

Identificación de asociaciones clínico-patológicas e hipermetilación de genes supresores de tumores en cáncer gástrico difuso a través de análisis de *Hierarchical clustering*

Luis Zavala G^{1a}, Víctor Luengo J^{1a}, Francisco Ossandón C^{1b}, Erick Riquelme S^{1c}, Claudia Backhouse E^{2c}, Mariana Palma V^{2c}, Jorge Argandoña C^{2d}, Miguel Angel Cumsille^{3e}, Alejandro Corvalán R^{1,2}.

Hierarchical clustering analysis to detect associations between clinical and pathological features of gastric tumors and hypermethylation of suppressor genes

Background: Methylation is an inactivation mechanism for tumor suppressor genes, that can have important clinical implications. **Aim:** To analyze the methylation status of 11 tumor suppressor genes in pathological samples of diffuse gastric cancer. **Material and methods:** Eighty three patients with diffuse gastric cancer with information about survival and infection with Epstein Barr virus, were studied. DNA was extracted from pathological slides and the methylation status of genes p14, p15, p16, APC, p73, FHIT, E-cadherin, SEMA3B, BRCA-1, MINT-2 y MGMT, was studied using sodium bisulphite modification and polymerase chain reaction. Results were grouped according to the methylation index or Hierarchical clustering (TIGR MultiExperiment Viewer). **Results:** Three genes had a high frequency of methylation (FHIT, BRCA1, APC), four had an intermediate frequency (p15, MGMT, p14, MINT2) and four had a low frequency (p16, p73, E-cadherin, SEMA3B). The methylation index had no association with clinical or pathological features of tumors or patients survival. Hierarchical clustering generated two clusters. One grouped clinical and pathological features with FHIT, BRCA1, and APC and the other grouped the other eight genes and Epstein Barr virus infection. Two significant associations were found, between APC and survival and p16/p14 and Epstein Barr virus infection. **Conclusions:** Hierarchical clustering is a tool that identifies associations between clinical and pathological features of tumors and methylation of tumor suppressor genes (Rev Méd Chile 2006; 134: 17-25).

(Key words: Cluster analysis; Genes, supressor; Stomach neoplasms)

Recibido el 9 de enero, 2006. Aceptado el 29 de mayo, 2006.
Proyecto financiado por FONDECYT 1030130.

¹Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina Pontificia Universidad Católica de Chile, ²Instituto Chileno Japonés de Enfermedades Digestivas, Hospital Clínico-San Borja Arriarán, Campus Centro y ³Escuela de Salud Pública, Facultad de Medicina Universidad de Chile.

^aAlumno de Medicina

^bAlumno de Bioquímica

^cTecnólogo Médico

^dLicenciado en Tecnología Médica

^eMagíster en Bioestadística

Correspondencia a: Dr. Alejandro Corvalán. Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. Lira 85 4° piso, Santiago. Tel: (2) 3543209. Fax: 6395101. E mail: corvalan@med.puc.cl

El cáncer gástrico representa la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo¹. En Latinoamérica, Chile ocupa el segundo lugar en mortalidad después de Costa Rica, sumando ambos países casi 50% de la mortalidad en este continente². En Chile, el cáncer gástrico es la primera causa de muerte por enfermedades neoplásicas³, a pesar de una constante declinación en su mortalidad durante varias décadas y una estabilización entre 19 y 20 por 100.000 habitantes a fines de la década 1990-99⁴. En este mismo período ha ocurrido un cambio en el perfil epidemiológico del cáncer gástrico, ya que se ha reportado un aumento en la proporción de casos de cáncer gástrico difuso (CGD), una característica considerada de mal pronóstico para esta enfermedad⁹.

Desde mediados de la década 1980-89, el reconocimiento de activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores (GST) en el proceso neoplásico, ha permitido proponer un modelo genético del cáncer, en el que por lo general existe un tipo de genes (GST u oncogenes) asociado de forma específica a un tipo de cáncer. Así, la identificación de los GST responsables del CGD tendría un impacto importante en el diagnóstico precoz, ya que podrían utilizarse como marcadores de tamizaje en sujetos con riesgo de desarrollar esta enfermedad. Los GST pueden ser inactivados por 2 mecanismos, delección y metilación. Entre ellos, la metilación ocurre por incorporación de un grupo metilo en el carbono 5 de citosina, convirtiéndola en 5-metilcitosina¹⁰. Esta modificación epigenética ocurre con mayor frecuencia en regiones regulatorias de la expresión génica (secuencias promotoras), provocando represión transcripcional y, en consecuencia, inactivación génica^{10,11}. La metilación ha sido recientemente reconocida como mecanismo frecuente de inactivación de GST en tumores humanos y algunos de ellos con importantes asociaciones clínico-patológicas¹²⁻²². Sin embargo, el estudio de la inactivación de GST por metilación y su significado clínico-patológico en CGD es escasa y de genes aislados²³.

Actualmente, el reconocimiento del significado clínico-patológico de marcadores requiere de nuevas herramientas estadísticas. En este sentido el análisis mediante *hierarchical clustering*, una herramienta de emergente uso, ya que permite

agrupar información recogida de múltiples variables y asociarlas a casos con características similares entre sí, generando *clusters* o agrupamientos. A partir de los *clusters* generados sería posible identificar asociaciones entre marcadores biológicos (como metilación de ciertos genes) y variables clínico-patológicas particulares. El objetivo de este trabajo es analizar la frecuencia de metilación de la región promotora de 11 GST relacionados a distintas vías metabólicas relevantes en la patogénesis del CGD y explorar sus asociaciones con variables clínico-patológicas utilizando el método de *hierarchical clustering*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Casos clínicos. El estudio se realizó a partir de 305 casos de cáncer gástrico, en tejido incluido en parafina, de piezas quirúrgicas de pacientes operados entre 1993 y 1999 en el Instituto Chileno-Japonés de Enfermedades Digestivas - Hospital Clínico San Borja Arriarán. De este material, y utilizando la definición de Lauren²⁴ para CGD²⁵, se identificaron 83 casos que son la base del presente estudio. Las características clínicas de estos casos se obtuvieron de la revisión de fichas médicas y las características patológicas de informes anátomo-patológicos y revisión de láminas correspondientes. Las características clínicas consideradas fueron sexo (hombre, mujer), edad (menor o igual a 58 años, mayor de 58 años), sobrevida global (censura). Las características anátomo-patológicas consideradas fueron ubicación del tumor (antral, no antral), infiltración de pared gástrica (mucosa/submucosa, muscular propia/serosa) y compromiso ganglionar (sin consignar número de ganglios comprometidos) de acuerdo a la Unión Internacional Contra el Cáncer. Adicionalmente, incluimos la presencia del virus Epstein Barr (EBV) como variable anátomo-patológica en este estudio, dado que nuestro grupo ha descrito recientemente una fuerte asociación entre CGD y la infección por EBV²⁶. Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Servicio de Salud Metropolitano Central (Hospital Clínico San Borja Arriarán).

Extracción de ADN. A partir de cortes histológicos de 50 micras, se realizó extracción de ADN según

el método de proteinasa K²⁷. Brevemente, el tejido obtenido del corte histológico fue traspasado a tubos de 1,5 ml y resuspendido en 100 μ L de tampón de extracción (Tris pH 8,0, 50 mM; EDTA 1 mM; Tween 20 0,5%) con proteinasa K (1 mg/ml). Las muestras fueron incubadas a 55°C x 12 h y a 100°C x 10 min; luego, centrifugadas a 12.000 r.p.m. por 20 min y el sobrenadante traspasado a tubos estériles y mantenidos a -30°C hasta su modificación por bisulfito de sodio.

Modificación por bisulfito de sodio. El método se basa en la conversión de todos los residuos de citosinas no metiladas a uracilos (U) mediante deaminación. Sin embargo, los residuos metilados de citosinas que son resistentes a la modificación permanecen como citosinas^{28,29}. Esta diferencia es utilizada en la amplificación por PCR a través de partidores específicos para cada condición. Brevemente, a 25 μ L de ADN extraído, se agregaron 25 μ L de agua bidestilada estéril, 5,5 μ L de NaOH 2M y se incubó a 37°C durante 10 min. Luego agregamos 30 μ L de hidroquinona (55 mg en 50 ml de agua estéril) y 520 μ L de bisulfito de sodio (3,76 g en 10 mL de agua estéril) y se incubó a 55°C durante 16 h, de acuerdo a protocolos publicados para tejido incluido en parafina. Posteriormente, se utilizó el sistema de purificación Wizard[®] (Promega), agregando 1 mL de resina de purificación a 500 μ L de ADN tratado con bisulfito de sodio. Luego, lavamos con 2 mL de isopropanol, adicionamos 50 μ L de agua bidestilada a 65°C y 8,25 μ L de NaOH 2M, 1 μ L de glicógeno ultrapuro y 17 μ L de acetato de amonio 10 M. La mezcla fue precipitada en etanol absoluto a -20°C durante 1 h, resuspendida en 50 μ L de agua DEPC.

Reacción de polimerasa en cadena. La reacción de polimerasa en cadena se realizó en un volumen de 25 μ L con 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl, 200 μ M dNTP, 0,5 μ M partidores, 2,5 U Taq polimerasa y 4 μ L de ADN extraído y tratado con bisulfito previamente. Las condiciones de amplificación fueron desnaturalización inicial a 94°C x 5 min x 1 vez, seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C x 30 s, alineamiento a 63°C x 1 min y extensión a 72°C x 30 s; posteriormente sigue una extensión final de 72°C x 5 min. La temperatura de alineamiento se ajustó experimen-

talmente para cada gen incluido en el estudio. Para cada muestra se realizó en paralelo la amplificación del gen β -globina humana, para controlar pérdida de señal y eficiencia de la reducción. El resultado se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 3% a 200 volts, durante 20 min y visualización por luz UV posterior a tinción con bromuro de etidio al 0,05%. Los genes seleccionados en este análisis fueron p14, p15, p16, APC, p73, FHIT, E-caderina, SEMA3B, BRCA-1, MINT2 y MGMT³⁰, en base a revisión de la literatura. Dado el alto número de genes y casos analizados, utilizamos la estrategia descrita por Kang y col²⁷ en la cual se amplifica la condición metilada de todos los genes analizados, pero sólo la condición no metilada del gen p16, como control positivo de modificación de bisulfito de sodio. Las secuencias de los partidores y el tamaño de amplificación fueron tomados de la literatura y se muestran en la Tabla 1.

Estadística. Los resultados fueron agrupados según el índice de metilación (IM), que se define como la proporción de genes con metilación positiva dentro del total de genes analizados y se clasificó como alto si tenía un valor mayor a 30% o bajo si era menor a 30%, de acuerdo a Makarla et al³¹. Adicionalmente utilizamos el método *hierarchical clustering*, el cual mide la similitud de las variables analizadas mediante la métrica euclidiana, considerando la máxima distancia de los componentes de los *clusters* entre sí (*complete linkage*)³². De este modo el *hierarchical clustering*, a diferencia de otros métodos estadísticos, permite tener una visión gráfica de asociaciones particulares entre los genes estudiados y las variables clínico-patológicas entre sí y no promedios de datos como el IM. Las asociaciones más cercanas observadas mediante el *hierarchical clustering* fueron confirmadas por el test de chi cuadrado, con un valor significativo de $p < 0,05$ (Epinfo 2000).

RESULTADOS

Los casos seleccionados correspondieron a 53 hombres y 30 mujeres, con un promedio de edad de 57,8 (rango 20-84) años. Cuarenta y ocho casos (60,8%) estaban en localización no antral y 31

Tabla 1. Secuencias de partidores y condiciones de PCR para MS-PCR

Gen	Partidores (forward/reverse) (5'-3')	tamaño	T (°C)
FHIT-M	TTGGGGCGCGGGTTTGGGTTTTTACGC CGTAAACGACGCCGACCCCACTA	74	TD71-64
BRCA1-M	TCGTGGTAACGGAAAAGCGC AAATCTCAACGAACTCACGCCG	75	TD61-58
APC-M	TATTGCGGAGTGCGGGTC TCGACGAACTCCCACGA	98	55
P15-M	GGTTTTTATTTTGTAGAGCGAGGC TAACCGCAAATACGAACGCG	68	TD61-58
MGMT-M	TTTCGACGTTTCGTAGTTTTTCG GCACTCTTCCGAAAACGAAACG	81	59
P14-M	GTGTTAAAGGGCGGCGTAGC AAAACCCTCACTCGCGACGA	122	60
MINT2-M	AATCGAATTTGTCGTCGTTTC AAATAAATAAATAAAAAAAAAACGCG	88	60
P73-M	GGACGTAGCGAAATCGGGGTTC ACCCCGAACATCGACGTCCG	60	TD61-58
E-Caderina-M	TGTAGTTACGTATTTATTTTATAGTGGCGTC CGAATACGATCGAATCGAACCG	112	TD61-58
SEMA3B-M	TGGTTAGGCGGGGTATTTTC TCAACAATAAAAACGAAAACG	133	55
P16-M	TTATTAGAGGTGGGGCGGATCGC GACCCCGAACCGCGACCGTAA	150	65
P16-UM	TTATTAGAGGTGGGGTGGATTGT CAACCCCAAACCACAACCATAA	151	60

M= metilado. UM= no metilado.

(39,2%) en ubicación antral. En 4 casos (5%), la localización no estaba consignada. Doce (14,5%) tumores eran incipientes (1 con metástasis ganglionar) y 70 (84,3%) avanzados. En un caso (1,2%) el estadio no fue consignado. Veintiún tumores (25,3%) de la serie eran de tipo mucinoso (10 casos) y anillo de sello (11 casos). Al momento de la selección, 46 pacientes estaban muertos (42 de ellos por CGD y 4 por otras causas), con un promedio de sobrevida de 68,2 meses.

Frecuencia de metilación genética en 83 casos de cáncer gástrico difuso (CGD). La frecuencia de metilación de 11 GST en 83 casos consecutivos de CGD se muestra en la Tabla 2 y Figura 1. La frecuencia de metilación varió desde 67,5% (FHIT)

Tabla 2. Hipermetilación en 83 casos de cáncer gástrico difuso

Gen	N	%
FHIT	56	67,5
BRCA1	46	55,4
APC	39	47,0
P15	25	30,1
MGMT	22	26,5
P14	20	24,1
MINT2	18	21,7
P16	16	19,3
P73	16	19,3
E-Caderina	14	16,9
SEMA3B	13	15,7

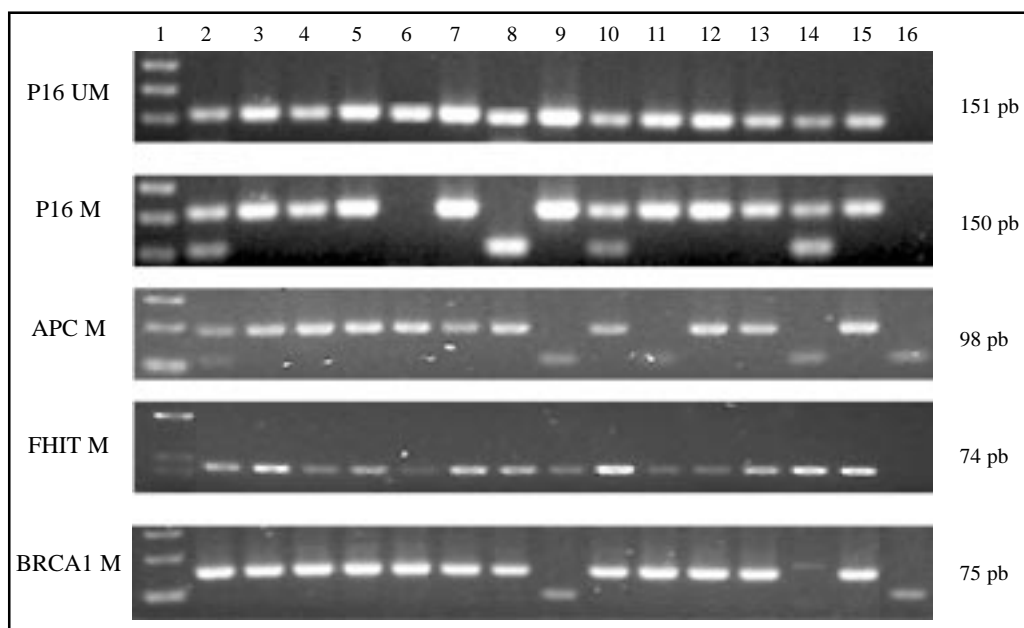


Figura 1. Ejemplos representativos de PCR metilación específica (MS-PCR) para la forma no metilada de p16 (NM) y metiladas de p16, BRCA1 y APC.

a 15,7% (SEMA3B). Tres genes demostraron una alta frecuencia de metilación: FHIT, BRCA1 y APC, 4 genes demostraron una frecuencia intermedia: p15, MGMT, p14 y MINT2 y 4 genes demostraron una frecuencia baja de metilación: p16, p73, E-caderina y SEMA3B. No se observan casos sin metilación en los genes estudiados.

Índice de metilación y correlaciones clínico-patológicas. Para comprender el significado clínico-patológico de la metilación de 11 genes en 83 casos consecutivos de CGD, agrupamos nuestros resultados de acuerdo al IM (ver Materiales y métodos). Treinta seis casos tuvieron un IM mayor a 30% y se consideraron como IM alto. Cuarenta y siete casos tuvieron un IM menor a 30% y fueron considerados IM bajo. Las correlaciones clínico-patológicas de ambos grupos se muestran en la Tabla 3. No encontramos características clínico-patológicas específicas de uno u otro grupo, con la excepción de una tendencia a baja frecuencia de infección por virus de Epstein-Barr en los casos IM bajo ($p=0,07$). El análisis de sobrevida mediante el método de Kaplan-Meier, no demostró asociaciones entre sobrevida e IM (datos no mostrados).

Análisis de hierarchical clustering y correlaciones clínico-patológicas. Para identificar asociaciones de metilación de genes particulares con variables clínico-patológicas específicas realizamos el análisis de *hierarchical clustering* (Figura 2). Este análisis nos generó dos *clusters* uno superior, donde se agruparon todas las variables clínico-patológicas (excepto ubicación y presencia de EBV) y los tres genes de mayor frecuencia de metilación identificados en este estudio (FHIT, BRCA1 y APC). Por otra parte, en el *cluster* inferior, se agruparon los restantes 8 genes junto con la variable ubicación e infección por EBV. A partir de los *clusters* generados, realizamos análisis de asociaciones clínico-patológicas con genes específicos. Este análisis nos permitió identificar dos asociaciones estadísticamente significativas, metilación de APC y menor sobrevida (Figura 3) y metilación de p16 y p14 en casos de CGD asociado a EBV²² (Tabla 4).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran una frecuencia importante de metilación de 11 genes en una serie

Tabla 3. Índice de metilación (IM) y correlaciones clínico-patológicas en 83 casos de cáncer gástrico difuso

		IM <30		IM >30		p
		N	%	N	%	
Género	Hombre	32	68	21	58	0,36
	Mujer	15	32	15	42	
Edad	<58 años	22	47	16	44	0,83
	>58 años	25	53	20	56	
Sobrevida	Vivo	20	43	15	42	0,54
	Muerto	19	40	19	53	
Ubicación	No antral	26	58	22	65	0,53
	Antral	19	42	12	35	
Estado	Incipiente	7	15	5	14	0,87
	Avanzado	39	83	31	86	
Linfonodos	Negativo	10	21	6	17	0,49
	Positivo	29	62	26	72	
Virus Epstein-Barr	Negativo	34	72	22	61	0,07
	Positivo	8	17	13	36	

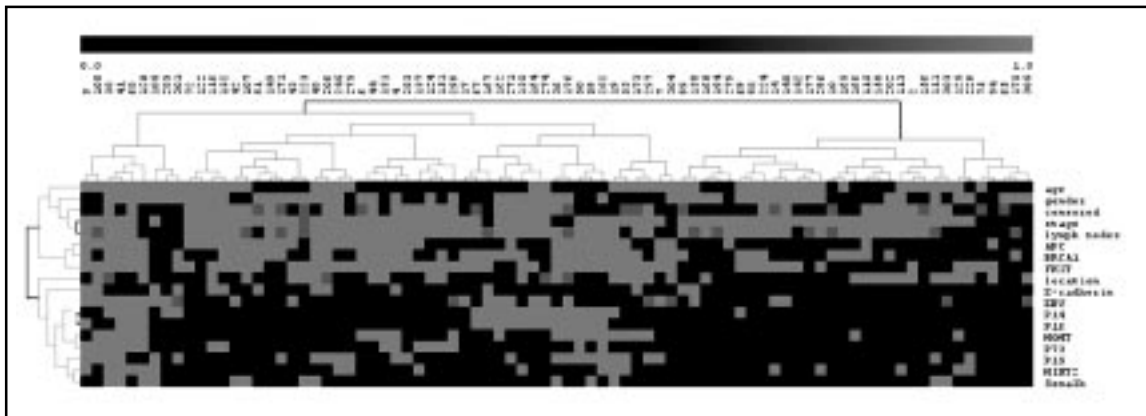


Figura 2. Análisis de *hierarchical clustering* en 83 casos de cáncer gástrico difuso. Se observan dos *clusters*, uno superior con todas las variables clínico-patológicas (excepto ubicación y presencia de virus EB) y FHIT, BRCA1 y APC y uno inferior con 8 genes y ubicación e infección por EBV. Se observa una fuerte asociación entre metilación de p16 y p14 e infección por EBV.

consecutiva de CGD. El índice de metilación en nuestros datos confirma el fenotipo metilador en CGD, como ha sido descrito previamente³³. Sin embargo, el estudio de las correlaciones clínico-patológicas e IM no indica asociaciones significativas que diferencien los grupos alto versus bajo. Sin embargo, el mismo conjunto de datos analizados por *hierarchical clustering* nos permite una

lectura gráfica de asociaciones específicas entre variables clínico-patológicas y genes particulares. Esta estrategia nos permitió la identificación de 3 genes FHIT, BRCA1 y APC, cuya metilación está asociada a variables clínico-patológicas de conocida relevancia en la supervivencia de CGD, como linfonodos y estadio clínico. El análisis estadístico de estas asociaciones nos permitió identificar a la

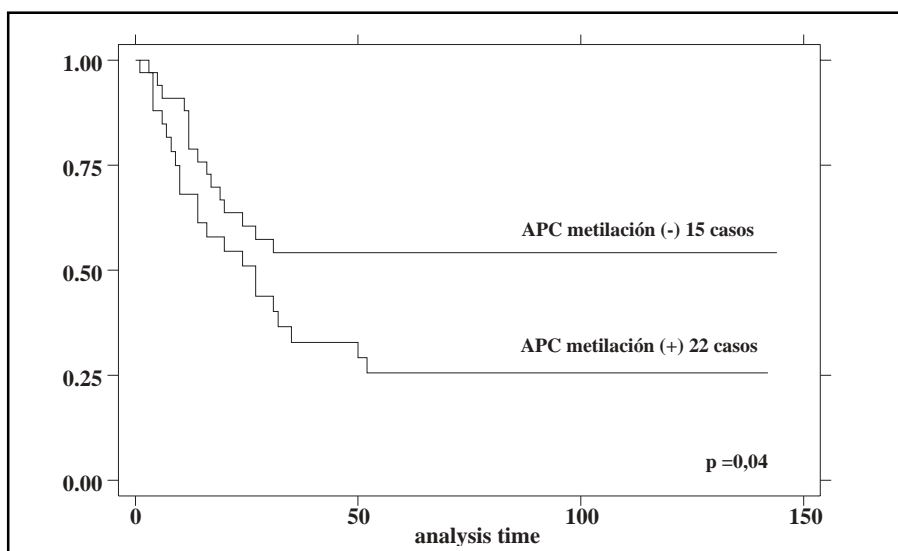


Figura 3. Análisis de sobrevida Kaplan-Meier para comparación de metilación de APC entre carcinomas gástricos difusos.

Tabla 4. Asociaciones del virus de Epstein-Barr y metilación de p14 /p16 en casos de cáncer gástrico difuso

	positivo	EBV negativo	p
p14			
positivo	11	8	0,0006
negativo	10	48	
p16			
positivo	10	6	0,0004
negativo	11	50	

metilación de APC como factor pronóstico en CGD, tal como ha sido descrito recientemente³⁴. Sin embargo, no encontramos una asociación entre sobrevida y metilación de FHIT o BRCA1. Esta información no es concordante con la literatura, que señala que la metilación de FHIT está asociada a un estadio tumoral avanzado, alto grado histológico y peor sobrevida³⁵. El análisis de *hierarchical clustering* nos permitió, además, confirmar la asociación entre EBV con metilación de p16 y p14 no sólo en tercio medio, como ha

sido descrito previamente³⁶, sino a todas las localizaciones del cáncer gástrico. Tomados en conjunto, nuestros datos confirman la potencialidad del análisis de *hierarchical clustering* para la búsqueda de asociaciones entre variables clínico-patológicas y moleculares en estudios con gran cantidad de biomarcadores. Es interesante la observación que estos mismos resultados no demuestran asociaciones al analizarlos con IM, una aproximación que mide promedios de datos y no datos particulares.

Con respecto a las frecuencias de metilación de los distintos genes en estudio, llama la atención la baja frecuencia relativa de E-caderina, ya que se ha descrito metilada en casi 80% de casos de CGD²⁹. Probablemente, el rendimiento del ensayo MS-PCR para E-caderina está disminuido por el tamaño de la región amplificada (120 pares de bases) y el tipo de muestra utilizada, tejido incluido en parafina³⁷. En este sentido, los tres genes que con mayor frecuencia aparecieron como metilados (FHIT, APC y BRCA1), corresponden a tamaños entre 67 y 98 pb. Esta información puede ser relevante al momento de interpretar los resultados, porque pueden estar influidos por el tamaño de la secuencia utilizada para la identificación de genes particulares. Por otra parte, el uso de muestras en tejido

fijado en formalina, e incluido en parafina, nos permitió el acceso a un número importante de casos de CGD en forma retrospectiva. El contar además en estos casos con información clínico-patológica y de sobrevida, nos permitió generar una información que de otra manera habría tomado años en reunirlos en forma prospectiva.

Una proyección de nuestro estudio sería aplicar la metilación de GST en la búsqueda de marcadores de detección precoz en CGD. En este sentido, se ha reportado que los genes APC, c-met, y p53 pueden ser detectados en sueros de pacientes con cáncer gástrico³⁸. De nuestro estudio, APC emergería como un potencial candidato para evaluación de tamizaje en pacientes con factores de riesgo o población asintomática. La

aplicación de esta estrategia de prevención secundaria sería un beneficio a la detección precoz del CGD, ya que permitiría focalizar la endoscopia digestiva alta a pacientes con APC metilado en suero. Esta aproximación se encuentra en evaluación en otros tumores, como cáncer colorrectal³⁹ y cáncer de mama, entre otros.

En resumen, nuestros datos indican que el uso del método de análisis gráfico *hierarchical clustering* es capaz de identificar asociaciones potencialmente significativas entre variables clínico-patológicas y metilación de GST en una serie consecutiva de CGD, en particular sobrevida y metilación de APC e infección por EBV y metilación de p16 y p14, que mediante otros métodos de asociación estadística no encontramos.

REFERENCIAS

1. PISANI P, PARKIN DM, BRAY F, FERLAY J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 83: 18-29.
2. SHIBUYA K, MATHERS CD, BOSCHI-PINTO C, LÓPEZ AD, MURRAY CJ. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer* 2002; 2: 37.
3. PRIETO M. *Mortalidad por cáncer en Chile*. Unidad de Cáncer, Ministerio de Salud, 2000.
4. SERRA I, BÁEZ S, SERRA J, CALVO A, DECINTI E. Evolución epidemiológica reciente del cáncer gástrico en Chile y el mundo. *Rev Chil Cir* 1997; 49: 54-63.
5. CSENDES A, SMOK G, MEDINA E, SALGADO I, RIVERA R, QUITRAL M. Características evolutivas del cáncer gástrico 1958-1990. *Rev Méd Chile* 1992; 120: 36-42.
6. BAL M. *Risk Factors and Survival in Gastric carcinoma*. Department of Biostatistics, School of Public Health, Faculty of Medicine, pp. 120. Santiago: Universidad de Chile, 2001.
7. MARUYAMA K. *Surgical treatment and end result of gastric cancer*. Gann. Tokyo, 1985.
8. OHNO S, TOMISAKI S, OIWA H, SAKAGUCHI Y, ICHIYOSHI Y, MAEHARA Y ET AL. Clinicopathologic characteristics and outcome of adenocarcinoma of the human gastric cardia in comparison with carcinoma of other regions of the stomach. *J Am Coll Surg* 1995; 180: 577-82.
9. HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
10. ESTELLER M, HERMAN JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 2002; 196: 1-7.
11. ESTELLER M, FRAGA MF, GUO M, GARCÍA-FONCILLAS J, HEDENFALK I, GODWIN A ET AL. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 3001-7.
12. TOYOTA M, AHUJA N, SUZUKI H, ITOH F, OHE-TOYOTA M, IMAI K ET AL. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res* 1999; 59: 5438-42.
13. TAMURA G, YIN J, WANG S, FLEISHER AS, ZOU T, ABRAHAM JM ET AL. E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 569-73.
14. SATO S, YOKOZAKI H, YASUI W, NIKAI H, TAHARA E. Silencing of the CD44 gene by CpG methylation in a human gastric carcinoma cell line. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 485-9.
15. SATO K, TAMURA G, TSUCHIYA T, ENDOH Y, USUBA O, KIMURA W ET AL. Frequent loss of expression without sequence mutations of the DCC gene in primary gastric cancer. *Br J Cancer* 2001; 85: 199-203.
16. LEE YY, KANG SH, SEO JY, JUNG CW, LEE KU, CHOE KJ. Alterations of p16INK4A and p15INK4B genes in gastric carcinomas. *Cancer* 1997; 80: 1889-96.
17. KANG YH, LEE HS, KIM WH. Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Lab Invest* 2002; 82: 285-91.
18. IIDA S, AKIYAMA Y, NAKAJIMA T, ICHIKAWA W, NIHEI Z, SUGIHARA K ET AL. Alterations and hypermethylation

- tion of the p14(ARF) gene in gastric cancer. *Int J Cancer* 2000; 87: 654-8.
19. BYUN DS, LEE MG, CHAE KS, RYU BG, CHI SG. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A by aberrant promoter hypermethylation in human gastric adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 7034-8.
 20. BEVILACQUA RA, SIMPSON AJ. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. *Int J Cancer* 2000; 87: 200-3.
 21. HAYASHI K, YOKOZAKI H, GOODISON S, OUE N, SUZUKI T, LOTAN R ET AL. Inactivation of retinoic acid receptor beta by promoter CpG hypermethylation in gastric cancer. *Differentiation* 2001; 68: 13-21.
 22. YASUI W, OUE N, AUNG PP, MATSUMURA S, SHUTOH M, NAKAYAMA H. Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review. *Gastric Cancer* 2005; 8: 86-94.
 23. EISEN MB, SPELLMAN PT, BROWN PO, BOTSTEIN D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14863-8.
 24. LAUREN P. The two histological main types of gastric carcinoma, diffuse and so-called intestinal -type carcinoma. *Acta Path Microbiol Scan* 1965; 64: 31-49.
 25. CORVALÁN A, AKIBA S, VALENZUELA M, CUMSILLE M, KORIYAMA C, ARGANDOÑA J ET AL. Características clínico-moleculares del cáncer gástrico cardial asociado al virus Epstein Barr. *Rev Méd Chile* 2005; 133: 753-60.
 26. CORVALÁN A, KORIYAMA C, AKIBA S, EIZURU Y, BACHHOUSE C, PALMA M ET AL. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma is associated with location in the cardia and with a diffuse histology: a study in one area of Chile. *Int J Cancer* 2001; 94: 527-30.
 27. HERMAN JG, GRAFF JR, MYOHANEN S, NELKIN BD, BAYLIN SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-6.
 28. GRUNAU C, CLARK SJ, ROSENTHAL A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: E65-65.
 29. TAN LW, DOBROVIC A. Methylation analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded sections using a nontoxic DNA extraction protocol. *Biotechniques* 2001; 31: 1354, 1356-7.
 30. KANG GH, LEE S, KIM WH, LEE HW, KIM JC, RHYU MG ET AL. Epstein-barr virus-positive gastric carcinoma demonstrates frequent aberrant methylation of multiple genes and constitutes CpG island methylator phenotype-positive gastric carcinoma. *Am J Pathol* 2002; 160: 787-94.
 31. MAKARLA PB, SABOORIAN MH, ASHFAQ R, TOYOOKA KO, TOYOOKA S, MINNA JD ET AL. Promoter hypermethylation profile of ovarian epithelial neoplasms. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5365-9.
 32. SAEED AI, SHAROV V, WHITE J, LI J, LIANG W, BHAGABATI N ET AL. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 2003; 34: 374-8.
 33. LEUNG WK, TO KF, CHU ES, CHAN MW, BAI AH, NG EK ET AL. Potential diagnostic and prognostic values of detecting promoter hypermethylation in the serum of patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 2005; 92: 2190-4.
 34. BRAGANTINI E, BARBI S, BEGHELLI S, MOORE PS, DE MANZONI G, ROVIELLO F ET AL. Loss of Fhit expression is associated with poorer survival in gastric cancer but is not an independent prognostic marker. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005: 1-6.
 35. VO QN, GERADTS J, GUILLEY ML, BOUDREAU DA, BRAVO JC, SCHNEIDER BG. Epstein-Barr virus in gastric adenocarcinomas: association with ethnicity and CDKN2A promoter methylation. *J Clin Pathol* 2002; 55: 669-75.
 36. ROA JC, ANABALÓN RL, ROA EI, TAPIA EO, MELO A, VILLASECA HM ET AL. Estudio del patrón de metilación génica en el cáncer gástrico en Chile. *Rev Méd Chile* 2005; 133: 874-80.
 37. WANG JY, HSIEH JS, CHEN CC, TZOU WS, CHENG TL, CHEN FM ET AL. Alterations of APC, c-met, and p53 genes in tumor tissue and serum of patients with gastric cancers. *J Surg Res* 2004; 120: 242-8.
 38. WANG JY, HSIEH JS, CHANG MY, HUANG TJ, CHEN FM, CHENG TL ET AL. Molecular detection of APC, K-ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. *World J Surg* 2004; 28: 721-6.
 39. FIEGL H, MILLINGER S, MUELLER-HOLZNER E, MARTH C, ENSINGER C, BERGER A ET AL. Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res* 2005; 65: 1141-5.

Agradecimientos

Agradecemos la revisión crítica del manuscrito al Dr. Juan Carlos Roa, Universidad de la Frontera, Temuco, Chile.