.

INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico (CG) es uno de los tumores malignos más frecuentes y la tercera causa de mortalidad por cualquier tipo de cáncer en el mundo (Torre et al., 2015). CG es una enfermedad heterogénea que resulta de interacciones complejas entre factores ambientales y genéticos, que puede contribuir a los resultados dispares observados entre diferentes poblaciones de pacientes (van Beek et al., 2018). Según lo reportado hasta el año 2012 la tasa de muertes sobrepasa los 700 mil individuos, siendo los países ubicados en el extremo oriental del continente asiático los que presentan mayor número de casos (Ferlay et al., 2012). En nuestro país el CG es uno de los más comunes y representa un alto porcentaje de mortalidad principalmente en hombres (MINSAL, 2014; Ferlay et al., 2012). Los datos más alarmantes se observan en algunas comunas de la región de Los Lagos, las cuales destacan por presentar alta prevalencia de CG (MINSAL, 2014).

Debido a su alto grado de malignidad y metástasis temprana, la sobrevida global a 5 años es solo de aproximadamente 10 a 15%. Aunque el tratamiento integral con cirugía, radioterapia y quimioterapia se actualiza constantemente, la tasa de supervivencia global aún no ha mejorado. Todavía hay una falta de objetivos terapéuticos específicos e indicadores pronósticos independientes (Choi et al., 2015). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de realizar estudios para identificación de biomarcadores de detección temprana (Bernal et al., 2008).

El CG es considerada una neoplasia propia de la mucosa gástrica, que tiene como punto de inicio la expansión de células epiteliales (Avital et al., 2011). Existen dos tipos histológicos descritos por Lauren el adenocarcinoma de tipo difuso, observado mayoritariamente en población de bajo riesgo y sujeto a factores genéticos (Fuchs,

Mayer., 1995; Adachi et al., 2000) y el adenocarcinoma de tipo intestinal, el cual predomina en población de alto riesgo, principalmente en hombres de edad avanzada (Luebke et al., 2005; Dimitrios et al., 2002). A diferencia del CG de tipo difuso, el de tipo intestinal es precedido por una cascada de lesiones preneoplásicas de prolongada data, la que inicia con una respuesta inflamatoria crónica como consecuencia de la infección por *Helicobacter pylori* (Correa et al., 1970; Correa, 2013), hallada principalmente en la región estomacal antral (Carrasco et al., 2013).

Dicha cascada preneoplásica va progresando desde gastritis crónica no atrófica, a gastritis atrófica multifocal, metaplasia intestinal, displasia llegando finalmente a carcinoma invasivo (Correa et al., 2007).

La identificación de estas lesiones se llevó a cabo mediante la obtención de biopsias gástricas guiadas por endoscopia digestiva alta (EDA), basándose en el protocolo sugerido por el sistema Sydney (Dixon et al., 1996).

Con la finalidad de realizar la unidad de investigación y contribuir en el estudio “Caracterización y validación de marcadores de autofagia como determinantes terapéuticos y de pronóstico en lesiones tempranas de CG en la población de Molina”, se decide realizar el estudio prospectivo de muestras endoscópicas gástricas, obtenidas de una cohorte de pacientes asintomáticos provenientes de la región del Maule. Esta unidad de investigación será llevada a cabo en los Laboratorios de Ciencia Aplicada a Tecnología Médica (CATEM) de la Universidad Nacional Andrés Bello, además del Centro de Estudios Avanzados de Enfermedades Crónica (ACCDiS) perteneciente a Pontificia Universidad Católica de Chile.

En esta oportunidad las muestras endoscópicas fueron estudiadas bajo el sistema de estadificación de la evaluación operativa de gastritis (OLGA) (Rugge et al., 2007), que

se basa en la evaluación de cambios atróficos en la mucosa gástrica, los que resultan ser característicos de la cascada preneoplásica.

Dado que la carcinogénesis gástrica implica una acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, que conducen a una desregulación en la expresión de ciertos genes supresores de tumores (TSG) encargados de inhibir la proliferación celular excesiva (Bass, 2014).

Se evaluó la expresión de reprimido (RPRM), considerado gen supresor de tumor putativo (Morris et al., 2010; Xia et al., 2010), por su contribución en la detención del ciclo celular (Ohki et al., 2000). Dada su asociación a la carcinogénesis gástrica (Schneider et al., 2010), estudios demuestran que la expresión de RPRM está fuertemente asociada a un estado de metilación, lo que sugiere un silenciamiento de la expresión de este gen, alterando el producto proteico a nivel tisular (Luo et al., 2010).

A nivel clínico, los cambios en la expresión de supresores tumorales tales como RPRM han sido poco estudiados en la progresión de lesiones preneoplásicas, pudiendo haber cambios en la expresión de este marcador.

CAPÍTULO 1

1.1 Marco teórico

1.1.1 Incidencia Cáncer Gástrico

El cáncer gástrico (CG) es el cuarto cáncer más común y la tercera causa de muerte relacionada con el cáncer en ambos sexos en todo el mundo (Torre et al., 2015), con un estimado de 951,000 casos nuevos y 723,000 muertes por año hasta el 2012 (Ferlay et al., 2015). La incidencia de CG tiene una variación geográfica característica, encontrándose las tasas más altas en Asia, principalmente China, Japón, Corea del Sur y Mongolia (Ferlay et al., 2012), las regiones andinas de América del Sur y Europa del Este, en comparación a las de América del Norte, el norte de Europa y la mayoría de los países en África y en el sudeste de Asia que presentan las tasas más bajas (Parkin et al., 1997).

En Chile es el cuarto cáncer más común, constituye la primera causa de muerte por tumores malignos en ambos sexos; afectando mayoritariamente a hombres, con una proporción de 2:1 en relación a las mujeres (MINSAL, 2014; Ferlay et al., 2012). Algunas regiones de Chile poseen las tasas más altas de mortalidad, como son las

regiones de Aysén, Araucanía, Los Lagos, Los Ríos, Bio-Bio y el Maule (MINSAL, 2014).

1.1.2 Generalidades Cáncer Gástrico

Debemos tener en cuenta que el estómago se divide en cuatro regiones anatómicas fundamentales: el cardias, el fondo, cuerpo y antro. Estas áreas se distinguen tanto por su distribución anatómica como diferencias histológicas.

El GC es una neoplasia de origen epitelial, que se caracteriza por presentar una proliferación descontrolada de células neoplásicas en la mucosa del estómago, aproximadamente el 90% son de origen glandular, denominados adenocarcinoma (Avital et al., 2011). Por lo que nuestro interés en CG se centra en adenocarcinomas.

La clasificación más utilizada estadifica a los adenocarcinomas de CG en dos tipos histológicos principales: difuso e intestinal (Lauren, 1965). Estos difieren en morfología, marcadores moleculares, género, edad y otras características epidemiológicas (Henson et al., 2004).

El adenocarcinoma de tipo difuso, se caracteriza por presentar un patrón de crecimiento infiltrante de células neoplásicas no cohesivas, con un marcado componente estromal y con una apariencia típica de “células en anillo de sello” (Yamashiro et al., 1977), predominante en poblaciones de bajo riesgo; generalmente con antecedentes familiares relacionados con factores genéticos (Fuchs, Mayer., 1995; Adachi et al., 2000). En cambio, el adenocarcinoma de tipo intestinal, que se caracteriza por un crecimiento de células neoplásicas cohesivas que tienden a la formación de glándulas (Correa, Piazuelo., 2012); predomina en población de alto riesgo, con una ocurrencia

mayor en hombres y pacientes de mayor edad (Luebke et al., 2005; Dimitrios et al., 2002). El adenocarcinoma de tipo intestinal es de interés, ya que presenta ciertos rasgos epidemiológicos y de evolución relevantes.

1.1.3 Factores de riesgo Cáncer Gástrico

Existen varias condiciones asociadas al CG, debido a que se considera una patología multifactorial (Piazuelo, Correa, 2013), entre las que se describen el tabaquismo (IARC, 2004), bajo consumo de frutas y verduras (Bonequi et al., 2013), consumo excesivo de sal (Joossens et al., 1996), alcohol, alimentos ahumados, carnes procesadas (González et al., 2006), factores ambientales, genéticos y agentes infecciosos, principalmente la infección crónica por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (Burgess et al., 2002; Murphy et al., 2009).

1.1.3.1 Helicobacter pylori

H. pylori es una bacteria gram negativa, en forma de espiral y microaerofílica (Warren, Marshall., 1983), de 3 μm de largo con un diámetro de 0,5 μm ; que coloniza preferentemente la mucosa del antro estomacal (Carrasco et al., 2013). A nivel patológico, se ha demostrado que *H. pylori* induce los cambios fenotípicos que conducen al desarrollo de adenocarcinoma (Rugge et al., 1996), principalmente aquellas cepas que presentan expresión proteica de *vacA* y *cagA* (Queiroz et al., 1998).

1.1.4 Lesiones preneoplásicas de Cáncer Gástrico

Se postula que el adenocarcinoma de tipo intestinal es el resultado final de cambios progresivos en la mucosa gástrica (Bonne et al., 1938), principalmente de la pérdida de células parietales y la sustitución posterior de tejido gástrico normal por tejido metaplásico. (Jain et al., 2006; Goldenring et al., 2000) dichos cambios se deben principalmente a la infección crónica por *H.pylori* (Correa et al., 1970; Correa, 2013).

El proceso es descrito en el “modelo humano de carcinogénesis gástrica” (Correa et al., 2007), donde se establece que el CG de tipo intestinal está precedido por una cascada de lesiones preneoplásicas, la cual inicia con una transformación de la mucosa normal gástrica a una mucosa anormal con gastritis crónica no atrófica (GCNA), la que se caracteriza histológicamente por conservar estructuras glandulares gástricas, que inicialmente presentan una mayor infiltración de leucocitos mononucleares y neutrófilos polimorfonucleares en la lámina propia y que debido al proceso inflamatorio crónico, evoluciona a gastritis crónica atrófica multifocal (GCAM), con pérdida de glándulas gástricas, donde se destaca la pérdida de las células parietales como un punto de apoyo clave en el proceso preneoplásico debido al papel que desempeñan como células secretoras de ácido y fuente coordinadora de varios factores de crecimiento, que incluyen TGF-alfa, HB-EGF (Jain et al., 2006 ; Abe et al., 1997), además de la infiltración de leucocitos mononucleares, seguida por una fibrosis de la lámina propia. A medida que avanza la lesión, la atrofia desencadena una serie de cambios en las células que recubren la mucosa gástrica, generando el proceso de metaplasia intestinal (MI), en el cual la mucosa gástrica es reemplazada por un epitelio histológicamente maduro, con presencia de células caliciformes intestinales, similar a la mucosa intestinal (Goldenring et al., 2010); expresando marcadores intestinales apropiados que incluyen Muc2 y TFF3, así como otros marcadores intestinales del borde en cepillo que incluyen sacarasa-isomaltasa, Villina, Muc13 y proteína de unión a ácidos grasos (Lee et al., 2010). La MI

puede ser de dos tipos: la MI completa y/o la MI incompleta, las cuales se diferencian en que la MI completa está constituida por células caliciformes bien formadas e intercaladas entre los enterocitos con producción activa de enzimas digestivas, por otra parte, la MI incompleta posee células caliciformes mal formadas con escasa producción de enzimas digestivas (Correa, Piazuolo, 2012) (Figura.1).

La presencia de MI incompleta y mayor proporción de esta se asocia con alto riesgo de desarrollar CG (Filipe et al., 1994; Rokkas et al., 1991).

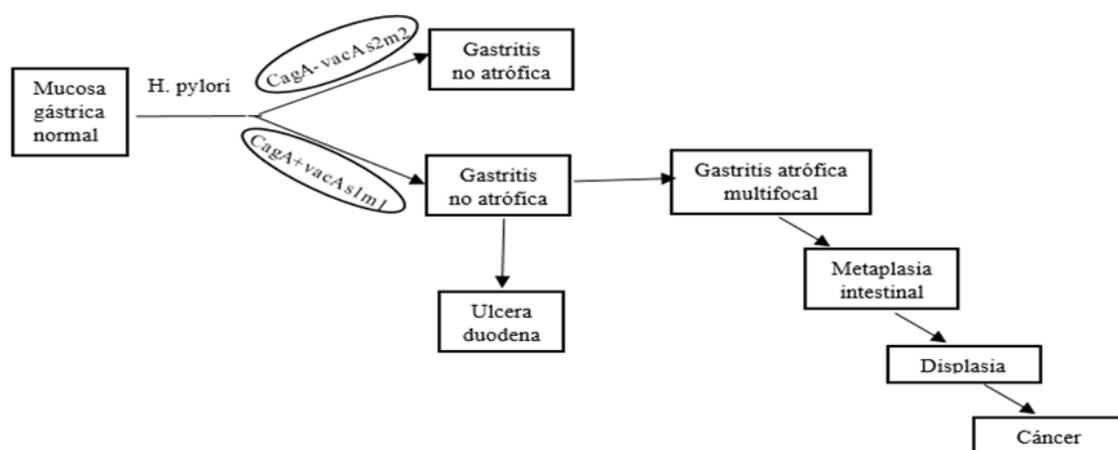


FIGURA 1. Representación esquemática de la cascada preneoplásica de CG (Extraído de Correa, Piazuolo, 2012).

Los cambios inflamatorios pueden persistir durante toda la cascada, pero estos pueden variar en intensidad a medida que avanza el proceso, lo que se relaciona de manera directa con un conjunto de factores etiológicos asociados a la susceptibilidad genética (Wroblewski et al., 2010).

A pesar que no existe una estrategia global de tamizaje. La endoscopia se ha convertido en el método de elección, sin embargo, no existe un método estandarizado. (Pérez-Mendoza et al., 2018), siendo el más utilizado el protocolo Sydney.

1.1.5 Protocolo Sydney

El diagnóstico de las lesiones gástricas se realiza mediante una endoscopia digestiva alta, donde se obtiene como mínimo 5 biopsias de tejido, utilizando el protocolo Sydney, que involucra la toma de biopsia de las zonas de antro, cuerpo e incisura angularis. Esto permite la evaluación de lesiones histológicas como la gastritis, atrofia gástrica y metaplasia intestinal en los respectivos sectores del estómago (Dixon et al., 1996).

Como resultado de diversos estudios que sugieren a estas lesiones gástricas como acompañantes del adenocarcinoma de tipo intestinal, se han desarrollado los sistemas OLGA y OLGIM que permiten el análisis y clasificación de las mismas (Rugge et al., 2007).

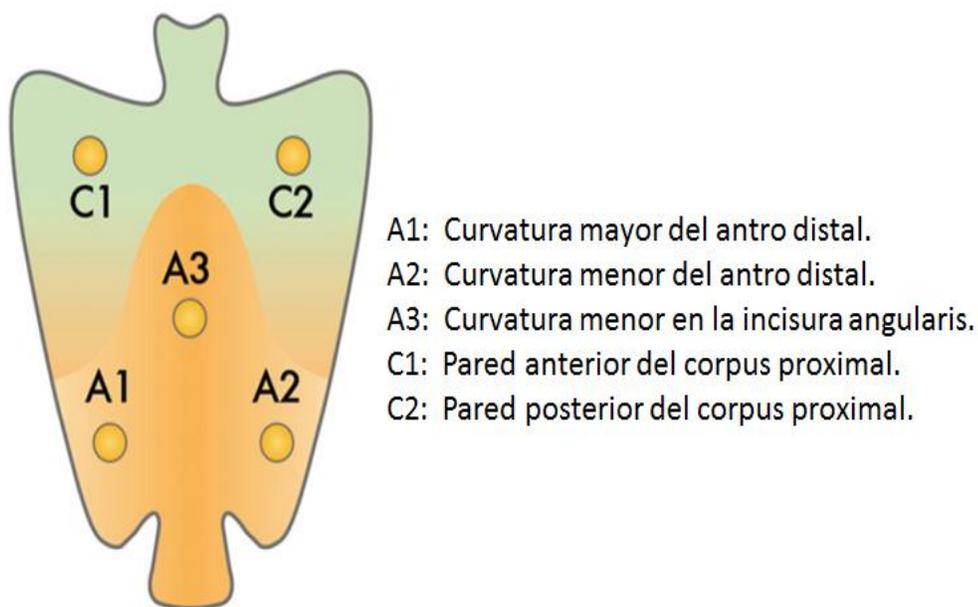


FIGURA 2: Protocolo de muestreo de biopsia gástrica según protocolo Sydney (Modificado a partir de Rugge et al., 2011).

1.1.6 OLGA

El sistema de estadificación de la evaluación operativa de gastritis (OLGA), que se basa en criterios internacionales de análisis de gastritis, mediante una escala visual analógica (EVA) la que evalúa los cambios atróficos; estratifica los fenotipos histológicos de gastritis en una escala de riesgo progresivo del GC, siendo el estado más bajo OLGA 0 y el más alto OLGA IV (Rugge et al., 2011) (Tabla 1).

Cuerpo					
Puntaje de atrofia		No atrofia	Atrofia leve	Atrofia moderada	Atrofia severa
		(Puntaje 0) ¹	(Puntaje 1) ¹	(Puntaje 2) ¹	(Puntaje 3) ¹
Antro	No atrofia (incluye incisura angularis)	Estadio 0	Estadio I	Estadio II	Estadio II
	Atrofia leve puntaje 1 (incluye incisura angularis)	Estadio I	Estadio I	Estadio II	Estadio III
	Atrofia leve puntaje 2 (incluye incisura angularis)	Estadio II	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
	Atrofia leve puntaje 3 (incluye incisura angularis)	Estadio III	Estadio III	Estadio IV	Estadio IV

¹ Mediante Escala Visual Análoga (EVA), de acuerdo al Protocolo Sydney.

Tabla 1: Etapificación del riesgo de cáncer gástrico según histología: Sistema OLGA (Operative Link for Gastritis Assessment) (Modificado a partir de Rugge et al., 2011).

1.1.7 Marcadores de lesiones preneoplásicas

Existen marcadores que se relacionan con la inestabilidad genética en cánceres humanos, incluyendo tumores gastrointestinales (Sato et al., 2006; Ooki et al., 2013). Dentro de estos marcadores se encuentra la proteína RPRM; que cumple una función de supresión tumoral.

1.1.7.1 Reprimo

El estudio de las alteraciones gástricas o marcadores es esencial para el diagnóstico precoz del CG. La carcinogénesis gástrica implica una acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, que conducen a una desregulación en la expresión de ciertos genes supresores de tumores (TSG) (Bass, 2014).

El gen Reprimo (RPRM) codifica a una proteína altamente glicosilada localizada en el citoplasma. Dicho gen se ubica en el cromosoma 2, específicamente en el locus 2q23.3 (Bernal, 2008), y se considera responsable de inducir detención del ciclo celular en la fase G2/M, sugiriendo que tiene una función supresora tumoral (Ohki et al., 2000), lo que permite considerarlo como un gen supresor de tumor putativo (Morris et al., 2010; Xia et al., 2010). La proteína normalmente se expresa en personas sanas y se describe que la pérdida de su expresión sería un marcador de agresividad en pacientes con CG (Saavedra et al., 2015).

El gen RPRM está fuertemente asociado a un estado de metilación aberrante (Takahashi et al., 2005) de su región promotora, lo que produce un silenciamiento de su expresión, alterando el producto proteico (Saavedra et al., 2015). Diversos resultados sugieren a RPRM como un posible biomarcador de detección temprana del CG en la

población, pudiendo ser detectado de forma primaria mediante test no invasivos (Bernal, 2008). En base a estos antecedentes sugerimos que RPRM en estadios OLGA bajos se expresa notablemente y a medida que aumenta el estadio OLGA (III) disminuye su expresión por la posible progresión a CG.

1.2 Hipótesis

- “Lesiones preneoplásicas de Cáncer Gástrico con estadios altos de OLGA muestran disminución en la expresión de RPRM”.

1.3 Objetivo general

- Evaluar los niveles de expresión de RPRM en lesiones preneoplásicas de CG en población de alto riesgo de la región del Maule.

1.4 Objetivos específicos

1.1.1 Analizar la morfología del epitelio gástrico de muestras endoscópicas, teñidas con Hematoxilina/Eosina.

1.1.2 Evaluar los estadios de OLGA en muestras endoscópicas con tinciones Hematoxilina/Eosina.

1.1.3 Evaluar el grado de expresión proteica de RPRM en muestras endoscópicas, mediante técnicas de inmunohistoquímica.

CAPÍTULO 2

2.1 Metodología

2.1.1 Tipo de estudio y diseño general

La investigación se basó en un estudio prospectivo de una cohorte de 934 pacientes asintomáticos, pertenecientes a cuatro postas rurales (Tres Esquinas, Itahue, Pichingal y Lontué) provenientes de la región del Maule, que forman parte del proyecto titulado “Caracterización y validación de marcadores de autofagia como determinantes terapéuticos y de pronóstico en lesiones tempranas de cáncer gástrico en la población de Molina” dirigido por el Dr. Nelson Brown y su director alterno Dr. Alejandro Corvalán. El proyecto es patrocinado y financiado por la Universidad de Talca, el Hospital de Curicó y el Gobierno Regional del Maule, bajo el formato del concurso público “Fondo de Innovación para la Competitividad” (FIC-R).

Estos individuos fueron reclutados vía encuesta telefónica, a los cuales se les realizó en primera instancia un análisis sanguíneo mediante la técnica MethyLight (ver Anexo A), con la cual se obtuvieron datos binomiales para la expresión de RPRM. De estos 934 individuos, 180 resultaron positivos para este marcador, siendo convocados para la

segunda etapa del estudio, donde se realizó la toma de biopsia gástrica, obtenida mediante una endoscopia digestiva alta (EDA), utilizando el protocolo Sídney, mediante un sistema de recolección de información basado en consentimiento informado (ver Anexo B).

En esta unidad de investigación se diseñó un estudio agrupado en caso-control, el cual se basa en la selección de un número específico de casos, emparejados con un grupo control de la cohorte en estudio, ya que este modelo resulta ser ventajoso para el estudio de precursores biológicos como es el caso de RPRM.

2.1.2 Criterios de inclusión y exclusión

Para el presente estudio fueron incluidas solo muestras endoscópicas gástricas de los individuos que en primera instancia resultó positivo el estudio del marcador RPRM, en análisis sanguíneos (técnica MethyLight).

El único criterio de exclusión utilizado abarcó a todos aquellos individuos que no presentaron positividad en el marcador RPRM en muestras sanguíneas.

2.1.3 Variables a estudiar

2.1.3.1 “Estadificación OLGA”

Se realizó un análisis histológico para evidenciar gastritis en muestras endoscópicas gástricas, a través del sistema de estadificación OLGA, que permitió evaluar cambios

atróficos asociados a la cascada de lesiones preneoplásicas, utilizando una notación basada en números enteros del 0 al 4.

2.1.3.2 “Expresión RPRM”

Se cuantificó la positividad de marcación IHQ de RPRM, mediante el método Quick score (Q), basado en un sistema de puntuación de números enteros del 1 al 12, permitiendo cuantificar los resultados de la inmunohistoquímica.

2.1.4 Tamaño muestral

De las 180 muestras incorporadas en la segunda fase del estudio, se seleccionaron aleatoriamente 40, incluyendo pacientes de ambos sexos cuyas edades fluctúan entre los 36 y 84 años. De estos 40 casos seleccionados se obtuvo muestras con estadios de OLGA bajos (0, I, II) y OLGA altos (III, IV) en una proporción de 3 es a 1 respectivamente, encontrando en la segunda categoría solo casos de OLGA de estadio III, por lo que el estadio más severo de gastritis atrófica (OLGA IV) queda fuera de este estudio.

El n muestral seleccionado es estadísticamente significativo y óptimo para el tiempo asignado a esta unidad de investigación.

2.1.5 Procesamiento histológico de muestras endoscópicas.

Las muestras endoscópicas analizadas en el presente estudio, previamente fijadas en zinc buffered formalin, THERMO SCIENTIFIC, (REF 5701zf) y almacenadas en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 4°C en las dependencias del Hospital de Curicó, fueron trasladadas para su almacenamiento a los laboratorios de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Tras su fijación las muestras fueron procesadas con métodos de histología convencional en un equipo automático MICROM modelo STP120, ubicado en los laboratorios CATEM de la escuela Tecnología Médica, Universidad Andrés Bello. En dicho equipo se realizó la deshidratación progresiva de los tejidos, para posteriormente infiltrar las muestras con un medio de inclusión anhidro (Paraplast®) con la finalidad de entregar mayor consistencia a dichas muestras (ver protocolo anexo C).

2.1.6 Inclusión y corte de muestras endoscópicas.

Las biopsias procesadas fueron incluidas en parafina para obtener un bloque histológico firme que prevenga la distorsión del tejido durante el corte en micrótopo.

Una vez obtenido el bloque de parafina con el tejido en su interior, se procedió a cortar en un micrótopo de rotación (Accu-Edge, SAKURA), para generar cortes de 3 μm , regulares y homogéneos de tejido (Carson, 2009). También fueron necesarios insumos como navajas desechables Accu-Edge, SAKURA, baño de flotación, platina fría, además de portaobjetos cargados CITOGLAS, (REF0313-3171), que otorgan una mejor adhesión del tejido, lo que resulta útil al realizar técnicas IHQ.

2.1.7 Tinción Hematoxilina/ Eosina (H/E).

Los cortes histológicos fueron secados a 60°C por 12 horas y sometidos a la tinción de rutina H/E (ver protocolo anexo D), donde se realizó una tinción nuclear y citoplasmática de los componentes tisulares. Una vez realizada la tinción se procedió a visualizar en microscopio óptico, con el fin de evidenciar la conservación de características morfológicas del epitelio gástrico.

2.1.8 Método de análisis de morfología gástrica.

Con el fin de evaluar la morfología del epitelio gástrico, además de su adecuada conservación y buen procesamiento analizamos características tintoriales de cortes teñidos con H/E, se evaluó la conservación adecuada de estructura nuclear, citoplasmática, tanto del tejido estromal, como del componente epitelial. Permitiendo establecer un control de calidad tanto de la muestra como de la conservación y ubicación del antígeno de interés.

Dichos criterios se organizaron en la tabla 2, que fue aplicada a la evaluación morfológica del epitelio gástrico de las 40 muestras gástricas:

Características histológicas generales
Continuidad del epitelio y estroma
Ausencia de centros hemorrágicos
Hiperemia fisiológica conservada
Ausencia de autolisis

Ausencia de vacuolizaciones
Ausencia de retracción tisular excesiva
Mantenimiento de las criptas gástricas (Foveolas)
Conservación de componentes celular: Polimorfonucleares, linfocitos, plasmocitos
Conservación nuclear, con distribución de cromatina normal
Mantención de la polaridad celular
Conservación de propiedades tintoriales

Tabla 2: Criterios de evaluación histológica tisular general (extraído de Robbins 9^a edición).

2.1.9 Método de análisis estadios OLGA

Las muestras endoscópicas gástricas a estudiar fueron analizadas bajo el sistema de estadificación OLGA, con la asesoría de un anatomopatólogo.

El análisis se realizó en base a la organización de fenotipos histológicos de la gastritis a lo largo de la cascada preneoplásica, desde el más bajo (estadio 0 de OLGA) hasta el más alto (estadio IV de OLGA). La gastritis se estadificó al combinar el grado de atrofia (en base a rasgos histológicos más comunes de inflamación gástrica), con su ubicación topográfica (resultado del protocolo Sydney), según el modelo establecido en la tabla 1. La descripción histológica utilizada para caracterizar los distintos estadios OLGA, se describe en la tabla a continuación:

Estadios OLGA	Hallazgos
OLGA 0	Se caracteriza por presentar mucosa no atrófica (normal), sin presencia de grados de atrofia glandular, con conservación de epitelio simple cilíndrico alto, ocasionalmente se pueden encontrar células metaplasicas (caliciformes) de focos minúsculos, particularmente en el epitelio foveolar pero la densidad total de las glándulas apropiadas no se ve afectada.
OLGA I	Se caracteriza por ser una etapa con mucosa atrófica más baja, donde puede existir una contracción o desaparición leve y poco evidente de las unidades glandulares normales. Puede coexistir con lesiones inflamatorias con presencia de polimorfos e infiltrado linfoide.
OLGA II	Caracterizada por la presencia de mucosa atrófica más elevada que un estadio OLGA I, dichas transformaciones atróficas pueden presentarse en diferentes ubicaciones dentro de la mucosa gástrica. Puede coexistir con lesiones inflamatorias con presencia de polimorfos e infiltrado linfoide.
OLGA III	<p>Caracterizada por la presencia de mucosa atrófica moderada principalmente en la mucosa antral, asociada a dos posibles causas:</p> <p>(a) una expansión fibrótica de la lámina propia circundante con una masa glandular reducida, pero que no implica ninguna modificación del fenotipo del epitelio original.</p> <p>(b) Producida por un reemplazo metaplasico de las glándulas normales por glándulas que presentan un nuevo compromiso celular (metaplasia intestinal y/o pseudopilórica).</p> <p>Resultado de esta atrofia moderada, el subtipo histológico más frecuente de transformación atrófica es la variante metaplasica, con presencia de células caliciformes y células de Paneth. Puede coexistir con lesiones inflamatorias con presencia de polimorfos e infiltrado linfoide.</p>

OLGA IV	<p>Caracterizada por la presencia de mucosa atrófica severa que afecta tanto a cuerpo y antro estomacal, asociada a dos posibles causas:</p> <p>(a) Una expansión fibrótica de la lámina propia circundante con una masa glandular reducida, pero que no implica ninguna modificación del fenotipo del epitelio original.</p> <p>(b) Producida por un reemplazo metaplasico de las glándulas normales por glándulas que presentan un nuevo compromiso celular (metaplasia intestinal y/o pseudopilórica).</p> <p>Resultado de esta atrofia severa, el subtipo histológico más frecuente de transformación atrófica es la variante metaplasica (células caliciformes), que se presenta de manera extensa en el epitelio glandular y presencia de células de Paneth. Puede coexistir con lesiones inflamatorias con presencia de polimorfos e infiltrado linfoide.</p>
----------------	--

Tabla 3: Tabla representativa de los criterios histológicos descritos para cada estadio OLGA (extraído de Rugge et al., 2008).

De acuerdo a este análisis se seleccionaron 40 casos, basados en el diseño de investigación caso-control. Se seleccionaron muestras clasificadas en OLGA alta (III) y OLGA baja (0, I, II).

La selección establecida permitió comparar la expresión de RPRM a medida que avanza la cascada preneoplásica.

2.1.10 Técnica Inmunohistoquímica (IHQ)

Los bloques histológicos cortados y adheridos a portaobjetos con carga CITOGLAS, (REF0313-3171), fueron utilizados para la técnica de IHQ, la que se basa en la interacción antígeno-anticuerpo. Esta técnica presenta mayor especificidad y

sensibilidad que una técnica histoquímica, puesto que requiere una menor cantidad de moléculas de interés presentes en la muestra en estudio para identificarla.

El inmunomarcaje va dirigido a un antígeno específico (molécula de interés), con un anticuerpo puntual, capaz de reconocer esta molécula, además de un sistema de detección, que permite la visualización de dicha interacción.

Se realizó un protocolo de IHQ indirecta (ver protocolo Anexo E), la que se describe como un método de detección de antígenos *in situ*, en el cual se utilizó un anticuerpo primario abcam (ab213961) contra el antígeno de interés (RPRM). Como sistema de detección se utilizó metodología de sistema de polímero conjugado (EPOC), el que conjuga anticuerpos secundarios unidos a un polímero de alto peso molecular (vector, Imm PRESS™ HRP reagent, MP7500), unido covalentemente a moléculas de peroxidasa, que al oxidar el cromógeno (DAB) nos permite visualización de la reacción, mediante el depósito de un sustrato coloreado e insoluble.

La técnica IHQ incluyó la utilización de controles paralelos (control positivo y negativo) (ver protocolo anexo F).

2.1.11 Método cuantitativo de análisis IHQ

En el presente estudio se evaluó la positividad de marcación IHQ de RPRM y se cuantificó mediante el método Quick score (Q), con el análisis en ciego de 4 evaluadores, anatomatólogo, profesor co-tutor y alumnas autoras de unidad de investigación de carrera Tecnología Médica. El análisis realizado por las alumnas se consideró válido, ya que fueron capacitadas por el anatomatólogo.

Dicho método permite cuantificar los resultados de las tinciones inmunohistoquímicas, bajo un sistema de puntuación basado en dos variables, descritas a continuación:

Proporción de células positivas (P)	0-25%	25-50%	50-75%	75-100%
Score	1	2	3	4

Tabla 4: tabla representativa de la variable proporción de células positivas (P), involucrada en el método Q-score.

Intensidad de marcaje (I)	Negativo (sin tinción a gran aumento)	Débil (solo visible a gran aumento)	Moderado (fácilmente visible a bajo aumento)	Fuerte (sorprendentemente positivo a bajo aumento)
Score	0	1	2	3

Tabla 5: Tabla representativa de la variable de intensidad de marcaje, involucrada en el método Q-Score.

Las variables presentadas en la tabla 4 y tabla 5 son sometidas a la siguiente fórmula $Q = P * I$, el producto (Q) de las variables (P, I) es un valor continuo entre 0 - 12, donde 0 indica ausencia de expresión y 12 indica el nivel más alto de expresión obtenido en base a este método.

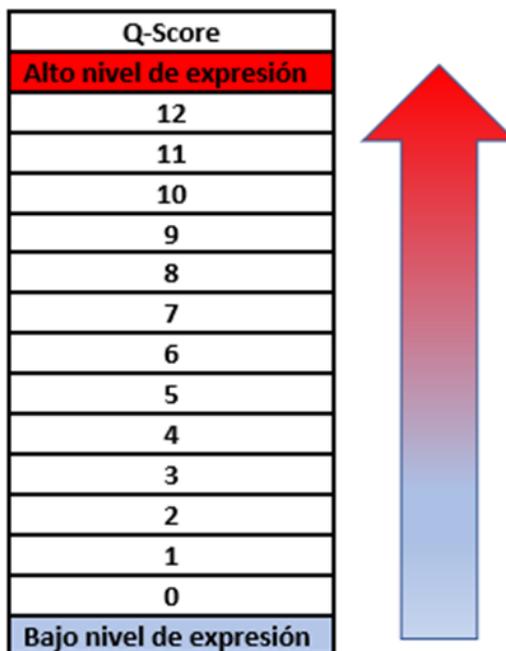


Figura 3: Representación de los niveles de expresión obtenidos mediante el método Q-Score.

2.1.12 Método estadístico de análisis de la información.

Las medidas de expresión proteica del marcador biológico RPRM fueron analizadas mediante el test de normalidad D'Agostino-Pearson y el test Ordinary one-way ANOVA, utilizando el programa Graph Pad Prism.

El test D'Agostino-Pearson permitió determinar la normalidad de la distribución de los datos en estudio y el posterior análisis a través del test Ordinary one-way ANOVA, que permitió estudiar las dispersiones de los grupos, además de evaluar la significancia, con valores P establecidos (0,1234 (ns); 0,0332 (*); 0,0021 (**); 0,0002 (***) < 0,0001 (****)), facilitando el análisis estadístico de las variables en estudio.

CAPÍTULO 3

3.1 Resultados

3.1.1 Análisis de la morfología del epitelio gástrico de muestras endoscópicas, teñidas con Hematoxilina/Eosina.

De un total de 40 muestras endoscópicas analizadas mediante la técnica Hematoxilina/Eosina, el 100% presentó una conservación adecuada del epitelio gástrico, la representación histológica y tabla de criterios morfológicos se detallan en la figura 4, con una imagen representativa del epitelio gástrico y la conservación de este, bajo los criterios descritos en la tabla 5.

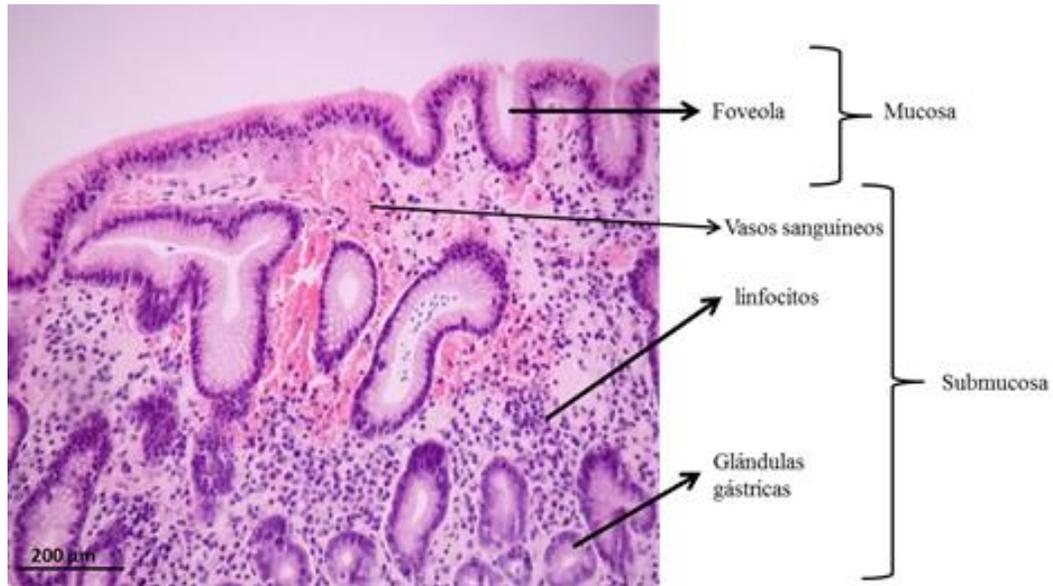


Figura 4: Tinción hematoxilina/Eosina, Mucosa gástrica, (400x).

En esta imagen se aprecia la vista panorámica de la mucosa gástrica. Es posible reconocer 2 capas histológicas que constituyen la pared del órgano. (1) Mucosa, formada por un epitelio simple cilíndrico alto que forma pliegues compactos; que dan forma a las foveolas donde desembocan las glándulas gástricas. (2) Submucosa, formada por tejido conectivo laxo con numerosos linfocitos, células plasmáticas y vasos sanguíneos.

Características histológicas generales	SI	NO
Continuidad del epitelio y estroma	X	
Ausencia de centros hemorrágicos	X	
Hiperemia fisiológica conservada	X	
Ausencia de autolisis	X	
Ausencia de vacuolizaciones	X	
Ausencia de retracción tisular excesiva	X	
Mantenimiento de las criptas gástricas (Foveolas)	X	
Conservación de componentes celular: Polimorfonucleares, linfocitos, plasmocitos	X	
Conservación nuclear, con distribución de cromatina normal	X	
Mantención de la polaridad celular	X	
Conservación de las capacidades tintoriales	X	

Tabla 6: Criterios de evaluación histológica tisular general, aplicados a las 40 muestras endoscópicas gástricas.

3.1.2 Evaluación de los estadios de OLGA en muestras endoscópicas con tinciones Hematoxilina/Eosina.

La distribución de las 40 muestras gástricas estratificadas según sus características histológicas dentro de los distintos estadios OLGA se presenta a continuación.

Clasificación OLGA	Número de muestras	%
OLGA 0	12	30 %
OLGA I	13	32,5 %
OLGA II	5	12,5 %
OLGA III	10	25 %
Total	40	100 %

Tabla 7: Cuadro de clasificación de muestras endoscópicas seleccionadas (n: 40), según el sistema de estadificación OLGA, con su respectivo porcentaje (%), divididas según estadios O, I, II y III.

El análisis de los niveles de gastritis basado en estadios OLGA, arrojó que el 75% de los casos se distribuyen en estadios OLGA bajos (0, I, II) y un 25% en estadios OLGA alto (III). El detalle de los rasgos histológicos de gastritis presentes en los diferentes estadios OLGA se describe a continuación:

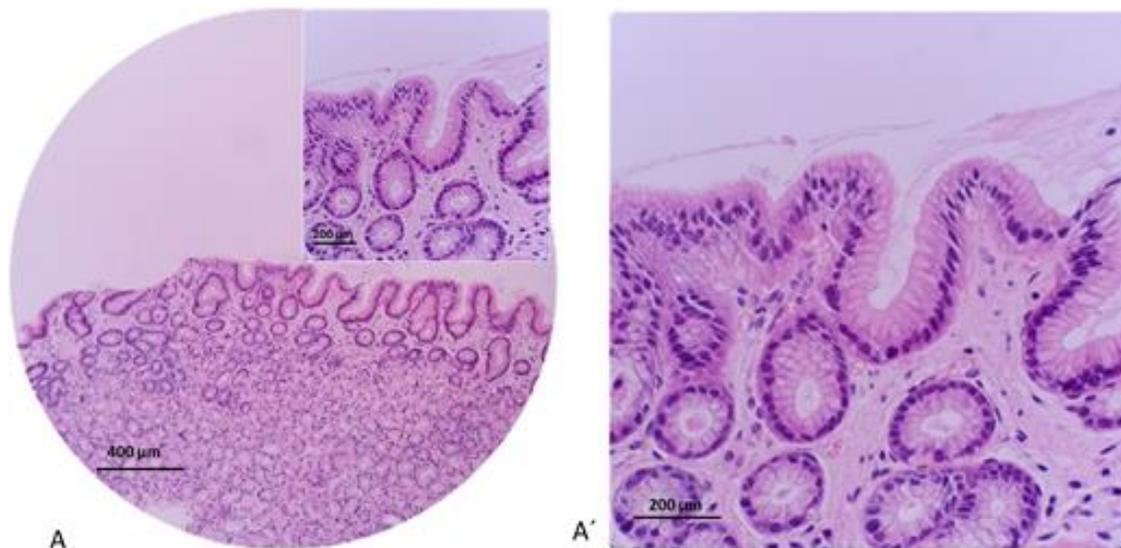


FIGURA 5: Tinción hematoxilina/Eosina, tejido gástrico, con estadio OLGA 0, aumento original para imagen A es de 100X, el recuadro superior derecho A' presenta un aumento de 400X.

Muestra endoscópica con estadio OLGA 0 (Fig.5): Se observan glándulas de carácter normal, la estructura foveolar consiste en células de secreción mucosa de las que podemos observar el epitelio monocapa de células altas, las cuales presentan núcleos parejos con cromatina homogénea, citoplasma con tinción pareja, sin presencia de vesículas, no se observan componentes inflamatorios, hemorragias o necrosis, además no se observa ninguna modificación del epitelio original.

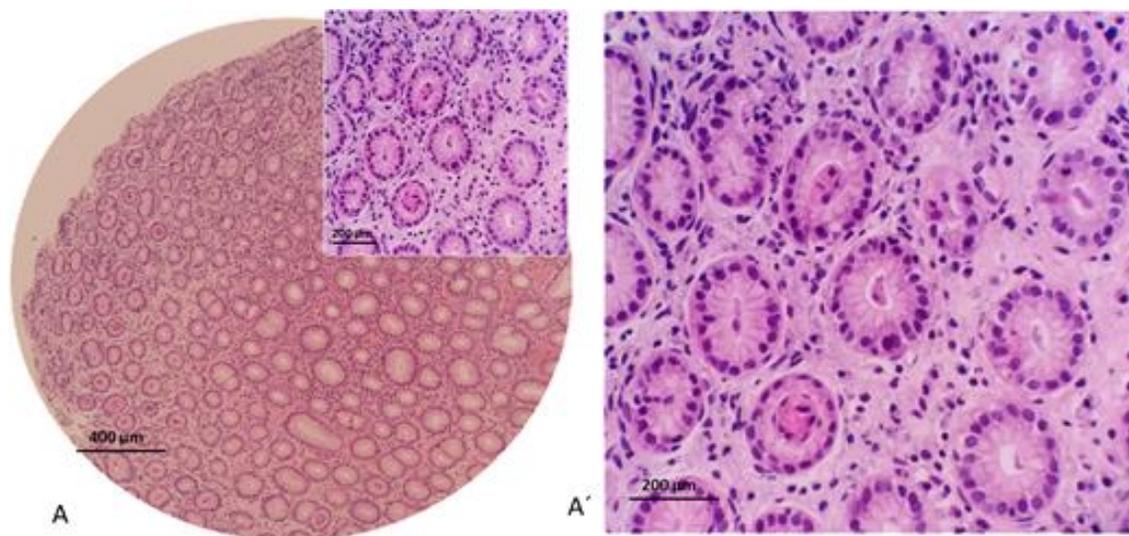


FIGURA 6: Tinción hematoxilina/Eosina, tejido gástrico, con estadio OLGA I, aumento original para imagen A es de 100X, el recuadro superior derecho A' presenta un aumento de 400X.

Muestra endoscópica con estadio OLGA I (Fig.6): Podemos observar atrofia leve, una mucosa corporal normal, con buen desarrollo glandular, presencia de componentes inflamatorios, células que asemejan características de células caliciformes. Este hallazgo no representa una metaplasia intestinal que afecte una unidad glandular completa.

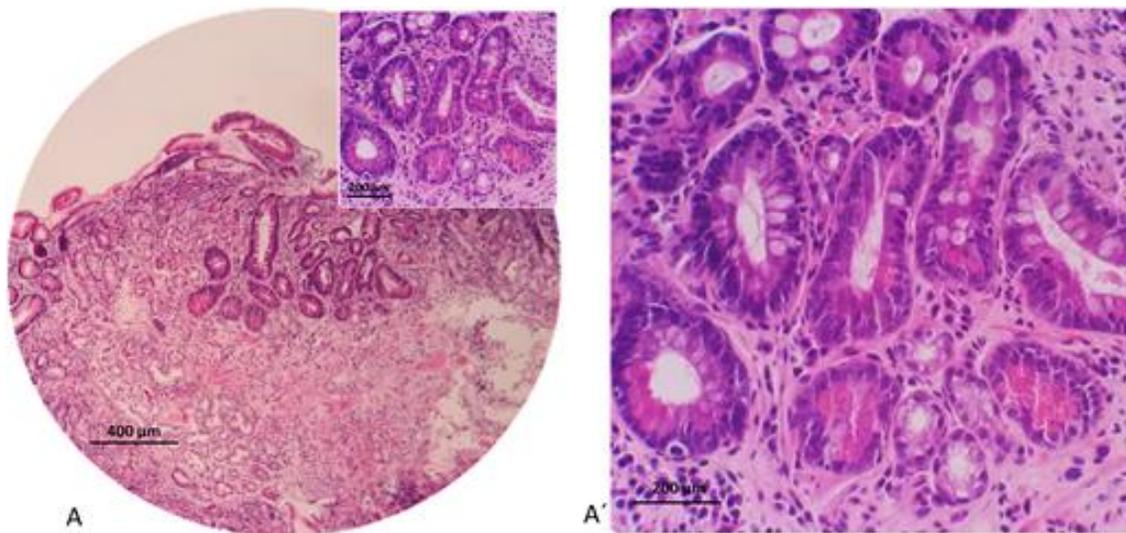


FIGURA 7: Tinción hematoxilina/Eosina, tejido gástrico, con estadio OLGA II, aumento original para imagen A es de 100X, el recuadro superior derecho A' presenta un aumento de 400X.

Muestra endoscópica con estadio OLGA II (Fig.7): Podemos observar la mucosa de cuerpo con sustitución metaplásica focal del epitelio foveolar superficial por células caliciforme y células de Paneth (con gránulos citoplasmáticos eosinófilos), asemejándose a criptas intestinales. Esto afecta a la unidad glandular completa y constituye marcador de atrofia moderada, observándose disminución del componente glandular normal.

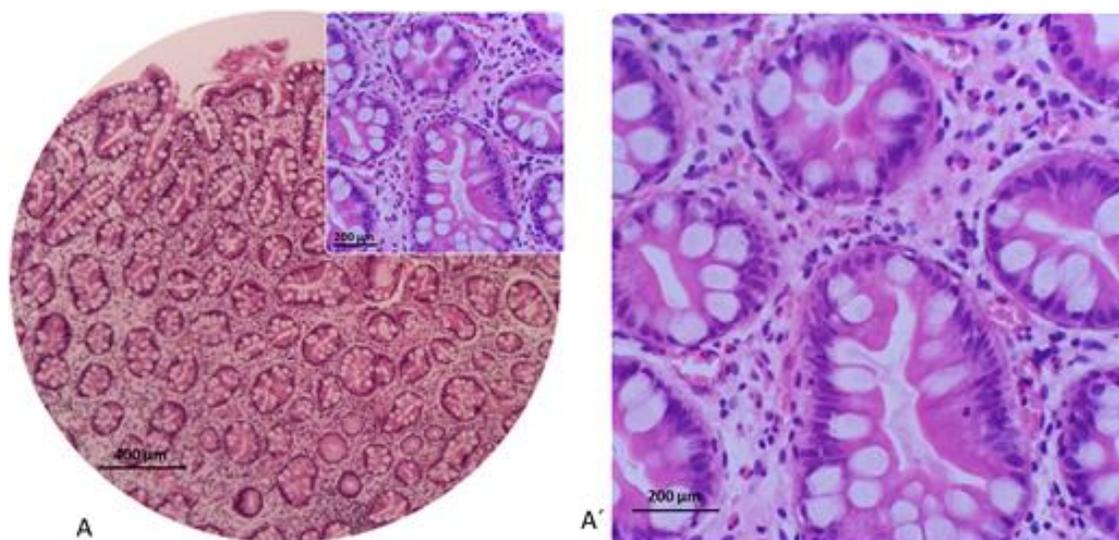


FIGURA 8: Tinción hematoxilina/Eosina, tejido gástrico, con estadio OLGA III, aumento original para imagen A es de 100X, el recuadro superior derecho A' presenta un aumento de 400X.

Muestra endoscópica con estadio OLGA III (Fig.8): Podemos reconocer reemplazo metaplásico de las glándulas gástricas nativas, con presencia de células caliciformes, ópticamente vacías, con parte apical más ancha, por acumulación de vesículas de secreción, estas están presentes en todo el espesor glandular. También se observa atrofia severa y presencia de células inflamatorias en estroma.

3.1.3 Evaluación del grado de expresión proteica de RPRM en muestras endoscópicas, mediante técnicas de Inmunohistoquímica.

La técnica IHQ realizada para evidenciar la expresión de RPRM en los diferentes estadios OLGA, fue empleada simultáneamente a controles (negativo y positivo), lo que nos permite confirmar la especificidad del anticuerpo y calidad del sistema de detección, obteniendo resultados más confiables. A continuación, se presentan muestras representativas de los parámetros comentados anteriormente.

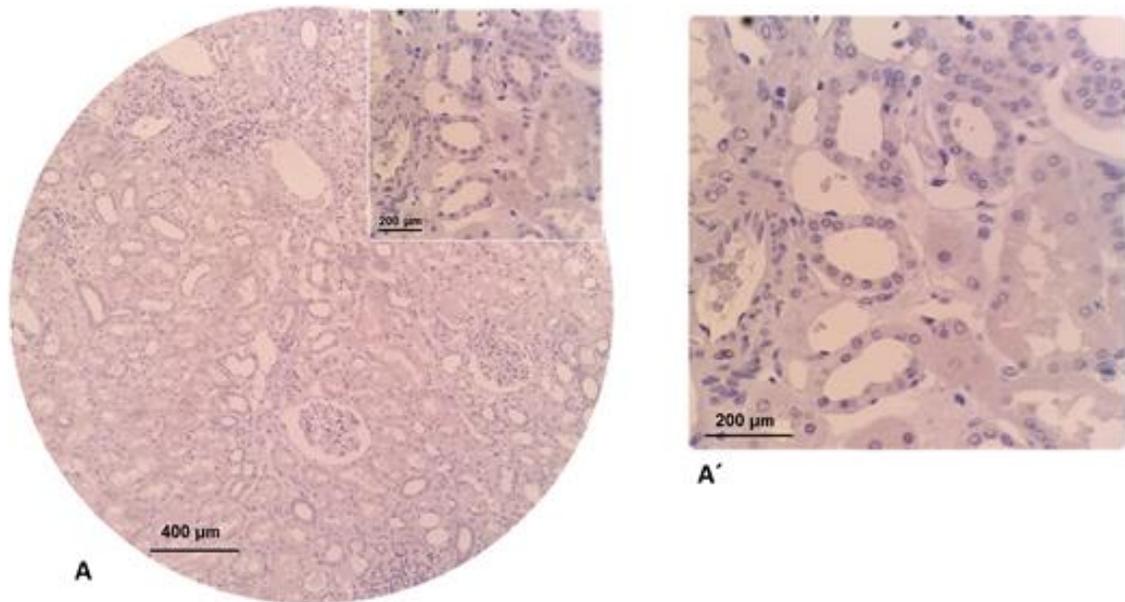


Figura 9: Tinción IHQ para el anticuerpo RPRM. En riñón humano, control negativo. Contraste nuclear con Hematoxilina. El aumento original para la imagen A fue 100X, con recuadro de aumento superior derecho (400X) (A').

Hallazgos: Se aprecia ausencia de marcación citoplasmática de RPRM en glomérulos y túbulos renales.

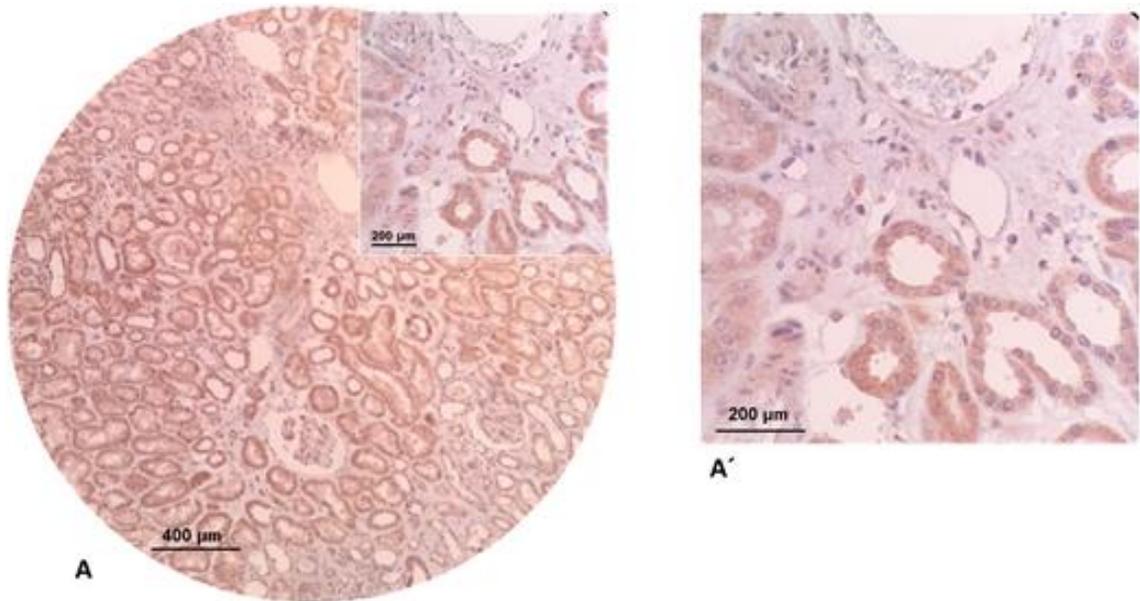


Figura 10: Tinción IHQ para el anticuerpo RPRM. Riñón humano, control positivo. Contraste nuclear con Hematoxilina. El aumento original para la imagen A fue 100X, con recuadro de aumento superior derecho (400X) (A').

Hallazgos: se observa una marcación citoplasmática positiva de intensidad moderada, en células de túbulo renales del marcador RPRM.

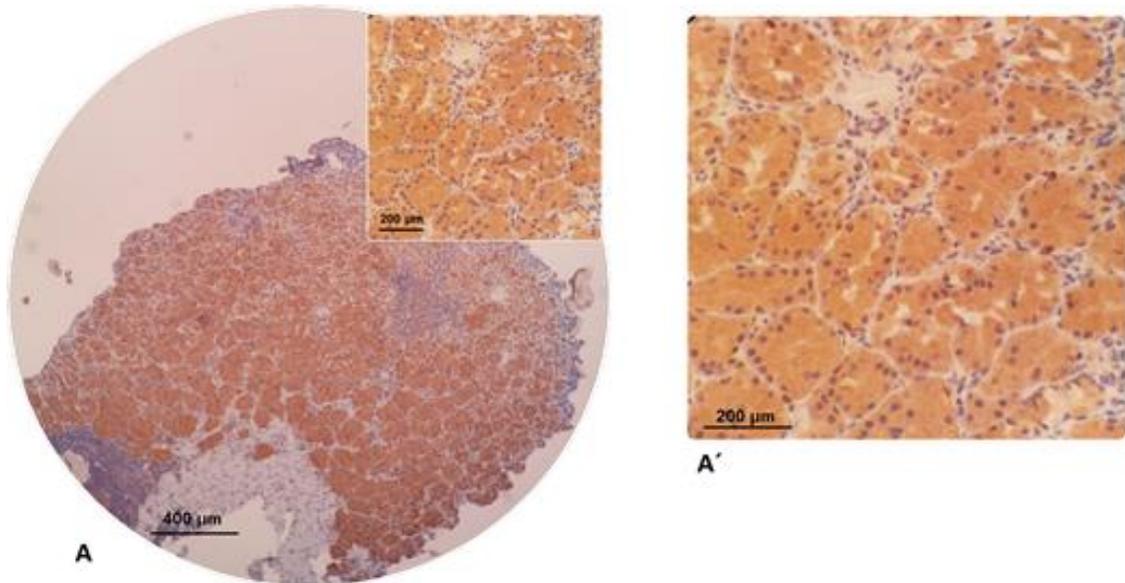


Figura 11: Tinción IHQ para el anticuerpo RPRM. Tejido gástrico. Contraste nuclear con Hematoxilina. El aumento original para la imagen A fue 100X, con recuadro de aumento superior derecho (400X) (A').

Hallazgos: Se observa una marcación positiva, para RPRM en células de glándulas gástricas, representativa de una muestra endoscópica con estadio OLGA 0.

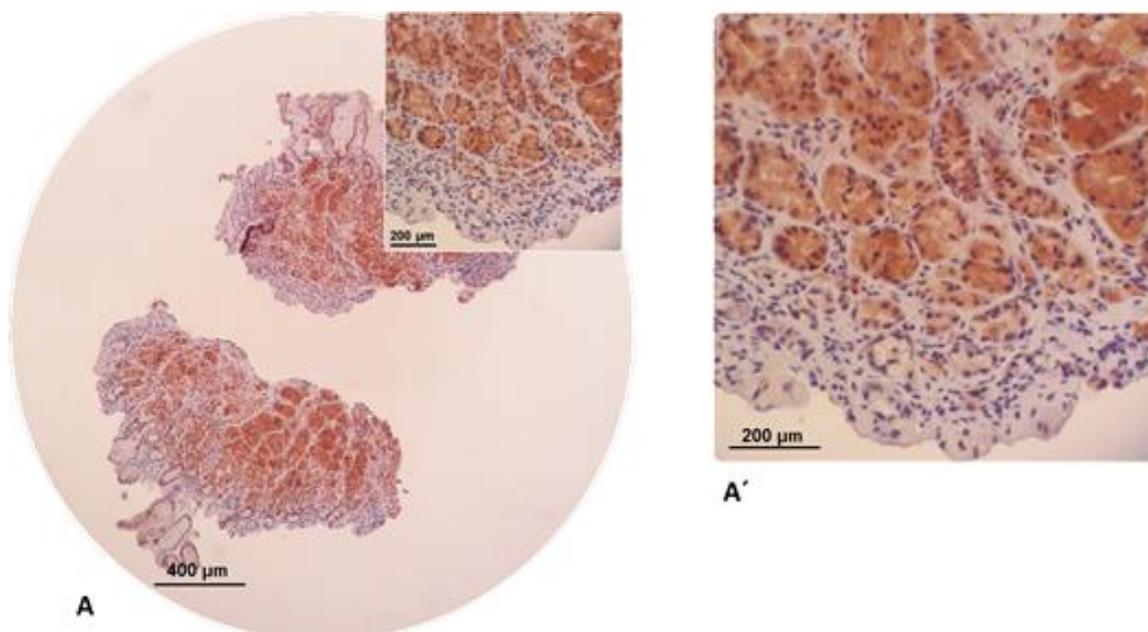


Figura 12: Tinción IHQ para el anticuerpo RPRM. Tejido gástrico. Contraste nuclear con Hematoxilina. El aumento original para la imagen A fue 100X, con recuadro de aumento superior derecho (400X) (A').

Hallazgos: Se observa una marcación positiva, para RPRM en células de glándulas gástricas, representativa de una muestra endoscópica con estadio OLGA I.

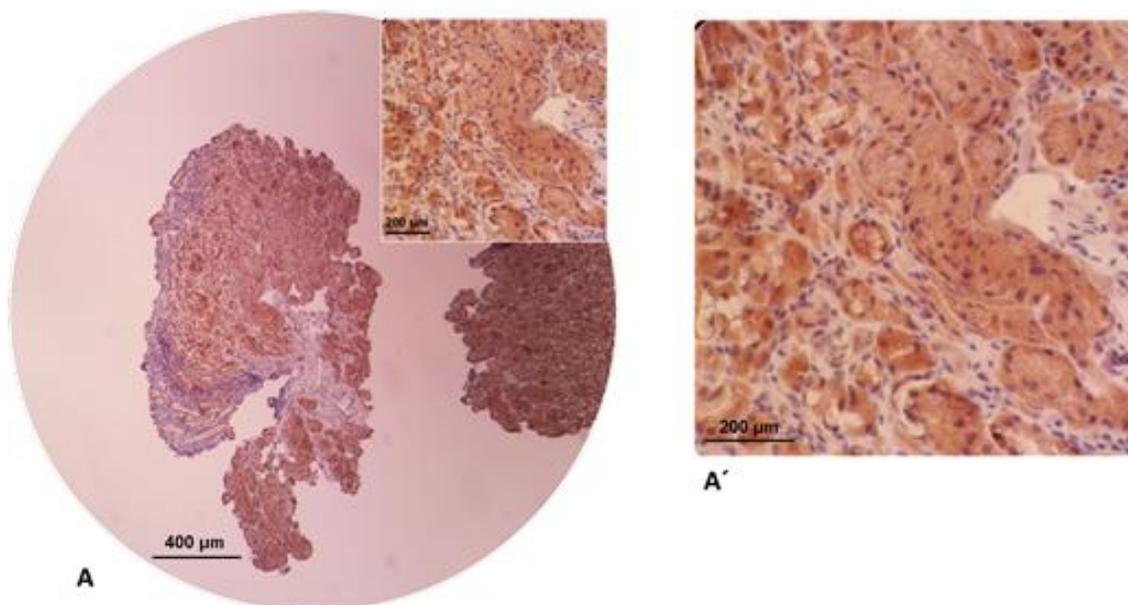


Figura 13: Tinción IHQ para el anticuerpo RPRM. Tejido gástrico. Contraste nuclear con Hematoxilina. El aumento original para la imagen A fue 100X, con recuadro de aumento superior derecho (400X) (A').

Hallazgos: Se observa una marcación positiva, para RPRM en células de glándulas gástricas, representativa de una muestra endoscópica con estadio OLGA II.

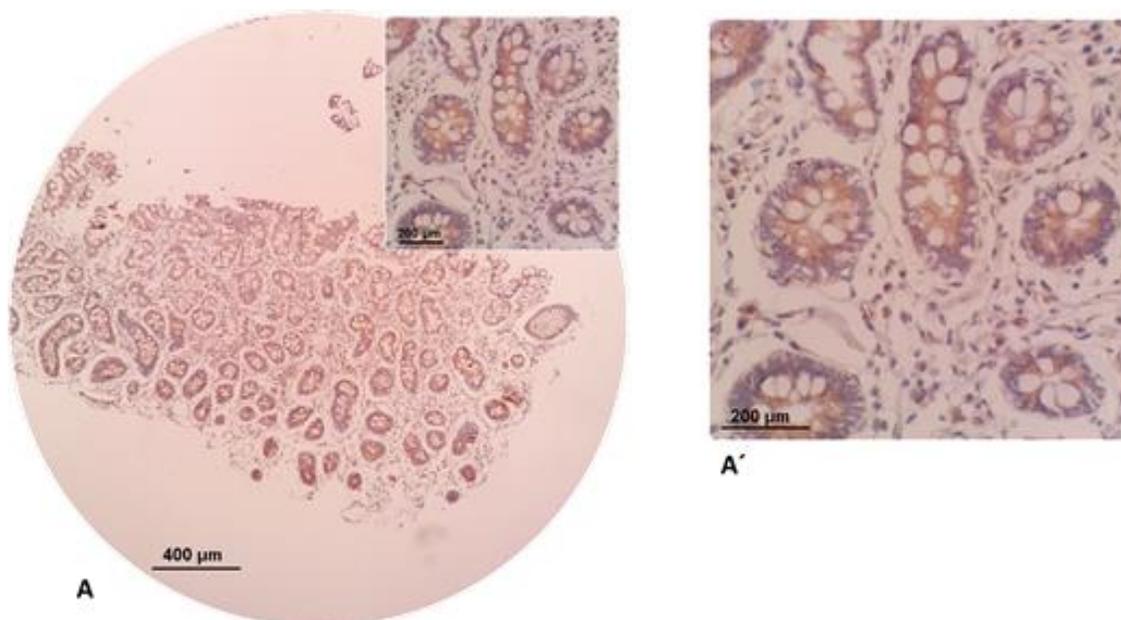


Figura 14: Tinción IHQ para el anticuerpo RPRM. Tejido gástrico. Contraste nuclear con Hematoxilina. El aumento original para la imagen A fue 100X, con recuadro de aumento superior derecho (400X) (A').

Hallazgos: se observa una marcación positiva, para RPRM en células de glándulas gástricas, representativa de una muestra endoscópica con estadio OLGA III.

El promedio simple obtenido entre los resultados de Q-Score realizados en ciego por 4 observadores, entre los que se encontraba un Anatomopatólogo, Tecnólogo Médico (Co-tutor) y alumnas autoras de la presente unidad de investigación, se detalla a continuación:

Muestra	Q Patólogo	Q Co-tutor	Q Alumna 1	Q Alumna 2	Q promedio
FIC-16-001	4	2	3	4	3
FIC-16-006	8	6	12	8	8
FIC-16-009	12	12	8	12	11
FIC-16-014	12	9	9	6	9
FIC-16-017	4	4	4	4	4
FIC-16-020	12	12	12	12	12
FIC-16-025	8	8	8	6	7
FIC-16-026	2	2	2	2	2
FIC-16-029	12	6	8	8	8
FIC-16-031	6	4	4	6	5
FIC-16-032	6	4	6	4	5
FIC-16-033	8	6	6	3	6
FIC-16-036	8	4	8	8	7
FIC-16-037	8	9	6	12	9
FIC-16-047	8	9	6	8	8
FIC-16-071	4	6	3	2	4
FIC-16-087	12	6	9	12	10
FIC-16-091	8	6	8	8	8
FIC-16-095	8	8	6	2	6
FIC-16-097	4	4	3	2	3
FIC-16-098	8	6	8	8	8
FIC-16-107	4	4	4	6	5
FIC-16-108	4	4	3	1	3
FIC-16-110	8	4	8	8	7
FIC-16-111	4	6	6	4	5
FIC-16-117	6	4	6	8	6
FIC-16-118	8	4	8	8	7
FIC-16-123	2	1	2	1	1
FIC-16-129	8	3	4	4	5
FIC-16-130	8	9	6	8	8
FIC-16-132	8	12	8	12	10
FIC-16-133	4	4	3	1	4
FIC-16-134	8	4	6	8	7
FIC-16-141	12	9	8	8	9
FIC-16-144	8	4	4	2	5
FIC-16-145	8	4	6	6	6
FIC-16-148	4	12	12	8	9
FIC-16-155	12	12	8	12	11
FIC-16-158	8	9	12	12	10
FIC-16-165	4	3	4	4	4

Tabla 8: Cuadro representativo de promedios Q-score realizado por 4 observadores, mediante el análisis IHQ de RPRM en 40 muestras endoscópicas (ver tablas completaría en anexo G, H, I, J).

La tabla 8 presenta los Q-score obtenidos por cada evaluador y el promedio final simple (Q-Score final) para las 40 biopsias gástricas analizadas mediante la técnica IHQ para RPRM. Se observa una distribución homogénea de promedio de datos (Q), con pequeñas desviaciones en los valores individuales obtenidos por cada evaluador, que son considerados válidos, dado que el promedio final de datos no se aleja de la opinión del experto (anatomopatólogo).

En base al Q-Score obtenido de la IHQ de RPRM y la clasificación según sistema OLGA de las 40 muestras endoscópicas, se realizó análisis estadístico representativo de ambas variables en estudio, graficado a continuación:

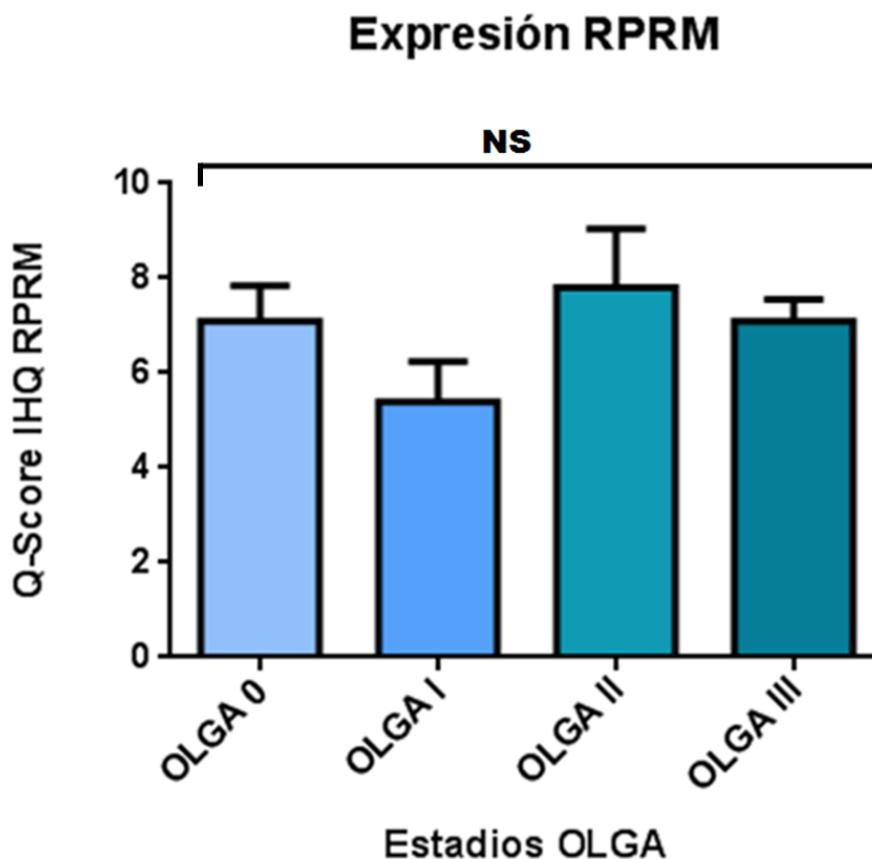


Figura 15: Análisis de expresión IHQ de reprimó (RPRM) vs estadios OLGA.

El siguiente gráfico muestra cómo se distribuye la expresión de RPRM analizada por Q-Score, en los distintos estadios OLGA. Según análisis Ordinary one-way ANOVA $P=0.2128$, no significativo (NS).

Se observa una dispersión de los niveles de expresión de RPRM en los distintos estadios OLGA, con un P value estadísticamente no significativo. Es posible visualizar que en los estadios OLGA 0 y OLGA III el Q-Score representativo de los niveles de expresión de RPRM presentó un comportamiento similar. En el estadio OLGA I se

apreció una leve disminución de los niveles de expresión en comparación a los demás estadios. Además, se observa que el estadio OLGA II comparado al resto de los estadios registró niveles de expresión levemente mayores, además de una dispersión de datos mayor.

CAPÍTULO 4

4.1 Discusión

En esta unidad de investigación se estudió el comportamiento del marcador gástrico RPRM a lo largo de la cascada preneoplásica de cáncer gástrico en los diferentes estadios OLGA, en individuos asintomáticos, pertenecientes a regiones con mayor población de alto riesgo de generar CG.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, se estableció que las muestras cumplieron con los criterios histológicos aptos para ser consideradas en estudios morfológicos e IHQ, asegurando que no existía daño del antígeno en estudio (RPRM).

El análisis histológico de 40 muestras endoscópicas, permitió confirmar la presencia de lesiones precursoras de CG como lo describe Correa en el “Modelo humano de carcinogénesis gástrica” (Correa et al., 2007), donde se identificó atrofia gástrica y MI. Estos hallazgos permitieron evaluar los posibles cambios en la expresión proteica de RPRM a través del análisis IHQ.

El análisis estadístico Ordinary one-way ANOVA, realizado en base a los promedios simples de Q-score obtenidos por los 4 evaluadores, se realizó con el fin de evitar una

cuantificación sesgada al momento de evaluar la marcación IHQ de RPRM, este dato entregó un valor cuantitativo no significativo ($P= 0.2128$). Como consecuencia de esto es aceptada hipótesis nula (H_0); lo que sugiere que las variables en estudio no se comportan como variables dependientes, por lo que no es posible establecer el comportamiento del marcador en los distintos estadios OLGA.

Una de las variables consideradas como posible causa de la obtención de valores no significativos entregados por el análisis estadístico ANOVA, es el volumen muestral utilizado ($n=40$), el cual se comportó de manera heterogénea producto del muestreo al azar de los distintos estadios OLGA, como se evidencia en OLGA II que presenta un N muestral igual a 5, lo que no influye en la significancia total de las muestras, dicho volumen resulta ser bajo en comparación a otros estudios realizados en la misma área de investigación, los cuales constan con un n muestral mayor al establecido en esta unidad de investigación. Dicha variable; se considera un factor influyente al momento de determinar si el descenso en la expresión de RPRM dentro de este estudio se ve sesgado.

No se encontró una asociación entre estadios OLGA y la expresión del producto proteico de RPRM en lesiones preneoplásicas de CG. Lo que se contrasta con la correlación clínico patológica de la pérdida de expresión de RPRM asociada con etapa invasiva de CG (Saavedra et al., 2015).

Si bien la gastritis es un factor de riesgo a desarrollar CG, las lesiones presentes en la cascada preneoplásica no presentan un comportamiento estable, lo que puede contribuir a que los niveles de expresión de RPRM fluctúen a lo largo de esta cascada. Por lo que se sugiere el estudio de este marcador con una variable que sea mejor caracterizada en la cascada preneoplásica.

Analizando el gráfico (Figura 15), podemos observar una tendencia poco clara del comportamiento de la proteína RPRM en los distintos estadios OLGA que se utilizaron

como representación de la cascada preneoplásica. Teniendo en cuenta esta tendencia, se considera que el sistema OLGA pudiese ser poco representativo de la cascada, por lo que se realizó el análisis basándose en el sistema OLGIM, que permitió clasificar las muestras gástricas según la presencia de metaplasia intestinal. Por esta razón se realizó un cruce de datos entre la expresión de RPRM (Q-score) y la presencia o ausencia de MI (ver figura 16), donde se obtuvieron valores de significancia (**).

Al realizar el análisis de estas variables, el N muestral no resultó ser contraproducente, debido a que la expresión de RPRM se distribuyó de manera homogénea entre dos variables. Además es posible observar que los individuos con MI presentan mayor expresión de RPRM que aquellos que carecen de MI, lo que sugiere a la MI como una variable a tener presente al momento de evaluar la expresión de marcadores en pacientes con lesiones preneoplásicas.

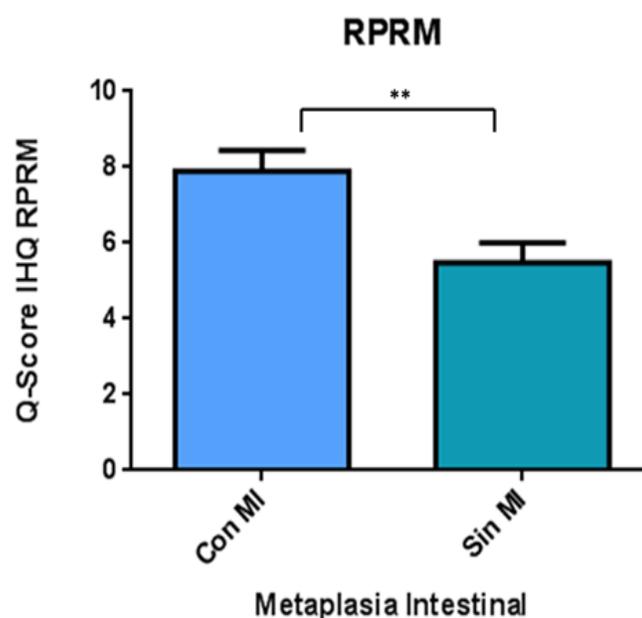


Figura 16: Análisis de expresión IHQ de reprimido (RPRM) versus metaplasia intestinal.

El siguiente gráfico muestra el comportamiento de la expresión de RPRM analizada por Q-score, en tejidos de muestras gástricas con y sin metaplasia intestinal. Según análisis t-test $P= 0.0027$, con significancia **.

CAPÍTULO 5

5.1 Conclusiones

Para todos es claro que el CG continúa siendo un problema de salud pública, ya que la tasa de supervivencia sigue siendo baja por su tardía detección.

Nuestros resultados indican que no es posible establecer una diferencia significativa en los niveles de expresión de RPRM para cada estadio OLGA en los pacientes asintomáticos de la región del Maule.

Se sugiere realizar el estudio de poblaciones asintomáticas con un N muestral mayor, para poder complementar el vacío existente en el estudio de biomarcadores gástricos de detección temprana de CG.

El marcador RPRM considerado supresor de tumor putativo no necesariamente está vinculado con los niveles OLGA, ni con su progresión a malignidad del CG.

Además, nuestro estudio sugiere la incorporación de estadificación de MI bajo el sistema OLGIM, como una de las variables a tener en consideración al momento de realizar el análisis de marcadores gástricos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avital I, Pisters PWT, Kelsen DP, Willett CG. Cancer of the Stomach. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. 924-54.
- Adachi Y, Yasuda K, Inomata M, et al.: Pathology and prognosis of gastric carcinoma: well versus poorly differentiated type. *Cancer* 2000; (7):1418- 24.
- Abe S, Sasano H, Katoh K, Ohara S, Arikawa T, Noguchi T, Asaki S, Yasui W, Tahara E, Nagura H, et al. Immunohistochemical studies on EGF family growth factors in normal and ulcerated human gastric mucosa. *Dig Dis Sci.* 1997; 42:1199–1209.
- Bernal Carolina, Francisco Aguayo, Cynthia Villarroel, Macarena Vargas, Ignacio Díaz, Francisco J. Ossandon, Eudocia Santibáñez, Mariana Palma, Edmundo Aravena, Carlos Barrientos and Alejandro H. Corvalan. *Reprimo* como biomarcador potencial para la detección temprana del cáncer gástrico. 2008. DOI: 10.1158 /1078-0432.CCR-07-4522.
- Bass AJ. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014; 513: 202–209. doi: 10.1038/nature13480 PMID: 25079317.
- Bonne C, Hartz PH, Klerks JV, Posthuma JH, Radsma W, Tjokronegoro S. Morfología del estómago y la secreción gástrica en malayos y chinos y la diferente incidencia de úlcera gástrica y cáncer gástrico en estas razas. *Am J Cancer.* 1938; 33: 265-9.

- Bonequi P, Meneses-González F, Correa P, Rabkin CS, Camargo MC. Risk factors for gastric cancer in Latin-America: a meta-analysis. *Cancer causes & control: CCC*. 2013; 24 (2):217-231.
- Burgess DE, Woodman CB, Flavell KJ, et al. Low prevalence of Epstein–Barr virus in incident gastric adenocarcinomas from the United Kingdom. *British Journal of Cancer*. 2002; 86 (5):702-704.
- Choi YY, Noh SH, Cheong JH. Evolution of Gastric Cancer Treatment: From the Golden Age of Surgery to an Era of Precision Medicine. *Yonsei Medical Journal*. 2015; 56:1177–1185.
- Correa P, Piazuelo B, The gastric precancerous cascade, *Journal of Digestive Diseases* 2012; 13; 2-9.
- Correa P, Cuello C, Duque E. Carcinoma and intestinal metaplasia of the stomach in Colombian migrants. *J Natl Cancer Inst* 1970; 44 (2): 297-306.
- Correa P. Gastric Cancer: Overview. *Gastroenterology clinics of North America*. 2013;42 (2):211-217.
- Correa P. and Houghton J., “Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*,” *Gastroenterology*, vol. 133, no. 2, pp. 659–672, 2007.
- Carrasco G, Corvalan A. H, Review Article *Helicobacter pylori*-Induced Chronic Gastritis and Assessing Risks for Gastric Cancer. *Gastro Res and Pract*, 2013; 393015.

- Dimitrios H., Roukos M.D., Niki J., Agnantis M.D., Michael Fatouros M.D. y Angelos M. Mini review: Gastric Cancer: Introduction, Pathology, Epidemiology. *Gast and Breast Cancer*, 2002 1: 1-3.
- Dixon M, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Surg Path* 1996; 20:1161-81.
- Elke J. A. H. van Beek, MD, Jonathan M. Hernandez, MD, Debra A. Goldman, MS , Jeremy L. Davis, MD, Kaitlin McLaughlin, MD , R. Taylor Ripley, MD , Teresa S. Kim, MD , Laura H. Tang, MD, PhD , Jaclyn F. Hechtman, MD, Jian Zheng, MD , Marinela Capanu, PhD , Nikolaus Schultz, PhD, David M. Hyman, MD , Marc Ladanyi, MD, Michael F. Berger, PhD, David B. Solit, MD, Yelena Y. Janjigian, MD, and Vivian E. Strong, MD, FACS. Rates of TP53 Mutation are Significantly Elevated in African American Patients with Gastric Cancer. 2018. *Ann Surg Oncol* <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6502-x>.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136:E359–86. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>.
- Fuchs CS, RJ. Mayer. “Gastric carcinoma.” *Engl J Med*, 1995; 333(1)32-41.
- Filipe MI, Munoz N, Matko I, et al. Intestinal metaplasia types and the risk of gastric cancer: a cohort study in Slovenia. *Int J Cancer*. 1994; 57: 324–9.

- González CA, Jakszyn P, Pera G, et al. Meat intake and risk of stomach and esophageal adenocarcinoma within the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC) J Natl Cancer Inst.2006; 98: 345–54.
- Goldenring James R. and Ki Taek Nam. Oxyntic atrophy, metaplasia and gastric cancer,Prog Mol Biol Transl Sci. 2010; 96: 117–131., doi: 10.1016/B978-0-12-381280-3.00005-1.
- Henson DE, Dittus C, Younes M, Nguyen H, Albores-Saavedra J. Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: increase in the signet ring cell type. Arch Pathol Lab Med. 2004; 128:765–70.
- International Agency for Research on Cancer. IARC Press; IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. Lyon (France), 2004.
- Joossens JV, Hill MJ, Elliott P, et al. Dietary salt, nitrate and stomach cancer mortality in 24 countries. European Cancer Prevention (ECP) and the INTERSALT Cooperative Research Group. Int J Epidemiol.1996;25: 494–504.
- Jain RN, Brunkan CS, Chew CS, Samuelson LC. Gene expression profiling of gastrin target genes in parietal cells. Physiol Genomics. 2006; 24:124–132. [PubMed].
- Luebke T., Baldus S., Grass G., Bollschweiler E., Thiele J., Dienes H., Hoelscher A. y Moening S. Histopathological grading in Gastric Cáncer By Ming Classification: Correlation with Histopathological subtypes, Metastasis, and Prognosis. World J Surgery, 2005; 29:1422-1427.

- Luo J, Zhu Y, Yang G, Gong L, Wang B, Liu H. Loss of Reprimo and S100A2 expression in human gastric adenocarcinoma. *Diagn Cytopathol*. 2010.
- Lauren P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965; 64:31–49.
- Lee HJ, Nam KT, Park HS, Kim MA, LaFleur BJ, Aburatani H, Yang HK, Kim WH, Goldenring JR. Gene expression profiling of metaplastic lineages identifies CDH17 as a prognostic marker in early-stage gastric cancer. *Gastroenterology*. 2010 In Press. [PMC free article] [PubMed].
- Morris MR, Ricketts C, Gentle D, Abdulrahman M, Clarke N, Brown M, et al. Identification of candidate tumour suppressor genes frequently methylated in renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2010; 29: 2104– 2117. doi: 10.1038/onc.2009.493 PMID: 20154727.
- Ministerio de Salud Chile, Guías Clínicas AUGE Cáncer Gástrico, 2014.
- Murphy, Gwen et al. “Meta-Analysis Shows That Prevalence of Epstein-Barr Virus-Positive Gastric Cancer Differs Based on Sex and Anatomic Location.” *Gastroenterology* 137.3 2009: 824–833.
- Ohki R, Nemoto J, Murasawa H, Oda E, Inazawa J, Tanaka N, et al. Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J Biol Chem*. 2000; 275: 22627–22630. PMID: 10930422.
- Ooki A, Yamashita K, Yamaguchi K, Mondal A, Nishimiya H, Watanabe M. DNA damage-inducible gene, reprimo functions as a tumor suppressor and is suppressed by

promoter methylation in gastric cancer. *Mol Cancer Res.* 2013; 11(11):1362–74. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0091> PMID: 23982217.

- Piazuolo MB, Correa P. Gastric cáncer: Overview. *Colombia Médica: CM.* 2013; 44(3):192-201.
- Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J (1997). *Cancer Incidence in Five Continents.* IARC Press: Lyon.
- A.Pérez-Mendozaa, Á.M.Zárate-Guzmána, E.S.Galvis Garcíaa, S.Sobrino Cossío, J.Djamus Bircha, Systematic alphanumeric-coded endoscopy versus chromoendoscopy for the detection of precancerous gastric lesions and early gastric cancer in subjects at average risk for gastric cancer, *Revista de Gastroenterología de México*, Volume 83, Issue 2, April–June 2018, Pages 117-124.
- Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Oliveira AM, Oliveira CA, Magalhaes PP, Moura SB, Cabral MM, Nogueira AM (1998). cagA-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. *Int J Cancer* 78: 135-139.
- Rugge M, Cassaro M, Leandro G, Baffa R, Avellini C, Bufo P, Stracca V, Battaglia G, Fabiano A, Guerini A, DiMario F (1996). *Helicobacter pylori* in promotion of gastric carcinogenesis. *Dig Dis Sci* 41: 950-955.
- Rugge M, Meggio A, Pennelli G, Pisciole F, Giacomelli L, De Pretis G, Graham DY. Gastritis staging in clinical practice: The OLGA staging system. *Gut* 2007; 56: 631-6.
- Rugge M, Pennelli G, Pillozzi E, Fassan M, Ingravallo G, Russo VM, et al. Gastritis: the histology report. *Dig Liver Dis* 2011; 43 Suppl 4: S373-84.

- Rokkas T, Filipe MI, Sladen GE. Detection of an increased incidence of early gastric cancer in patients with intestinal metaplasia type III who are closely followed up. *Gut*. 1991; 32:1110–3).
- Schneider BG, Peng DF, Camargo MC, Piazuolo MB, Sicinski LA, Mera R, et al. Promoter DNA hypermethylation in gastric biopsies from subjects at high and low risk for gastric cancer. *Int J Cancer*. 2010; 127: 2588–2597. doi: 10.1002/ijc.25274 PMID: 20178103.
- Kathleen Saavedra, José Valbuena, Wilda Olivares, María José Marchant, Andrés Rodríguez, Verónica Torres-Estay, Gonzalo Carrasco-Avino, Leda Guzmán, Francisco Aguayo, Juan Carlos Roa, Alejandro H. Corvalán, Loss of Expression of Reprimo, a p53-induced Cell Cycle Arrest Gene, Correlates with Invasive Stage of Tumor Progression and p73 Expression in Gastric Cancer, 2015, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125834>
- Sato N, Fukushima N, Matsubayashi H, Iacobuzio-Donahue CA, Yeo CJ, Goggins M. Aberrant methylation of Reprimo correlates with genetic instability and predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer*. 2006; 107(2):251–7. <https://doi.org/10.1002/cncr.21977> PMID: 16752411.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A., Global cancer statistics, 2012., *CA Cancer J Clin*. 2015, 65(2):87-108. doi: 10.3322/caac.21262.
- Takahashi T, Suzuki M, Shigematsu H, et al. Aberrant methylation of Reprimo in human malignancies. *Int J Cancer* 2005; 115:503 ^ 10.
- Wroblewski LE, Peek RM, Jr, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23:713–39.

- Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis (Letter). *Lancet*, 1983; 1:1273.
- Xia HH, Kalantar JS, Talley NJ, Wyatt JM, SAdams S, Cheung K, Mitchell HM. Antral-type mucosa in the gastric incisura, body and fundus (antralization): A link between *Helicobacter pylori* infection and intestinal metaplasia. *Am. J. Gastroenterol.* 2000; 95:114–121. [PubMed].
- Yamashiro K, Suzuki H, Nagayo T. Electron microscopic study of signet ring cells in diffuse carcinoma of the human stomach. *Virch Arch* 1977; 374: 275.

ANEXOS

Anexo A. Técnica MethyLight

Para estudiar el estado de metilación del Gen Reprimo se realizó un PCR cuantitativo en tiempo real (MethyLight), que se basa en la utilización de sondas secuencia específicas que tienen un fluoróforo unido, y permiten detectar de manera sensible y cuantitativa la metilación del ADN por medio de la utilización de partidores específicos que están diseñados para solapar el sitio CpG de interés, lo que permite detectar el estado de metilación del ADN, ya que solo amplifican aquellas regiones que poseen citocinas que se encuentran metiladas. Las sondas utilizadas son sondas de hibridización, que se basan en el principio de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET). Este principio consiste en que el fluoróforo dador (fluoresceína en extremo 3') es excitado por una fuente de luz LED y transfiere su energía al fluoróforo aceptor adyacente (LC Red 640 en extremo 5'), cuya luz es detectada en canales específicos (Manual LightCycler 480 Real-Time PCR Instrument). Se utilizan a menudo para la sensibilidad y cuantificación del patrón de metilación.

Para realizar el PCR se utilizó el kit Lightcycler FastStart DNA Master HybProbe (Roche Applied Science). El mix de PCR con concentración 1X se preparó con 4 µl de ADN modificado en un volumen final de 10 µl [Buffer 10 X, MgCl₂ 25mM, agua libre de nucleasas (Roche Applied Science), partidore forward 4µM, partidore reverse 4µM, sonda 10 µM (Integrated DNA Technologies)].

Anexo B. Consentimiento informado



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto: "Caracterización y validación de marcadores de autofagia como determinantes terapéuticos y de pronóstico en lesiones tempranas de cáncer gástrico en la población de Molina"

Patrocinante: Universidad de Talca, Hospital de Curicó, Gobierno Regional del Maule, Centro de Estudios Avanzados de Enfermedades Crónicas

Investigador Principal: Dr. Nelson Brown

Estimado Sr. (Sra., Srta.): _____

El propósito de este documento es entregarle toda la información necesaria para que usted pueda decidir libremente si desea participar en la presente investigación médica relacionada con cáncer gástrico. Por favor, lea cuidadosamente este documento y haga cualquier consulta al personal del estudio si lo estima conveniente. Este estudio está siendo financiado con fondos del Gobierno Regional del Maule. Su participación es absolutamente voluntaria y se hará efectiva solo después que firme este consentimiento informado. A continuación se describe en forma resumida la investigación que se pretende realizar.



Resumen

El cáncer de estómago, también conocido como cáncer gástrico, es una enfermedad muy común en Chile. A diferencia de otros tipos de cáncer, la detección del cáncer de estómago ocurre de manera tardía, cuando la posibilidad de curar la enfermedad es baja. Este estudio tiene como fin la validación de "marcadores" que puedan ser utilizados en el futuro para la detección o tratamiento temprano del cáncer de estómago. Con el término "marcadores" nos referimos a sustancias que están presentes en el cáncer o que son liberadas por el cáncer a la sangre. La idea es que la simple medición de los niveles de un marcador en la sangre de una persona nos pueda indicar si esa persona está o no en riesgo de desarrollar cáncer de estómago. Si tuviéramos uno de estos marcadores podríamos prevenir e incluso curar el cáncer de estómago.

Para saber si un marcador funciona como tal debemos estudiar personas sanas que habiten zonas donde el cáncer de estómago es común, como lo es la comuna de Molina. Según nuestros registros, usted es uno de los 934 individuos pertenecientes a cuatro postas rurales (Tres Esquinas, Itahue, Pichingal y Lontue) que en el año 2013 participaron en un estudio destinado a validar "**reprimo**" como marcador no invasivo para la detección precoz de cáncer de estómago. De estos 934 individuos, 180 resultaron positivos y 754 resultaron negativos para ese marcador. El presente estudio es un esfuerzo de completar dicho estudio a través de la incorporación de otros marcadores en los 180 individuos que resultaron positivos. Se incluirán, además, 60 de los 754 individuos negativos como grupo control (240 individuos en total).

Se espera que un porcentaje de los participantes alberguen en sus estómagos lesiones que predisponen a cáncer de estómago. Estas lesiones "pre-malignas" serán evaluadas en el laboratorio para la presencia de otros marcadores (llamados marcadores de autofagia), esta vez en la biopsia misma.

1. Procedimientos: ¿En qué consiste mi participación?

Si usted decide participar, se le realizará una breve encuesta que le tomará 10 minutos llenar. Luego se le realizará una endoscopia digestiva alta con toma de



biopsias. La endoscopia digestiva alta es un procedimiento en el que un tubo flexible, con una pequeña cámara en su extremo, es introducida por la garganta hasta el estómago. Con este tubo también es posible extraer una o más biopsias. Una biopsia es un trozo muy pequeño de la parte interna del estómago. La biopsia se envía a un laboratorio donde la examina en busca de signos de cáncer u otros problemas.

Junto con la endoscopia digestiva alta, se le solicitará una muestra de sangre para la detección de dos marcadores, pepsinógeno y reprimógeno. No se realizarán pruebas en sangre diferentes a la detección de los marcadores antes mencionados.

2. Beneficios: ¿Qué beneficios obtengo si participo en el estudio?

Usted podrá acceder a tres exámenes nuevos que le indicarán cómo está su estómago. Si alguno de estos exámenes estuviera alterado, se podrá detectar y tratar precozmente, evitando así que la lesión avance a cáncer. Asimismo, su participación contribuirá a que en el futuro el cáncer de estómago pueda ser detectado en etapas tempranas y a que se puedan encontrar nuevas formas de tratar esta enfermedad.

En caso que sus biopsias indiquen lesiones pre-malignas o malignas, usted será evaluado y tratado en el hospital de Curicó. Por otro lado, en caso que los marcadores en su sangre resulten positivos, aunque las biopsias sean normales, usted entrará en un programa de seguimiento anual también en el hospital de Curicó.

3. Riesgos: ¿Tiene algún riesgo participar en este estudio?

La toma de muestra de sangre a veces produce dolor o hematoma (moretón) en el sitio de punción. Por otro lado, la endoscopia digestiva alta tiene un riesgo bajo de complicaciones (1 por cada 10.000 exámenes), que incluyen infección y desgarramiento. Durante la toma de biopsias se puede producir perforación y hemorragia, aunque estas complicaciones son también poco frecuentes (1 por cada 10.000). La sedación utilizada en la endoscopia podría producirle una sensación de mareo al despertar. De manera muy infrecuente podría sufrir una depresión respiratoria, esto es, una respiración lenta o débil que hace difícil la llegada de oxígeno a los pulmones. En la mayoría de los casos la depresión respiratoria es manejada con medicamentos. En casos muy raros podría requerir hospitalización.



En el caso de que ocurra cualquiera de los eventos adversos mencionados, estos serán inmediatamente evaluados y tratados en el hospital de Curicó.

4. Usos potenciales de la investigación: ¿De qué forma se van a usar los resultados de este estudio?

Los resultados de esta investigación podrían utilizarse en el futuro para la generación de un examen de detección temprana de cáncer de estómago, disponible comercialmente para ser usado en clínicas y hospitales de nuestro país.

5. Costos: ¿Tengo que pagar algo para participar?

No existe costo por el análisis de las muestras de sangre requeridas en este estudio. Dado que usted pertenece a FONASA, la endoscopia digestiva y los procedimientos de toma y procesamiento de biopsias no tendrán ningún costo para usted. Si ocurriera alguna complicación derivada directamente de su participación en este estudio, el costo asociado será asumido por el investigador.

6. Compensaciones: ¿Voy a recibir algún pago por participar?

Usted no recibirá compensación económica por participar en este estudio. Tampoco se compensarán los gastos en que usted deba incurrir (movilización, entre otros) durante este estudio.

7. Confidencialidad: ¿Cómo me aseguro de que mi información será manejada de forma confidencial?

Tanto su información personal como la obtenida de sus muestras de sangre y biopsias serán mantenidas en forma absolutamente confidencial y solo serán utilizadas con fines científicos. El Director de este proyecto (Dr. Nelson Brown), su Director Alterno (Dr. Alejandro Corvalán) y la institución de salud participante (Hospital de Curicó) serán los custodios de los datos obtenidos. El remanente de muestra de sangre que no se utilice en el estudio será almacenado por 5 años en el Laboratorio de Patología Molecular de la Pontificia Universidad Católica, bajo responsabilidad del Dr. A. Corvalán. Después de ese periodo, las muestras de sangre serán descartadas.



Asimismo, las biopsias de estómago se almacenarán en el departamento de patología del Hospital de Curicó y serán utilizadas solo con los fines diagnósticos y científicos asociados a este estudio. En caso de otros estudios en el futuro se le solicitará una nueva autorización para participación en estos estudios.

Es posible que los resultados de este estudio sean presentados en revistas o reuniones científicas. Sin embargo, sus datos personales no serán dados a conocer. Si usted decide retirarse en algún momento del estudio, tanto sus muestras de sangre y biopsias como la información recogida por la encuesta serán eliminadas. Finalmente, los resultados de la investigación serán informados a usted al término de esta (fines del 2017) a través de una carta confidencial. No obstante, usted tendrá el derecho de informarse de manera continua acerca de los resultados del estudio.

8. Contacto: ¿Con quién me debo comunicar si tengo alguna pregunta?

Si usted desea obtener más información sobre los alcances y proyecciones de este estudio puede contactarse directamente con su director (Dr. Nelson Brown, Teléfono: 071-2-418822; correo electrónico: nbrown@utalca.cl). Si desea saber acerca de sus derechos como participante de este estudio, puede comunicarse con el Comité Ético Científico de la Universidad de Talca (Sr. Javier Barra, correos electrónicos: jbarra@utalca.cl; comitodobioteica@utalca.cl; Teléfono: 071 2 200181).

Estimado participante, recuerde que la decisión de participar es absolutamente suya. Puede aceptar o rechazar la investigación, e incluso arrepentirse de su primera decisión, sin ningún problema o represalia para usted.



Declaración de consentimiento

- He recibido una explicación satisfactoria sobre el propósito de la investigación, así como de los beneficios sociales que se espera éstos produzcan.
- He sido informado/a sobre las eventuales riesgos de mi participación en la investigación.
- He sido informado/a que los procedimientos que se realicen no implican un costo que yo deba asumir.
- Estoy en pleno conocimiento que la información obtenida en este estudio será absolutamente confidencial. Esto significa que sólo el equipo investigador tendrá acceso a mis datos. En caso de que la información obtenida sea publicada, ésta se mantendrá anónima. Esto significa que no aparecerá ningún dato con el que puedan identificarme en libros, revistas y otros medios de publicidad derivadas de la investigación ya descrita.
- Sé que la decisión de participar en esta investigación es absolutamente voluntaria. Si no deseo participar en ella, o una vez iniciada la investigación no deseo seguir colaborando, puedo hacerlo sin problemas y sin tener que dar ninguna explicación. En ambos casos, se me asegura que mi negativa no implicará ninguna consecuencia negativa para mí. Para esto último sólo debo presentarme en la Escuela de Medicina de la Universidad de Talca, Avenida Lircay S/N, entre las 9:00 y 18:00 horas y contactarme con el Dr. Nelson Brown (Teléfono: 071-2-418822; correo electrónico: nbrown@utalca.cl), para firmar la hoja de revocación.
- Los investigadores responsables (Dr. Nelson Brown, Dr. Alejandro Corvalán) han manifestado su voluntad de aclarar cualquier duda que me surja, antes, durante y después de mi participación en el estudio. Además, si deseara realizar consultas personalmente, el domicilio para estos efectos es Campus Lircay s/n, Escuela de Medicina, en Talca, con el investigador Sr. Nelson Brown (Teléfono: 071-2-418822; correo electrónico: nbrown@utalca.cl), en el horario comprendido entre las 9:00 y las 18:00 horas. También se me ofrece la posibilidad de contactarme con el Comité Ético Científico, a través de la Dirección de Investigación de la Universidad de Talca (Dr. Javier Barra, correos electrónicos: jbarra@utalca.cl; comitedebiocica@utalca.cl; Teléfono: 071 2 200181), de Lunes a Jueves de 10:00 a 12:00 y de 15:00 a 17:00 horas.



ACEPTACIÓN

He leído el documento, entiendo las declaraciones contenidas en él y la necesidad de hacer constar mi consentimiento, para lo cual lo firmo libre y voluntariamente, recibiendo en el acto copia de este documento ya firmado.

Yo,,
 Cédula de identidad N°....., de nacionalidad.....
 mayor de edad, con domicilio en,
 consiento en participar en la investigación denominada: **“Caracterización y validación de marcadores de autofagia como determinantes terapéuticos y de pronóstico en lesiones tempranas de cáncer gástrico en la población de Molina”**, autorizo al Sr. **Nelson Enrique Brown Vega**, investigador responsable del proyecto y/o a quienes éste designe como sus colaboradores directos y cuya identidad consta al pie del presente documento, para realizar el (los) procedimiento (s) requerido (s) por el proyecto de investigación descrito.

Fecha:/...../.....

Hora:

Firma de la persona que consiente:

.....

Investigador responsable:

Nombre

Firma

Co-investigador:

Nombre

Firma



RECHAZO

He leído el documento, entiendo las declaraciones contenidas en él. Sin embargo, rechazo otorgar mi consentimiento, para lo cual firmo libre y voluntariamente el siguiente documento, recibiendo en el acto copia de éste ya firmado.

Yo,,
 Cédula de identidad N°, de nacionalidad,
 mayor de edad, con domicilio en, **No**
 consiento en participar en la investigación denominada: "**Caracterización y validación de marcadores de autofagia como determinantes terapéuticos y de pronóstico en lesiones tempranas de cáncer gástrico en la población de Molina**", y **No** autorizo al Sr. **Nelson Enrique Brown Vega**, investigador responsable del proyecto y/o a quienes éste designe como sus colaboradores directos y cuya identidad consta al pie del presente documento, para realizar el (los) procedimiento (s) requerido (s) por el proyecto de investigación descrito.

Fecha:/...../.....

Hora:

Firma de la persona que rechaza:

.....

Investigador responsable:

Nombre

Firma

Co-investigador 1 :

Nombre

Firma



REVOCACIÓN

Mediante la presente revoco lo anteriormente firmado, para lo cual firmo este nuevo documento libre y voluntariamente, recibiendo en el acto copia de este documento ya firmado.

Yo,,
 Cédula de identidad N°....., de nacionalidad.....,
 mayor de edad, con domicilio en, Revoco
 lo anteriormente firmado.

Fecha:/...../.....

Hora:

Firma de la persona que revoca:

.....

Investigador responsable:

Nombre

Firma

Có-investigador 1 :

Nombre

Firma



Anexo C. Protocolo de procesamiento histológico de muestras endoscópicas.

Etapa	Reactivo	Tiempo
Lavado	PBS 1X	2 horas
Deshidratación	Alcohol 70°	1 hora 30 minutos
	Alcohol 95°	1 hora 30 minutos
	Alcohol 95°	1 hora
	Alcohol 100°	1 hora
	Alcohol 100°	1 hora
Aclaramiento	Xilol 1	1 hora
	Xilol 2	1 hora 30 minutos
	Xilol 3	1 hora 30 minutos
Impregnación	Parafina 1	1 hora
	Parafina 2	1 hora
	Parafina 3	1 hora

Anexo D. Protocolo tinción Hematoxilina/Eosina

1. Proceso de desparafinación, se realiza con una batería de Xilol, donde se procede a retirar la parafina excedente de la lámina.

- Xilol I (5 minutos).
- Xilol II (5 minutos).
- Xilol III (5 minutos).

2. Proceso de rehidratación, se realiza con alcoholes en forma decreciente para ir agregando el agua a los tejidos. Esto se realiza para ayudar a la posterior tinción.

- Alcohol de 100° (5 minutos).
- Alcohol de 100° (5 minutos).
- Alcohol de 95° (5 minutos).
- Alcohol de 95° (5 minutos).
- Alcohol de 70° (5 minutos).

3. Se realiza un lavado en agua corriente para retirar el alcohol y detener el proceso anterior.

- Lavado en agua corriente.
- Lavado en agua destilada.

4. Coloración con hematoxilina.

- Hematoxilina (5 a 7 minutos).
- Agua destilada para eliminar el exceso.

5. Diferenciación.

- Alcohol acido OH-CL (1 dipping).
- Agua corriente.

- Agua destilada.

6. Viraje o azulamiento.

- Borato de sodio al 2% (30 segundos a 1 minuto).

7. Lavado en agua destilada para detener el proceso de azulamiento y pasar a otro colorante.

- Lavar en agua destilada (2 a 3 minutos).

8. Coloración con eosina Y.

- Eosina (5 minutos).

9. Deshidratación en alcoholes ascendentes, para retirar el exceso de agua y para poder hacer el posterior montaje en un medio anhidro.

- Alcohol de 70°, para retirar el excedente de eosina.
- Alcohol de 70° (5 minutos).
- Alcohol de 95° (5 minutos).
- Alcohol de 95° (5 minutos).
- Alcohol de 100° (5 minutos).
- Alcohol de 100° (5 minutos).
- Alcohol de 100° (5 minutos).

10. Aclaramiento, en xiloles consecutivos para retirar el alcohol y también hacer aún más favorable el posterior montaje.

- Xilol I (5 minutos).
- Xilol II (5 minutos).
- Xilol III (5 minutos).

11. Montaje con medio anhidro.

- Entellan.

Anexo E. Protocolo IHQ

1. Desparafinar cortes hasta hidratar con agua destilada.
2. Realizar recuperación de antígenos en las placas en olla a alta presión por 20 minutos en buffer EDTA a pH 9.
3. Dejar enfriar cortes por 5 minutos y llevarlos al agua destilada por 10 minutos.
4. Secar las placas y remarcar los bordes del tejido con lápiz hidrófobo.
5. Lavar con buffer PBS-Tween20 por 3 minutos.
6. Realizar bloqueo de peroxidasa endógena con peróxido de Hidrógeno 4% diluido en PBS 1X por 20 minutos.
7. Lavar con PBS Tween por 5 minutos, 3 veces.
8. Realizar bloqueo de proteínas con BSA universal (anti Mouse igG/Rabbit igG) por 25 minutos.
9. Sin lavar, remover solución sobre una toalla de papel y aplicar anticuerpo primario α RPRM abcam (ab213961) en una dilución 1:1000 con solución de dilución comercial de anticuerpo. Dejar dentro de cámara húmeda por 1 hora a temperatura ambiente, protegida de la luz.

10. Lavar placas con PBS Tween por 5 minutos 3 veces.
11. Incubar con Anticuerpo secundario polímero marcado HRP (vector, Imm PRESS™ HRP reagent, MP7500) durante 20 minutos.
12. Lavar placas con PBS Tween por 5 minutos 3 veces.
15. Realizar el revelado con Diaminobencidina (DAB) por 1 minuto.
16. Detener reacción con agua destilada.
17. Contrastar con Hematoxilina de Mayer por 10 segundos.
18. Lavar con agua y dejar por 15 minutos hasta que la placa tome un color azul.
19. Deshidratar en batería ascendentes de alcoholes 70°, 95° y 100° por 5 minutos cada uno.
20. Aclarar en xilol 3 cambios de 5 minutos cada uno.
21. Montar en resina hidrófoba.

Anexo F. Protocolo IHQ para control negativo

1. Desparafinar cortes hasta hidratar con agua destilada.
2. Realizar recuperación de antígenos en las placas en olla a alta presión por 20 minutos en buffer EDTA a pH 9.
3. Dejar enfriar cortes por 5 minutos y llevarlos al agua destilada por 10 minutos.
4. Secar las placas y remarcar los bordes del tejido con lápiz hidrófobo.
5. Lavar con buffer PBS-Tween20 por 3 minutos.
6. Realizar bloqueo de peroxidasa endógena con peróxido de Hidrógeno 4% diluido en PBS 1X por 20 minutos.
7. Lavar con PBS Tween por 5 minutos, 3 veces.
8. Realizar bloqueo de proteínas con BSA universal (anti Mouse igG/Rabbit igG) por 25 minutos.
9. Sin lavar, remover solución sobre una toalla de papel y aplicar solución de dilución comercial de anticuerpo, en ausencia de anticuerpo primario. Dejar dentro de cámara húmeda por 1 hora a temperatura ambiente, protegida de la luz.

10. Lavar placas con PBS Tween por 5 minutos 3 veces.
11. Incubar con Anticuerpo secundario polímero marcado HRP (vector, Imm PRESS™ HRP reagent, MP7500) durante 20 minutos.
12. Lavar placas con PBS Tween por 5 minutos 3 veces.
15. Realizar el revelado con Diaminobencidina (DAB) por 1 minuto.
16. Detener reacción con agua destilada.
17. Contrastar con Hematoxilina de Mayer por 10 segundos.
18. Lavar con agua y dejar por 15 minutos hasta que la placa tome un color azul.
19. Deshidratar en batería ascendentes de alcoholes 70°, 95° y 100° por 5 minutos cada uno.
20. Aclarar en xilol 3 cambios de 5 minutos cada uno.
21. Montar en resina hidrófoba.

Anexo G. Tabla complementaria

Evaluación patólogo				
Muestra	RPRM (+/-)	I	P	Q
FIC-16-001	+	1	4	4
FIC-16-006	+	2	4	8
FIC-16-009	+	3	4	12
FIC-16-014	+	3	4	12
FIC-16-017	+	2	2	4
FIC-16-020	+	3	4	12
FIC-16-025	+	2	4	8
FIC-16-026	+	1	2	2
FIC-16-029	+	3	4	12
FIC-16-031	+	2	3	6
FIC-16-032	+	2	3	6
FIC-16-033	+	2	4	8
FIC-16-036	+	2	4	8
FIC-16-037	+	2	4	8
FIC-16-047	+	2	4	8
FIC-16-071	+	1	4	4
FIC-16-087	+	3	4	12
FIC-16-091	+	2	4	8
FIC-16-095	+	2	4	8
FIC-16-097	+	1	4	4
FIC-16-098	+	2	4	8
FIC-16-107	+	1	4	4
FIC-16-108	+	1	4	4
FIC-16-110	+	2	4	8
FIC-16-111	+	1	4	4
FIC-16-117	+	2	3	6
FIC-16-118	+	2	4	8
FIC-16-123	+	2	1	2
FIC-16-129	+	2	4	8
FIC-16-130	+	2	4	8
FIC-16-132	+	2	4	8
FIC-16-133	+	1	4	4
FIC-16-134	+	2	4	8
FIC-16-141	+	3	4	12
FIC-16-144	+	2	4	8
FIC-16-145	+	2	4	8
FIC-16-148	+	1	4	4
FIC-16-155	+	3	4	12
FIC-16-158	+	2	4	8
FIC-16-165	+	1	4	4

Anexo H. Tabla complementaria

Evaluación Profesor Co-guía				
Muestra	RPRM (+/-)	I	P	Q
FIC-16-001	+	1	2	2
FIC-16-006	+	2	3	6
FIC-16-009	+	3	4	12
FIC-16-014	+	3	3	9
FIC-16-017	+	2	2	4
FIC-16-020	+	3	4	12
FIC-16-025	+	2	4	8
FIC-16-026	+	1	2	2
FIC-16-029	+	2	3	6
FIC-16-031	+	2	2	4
FIC-16-032	+	2	2	4
FIC-16-033	+	2	3	6
FIC-16-036	+	2	4	4
FIC-16-037	+	3	3	9
FIC-16-047	+	3	3	9
FIC-16-071	+	2	3	6
FIC-16-087	+	3	2	6
FIC-16-091	+	2	3	6
FIC-16-095	+	2	4	8
FIC-16-097	+	2	2	4
FIC-16-098	+	2	3	6
FIC-16-107	+	2	2	4
FIC-16-108	+	2	2	4
FIC-16-110	+	2	2	4
FIC-16-111	+	2	3	6
FIC-16-117	+	2	2	4
FIC-16-118	+	2	2	4
FIC-16-123	+	1	1	1
FIC-16-129	+	1	3	3
FIC-16-130	+	3	3	9
FIC-16-132	+	3	4	12
FIC-16-133	+	2	2	4
FIC-16-134	+	2	2	4
FIC-16-141	+	3	3	9
FIC-16-144	+	2	2	4
FIC-16-145	+	2	2	4
FIC-16-148	+	3	4	12
FIC-16-155	+	3	4	12
FIC-16-158	+	3	3	9
FIC-16-165	+	1	3	3

Anexo I. Tabla complementaria

Evaluación Alumna 1				
Muestra	RPRM (+/-)	I	P	Q
FIC-16-001	+	1	3	3
FIC-16-006	+	3	4	12
FIC-16-009	+	2	4	8
FIC-16-014	+	3	3	9
FIC-16-017	+	2	2	4
FIC-16-020	+	3	4	12
FIC-16-025	+	2	4	8
FIC-16-026	+	1	2	2
FIC-16-029	+	2	4	8
FIC-16-031	+	2	2	4
FIC-16-032	+	2	3	6
FIC-16-033	+	2	3	6
FIC-16-036	+	2	4	8
FIC-16-037	+	2	3	6
FIC-16-047	+	3	2	6
FIC-16-071	+	1	3	3
FIC-16-087	+	3	3	9
FIC-16-091	+	2	4	8
FIC-16-095	+	2	3	6
FIC-16-097	+	1	3	3
FIC-16-098	+	2	4	8
FIC-16-107	+	1	4	4
FIC-16-108	+	1	3	3
FIC-16-110	+	2	4	8
FIC-16-111	+	2	3	6
FIC-16-117	+	2	3	6
FIC-16-118	+	2	4	8
FIC-16-123	+	1	2	2
FIC-16-129	+	1	4	4
FIC-16-130	+	2	3	6
FIC-16-132	+	2	4	8
FIC-16-133	+	1	3	3
FIC-16-134	+	2	3	6
FIC-16-141	+	2	4	8
FIC-16-144	+	2	2	4
FIC-16-145	+	2	3	6
FIC-16-148	+	2	4	12
FIC-16-155	+	2	4	8
FIC-16-158	+	3	4	12
FIC-16-165	+	1	4	4

Anexo J. Tabla complementaria

Evaluación Alumna 2				
Muestra	RPRM (+/-)	I	P	Q
FIC-16-001	+	1	4	4
FIC-16-006	+	2	4	8
FIC-16-009	+	3	4	12
FIC-16-014	+	2	3	6
FIC-16-017	+	2	2	4
FIC-16-020	+	3	4	12
FIC-16-025	+	2	3	6
FIC-16-026	+	2	1	2
FIC-16-029	+	2	4	8
FIC-16-031	+	2	3	6
FIC-16-032	+	2	2	4
FIC-16-033	+	1	3	3
FIC-16-036	+	2	4	8
FIC-16-037	+	3	4	12
FIC-16-047	+	2	4	8
FIC-16-071	+	1	2	2
FIC-16-087	+	3	4	12
FIC-16-091	+	2	4	8
FIC-16-095	+	2	1	2
FIC-16-097	+	1	2	2
FIC-16-098	+	2	4	8
FIC-16-107	+	2	3	6
FIC-16-108	+	1	1	1
FIC-16-110	+	2	4	8
FIC-16-111	+	1	4	4
FIC-16-117	+	2	4	8
FIC-16-118	+	2	4	8
FIC-16-123	+	0	0	0
FIC-16-129	+	1	4	4
FIC-16-130	+	2	4	8
FIC-16-132	+	3	4	12
FIC-16-133	+	1	1	1
FIC-16-134	+	2	4	8
FIC-16-141	+	2	4	8
FIC-16-144	+	1	2	2
FIC-16-145	+	2	3	6
FIC-16-148	+	2	4	8
FIC-16-155	+	3	4	12
FIC-16-158	+	3	4	12
FIC-16-165	+	1	4	4