





**Universidad CEU San Pablo  
CEINDO – CEU Escuela Internacional de  
Doctorado**

**PROGRAMA en MEDICINA TRASLACIONAL**



**Estudio de los parámetros séricos  
inflamatorios y de la inestabilidad de  
microsatélites en pacientes con cáncer de  
estómago y de la unión gastroesofágica  
tratados con intención curativa y su posible  
importancia pronóstica.**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por: Martina Giuppi

Dirigida por: Dr. D. Carlos Jesús Gómez Martín

MADRID

2021



**Universidad CEU San Pablo  
CEINDO – CEU Escuela Internacional de  
Doctorado**

**PROGRAMA en MEDICINA TRASLACIONAL**

**Estudio de los parámetros séricos  
inflamatorios y de la inestabilidad de  
microsatélites en pacientes con cáncer de  
estómago y de la unión gastroesofágica  
tratados con intención curativa y su posible  
importancia pronóstica.**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por: Martina Giuppi

Dirigida por: Dr. D. Carlos Jesús Gómez Martín

**MADRID**

**2021**



# AGRADECIMIENTOS

tbd





# ABREVIATURAS



ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

Ag-Ac: Antígeno-Anticuerpo.

AJCC: American Joint Committee on Cancer.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ASCO: American Society of Clinical Oncology.

CDDP: Cisplatino.

CDK: Ciclinas Dependientes de Quinasas.

CEA: Antígeno Carcinoembrionario.

CF: Cisplatino, 5-Fu.

CG: Cáncer gástrico.

CGP: Cáncer Gástrico Precoz.

CGDH: Cáncer Gástrico Difuso Hereditario.

CGH: Comparison Genomic Hybridation.

CIMP: Fenotipo Metilador de Islotes CpG.

CIN: Cromosómicamente inestable.

CNV: Cambios en el Número de Copias.

CPT11: Irinotecán.

CTLA: Antígeno asociado al Linfocito T Citotóxico.

DC: Docetaxel, Cisplatino.

DCF: Docetaxel, Cisplatino, 5-Fu.

DE: Desviación estándar.

DHFU: Dihidro-Fluoruracilo.

dNLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos derivado.

DPD: Dihidro-Pirimidin-Deshidrogenasa.

EBER: Epstein-Barr encoded RNA.

ECF: Epirubicina, Cisplatino, 5-Fu.

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group.

ECX: Epirubicina, Cisplatino, Capecitabina.

EE: Enfermedad estable.

EGC-JGES: Clasificación de Cáncer Gástrico Precoz de la Sociedad Japonesa de Gastroenterología Endoscópica.

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor.

EMA: European Medicines Agency.

EMR: Resección Mucosa Endoscópica.

EOC: Epirubicina, Oxaliplatino, 5-Fu.

EORTC: European Organization for Research and Treatment of Cancer.

EOX: Epirubicina, Oxaliplatino, Capecitabina.

ESD: Disección Endoscópica Submucosa.

ESMO: Sociedad Europea de Oncología Médica.

FDA: Food and Drug Administration.

FGFR: Fibroblastic Growth Factor Receptor.

FGFR2: Fibroblastic Growth Factor Receptor 2.

FIGC: Síndrome de Cáncer Gástrico Familiar de tipo Intestinal.

FISH: Hibridación In Situ Fluorescente.

FLOT: 5-Fu, Leucovorin, Oxaliplatino, Docetaxel.

FOLFIRI: 5-Fu, Irinotecán.

FOLFOX: 5-Fu, Oxaliplatino.

5-Fu: 5-Fluoruracilo.

GAPPS: Síndrome de Adenocarcinoma Gástrico y Poliposis Proximal del Estómago.

GS: Genómicamente Estable.

H-E: Hematoxilina-Eosina.

HER2: Human Epidermal Growth Factor 2.

HGF: Hepatocyte Growth Factor.

H. pylori: Helicobacter Pylori.

HR: Hazard Ratio.

IARC: International Agency for Research Cancer.

IC: Intervalo de confianza.

ICGC: The International Cancer Genome Consortium.

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina.

IHQ: Inmunohistoquímica.

IL: Interleuquina.

ILVN: Invasión linfática, vascular y perineural.

IMC: Índice de Masa Corporal.

IMS: Inestabilidad de Microsatelites.

JGCA: Japan Gastric Cancer Association.

JCGC: Japanese Clasification of Gastric Cancer.

LDH: Lactato Deshidrogenasa.

MALT: Linfoma T asociado a mucosas.

miARN: microARN.

MET: Mesenchymal to Epithelial Transition gene.

MLH1: MutL Homolog 1.

MMPS: Metaloproteasas de la Matriz Extracelular.

MMR: Mismatch Repair Genes.

MRC: British Medical Research Council.

MSH2: MutS Homolog 2.

MSH6: MutS Homolog 6.

MSI: Microsatellite instability.

NA: No alcanzado.

NCCN: National Comprehensive Cancer Network.

ND: No Determinado.

NF- $\kappa$ B: Factor de Transcripción Nuclear  $\kappa$ B.

NLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos.

NGS: Next-Generation Sequencing.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OR: Odds Ratio.

PARP: Poli-ADP-polimerasa.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerada.

PD: Progression Disease.

PD-1: Proteína de muerte celular programada 1.

PD-L: Ligando del Receptor de Muerte Programada.

PD-L1: Ligando 1 del Receptor de Muerte Programada.

PE: Progresión de la enfermedad.

PF: Cisplatino, 5-Fu.

PGF: Placental Growth Factor.

PGM: Personal Genome Machine.

PI3K/AKT/mTOR: Fosfatidilinositol-3-quinasa/proteína quinasa B/mammalian target of rapamycin.

PLR: Ratio Plaquetas/Linfocitos.

PMS2: PMS1 Homolog2.

PSCA: Prostate Stem Cell Antigen.

Q-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.

RC: Respuesta Completa.

RECIST: Response Evaluation Criteria In Solid Tumors.

RP: Respuesta Parcial.

RTK: Receptores Tirosina Quinasa.

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerada por transcriptase Reversa.

SEAP: Sociedad Española de Anatomía Patológica.

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica.

SG: Supervivencia global.

SII: Índice de Inflamación Sistémica.

SLE: Supervivencia libre de enfermedad.

SLP: Supervivencia libre de progresión.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SNP: Polimorfismos de Nucleótido Único.

SWOG: Southwest Oncology Group.

TCGA: The Cancer Genome Atlas.

T-DM1: Trastuzumab-emtansina.

TGF: Factor de Crecimiento Transformante.

TIL: Linfocitos Infiltrantes de Tumor.

TMB: Tumor Mutational Burden.

TP: Timidilato Fosforilasa.

TS: Timidilato Sintetasa.

UE: Unión Europea.

UICC: International Union Against Cancer.

UGE: Unión Gastroesofágica.

VEB: Virus de Epstein-Barr.

VEGFR: Vascular Endotelial Growth Factor Receptor.

XELOX: Capecitabina, Oxaliplatino.



# ÍNDICE GENERAL





<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	
<b>RESUMEN</b> .....	
<b>SUMMARY</b> .....	
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	
Epidemiología del Cáncer Gástrico.....	1
Clasificación topográfica, histopatológica y molecular del Cáncer Gástrico.....	4
Clasificación topográfica.....	4
Clasificación histopatológica.....	5
<i>Clasificaciones histológicas macroscópicas</i> .....	5
<i>Clasificaciones histológicas microscópicas</i> .....	8
Clasificación molecular.....	12
Estadificación del Cáncer Gástrico .....	19
<i>Estadificación TNM</i> .....	19
<i>Clasificación Japonesa</i> .....	25
Factores pronósticos en Cáncer Gástrico.....	26
<i>Factores clínicos y patológicos</i> .....	26
<i>Factores moleculares</i> .....	31
Factores predictivos en Cáncer Gástrico .....	42
Inflamación sistémica y cáncer.....	53
Inflamación sistémica y Cáncer Gástrico .....	59
Inestabilidad de microsatélites e inflamación en Cáncer Gástrico.....	62
Tratamiento del Cáncer Gástrico localizado y localmente avanzado .....	64
<i>Tratamiento quirúrgico del Cáncer Gástrico localizado</i> .....	64
<i>Tratamiento quimioterápico y/o radioterápico en enfermedad localizada o localmente avanzada potencialmente resecable</i> .....	72
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>81</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>82</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>83</b>
Selección de casos y recogida de variables.....	83
Estudio de los parámetros de inflamación sistémica .....	88
Estudio de la Inestabilidad de Microsatélites .....	89
Identificación de otros biomarcadores moleculares en el subgrupo del Hospital Universitario 12 de Octubre.....	92
<i>Estudio mediante Next-Generation Sequencing de alteraciones genómicas</i> .....	92
<i>Estudio por inmunohistoquímica de la expresión de PD-L1, E-cadherina y de Genoma de Virus de Epstein-Barr en las células tumorales</i> .....	95
<i>Estudio mediante Hibridación fluorescente in situ de la amplificación de HER2</i> .....	97
<i>Estudio mediante Hibridación fluorescente in situ de la amplificación de MET y FGFR2</i> .....	97
Almacenamiento de los datos y análisis estadístico .....	99
<b>Resultados</b> .....	<b>102</b>
Características clínicas y patológicas.....	102

Características de los parámetros de Inflamación sistémica.....	105
Resultados del estudio de la Inestabilidad de Microsatélites.....	109
Análisis de la Relación entre el origen geográfico y las variables estudiadas.....	112
Relación entre los parámetros de Inflamación Sistémica y las características clínico-patológicas.....	115
Relación entre los parámetros de Inflamación Sistémica y la respuesta al tratamiento neoadyuvante.....	118
Relación entre los parámetros de Inflamación Sistémica e Inestabilidad de Microsatélites.....	121
Análisis de la Supervivencia Global.....	123
Análisis de la Supervivencia Global en la Cohorte Occidental .....	124
<i>Supervivencia Global según las características clínico-patológicas.....</i>	<i>125</i>
Supervivencia Global y Edad al diagnóstico.....	127
Supervivencia Global y Clasificación de Lauren.....	127
Supervivencia Global y Resultado de la resección.....	128
Supervivencia Global y Afectación ganglionar en la pieza quirúrgica .....	129
Supervivencia Global y Administración de tratamiento adyuvante.....	129
Supervivencia Global y Recidiva.....	130
Supervivencia Global y Localización de la recidiva .....	130
Análisis de la Supervivencia Global según Expresión de las proteínas de reparación del ADN (proteínas MMR).....	131
<i>Análisis de la Supervivencia Global según los parámetros de Inflamación Sistémica .....</i>	<i>131</i>
Análisis multivariante de la Supervivencia Global .....	133
Análisis de la Supervivencia Libre de Progresión.....	135
Análisis de la Supervivencia Libre de Progresión en la Cohorte Occidental .....	136
<i>Supervivencia Libre de Progresión según las características clínico-patológicas....</i>	<i>137</i>
Supervivencia Libre de Progresión y Edad al diagnóstico .....	139
Supervivencia Libre de Progresión y Clasificación de Lauren.....	139
Supervivencia Libre de Progresión y Resultado de la resección .....	141
Supervivencia Libre de Progresión y Afectación ganglionar en la pieza quirúrgica.....	141
Supervivencia Libre de Progresión y Administración de tratamiento adyuvante.....	142
Análisis de la Supervivencia Libre de Progresión según la expresión de las proteínas de reparación del ADN (proteínas MMR) .....	142
<i>Análisis de la Supervivencia Libre de Progresión según los parámetros de Inflamación Sistémica.....</i>	<i>142</i>
Análisis multivariante de la Supervivencia Libre de Progresión tumoral.....	144
Resultados en el subgrupo de pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre ...	146
<i>Características de los parámetros de Inflamación Sistémica en los pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre.....</i>	<i>148</i>
<i>Resultados del estudio de la Inestabilidad de Microsatélites y de otros biomarcadores en los pacientes del Hospital Univeritario 12 de Octubre.....</i>	<i>150</i>
<i>Estudio mediante Next-Generation Sequencing de otras alteraciones moleculares en los pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre .....</i>	<i>153</i>

*Análisis de la Supervivencia en los pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre*..... 156

**DISCUSIÓN**..... 163

Caracterización clínico-patológica Del cáncer gástrico y de la union gastroesofágica resecable ..... 163

Caracterización y valor pronóstico de los parámetros de inflamación sistémica en cáncer gástrico resecable ..... 168

Caracterización y valor pronóstico de la Inestabilidad de microsatélites en el cáncer gástrico resecable ..... 176

Relación entre los parámetros de inflamación sistémica y la inestabilidad de microsatélites en cáncer gástrico resecable..... 179

Caracterización molecular del cáncer gástrico resecable en el subgrupo de pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre ..... 180

IMPLICACIONES PRÁCTICAS ..... 185

limitaciones del estudio ..... 186

**CONCLUSIONES** ..... 188

**BIBLIOGRAFÍA**..... 190

**ANEXOS**..... 226

ANEXO I. APROBACIÓN CEIC HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE ..... 226

ANEXO II. VALORES DE REFERENCIA Y RANGOS DE LABORATORIO DE LOS CENTROS PARTICIPANTES..... 227

ANEXO III. CRITERIOS RECIST 1.1 DE VALORACIÓN DE LA RESPUESTA TUMORAL..... 228

**ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS** ..... 229



## RESUMEN

Según las últimas estimaciones, el Cáncer Gástrico es el quinto cáncer por incidencia a nivel mundial y el segundo en términos de mortalidad. En el contexto del GC resecable, a pesar de los avances logrados con el tratamiento multidisciplinario, que incluye cirugía con intención curativa y quimioterapia, el cumplimiento del tratamiento postquirúrgico y la supervivencia a largo plazo siguen siendo insuficientes. Por ello, se hace necesaria la búsqueda de biomarcadores pronósticos y predictivos fiables que permitan clasificar de manera más adecuada a los pacientes y por lo tanto mejorar el cumplimiento terapéutico y su supervivencia global y libre de progresión. A este respecto, en este trabajo se analiza de forma retrospectiva y multicéntrica el valor pronóstico de los biomarcadores de inflamación sistémica NLR, dNLR, SII, LDH y de la inestabilidad de microsatélites en las muestras tumorales de pacientes occidentales y orientales. En la población occidental de pacientes, el parámetro dNLR pre-cirugía ha mostrado tener valor pronóstico independiente en términos de supervivencia libre de progresión (dNLR  $p=0,02$ ). Por otro lado, la inestabilidad de microsatélites no ha demostrado tener un valor pronóstico en la misma población, probablemente debido al pequeño tamaño muestral.



## SUMMARY

According to the latest estimation, Gastric Cancer is the fifth most common cancer worldwide and the second cause of cancer related death. Regarding to resectable disease, despite significant advances in multidisciplinary treatment that include surgery with curative intent and perioperative chemotherapy, the compliance of postsurgical treatment and the long-term survival remain poor. These findings call for the need for reliable prognostic and predictive biomarkers to allow for a more adequate classification of patients and therefore improve their therapeutic compliance as well as their overall and progression-free survival. In this sense, this work analyzes the prognostic value of the systemic inflammatory biomarkers NLR, dNLR, SII and LDH and the prognostic value of the microsatellite instability in tumor samples from Western and Eastern patients. In Western population, pre-surgery dNLR has shown to be an independent prognostic factor in terms of progression-free survival (dNLR  $p=0,02$ ). On the other hand, microsatellite instability has not shown to have a prognostic role in the same population, probably due to the limited sample size.





# INTRODUCCIÓN



## EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER GÁSTRICO

Según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, y a pesar de un descenso importante en la incidencia del Cáncer Gástrico (CG) a nivel mundial en las últimas décadas, el CG ha ocupado en el año 2018 el quinto y el segundo lugar en términos de incidencia y mortalidad respectivamente a nivel mundial. En 2018 se estimaron 1.033.701 nuevos casos de carcinoma de estómago en el mundo (5,7% del total) siendo la tasa de incidencia, normalizada por edad en ambos géneros, más elevada en hombres (1-3) (15,8/100.000 habitantes) que en mujeres (7/100.000 habitantes).

En términos de incidencia, el CG presenta diferencias geográficas significativas. En 2018 el 74,5% de los nuevos casos ocurrieron en Asia, siendo mayor la tasa de incidencia normalizada por edad en Asia Oriental (22,4). Le siguen Europa (12,9%), América Latina y Caribe (6,5%), África (3%), América del Norte (2,8%) y Oceanía (0,32%). En Europa, en 2018 el número de nuevos casos fue de 133.133 (12,9%), siendo las tasas de incidencias normalizadas por edad en ambos géneros mayores en Europa Central y del Este (11,4) y en Europa Meridional (7,5) (2).

A nivel mundial, el CG constituye la segunda causa de muerte por cáncer en ambos sexos solo superada por el cáncer de pulmón, y subiendo de una posición respecto a los datos publicados en 2012. En 2018 en el mundo se han estimado aproximadamente 782.685 muertes por CG (8.2 % del total de muertes por cáncer).

El 74,7% de los decesos ocurrieron en Asia mientras que en Europa el número de muertos por cáncer gástrico fue de 102.167 (13,1%), de los cuales más de la mitad se han producido en Europa Central y del Este (53.268). Siguen a Europa, América Latina y Caribe (6,6%), África (3,7%), América del Norte (1,7%) y Oceanía (0,27%).

Aunque el descenso significativo en la incidencia del CG a nivel mundial está relacionada en parte con el reconocimiento de factores de riesgo como la infección por *Helicobacter pylori* así como otros factores dietéticos y ambientales, parece existir una tendencia creciente en la incidencia del CG

entre la población joven en ciertos países (4-6). Asimismo, la reducción del tabaquismo en los países en los que era común, puede haber contribuido también a esa disminución (7).

En Japón y Corea los altos índices de cáncer gástrico se acompañan sin embargo de ratios de mortalidad por edad muy inferiores, en probable relación con los sistemas de cribaje y vigilancia que permiten diagnósticos más precoces y tratamientos más efectivos (8). La raza asiática mantiene ese mejor pronóstico también cuando los pacientes son tratados en países occidentales (9). A este respecto, un estudio sobre movimientos migratorios desde Japón a Estados Unidos ha confirmado que la exposición ambiental temprana prevalece sobre los factores genéticos en las tasas de incidencia y mortalidad del CG (10).

A nivel anatómico, el carcinoma de estómago proximal es más común en los países occidentales y el no proximal en los países asiáticos. De manera global se ha evidenciado una disminución de la ocurrencia del carcinoma gástrico distal o antral que se relaciona con la infección *H. pylori*. Sin embargo, las tasas del carcinoma gástrico proximal están aumentando tanto en Estados Unidos como en otros países europeos, como resultado, se postula, del aumento de la obesidad y los factores de riesgo para CG asociados a la misma como el reflujo gastroesofágico (11).

Aproximadamente el 90% de los CG son adenocarcinomas gástricos. Los factores de riesgo, la distribución geográfica y la edad de aparición difieren según el tipo histológico y según la localización anatómica del tumor (unión gastroesofágica, estómago proximal o cardias, estómago distal). El adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal es el tipo histológico más frecuente en las áreas de mayor incidencia y parece ser responsable de la variación reciente de las cifras de CG a nivel mundial (12). De hecho, a partir de la década de 1950, la disminución en la incidencia del adenocarcinoma gástrico ha sido preferentemente del tipo intestinal, haciendo que el difuso sea relativamente más frecuente que anteriormente y siendo el tipo histológico más frecuente en las áreas de menor incidencia. El descenso en los casos del tipo

intestinal se ha documentado en EEUU y Japón mientras que los casos de tipo difuso han aumentado (en EEUU) o se han mantenido estables (Japón) (13).

Los factores de riesgo para el desarrollo del carcinoma gástrico proximal incluyen la obesidad, la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) y el esófago de Barrett. Los factores de riesgo asociados con el no-proximal serían la infección por *H. pylori*, nivel socioeconómico bajo, exceso de nitratos en la dieta y gastritis atrófica. El carcinoma de estómago no-proximal también se ha visto relacionado con el consumo de alcohol, una dieta rica en sal y el consumo de carne procesada. Ambos tipos de carcinomas están influenciados por el uso de tabaco y por la baja ingesta de fruta y verdura, y son más frecuentes en hombres que en mujeres (incidencia dos veces mayor en hombres). Asimismo la realización de una gastrectomía parcial previa por cualquier causa y la enfermedad de Ménétrier parecen jugar un papel importante (14).

Por otro lado, el CG sigue siendo uno de los tumores cuya etiología clásicamente está asociada a infecciones dada su relación no solamente con *H. pylori*, sino también con el virus de Epstein-Barr (VEB) (15).

## CLASIFICACIÓN TOPOGRÁFICA, HISTOPATOLÓGICA Y MOLECULAR DEL CÁNCER GÁSTRICO

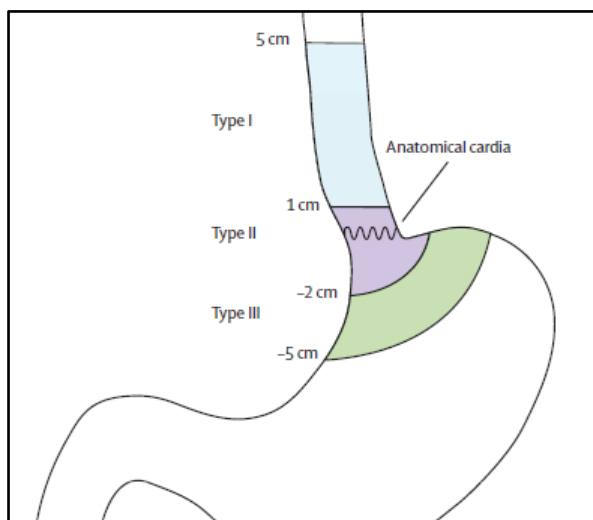
Los adenocarcinomas del estómago son neoplasias malignas del epitelio de la mucosa gástrica que presentan diversos grados de diferenciación glandular. Estas neoplasias pueden desarrollarse en cualquiera de las zonas anatómicas del estómago. Históricamente las neoplasias malignas de estómago se han clasificado de acuerdo con su localización topográfica y sus características histopatológicas, y solo más recientemente se han propuesto diversas clasificaciones moleculares.

### CLASIFICACIÓN TOPOGRÁFICA

A nivel topográfico los carcinomas gástricos suelen clasificarse en proximales o distales. Esta clasificación se basa tanto en factores etiológicos como epidemiológicos y tiene importantes implicaciones en el tratamiento quirúrgico y complementario empleados.

- **PROXIMALES O DE LA UNIÓN GASTROESOFAGICA (UGE).** Incluyen los adenocarcinomas que engloba la UGE, independientemente de la localización de la masa tumoral, así como los localizados hasta 5 cm por debajo de la UGE. Siewert y Stein clasificaron estos tumores en tres tipos (16, 17) (Figura 1):
  - **Siewert Tipo I.** Adenocarcinomas del esófago distal que asientan sobre un área de metaplasia intestinal (ej. esófago de Barret) y cuyo epicentro se encuentra entre 1 cm por encima de la línea Z hasta 5 cm en sentido proximal
  - **Siewert Tipo II.** Carcinomas que asientan sobre el cardias o la verdadera UGE cuyo epicentro se encuentra desde 1 cm por encima de la línea Z hasta 2 cm por debajo de la misma
  - **Siewert Tipo III.** Carcinomas que asientan en la región subcardial cuyo epicentro se encuentra desde 2 cm por debajo de la línea Z hasta 5 cm en sentido distal. Pueden infiltrar la UGE desde abajo
- **DISTALES A LA UGE.** Carcinomas que asientan en cuerpo, antro y píloro.

Figura 1. Clasificación de Siewert-Lend (1998), tomado de (18).



## CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA

Más del 95% de las neoplasias malignas de estómago son adenocarcinomas. Por ese motivo nos referimos a ellos cuando hablamos de manera genérica de cáncer gástrico. Los adenocarcinomas gástricos pueden presentar asimismo diferentes patrones histológicos, los cuales podemos clasificar desde un punto de vista macroscópico y/o microscópico en diversas clasificaciones.

## CLASIFICACIONES HISTOLÓGICAS MACROSCÓPICAS

Las clasificaciones histopatológicas según el aspecto macroscópico del tumor más utilizadas son la Clasificación del Cáncer Gástrico Precoz de la Sociedad Japonesa de Gastroenterología Endoscópica (EGC-JGES), en caso de pacientes con adenocarcinomas confinados a mucosa o submucosa, y la Clasificación de Borrmann en caso de pacientes con neoplasias avanzadas. Ambas clasificaciones tienen además un demostrado valor pronóstico.

## CLASIFICACIÓN JAPONESA (EGC-JGES)

La clasificación EGC-JGES (19) divide los carcinomas gástricos precoces de acuerdo con la apariencia macroscópica del tumor en la visión endoscópica en 3 tipos principales:

**Tipo 0-I (prominente).** Lesión polipoide, protruye más de 3 mm sobre la superficie de la mucosa gástrica

**Tipo 0-IIa (elevada superficial).** Lesión que protruye ligeramente a menos de 3 mm sobre la superficie de la mucosa gástrica

**Tipo 0-IIb (plano superficial).** Tumores sin elevación o depresión

**Tipo 0-IIc (deprimida superficial).** Lesión ligeramente deprimida

**Tipo 0-III (excavado).** Lesión con una depresión prominente

Esta clasificación se emplea en los casos de cáncer gástrico precoz (CGP), término que se originó en Japón y se refiere a los adenocarcinomas cuyo crecimiento está confinado a la mucosa o submucosa gástrica, independientemente de si se acompaña o no de metástasis en los ganglios linfáticos locorreionales. Estos casos se corresponderían con los T1 de la clasificación TNM que se detalla más adelante (Figura 2).

## CLASIFICACIÓN DE BORRMANN

La clasificación de Borrmann (20) se utiliza en caso de pacientes con neoplasias gástricas más avanzadas, carcinomas que invaden la pared gástrica y alcanzan la capa muscular propia o la atraviesan, independientemente de si tienen o no ganglios linfáticos afectados. Correspondería a los casos T2-T4 de la clasificación TNM detallada posteriormente.

La clasificación de Borrmann divide los tumores en cuatro tipos, de acuerdo a su apariencia macroscópica (Figura 3):

**Tipo I. Polipoide.** Tumores polipoides bien circunscritos, marcadamente demarcados de la mucosa circundante

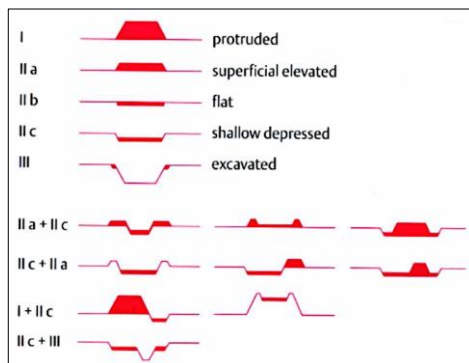
**Tipo II. Ulcerado.** Tumores ulcerados con una marcada infiltración central y márgenes elevados y definidos/claros, que rodean una pared gástrica engrosada



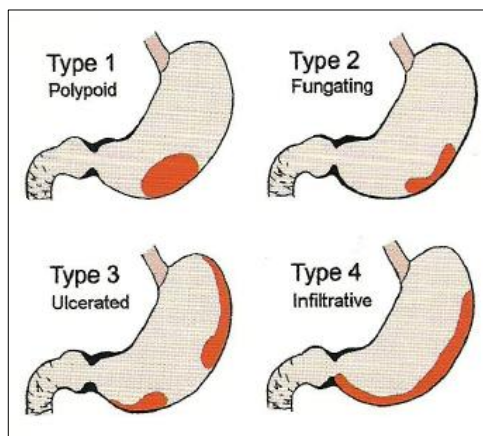
**Tipo III. Infiltrativo ulcerado.** Tumores ulcerados con márgenes elevados, infiltrativos y no definidos/claros, que rodean una pared gástrica engrosada

**Tipo IV. Infiltrativo difuso.** Tumores sin ulceración marcada ni márgenes elevados ni definidos/claros. Estos tumores se extienden superficialmente en la mucosa y submucosa produciendo una lesión plana con o sin ulceración que, en caso de ser más extensa, se denomina linitis plástica o estómago en “bota de cuero”. En esta última variante del tipo IV se encuentran carcinomas de tipo Infiltrativo que se extienden difusamente a todo el estómago. Generalmente presenta células en anillo de sello y abundante estroma fibroso a nivel de submucosa, muscular y serosa. Aunque conserve su forma, el estómago es más pequeño, rígido y de pared uniformemente engrosada.

**Figura 2. Clasificación del Cáncer Gástrico Precoz de la Sociedad Japonesa de Gastroenterología Endoscópica.**



**Figura 3. Clasificación de Borrmann para el Cáncer Gástrico avanzado.**



---

## CLASIFICACIONES HISTOLÓGICAS MICROSCÓPICAS

El cáncer gástrico (CG) es una enfermedad heterogénea tanto a nivel arquitectónico como citológico en el que se demuestra la coexistencia de varios elementos histológicos.

Actualmente las dos clasificaciones microscópicas más aceptadas y usadas de manera universal por su enfoque simple, robusto y por su reproducibilidad, son la Clasificación de Lauren y la Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Otras clasificaciones histológicas menos empleadas en los países occidentales son las propuestas por la Asociación Japonesa del Cáncer Gástrico (JGCA) (21) o la de Nakamura (22), así como las descritas por otros autores (23-25).

### CLASIFICACIÓN DE LAUREN

La Clasificación de Lauren (26), propuesta por el patólogo Pekka A. Lauren en 1965, divide los adenocarcinomas gástricos en dos subtipos histológicos que exhiben una serie de características clínicas y moleculares distintas incluyendo epidemiología, etiología, histogénesis, diferenciación celular, carcinogénesis, comportamiento biológico y pronóstico.

- **Carcinomas Intestinales.** Forman estructuras glandulares de diferente grado de diferenciación, a veces pobremente diferenciadas en el borde de avance del tumor. Suelen aparecer en edades más avanzadas y se relacionan con factores ambientales y lesiones precursoras del tipo de gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia y carcinoma in situ. Suelen diseminarse principalmente por vía hematógena, siendo las metástasis hepáticas las más frecuentes.
- **Carcinomas Difusos.** Se caracterizan por presentar neoplasias pobremente cohesionadas que infiltran la pared gástrica de manera difusa con escasa o nula formación de glándulas. Las células suelen ser redondas y pequeñas, dispuestas de manera aislada o en pequeños acúmulos que simulan glándulas o retículos. Pueden presentar

pequeñas cantidades de mucina intersticial, tienen inferior tasa mitótica que los del tipo intestinal, y es menos evidente la inflamación asociada. Por el contrario, el grado de desmoplasia es mayor en este tipo tumoral. Suelen extenderse por la superficie peritoneal en forma de carcinomatosis.

Los carcinomas que contienen una proporción similar de ambos tipos en su interior se denominan **carcinomas mixtos**. Los carcinomas por cuyas características no pueden ser incluidos en ninguno de los tres tipos anteriores se denominan **carcinomas indeterminados**.

## **CLASIFICACIÓN DE LA OMS**

La clasificación de la OMS, actualizada según la 5ª edición de la WHO *Classification Tumours of the digestive System (27)* (World Health Organization 2019), subdivide los carcinomas gástricos en 5 subtipos principales de adenocarcinomas y otras entidades más raras y menos frecuentes.

- **Adenocarcinoma tubular.** Es el subtipo histológico más común, con una frecuencia relativa que oscila entre el 45% en Europa y el 64% en un estudio nacional japonés. Contiene túbulos ramificados dilatados o en forma de hendidura de manera prominente que varían en su diámetro, y pueden presentar estructuras acinares. Las células tumorales pueden ser columnares, cuboideas o aplanadas por mucina intraluminal o restos celulares. Pueden verse también células claras. En este subtipo histológico se incluyen también los tumores con estructuras sólidas y túbulos apenas reconocibles, clasificados como carcinomas (sólidos) tubulares pobremente diferenciados.
- **Adenocarcinoma papilar.** Se trata de un subtipo histológico relativamente raro, con patrón de crecimiento exofítico y tumores bien diferenciados que se caracterizan por presentar procesos alargados y recubiertos de células columnares o cuboideas unidas a una matriz de tejido conectivo fibrovascular. Algunos de estos tumores pueden

presentar túbulos (tubulopapilares). No obstante sean tumores bien-diferenciados con borde tumoral bien delimitado y frecuente infiltración por células inflamatorias, estos tumores se asocian a una más elevada frecuencia de metástasis hepáticas y pobre supervivencia.

- **Carcinoma pobremente cohesivo, incluyendo carcinoma con células en anillo de sello y otros subtipos.** Este subtipo histológico representa el 20-54% de los cánceres gástricos, con frecuencias más elevadas en pacientes japoneses. Se compone de células neoplásicas aisladas o formando pequeños agregados sin glándulas bien formadas. Puede presentar o no células en anillo de sello. Cuando las presenta, se compone de manera predominante o exclusivamente por este tipo celular, caracterizado por un núcleo excéntrico desplazado por un citoplasma globoide ópticamente claro compuesto de mucina. Estas células pueden llegar a constituir glándulas con forma de cordón o seguir un patrón microtrabecular. Otras variantes de carcinoma pobremente cohesivo incluyen tumores compuestos por células neoplásicas que asemejan histiocitos o linfocitos, células de citoplasma intensamente eosinofílico y células con núcleos irregulares y bizarros. Algunos tumores pueden presentar una mezcla de estos distintos tipos celular e incluso algunas células en anillo de sello.
- **Adenocarcinoma mucinoso.** Compuesto por células epiteliales malignas y lagos de mucina extracelular, esta última ocupa más del 50% del área tumoral. Pueden verse dos patrones principales de crecimiento. Por un lado pueden ser reconocibles estructuras glandulares o túbulos revestidos por epitelio columnar con mucina intersticial, por otro lado cadenas, nidos o células individuales, incluyendo células en anillo de sello, rodeadas por mucina.
- **Adenocarcinoma mixto.** Estos tumores están constituidos por un componente glandular (tubular/papilar) y un componente pobremente cohesivo con o sin células en anillo de sello. La relevancia de la proporción de cada componente en el pronóstico del paciente no está establecida, aunque datos preliminares sugieren que la presencia de

cualquier componente de carcinoma pobremente cohesivo se asocia a un peor pronóstico. Los carcinomas mixtos son clonales y la divergencia fenotípica se ha atribuido a la mutación somática en el gen de E-cadherina (*CDH1*), restringido al componente de células en anillo de sello/pobremente cohesivo.

**Tabla 1. Comparación entre Clasificación de la OMS y Clasificación de Lauren del cáncer gástrico.**

<b>WHO (2019)</b>	<b>Lauren (1965)</b>
<b>Adenocarcinoma papilar</b> <b>Adenocarcinoma tubular, bien diferenciado</b> <b>Adenocarcinoma tubular, moderadamente diferenciado</b>	Tipo intestinal
<b>Adenocarcinoma tubular, pobremente diferenciado</b>	Tipo indeterminado
<b>Carcinoma pobremente cohesivo, tipo células en anillo de sello</b> <b>Carcinoma pobremente cohesivo, otros tipos celulares</b>	Tipo difuso
<b>Carcinoma mucinoso</b>	Tipo intestinal/ difuso / indeterminado
<b>Carcinoma mixto</b>	Tipo mixto
<b>Carcinoma adenoescamoso</b> <b>Carcinoma de células escamosas</b> <b>Carcinoma no diferenciado</b> <b>Carcinoma con estroma linfoide</b> <b>Carcinoma hepatoide</b> <b>Adenocarcinoma con diferenciación enteroblástica</b> <b>Adenocarcinoma con glándulas tipo fúndicas</b> <b>Adenocarcinoma micropapilar</b>	No definido

## CLASIFICACIÓN MOLECULAR

Como hemos señalado anteriormente, la gran mayoría de los tumores gástricos son adenocarcinomas que pueden ser subdivididos de acuerdo a diferentes clasificaciones topográficas e histológicas. Sin embargo, estos sistemas de clasificación han demostrado ser de una limitada utilidad respecto al conocimiento de esta neoplasia debido a la gran complejidad biológica de la misma. Los avances en tecnologías de alto rendimiento como la expresión génica o la secuenciación del ADN, han dado lugar a diversas clasificaciones moleculares no directamente equivalentes entre sí, poniéndose de relieve el alto nivel de heterogeneidad inter- e intra-tumoral del cáncer gástrico, en el que cada paciente presenta un perfil genético y molecular particular (28-31).

Algunos de estos avances están relacionados con la disponibilidad pública de diferentes clasificaciones moleculares basadas en genes. En 2011, Tan y cols (31) utilizaron una firma de 171 genes obtenidos de los datos de perfiles de expresión de ARN de 37 líneas celulares de CG, para caracterizar dos subtipos genómicos intrínsecos principales, G-INT y G-DIF. Estos dos grupos no solo eran molecularmente diferentes, sino que también poseían una quimiosensibilidad diferente al 5-fluorouracilo y al oxaliplatino o cisplatino. Dos años más tarde (29), este grupo de Australasia utilizó patrones de expresión génica para validar tres subtipos de adenocarcinoma gástrico (proliferativo, metabólico y mesenquimal). Los tumores de tipo proliferativo poseen características moleculares como inestabilidad genómica, mutaciones en TP53 e hipometilación del ADN. Los tumores de subtipo mesenquimatoso contienen células con características de células madre cancerosas y son particularmente sensibles a los inhibidores de PI3K-Akt-mTOR in vitro. Más recientemente, *The Cancer Genome Atlas Research Network* (TCGA) (32) y el *Asian Cancer Research Group* (33) nos han brindado una visión más amplia de los clasificadores moleculares de CG mediante un enfoque más completo. El trabajo de TCGA caracterizó 295 muestras de tumores primarios utilizando seis plataformas moleculares: análisis de número de copias somáticas basado en matrices, secuenciación del exoma completo, perfil de metilación de ADN basado en matrices, secuenciación de ARN mensajero, secuenciación de

microARN (miARN) y matriz de proteínas de fase inversa (RPPA). En base a este estudio, se identificaron cuatro subtipos moleculares principales de CG: tumores positivos para el virus de Epstein-Barr, que presentan mutaciones recurrentes de *PIK3CA*, hipermetilación extrema del ADN y amplificación de *JAK2*, *CD274* (PD-L1) y *PDCD1LG2* (PD-L2); tumores con inestabilidad de microsatélites, que muestran tasas elevadas de mutación; tumores genómicamente estables, que están enriquecidos por la variante histológica difusa y mutaciones de *RHOA* o fusiones que involucran proteínas activadoras de GTPasa de la familia RHO; tumores con inestabilidad cromosómica, que muestran aneuploidía marcada y amplificación focal de receptores tirosina quinasa. De manera similar, pero no tan completa, el *Asian Cancer Research Group* analizó los datos de expresión génica de 300 tumores gástricos primarios para establecer cuatro subtipos moleculares con distintos resultados clínicos y alteraciones moleculares: subtipo MSS / EMT, subtipo MSI, subtipo MSS / TP53 + y subtipo MSS / TP53- (33). El subtipo MSS / EMT incluye tumores de subtipo difuso con el peor pronóstico, la tendencia a ocurrir a una edad más temprana y la frecuencia de recurrencia más alta (63%) de los cuatro subtipos. El subtipo MSI contiene tumores de subtipo intestinal hipermutados que se producen en el antro, con el mejor pronóstico general y la menor frecuencia de recurrencia (22%). Los pacientes de los subtipos MSS / TP53 + y MSS / TP53 - tienen un pronóstico intermedio y tasas de recurrencia, mientras que el grupo activo con TP53 muestra un mejor pronóstico. A pesar de utilizar procedimientos similares, ambas clasificaciones no son superponibles y los subgrupos determinados en ellas no son equivalentes. Solo el subtipo con inestabilidad de microsatélites parece ser equivalente en términos de supervivencia en ambas clasificaciones. El subtipo GS en el conjunto TCGA estuvo presente en todos los subtipos ACRG en el conjunto de datos ACRG y, en realidad, el tipo TCGA GS no es equivalente al subtipo ACRG MSS / EMT debido a diferencias significativas en la clasificación de casos de Lauren (70% frente a 80%), tasa de mutaciones de *CDH1* (37% frente a 2%) y *RHOA* (15% frente a 2,8%). Aún más, no existe un subtipo equivalente en las cohortes TCGA o Singapur que corresponda a los grupos ACRG MSS / TP53 + o MSS / TP53-. En los últimos años se han realizado diferentes esfuerzos para aclarar

el papel pronóstico de estas clasificaciones y se han realizado varios perfiles moleculares de alguna manera accesibles, tratando de lograr su implementación clínica. De esta forma N. Setia y cols (34) en EE. UU. y S. Ahn (35) en Corea emplearon el mismo perfil de expresión inmunohistoquímica y basada en ARNm para clasificar a los pacientes en 5 subgrupos que integran las clasificaciones TCGA y ACRG: tumores C1-EBV , Tumores C2-MSI, tumores C3-EMT, tumores de expresión de p53 aberrantes en C4 y tumores p53 normales en C5. Estas investigaciones han demostrado cómo el uso del mismo enfoque de diagnóstico en poblaciones étnicamente diferentes conduce a un mejor conocimiento de las diferencias moleculares subyacentes. Por tanto, la tasa de pacientes con tumores C2-MSI o tumores p53 normales C5 en las poblaciones del este y oeste fue claramente diferente (16% frente a 7% y 7% frente a 22% respectivamente). De manera similar, un artículo publicado en 2017 por F.Jia y cols analizó la discordancia de la tasa de mutaciones somáticas en diferentes poblaciones mediante el estudio de sus perfiles de genes que se obtuvieron de la base de datos TCGA, sus propios pacientes y datos genéticos publicados de Hong Kong, Japón y pacientes de Singapur. Mostraron cómo la incidencia de mutaciones somáticas en genes relevantes en cáncer gástrico (*ARID1A*, *PTEN*, *PI3KCA*) era significativamente diferente según la raza del grupo estudiado (36) .

El cáncer de estómago es una enfermedad heterogénea y su clasificación molecular es un trabajo complejo. La carcinogénesis gástrica parece estar impulsada por múltiples vías esenciales con entrecruzamientos poco conocidos en lugar de ser predominantemente adicta a un oncogén particular o a una vía de señalización. Las diferencias moleculares relacionadas con la etnia son evidentes en estudios recientes aunque hay poca superposición entre ellos y su reproducibilidad es un desafío hoy en día (37, 38).

Una de las aplicaciones más directas de la descripción molecular del cáncer gástrico es la búsqueda de marcadores predictivos de respuesta que guíen el tratamiento sistémico de los pacientes con cáncer gástrico. Actualmente el único biomarcador predictivo de respuesta es la sobreexpresión y/o



amplificación de *HER2*. Este biomarcador predice el beneficio del tratamiento con Trastuzumab en pacientes con enfermedad avanzada (39, 40).

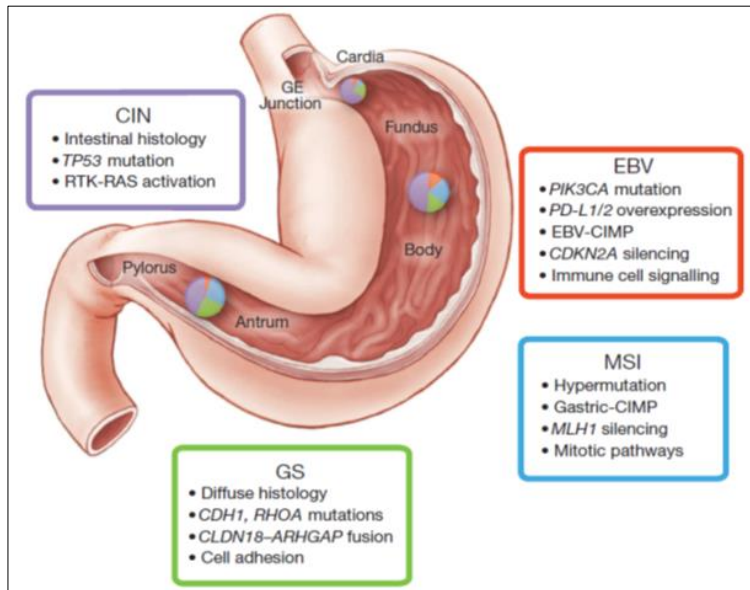
Aunque recientemente la aprobación del anticuerpo anti-VEGFR2 Ramucirumab ha permitido aumentar el arsenal terapéutico de moléculas dirigidas frente a dianas terapéuticas específicas en el cáncer gástrico, no se han identificado aún marcadores predictivos validados que seleccionen qué pacientes pueden beneficiarse de las terapias dirigidas frente a VEGFR (41, 42).

### **CLASIFICACIÓN DEL CANCER GENOME ATLAS (TCGA)**

Actualmente una de las clasificaciones moleculares del cáncer gástrico con cierto grado de aplicabilidad directa en la práctica clínica es la clasificación publicada por el grupo *The Cancer Genome Atlas Research Network* (TCGA) (32), la cual se desarrolla a continuación por ser la de referencia en población no asiática como es la que fundamenta este proyecto de tesis doctoral.

En este trabajo, se analizaron muestras de tejido fresco de 295 pacientes con adenocarcinoma gástrico no tratados previamente, utilizando ADN de línea germinal, proveniente de muestras de sangre periférica o mucosa gástrica sana como referencia para la detección de mutaciones somáticas. Las muestras fueron caracterizadas mediante seis plataformas moleculares, siendo posible analizar el 77% de los tumores mediante las seis plataformas: análisis del número de copias somáticas, secuenciación masiva de exomas, perfil de metilación del ADN, secuenciación de ARN mensajero (ARNm), secuenciación de microARN (miARN) y arrays de proteínas en fase reversa (RPPA). Basándose en los resultados del análisis de estas seis plataformas, se creó un algoritmo para clasificar las 295 muestras de CG en 4 subtipos moleculares, utilizando una aproximación que pudiera ser aplicada fácilmente en la práctica clínica. Primero se identificaron los tumores con positividad para el Virus Epstein-Barr (subtipo VEB), representando el 9% de los CG. Posteriormente se clasificaron según la presencia o no de alta inestabilidad de microsatélites (subtipo MSI), el cual agruparía al 22% de los CG. Los restantes se diferenciaron por el grado de aneuploidía en genómicamente estables 20% (subtipo GS) y en aquellos con inestabilidad cromosómica 50% (subtipo CIN).

Figura 4. Principales características de los cuatro subtipos moleculares de CG, tomando de (32).

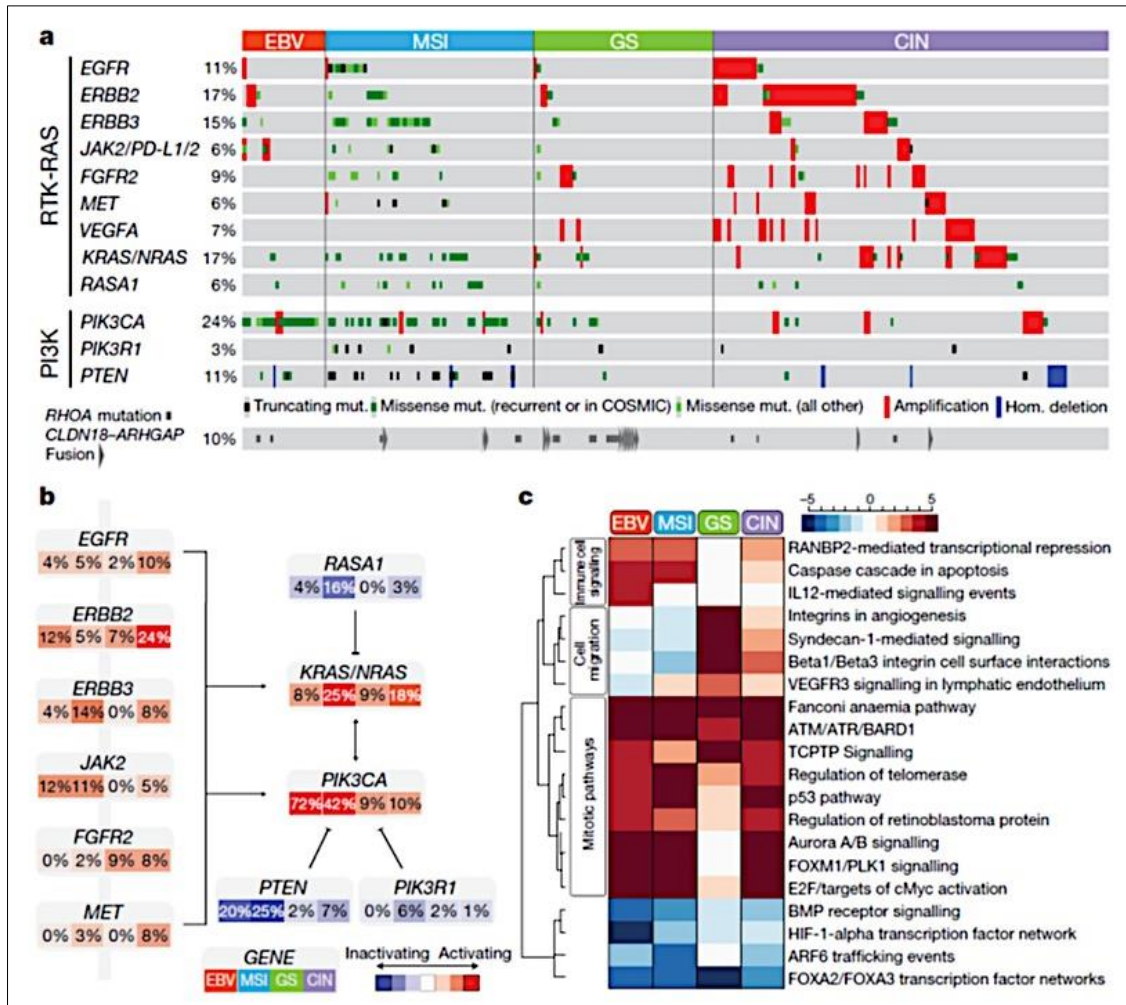


Estos cuatro subtipos moleculares se relacionaron con algunas características clínicas e histopatológicas propias, las cuales se resumen a continuación:

- El subtipo VEB predomina en hombres, suele localizarse en cuerpo o fundus gástricos, y se caracteriza por presentar frecuentemente mutaciones de *PIK3CA*, hipermetilación y amplificación de los genes *JAK2*, *ERBB2*.
- Los tumores del subtipo MSI se diagnostican generalmente a edades más avanzadas, predominan en mujeres y se caracterizan por tener elevados índices de mutaciones que incluyen genes que frecuentemente están afectados en otros cánceres como *PIK3CA*, *ERBB3*, *ERBB2* y *EGFR*. Destaca la ausencia de mutaciones de *BRAF V600E*, frecuentemente observada en el cáncer colorrectal con inestabilidad de microsatélites.
- En el subtipo GS el diagnóstico se realiza a edades más tempranas que en el resto de subtipos moleculares y existe un predominio de la histología difusa con alteraciones en los genes *RHOA* y *CDLN18*.
- Los tumores del subtipo CIN se localizan preferentemente en UGE/cardias y muestran un elevado índices de mutaciones en *TP53* (71%), considerable aneuploidía y amplificación de receptores tirosina quinasa, VEGFA y mediadores del ciclo celular (*CCNE1*, *CCND1* y *CDK6*).

Entre los cuatro subtipos, los resultados preliminares respecto a posibles diferencias en supervivencia y por tanto una validéz pronóstica de esta clasificación no evidenciaron diferencias significativas, muy probablemente por el corto seguimiento de los casos incluidos en este análisis molecular (mediana de seguimiento inferior a 1 año).

**Figura 5. Descripción molecular del cáncer gástrico según la clasificación de TCGA, tomando de (32).**



a) Mutaciones, cambios en el número de copias y translocaciones de genes seleccionados organizados por subtipos moleculares. La frecuencia de las alteraciones está expresada en porcentaje sobre el total de casos. b) Alteraciones en las vías RTK/RAS y RTK/PI3K en los diferentes subtipos moleculares. Rojo: activación. Azul: inactivación. c) Vías significativamente activadas (rojo) o inhibidas (azul) en los 4 subtipos comparado con la mucosa gástrica normal. RTK: Receptores con actividad tirosina quinasa.

La comparación del perfil de expresión de cada sujeto con los restantes subgrupos y con el tejido gástrico normal reveló algunos patrones a destacar.

Todos los subtipos moleculares, pero en menor medida los tumores del subtipo GS, presentaban una elevada expresión de componentes de la mitosis como AURKA/B, E2F (diana de activación de MYC), de la vía FOXM1/PLK1 y componentes de la respuesta al daño del ADN. Al contrario, el subtipo GS presentaba elevada expresión de alteraciones en los componentes de la vía de adhesión celular, incluyendo integrinas B1/B3, vías mediadas por syndecan-1 y vías relacionadas con la angiogénesis. En los tumores del subtipo VEB se evidenció una alta expresión de la vía de la IL-12 y alta sobreexpresión de PD-L1/2, sugiriendo una fuerte implicación de la respuesta inmune.

## ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER GÁSTRICO

En el CG existen diferentes sistemas de estadificación para evaluar el grado de la extensión tumoral, lo que ha hecho difícil la interpretación y comparación de los resultados según su procedencia geográfica.

Actualmente en la práctica clínica la clasificación de estos tumores se realiza de acuerdo a aquellos factores que son directamente implicados en la toma de decisiones terapéuticas.

### ESTADIFICACIÓN TNM

En occidente el sistema de estadificación empleado es el sistema TNM, propuesto por la *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) y el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) los cuales lo revisan periódicamente. El TNM clasifica los tumores en función de la extensión del tumor primario (T), la presencia o ausencia de ganglios linfáticos regionales afectados (N), y de la presencia o ausencia de metástasis a distancia (M). El valor de T, N y M definen el estadio tumoral, permitiendo agrupar los casos con pronóstico similar. Las revisiones tienen periodicidad máxima de 8 años y tienen en cuenta la aportación de nuevos datos clínicos, anatomopatológicos y biológicos que puedan influir en el pronóstico.

En el momento del diagnóstico, el TNM debe ser reportado de acuerdo con la última edición aprobada. En el momento actual la última publicada y actualmente en uso la 8ª edición (43), aunque para el desarrollo de esta tesis los tumores se estadificaron de acuerdo a la 7ª edición pues era la vigente en el momento de ser tratados los pacientes (44).

El TNM clínico (cTNM) define el pronóstico previamente al tratamiento inicial. Se basa en la evidencia de la extensión de la enfermedad tumoral mediante exploración física, imágenes radiológicas, endoscopia, biopsia y pruebas de laboratorio. El TNM patológico (pTNM) recoge los datos clínicos y del análisis histológico de la resección quirúrgica, proporcionando un pronóstico más preciso. La clasificación ycTNM y ypTNM incluyen los datos clínicos (ycTNM) y patológicos (ypTNM) después de un tratamiento multimodal inicial.

Tx, Nx, Mx se utilizan cuando respectivamente infiltración del tumor primario, afectación ganglionar, y presencia de metástasis a distancia no se pueden determinar.

Para los CG, a partir de la 7ª edición de la clasificación TNM disponible desde 2010, la categoría T1 se subdivide en T1a (invasión de la lámina propia y/o muscularis mucosa) y T1b (invasión de la submucosa). La categoría T2 describe la invasión de la muscularis propia. La categoría T3 define la penetración en la subserosa sin invasión del peritoneo visceral ni estructuras adyacentes. La T4 define la afectación de la serosa y estructuras adyacentes. La categoría T4 se subdivide en T4a (infiltración de la serosa o del peritoneo visceral) y T4b (invasión de órganos adyacentes).

La categoría N1 define la afectación tumoral de 1-2 ganglios regionales, la N2 describe la presencia de 3-6 ganglios regionales infiltrados y la N3 define la afectación a más de 7 ganglios regionales. La categoría N3 se subdivide en 3a, entre 7-15 ganglios regionales infiltrados, y 3b, cuando la afectación es mayor a 16 ganglios regionales.

La ausencia de infiltración ganglionar mediante técnicas de inmunohistoquímica o moleculares de gran sensibilidad, o la presencia únicamente de células tumorales aisladas (clúster de células  $\leq 0,2$  mm de tamaño) se consideran pN0.

Los ganglios regionales se encuentran a lo largo de la curvatura menor (curvatura menor del estómago, del omento, ganglios a la izquierda de la arteria gástrica, ganglios cardioesofágicos, de la arteria hepática común, celiaca y ganglios hepatoduodenales) y de la curvatura mayor del estómago (curvatura mayor, omento mayor, gastroduodenales, gastropilóricos, pancreaticoduodenales), y de los principales vasos, tanto arteriales como venosos, que salen de la aorta y de la vena porta (pancreáticos, peripancreáticos, esplénicos).

La categoría M define la ausencia (0) o presencia (1) de enfermedad metastásica. La afectación a distancia suele interesar hígado, colon transverso, páncreas, y peritoneo. La afectación a distancia de los ganglios linfáticos es común. La citología positiva del lavado peritoneal se considera metástasis. Las

metástasis a nivel del sistema nervioso central (SNC) y en los pulmones son menos frecuentes.

**Tabla 2. Estadio TNM del cáncer gástrico: TNM 7ª edición (UICC/AJCC).**

<b>T. Tumor primario</b>		
<b>Tx</b>	El tumor primario no se puede evaluar	
<b>T0</b>	No hay evidencia de tumor primario	
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ: tumor intraepitelial sin invasión de la lámina propia	
<b>T1</b>	El tumor invade lámina propia, muscula de la mucosa o submucosa	
	T1a	El tumor invade lámina propia o muscular de la mucosa
	T1b	El tumor invade la submucosa
<b>T2</b>	El tumor invade la muscular propia	
<b>T3</b>	El tumor invade la subserosa	
<b>T4</b>	El tumor invade la serosa (peritoneo visceral) o estructuras adyacentes	
	T4a	Invade serosa
	T4b	Invade estructuras adyacentes
<b>N. Ganglios linfáticos</b>		
<b>Nx</b>	Los ganglios linfáticos regionales no se pueden valorar	
<b>N0</b>	No hay evidencia de metástasis ganglionares regionales	
<b>N1</b>	Metástasis en 1 a 2 ganglios linfáticos regionales	
<b>N2</b>	Metástasis en 3 a 6 ganglios linfáticos regionales	
<b>N3</b>	Metástasis en más de 6 ganglios linfáticos regionales	
	N3a	Metástasis en 7 a 15 ganglios linfáticos regionales
	N3b	Metástasis en más de 15 ganglios linfáticos regionales
<b>M. Metástasis a distancia</b>		
<b>Mx</b>	Las metástasis a distancia no se pueden valorar	
<b>M0</b>	No hay evidencia de metástasis a distancia	
<b>M1</b>	Presencia de metástasis a distancia	

**Tabla 3. Grupos por estadio patológico del cáncer gástrico: TNM 7ª edición (UICC/AJCC).**

Estadios TNM			
<b>Estadio 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Estadio IA</b>	T1	N0	M0
<b>Estadio IB</b>	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
<b>Estadio IIA</b>	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
<b>Estadio IIB</b>	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
<b>Estadio IIIA</b>	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
<b>Estadio IIIB</b>	T4b	N0	M0
	T4b	N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
<b>Estadio IIIC</b>	T4b	N2	M0
	T4b	N3	M0
	T4a	N3	M0
<b>Estadio IV</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1

Siguiendo la 7ª edición del sistema de estadificación del cáncer del *American Joint Committee*, los tumores del esófago distal localizados hasta a 5cm de la UGE, de la UGE o de los primeros 5 cm del estómago (cardias) que se extienden a la unión esofagogástrica o al esófago (Siewert III), se clasifican y se tratan como adenocarcinomas de esófago. Por otro lado, los tumores de estómago a más de 5 cm de la UGE o los tumores que se desarrollan en los



primeros 5 cm del estómago y que no se extienden a la UGE o al esófago, se clasifican siguiendo la estadificación para tumores gástricos.

En el CG, la 8ª edición de la clasificación TNM efectiva a partir de enero de 2017 introduce cambios en los grupos en ambos estadios clínico y patológico (Tabla 4-5). Introduce también una nueva estadificación patológica tras tratamiento neoadyuvante (Tabla 6). Además, re-clasifica los tumores del esófago distal a 2cm de la UGE con extensión hacia el esófago, y de los primeros 2cm del cardias (Siewert tipo I/II) con afectación de la UGE, como cánceres de esófago. Por otro lado, los cánceres cuyo epicentro se encuentra en el cardias a más de 2 cm de la UGE se clasifican y tratan como tumores gástricos, incluso si el tumor se extiende e invade la UGE.

**Tabla 4. Grupos por estadio clínico del cáncer gástrico: TNM 8ª edición (UICC/AJCC).**

Estadio	T	N	M
<b>Estadio 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Estadio I</b>	T1-2	N0	M0
<b>Estadio IIA</b>	T1-2	N1-3	M0
<b>Estadio IIB</b>	T3-4a	N0	M0
<b>Estadio III</b>	T3-4a	N1-3	M0
<b>Estadio IVA</b>	T4b	N1-3	M0
<b>Estadio IVB</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tabla 5. Grupos por estadio patológico del cáncer gástrico: TNM 8ª edición (UICC/AJCC).

Estadio	T	N	M
<b>Estadio 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Estadio IA</b>	T1	N0	M0
<b>Estadio IB</b>	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
<b>Estadio IIA</b>	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
<b>Estadio IIB</b>	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3a	M0
<b>Estadio IIIA</b>	T4b	N0	M0
	T4a	N1-2	M0
	T3	N2	
	T2	N3a	M0
<b>Estadio IIIB</b>	T4b	N1-2	M0
	T3-4a	N3a	M0
	T1-2	N3b	M0
<b>Estadio IIIC</b>	T4b	N3a-3b	M0
	T3-4a	N3b	M0
<b>Estadio IV</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tabla 6. Grupos por estadio patológico del cáncer gástrico tras neoadyuvancia: TNM 8ª edición (UICC/AJCC).

Estadio	T	N	M
<b>Estadio I</b>	T1-2	N0	M0
	T1	N1	M0
<b>Estadio II</b>	T3-4a	N0	M0
	T2-3	N1	M0
	T1-2	N2	M0
	T1	N3	M0
<b>Estadio III</b>	T4b	N0	M0
	T4a-4b	N1	M0
	T3, 4a, 4b	N2	M0
	T2, 3, 4a, 4b	N3	M0
<b>Estadio IV</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1

## CLASIFICACIÓN JAPONESA

La *Japanese Classification of Gastric Cancer* (JCGC) fue desarrollada inicialmente por cirujanos japoneses para estandarizar el abordaje quirúrgico y la linfadenectomía empleada, sufriendo posteriormente diversas revisiones que incluyen aspectos endoscópicos, quirúrgicos y patológicos (45).

A diferencia de la estadificación TNM, la JCGC utiliza 4 categorías diagnósticas: clínica, quirúrgica, patológica, final.

Vigente hasta antes del 2010, la antigua clasificación japonesa consideraba la afectación ganglionar según una meticulosa evaluación topográfica con muestreo con biopsia de 16 estaciones ganglionares divididas en 3 grupos de acuerdo a la localización del tumor primario, y diferenciaba como categorías distintas los casos de metástasis hepáticas, peritoneales o de otra localización a distancia, basándose en el peor pronóstico de los pacientes con afectación hepática o peritoneal frente a otras localizaciones como pulmón o hueso.

Con la siguiente versión se ha redefinido y simplificado el concepto de linfadenectomía D1/D2 en función del tipo de gastrectomía realizada (y no en función de la localización del tumor primario), y se ha adoptado el criterio de la 7ª edición de la clasificación TNM para evaluar la categoría N (antes según localización anatómica de los grupos ganglionares respecto al tumor primario) (19).

Los cambios realizados pretenden facilitar el manejo terapéutico y la comparación de resultados de una forma más uniforme entre países, aunque siga existiendo desacuerdo en cuanto a la clasificación de los tumores gástricos proximales que se extienden hacia el esófago, que siguen la estadificación de los tumores gástricos en la clasificación japonesa y se consideran tumores esofágicos tipo adenocarcinoma en la clasificación TNM.

## FACTORES PRONÓSTICOS EN CÁNCER GÁSTRICO

En oncología, se consideran factores o marcadores pronósticos todas aquellas variables biológicas, histopatológicas o moleculares que influyen en la evolución de la enfermedad neoplásica en ausencia de cualquier tratamiento. Se trata de aquellas características que nos ayudan a seleccionar qué pacientes tratar y en qué momento en la evolución de su enfermedad. Dado que el pronóstico global de los pacientes afectados de CG sigue siendo muy sombrío, con una supervivencia global a los 5 años inferior al 30%, resulta de fundamental importancia el conocimiento de estos factores.

### FACTORES CLÍNICOS Y PATOLÓGICOS

**Factores relacionados con el paciente.** A pesar de la existencia de estudios iniciales que les asignaban cierto valor, ni el sexo, ni la edad, ni la duración de los síntomas antes del diagnóstico tumoral, poseen un valor como marcadores pronósticos independientes. Al contrario, el estado nutricional deteriorado y el estado inmunitario deficiente sí parecen poseer un carácter de mal pronóstico para estos pacientes (46-48). Actualmente se recomienda el cribado y valoración nutricional al inicio de la neoadyuvancia, aplicando terapia nutricional siempre que exista un riesgo de desnutrición (49).

**Localización tumoral.** La localización del tumor primario ha demostrado ser un factor pronóstico independiente en los estudios de CG, presentando peor pronóstico los tumores proximales. Esto podría deberse a factores relacionados con dicha localización como son la incidencia mayor de diseminación ganglionar al diagnóstico o la menor tasa de resecabilidad de los tumores de cardias y UGE frente a los de estómago distal, cuales los de cuerpo y antro gástricos (50).

**Aspecto macroscópico.** La clasificación descrita por Borrmann ha demostrado tener valor pronóstico en algunos estudios, correspondiendo el mejor resultado a los tumores de tipo I y II frente a los de tipo III y IV. Sin embargo este valor pronóstico no ha podido ser confirmado en otros trabajos (20, 51).

**Tipo histológico.** El valor pronóstico de los diferentes tipos histológicos es un tema controvertido. Un reciente estudio sugiere que en el carcinoma gástrico coexisten lesiones con diferentes pronóstico (52, 53).

El pronóstico de los pacientes con carcinoma pobremente cohesivo es particularmente pobre en adultos jóvenes, cuyo diagnóstico se retrasa a menudo por la falta de sospecha clínica y la escasa especificidad de los síntomas iniciales (54).

Algunos investigadores refieren que la clasificación de Goseki aportaría información pronóstica adicional a la clasificación TNM, al describir el contenido en mucina de los tumores. Así, los tumores ricos en mucina (Goseki tipos II y IV) presentarían peor pronóstico que los tumores pobres en mucina (Goseki tipos I y III), con una supervivencia a los 5 años para los tumores T3 del 18% y 53% respectivamente ( $p < 0,0003$ ) (55).

**Grado de diferenciación histológica.** La clasificación de los adenocarcinomas gástricos en función de su grado de diferenciación glandular en bien diferenciado (grado I, 95% del tumor forma glándulas), moderadamente diferenciado (grado II, 50-95% del tumor forma glándulas), pobremente diferenciado (grado III, < 50% del tumor forma glándulas) y un cuarto grupo correspondiente a los indiferenciados (grado IV), ha demostrado ser un adecuado factor pronóstico, presentando los pacientes peor supervivencia conforme más indiferenciado es el tumor. En el grado I, el 48% de los pacientes están vivos a los 5 años del diagnóstico, mientras que en caso de los de grado IV solo un 10% (56).

**Invasión linfática, vascular y perineural.** Dos grandes estudios, en pacientes intervenidos quirúrgicamente de CG, han confirmado el carácter pronóstico independiente de estas tres características patológicas. En el primer estudio se incluyeron 734 casos y aquellos pacientes cuyo estudio patológico reveló invasión linfática, vascular y perineural (ILVN) tuvieron unas supervivencias global (SG) y libre de progresión (SLP) estadísticamente inferior al grupo de pacientes sin estas características de invasividad (45,5 meses de SG frente a mediana no alcanzada en el grupo sin infiltración,  $p < 0,0001$ ) (57). El carácter de mal pronóstico se confirmó también en los casos de cáncer gástrico precoz

y estadios I, lo que permitiría seleccionar una población de mayor riesgo de recaída y peor pronóstico, y por lo tanto susceptible de tratamiento adyuvante. En el segundo estudio, realizado en pacientes intervenidos quirúrgicamente y con ausencia de afectación ganglionar locorregional en el examen anatomopatológico, se demostró la relación directa entre la presencia de ILVN y la existencia de micrometástasis en los ganglios linfáticos locorregionales (58).

**Linfocitos infiltrantes del tumor (TILs).** En 2008 se publicó un estudio que analizaba los resultados relativos a la densidad de TILs en veintidós muestras de cáncer gástrico. Los grupos de pacientes que presentaban en las muestras tumorales una alta densidad de CD3, CD20 y CD45Ro presentaban mayor supervivencia que las de los grupos de pacientes con densidad baja, confiriendo a la densidad de TILs el carácter de marcador pronóstico de supervivencia en CG (59).

Estudios posteriores han corroborado la existencia de una relación entre ciertos elementos del sistema inmune y el pronóstico del CG. Entre los elementos más estudiados se encuentran los linfocitos T reguladores (Foxp3) y los linfocitos T helper (CD4), ambos relacionados con peor pronóstico y mayor riesgo de recurrencia en el caso de adenocarcinomas cardiales (60).

Por otro lado, también se ha relacionado la densidad de infiltración de las células implicadas en la respuesta inmune con el pronóstico. Los ratios elevados de células CD68 positivas tanto en el estroma tumoral como en el tumor y de las células CD8/Foxp3 positivas en el tumor se han asociados a mejor pronóstico. Sin embargo, ratios elevados de células CD66 positivas en el estroma tumoral y en el tumor se han asociado con peor pronóstico (61).

Un último metaanálisis sugiere como una elevada expresión de TILs, sobre todo de linfocitos CD8, podría ser un potencial biomarcador pronóstico en pacientes con CG (62).

En otros artículos se ha hecho referencia a la posible relación entre los TILs y la respuesta a determinadas quimioterapias convencionales en el CG, como ya se había demostrado en otros tipos tumorales (ej. cáncer de mama y cáncer de colon) (63).

Es importante destacar es que todas estas células se encuentran implicadas en la respuesta inmune adaptativa frente al CG y que su implicación conlleva a la implicación a su vez de otros “puntos de control” del sistema inmune como son, por ejemplo, PD1 y PD-L1 (64).

**Estadio patológico.** El grado de infiltración tumoral en la pared gástrica y la existencia de metástasis ganglionares locorregionales son los factores pronósticos más reconocidos, y forman la base de todos los sistemas de estadificación recientes de esta enfermedad. La relación directa entre la infiltración tumoral en la pared gástrica (T según la Clasificación TNM) y la supervivencia del paciente está demostrada en diversos estudios tanto europeos como americanos y japoneses, en los que se confirma como el pronóstico de la enfermedad empeore conforme vaya aumentando la penetración tumoral (65).

Con respecto a la afectación ganglionar, hasta el 1997 el estadio N de la Clasificación TNM era determinado en base a la localización anatómica de los ganglios linfáticos infiltrados por el tumor. No obstante la relevancia de este dato, la dificultad de su validación y su falta de reproducibilidad entre estudios motivó su sustitución en esa fecha por una clasificación basada en el número de ganglios afectados por el tumor (44).

Esta nueva categorización sigue siendo un marcador pronóstico válido e independiente, existiendo una relación directa entre el número de ganglios infiltrados y el pronóstico del paciente (66).

Los pacientes sin evidencia de invasión ganglionar (N0) presentan índices de supervivencia del 80% a los 5 años del diagnóstico, cifra que desciende al 35% en los N1, al 15-20% en los casos N2 para llegar a ser inferior al 5% en los casos con infiltración tumoral más extensa (N3). Estas diferencias son en todos los casos estadísticamente significativas.

También se ha descrito el valor pronóstico del ratio de ganglios linfáticos metastásicos, correspondiente al número de ganglios infiltrados dividido por el número total de ganglios aislados. Este factor pronóstico para ser incluso más exacto a la hora de valorar la infiltración tumoral ganglionar en cada paciente (67, 68). Es evidente que la probabilidad de encontrar ganglios linfáticos

afectos aumenta con el número de ganglios linfáticos resecaados e identificados en la pieza quirúrgica, lo cual está directamente relacionado con la extensión de la linfadenectomía realizada (69, 70) y ello se relaciona directamente con la supervivencia. En la actualidad se considera que el número mínimo de ganglios identificados en la pieza quirúrgica para considerarse adecuado debe ser mayor de quince. Los pacientes con un ratio menor de 0,2 tienen un mejor pronóstico (71-73).

La presencia de metástasis hepáticas y/o de carcinomatosis peritoneal al diagnóstico representa un factor de mal pronóstico. El índice pronóstico del Hospital Royal Marsden para el cáncer gástrico metastásico identificó las metástasis hepáticas y las metástasis peritoneales como dos factores clínicos independientes asociados a un peor pronóstico (74, 75).

**Niveles preoperatorios del antígeno carcinoembrionario (CEA).** Los pacientes con elevados niveles de CEA en plasma obtenido previamente a una intervención quirúrgica con intención curativa tienen peor pronóstico con respecto a aquellos con niveles más bajos. Este factor permanece significativo cuando se ha analizado ajustado a otros marcadores pronósticos conocidos (76, 77).

**Factores relacionados con el tratamiento.** La presencia de células tumorales tras una exéresis quirúrgica, bien en forma microscópica (resección R1) o macroscópica (resección R2), es un indicador de mal pronóstico independiente del resto de las características clínico-patológicas. Los pacientes con cirugías incompletas presentan una supervivencia escasamente superior a la de los pacientes metastásicos al diagnóstico inicial (78).

Algunos estudios han destacado la experiencia del cirujano y del centro en que se realiza la gastrectomía como factores pronósticos determinantes en el CG. La mortalidad operatoria desciende un 41% y el riesgo de muerte un 7% por cada incremento de 10 casos por año en la experiencia del cirujano (79).

El carácter pronóstico de la experiencia del cirujano resulta significativo incluso cuando se analiza dentro de centros con amplia experiencia y un número elevados de casos por año (80).



## FACTORES MOLECULARES

Diversos estudios en las últimas décadas han destacado el papel de las alteraciones genéticas en el desarrollo y progresión del CG.

Hoy en día se conoce cómo las alteraciones moleculares en el CG son diferentes dependiendo del subtipo histológico y de las diferentes etiopatogenias implicadas en la neoplasia (32). El conocimiento de las alteraciones moleculares del CG nos permite entender mejor la patogenia de esta enfermedad y obtener marcadores pronósticos, algunos de los cuales tienen asimismo valor predictivo con respecto a un posible tratamiento sistémico, permitiendo llevar a cabo estrategias terapéuticas más adecuadas al pronóstico y la respuesta esperada para cada paciente (81-83).

Diversos estudios han tratado identificar un perfil molecular con valor pronóstico aplicable a la práctica clínica de los pacientes con CG. Un estudio de Cho y cols (83) identificó un conjunto de seis genes (*CTNNB1*, *EXOSC3*, *TOP2A*, *LBA1*, *LZTR1* y *CCL5*), cuyo patrón de expresión se correlacionó con el pronóstico de los pacientes con CG, siendo además fácilmente aplicable en la clínica mediante qRT-PCR. Las limitaciones del estudio eran su carácter retrospectivo y la falta de datos sobre el valor predictivo de respuesta a los tratamientos que puedan modificar el pronóstico de los pacientes.

**Alteraciones de P53.** *TP53* es un gen supresor tumoral que codifica una proteína nuclear que juega un papel fundamental en la progresión tumoral, regulando la reparación del ADN, la división celular y la apoptosis. La baja tasa de apoptosis y la alta proliferación celular son factores importantes en el desarrollo del CG y la sobreexpresión de p53 podría ser esencial para controlar la carcinogénesis. Sin embargo, el rol de p53 como factor pronóstico en CG no está establecido y los trabajos publicados presentan resultados contradictorios, habiéndose empleado anticuerpos, técnicas y métodos de interpretación distintos en cada serie (81, 84, 85).

El gen *TP53* induce la expresión de la proteína p21 que a su vez provoca un bloqueo del ciclo celular en la fase S mediante la fosforilación de quinasas dependientes de ciclinas. Esta relación fue estudiada como posible factor

pronóstico en un trabajo en el que se concluyó como los pacientes con tumores sin sobreexpresión de p53 pero sí de p21 presentaban una mediana de supervivencia superior a los casos que sobreexpresaban ambos genes simultáneamente (86).

Curiosamente y por otro lado, se ha identificado la sobreexpresión de p53 como factor pronóstico desfavorable en pacientes con CG avanzado (87), contrariamente a las evidencias actuales de los estadios precoces (88).

**E-cadherina y B-catenina.** *CDH1* es un gen que codifica la proteína E-cadherina, molécula esencial para mantener la adhesión intercelular en las células epiteliales. La disfunción de E-cadherina es uno de los factores más importantes en el proceso de iniciación y progresión del CG, correspondiendo al 90% de los casos. No obstante, sólo la presencia de alteraciones estructurales en esta proteína (10% de los casos) representa un factor de mal pronóstico objetivo (89, 90).

Se ha demostrado pérdida de expresión de E-cadherina en muchos tipos de neoplasias malignas incluyendo el CG, proponiendo la metilación del promotor del gen *CDH1* o un polimorfismo del mismo como causa de esta pérdida (91).

Asimismo, se postula la existencia de una relación directa entre la expresión de E-cadherina y el pronóstico, siendo éste más favorable en los casos de expresión normal de la proteína, junto con la ausencia de expresión de MUC-1, el antígeno de mucina (92, 93).

Se ha propuesto también que la metilación de *CDH1*, entre otras alteraciones epigenéticas, puede ser un factor de mal pronóstico en pacientes con CG (94).

También se ha publicado un trabajo que muestra como en CG existe una expresión anormal de E-cadherina y de  $\beta$ -catenina en un 46% y 44% de casos respectivamente, siendo más frecuente entre los casos de tipo histológico difuso de la clasificación de Lauren (95).

De manera similar se ha demostrado una correlación significativa entre la expresión anormal de  $\beta$ -catenina y la existencia de metástasis ganglionares.

La expresión alterada de E-cadherina y  $\beta$ -catenina se encuentra en un 16% y 36% de los casos de displasia gástrica, sugiriendo que pueden ser eventos precoces en el proceso de tumorigénesis gástrica. La correlación de  $\beta$ -catenina

y pobre supervivencia le dan un carácter pronóstico que está pendiente de validación en series más amplias de casos (81).

**Inestabilidad de microsatélites.** Los microsatélites son secuencias altamente repetitivas de nucleótidos presentes en el ADN en condiciones normales. Se definen como repeticiones en tándem de 1-4 nucleótidos, llamados mono-, di-, tri- y tetra-nucleótidos, y son muy propensas a desalinearse o aparearse incorrectamente durante la replicación del ADN dando lugar al deslizamiento de las hebras (*slippage*). En condiciones normales, el mecanismo de reparación de errores por apareamiento erróneo (*mismatch repair, MMR*) interviene, corrigiendo las deleciones e inserciones erróneas generadas en las secuencias microsatélites. Las principales proteínas responsables de este mecanismo de reparación son seis: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, MSH3 y MLH3. Estas proteínas, formando heterodímeros, forman el complejo final que identifica el error del ADN y lo repara. Actualmente se conocen 2 tipos de complejos heterodiméricos: Mut $\alpha$ , formado por MSH2-MSH6, y Mut $\beta$ , formado por MLH1-PMS2.

La inestabilidad de los microsatélites (*Microsatellite Instability, MSI*) ocurre cuando algunos genes que codifican las enzimas reparadoras de la replicación del ADN (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2) están inactivados. De esta manera, los errores de replicación cometidos por la ADN polimerasa no se reparan, causando la aparición de un “fenotipo inestable / mutador”.

En el cáncer gástrico esporádico o no hereditario, la inestabilidad de microsatélites se debe principalmente al silenciamiento del gen MLH1 por hipermetilación de su promotor.

Las mutaciones somáticas de los genes de MMR son muy poco frecuentes en el cáncer gástrico esporádico. La incidencia de la inestabilidad de microsatélites se cifra en torno al 5-10% en los carcinomas gástricos difusos y en un 15-40% en los carcinomas gástricos intestinales.

Los carcinomas gástricos con alta inestabilidad de microsatélites (MSI-high o MSI-H) suelen desarrollarse en el antro, tener fenotipo intestinal y patrón de crecimiento expansivo, mostrando mejor pronóstico con respecto a los que tienen baja inestabilidad de microsatélites (MSI-low, MSI-L) (96).

Los tumores MSI son menos agresivos en comparación con los tumores EBV, GS y CIN descritos previamente al hablar de la clasificación molecular del carcinoma gástrico y se asocian a mejor pronóstico (32, 97).

Datos recientes sugieren que el fenotipo MSI debería ser sistemáticamente estudiado en el momento del diagnóstico dado su posible impacto en los resultados del tratamiento perioperatorio (98).

**Familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico. Epidermal growth factor receptor (EGFR, HER1).** El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, HER1) se sobreexpresa aproximadamente en un tercio de los casos de adenocarcinoma gástrico (99, 100).

En algunos estudios la expresión de EGFR por IHQ o la positividad por hibridación *in situ* fluorescente de un alto número de copias, se han asociado con la presencia de metástasis ganglionares, alto grado y peor supervivencia (99-102).

En el análisis univariante, Lieto y cols. vieron que la supervivencia enfermedad-específica a los 5 años era del 73% en los pacientes EGFR negativos frente al 40% en los pacientes EGFR positivos (HR de muerte 0,35 con IC95% 0,13-0,75). En el mismo estudio la intensidad de expresión de EGFR no se asoció con los resultados a largo plazo. En el análisis multivariante sólo la positividad por IHQ se identificó como factor de mal pronóstico (99).

Sin embargo otros estudios indican que la expresión de EGFR podría no asociarse al pronóstico (103, 104) o ser incluso un factor de buen pronóstico.

**Human epidermal growth factor 2 (HER2).** El oncogén *HER2/neu* es uno de los cuatro componentes que forma parte de la familia de receptores transmembrana de tipo 1 con actividad tirosina quinasa (Familia Erbb). En ella se incluyen el ya citado EGFR o HER1 (*ERBB1*) y *HER2/neu* (*ERBB2*), HER3 (*ERBB3*), HER4 (*ERBB4*). La amplificación de *ERBB2* y la sobreexpresión de *HER2* son biomarcadores pronósticos establecidos en cáncer de mama. El protocolo aceptado y ampliamente utilizado para determinar alteraciones de *HER2* consiste en el uso de técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos específicos y técnicas de hibridación *in situ* (hibridación *in situ* fluorescente FISH, hibridación *in situ* cromogénica CISH, o hibridación *in situ* argéntica

SISH). Los tumores 3+ por IHQ se consideran HER2 positivos mientras aquellos con 2+ por IHQ requieren confirmación por FISH, CISH o SISH. Los tumores con IHQ < 2+ se consideran HER2 negativos.

La sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* ha sido observada también en otros tumores como en el cáncer de pulmón, estómago y ovario utilizando sistemas de determinación similares (89, 105).

En CG la sobreexpresión de *HER2* o la amplificación de *ERBB2* se ha reportado en el 7-34% de los casos (105-107), sobre todo en aquellos localizados en la UGE y del subtipo intestinal de la clasificación de Lauren (107, 108).

Según lo descrito en el estudio TOGA (108), el porcentaje de casos de adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal con sobreexpresión o amplificación positiva alcanza el 32,2% del total. Los casos con resultados positivos y de tipo histológico difuso fueron el 6,1% (p-valor=0,001), mientras que la incidencia de casos positivos y localizados en la UGE fue del 33,2% frente al 20,9% de casos positivos con otras localizaciones (p-valor <0,001).

El valor pronóstico de HER2 en CG es aún controvertido, existiendo trabajos que indican como la amplificación de *ERBB2* se asocia con un peor pronóstico y una mayor agresividad de la enfermedad (69, 105, 109, 110), mientras otros estudios no encuentran diferencias estadísticamente significativas (111, 112).

Las diferencias en los resultados de estos estudios podrían estar relacionadas con el uso de diferentes metodologías o sistemas de clasificación para definir el estado de HER2 positivo. Los carcinomas gástricos son tumores con una expresión mucho más heterogénea de HER2 que los casos de cáncer de mama, neoplasia que se utilizó para la validación y gradación inicial de la sobreexpresión de cara a la utilización de un anticuerpo monoclonal frente a HER2 (Trastuzumab) en el tratamiento del mismo. En el cáncer gástrico la expresión suele ser más focal y a menudo la tinción de la membrana celular es incompleta. Estas diferencias han motivado la necesidad de adaptar progresivamente los criterios de positividad o no para HER2 de acuerdo con el conocimiento más actualizado.

El estudio ToGA se diseñó basándose en la propuesta de determinación del estado HER2 descrita por Hoffmann y cols (106), que describe un sistema de clasificación del estado HER2 específico para el CG. El estudio ToGA seleccionaba pacientes con IHQ 3+ o con positividad por FISH con ratio *HER2*/centrómero 17  $\geq$  2. Las guías actuales recomiendan el estudio de HER2 inicialmente con IHQ, considerando positivo IHQ 3+ y negativo IHQ 1+. Las muestras con resultados 2+ deben de ser estudiadas mediante FISH, considerándose positivas aquellas con ratio *HER2*/centrómero 17  $\geq$  2. Esta clasificación ha sido posteriormente validada y es la de empleo rutinario en la clínica hoy en día (113).

Recientemente Janjigian y cols han tratado de vislumbrar si HER2 es un factor pronóstico en CG metastásico en países occidentales empleando la metodología indicada anteriormente, llegando a la conclusión que el estado de HER2 por sí solo no es un factor pronóstico independiente.

**Angiogénesis y receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR).** La angiogénesis es el proceso por el que se generan nuevos vasos sanguíneos de manera incontrolada a partir de vasos ya existentes, promoviendo el crecimiento tumoral y las metástasis. La familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), compuesta por VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y factor de crecimiento placentario PGF, está continuamente implicada en la angiogénesis tumoral (114, 115).

VEGF se expresa en el 42%-49% de los CG, habiéndose asociado unos niveles altos de VEGF en suero a una mayor carga tumoral y una peor supervivencia (99, 116-118), así como niveles bajos de neurofilina-1, glicoproteína transmembrana implicada en la angiogénesis que actúa como correceptor de VEGF, se han asociado igualmente a un peor pronóstico (119, 120).

**Receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR).** La familia del receptor de crecimiento fibroblástico, compuesta por FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4, pertenece a la superfamilia de receptores de membrana con actividad tirosina quinasa. Mediante el estudio del número de copias por microarrays de

alta resolución de polimorfismos de nucleótido simple (SNP arrays), se encontró que el 9,3% de los CG presentaba una ganancia en el número de copias de *FGFR2*, siendo esto más común que las ganancias en *EGFR* (7,7%), *HER2* (7,2%) o *MET* (4,3%). Sin embargo no se encontró una clara correlación entre la ganancia en el número de copias de *FGFR2* y la amplificación de este mismo gen determinada por FISH.

Según los resultados publicados en un estudio realizado en poblaciones caucásicas y coreana, la incidencia de la amplificación de *FGFR2* en caucásicos sería mayor que en los coreanos (7,4% vs. 4,2%), asociándose en ambas poblaciones a la presencia de afectación ganglionar y a la histología difusa en el caso de la cohorte coreana (121). Otros estudios señalan la amplificación de *FGFR2* como biomarcador pronóstico de peor supervivencia (122).

**MET y factor de crecimiento hepatocitario.** MET es un receptor tirosina quinasa activado por el factor de crecimiento hepatocitario (HGF) que condiciona la activación de las vías PI3K/Akt y RAS e interactúa con las vías de EGFR y VEGFR. Las amplificaciones de *MET* se han visto implicadas en la resistencia a los inhibidores tirosina quinasa en cáncer de pulmón, y diversas aberraciones en *MET* se han relacionado con la patogénesis del carcinoma renal y de otros tumores sólidos como el CG (123).

La proteína MET se sobreexpresa en el 50% del CG aproximadamente y el gen *MET* está amplificado en más del 20% de los casos (124, 125). La sobreexpresión de *MET* se ha asociado con la presencia de metástasis hepáticas (126).

Muchos estudios muestran el posible papel pronóstico negativo de *MET*. En este sentido, un metaanálisis recientemente publicado que incluyó 2258 pacientes y que confirma el impacto desfavorable de la sobreexpresión de *MET* sobre la supervivencia de los pacientes con una HR de 2,57 (IC 95% 1,97-3,35) (127).

**Vía PI3K/Akt/mTOR y PTEN.** La vía fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) – proteína quinasa B (Akt/PKB) – diana de la rapamicina en los mamíferos

(mTOR) es una vía con acciones antiapoptoicas y pro-supervivencia que regula funciones celulares como la proliferación, la supervivencia y la migración celular, siendo la vía final se convergencia de la activación de diferentes receptores proteína quinasa. Las mutaciones oncogénicas en *PIK3CA*, gen codificante de la subunidad catalítica  $\alpha$  p 110 de PI3K, provocan la activación constitutiva de la vía PI3K/mTOR con una frecuencia que oscila entre el 5,1% y el 25% tal como se reporta en algunos estudios (89).

En uno de estos estudios se objetivó un 67% de amplificaciones de *PIK3CA*, las cuales se asociaban a un peor pronóstico, indicando que la mutación de *PIK3CA* es un mecanismo fundamental en la activación de la vía PI3K/mTOR en CG (128).

Sin embargo, la tasa de mutaciones de este gen no parece muy significativa (2,5-5% de los casos) de acuerdo a un reciente análisis de biomarcadores llevado a cabo dentro de un ensayo clínico (129).

Diversos estudios muestran que pacientes con CG con expresión anormal de PI3K/Akt/mTOR presentan con mayor frecuencia estadios avanzados de CG al diagnóstico y menores tasas de supervivencia (130-132).

*PTEN* es un gen de supresión tumoral, regulador negativo de la vía PI3K/Akt/mTOR. La infección por VEB induce la pérdida de expresión de *PTEN* por hipermetilación del promotor, conduciendo a la activación de PI3K/Akt en el CG asociado a VEB (133).

En otro estudio la pérdida de expresión de *PTEN* se correlaciona con la profundidad de la invasión, el grado de diferenciación, la presencia de metástasis ganglionares y el estadio clínico-patológico del CG (134).

**Programmed cell death protein 1 (PD-1), Programmed cell Death Ligand-1 (PD-L1) y 2 (PD-L2).** Las proteínas de membrana PD-1, PD-L1 y PD-L2 han sido en los últimos años una de las dianas emergentes en el campo de la inmunoterapia. Esta diana actúa como regulador de la respuesta inmune mediante la inhibición de células T tumor-específicas en el microambiente tumoral (135).

La expresión de PD-1 o PD-L1 parece ser mayor en estadios avanzados de la enfermedad y podría asociarse a un peor pronóstico (82). Se ha asociado la



positividad del tumor para PD-1 como un factor pronóstico desfavorable independiente de supervivencia libre de enfermedad (SLE) en pacientes con CG estadios II/III sometido a cirugía con intención curativa (SLE a los 3 años: 36,1% vs. 64,7%  $p < 0,05$ ) y de riesgo de recaída tras la cirugía (RR 2,430 IC 95% 1,217-4,852), no alcanzándose la significación estadística en términos de supervivencia global (SG) (136).

Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en SLE ni SG según la expresión de PD-L1. Por este motivo no está establecido todavía si la positividad de PD-L1 podría ser útil como marcador pronóstico en CG.

**Claudina.** La familia de las claudinas se constituye por al menos 24 tipos de proteínas transmembrana estrechamente relacionadas y que actúan como proteínas de unión celular, empleándose en el diagnóstico diferencial de diferentes tipos de neoplasias. Asimismo se ha visto que la expresión de ciertas claudinas puede emplearse como marcador pronóstico de diversos tipos de cáncer (137).

Un metanálisis, que incluyó 1265 pacientes con CG, mostró que la sobreexpresión de Claudina-4 se asociaba a peor supervivencia (HR 2,01 IC 95%: 1,62-2,50), estadio avanzado (OR 1,96 IC 95%: 1,08-3,56) y metástasis ganglionares (OR 1,72 IC 95%: 1,05-2,81) en pacientes con CG(138).

Por otro lado, la expresión baja de Claudina-18 es la que se ha observado principalmente en el subtipo intestinal de CG y se ha asociado a peor pronóstico en estos casos (139).

**ALK (anaplastic lymphoma kinase).** Según los escasos datos disponibles, la frecuencia de expresión de ALK en CG es del 8,4% (140, 141). La sobreexpresión de ALK en CG se ha asociado a la presencia de células en anillo de sello y una edad joven, tal como mostraban estudios previos pacientes con cáncer de pulmón. En el análisis multivariante realizado, Chon y cols. se describe un incremento del riesgo de recurrencia y muerte en pacientes ALK+ (140).

**Factores asociados a la apoptosis.** *Bcl-2* es un protooncogén determinante de la susceptibilidad de la célula tumoral a la apoptosis y se ha asociado al pronóstico de los pacientes con cáncer gástrico avanzado (142, 143).

Otros factores relacionados con la apoptosis son FasL y survivina que también se han asociado a peor pronóstico en los pacientes con CG (144, 145).

**Citoquinas.** Los CG producen diversos tipos de citoquinas, incluyendo IL-1, IL-6, IL-10, IL-11, TNF y CXCL8. Recientemente se ha propuesto la activación de la vía GP130/JAK/STAT3 como factor pronóstico de pobre supervivencia en los pacientes con CG. Esta vía se asocia a otras vías de supervivencia y proliferación celular, angiogénesis y supresión del sistema inmune, siendo los niveles de IL-11 e IL-6 potenciales biomarcadores (146-148).

**Reguladores del ciclo celular.** Cambios en los niveles de expresión de las ciclinas favorecen la proliferación celular tumoral. De los dos tipos de ciclinas evaluados D1 y E, sólo la Ciclina E se considera un factor significativo como regulador del ciclo celular y un marcador pronóstico en CG (149).

**KRAS.** Las mutaciones activadoras en KRAS están presentes en el 4% de los carcinomas gástricos, principalmente en el CG MSI (150). En una publicación reciente se asocia la presencia de mutaciones en KRAS con peor pronóstico en pacientes con CG proximal, no obstante son necesarios más estudios para clarificarlo (151).

**MicroARN.** Los microARN (miARN) han demostrado tener un rol fundamental en el desarrollo del CG, siendo implicados en varios mecanismos celulares como la apoptosis, metástasis, proliferación y angiogénesis. Los miRNA pueden ser utilizados como factores pronósticos porque se expresan de forma estable y robusta en los tejidos y en la circulación. En CG los miARN se han correlacionado con supervivencia y estadio tumoral, así como con riesgo de recurrencia tumoral y metástasis ganglionares. Ueda y cols. hallaron 22 miARNs sobreexpresados y 12 subexpresados comparando 353 muestras tumorales con mucosa gástrica no tumoral. Identificaron que a niveles bajos de

let-7g y miR-1433 y niveles altos de miR-214 se asociaban a pronóstico desfavorable, independientemente de otros factores clínico-patológicos (152).

Otro estudio confirmó que, en muestras de CG avanzado, niveles altos de miR-20a, miR-25, miR-93, miR-103, miR-106a, miR-106b, miR-130, miR-155, miR-221 y miR-222 parecen ser factores de riesgo altamente asociados a penetración de la serosa, metástasis a distancia, afectación ganglionar y malos resultados en supervivencia a largo plazo en pacientes sometidos a cirugía con intención radical y quimioterapia adyuvante (153).

Más estudios han identificado miARN circulantes como factores predictores de la supervivencia, sin embargo son necesarios estudios prospectivos de mayor tamaño con cohortes independientes para poder validar y aplicar el análisis de miARN a la práctica clínica (94).

## FACTORES PREDICTIVOS EN CÁNCER GÁSTRICO

Los factores predictivos son aquellas variables genéticas, biológicas o moleculares que ayudan a predeterminar la posibilidad de obtener una respuesta a un determinado tratamiento. En muchos casos un mismo factor/marcador predictivo tiene también valor pronóstico en la enfermedad. En CG se han identificado algunos factores predictivos en relación con el empleo de los tratamientos quimioterápicos y agentes dirigidos frente a dianas moleculares específicas.

**Timidilato sintetasa.** La Timidilato Sintetasa (TS) es uno de los enzimas clave en el control de la replicación del ADN y asimismo es la diana de varios agentes antineoplásicos. Uno de esos agentes es el 5-fluorouracilo (5-fu). Datos preclínicos demostraron que la sobreexpresión de TS por las células tumorales determina la resistencia de las mismas al 5-fu y a la fluorodeoxyuridina (154, 155).

A nivel clínico, un estudio de 65 casos de CG tratado mediante quimioterapia neoadyuvante, que incluía cisplatino y 5-fu en infusión continua, demostró una correlación entre los niveles de ARNm de TS y la respuesta al tratamiento, encontrándose como el 54% de los pacientes con escasa expresión tumoral de TS respondían al tratamiento, mientras sólo el 17% con niveles elevados de expresión de TS tuvieron una respuesta objetiva (156). Posteriormente este estudio fue corroborado por otros que determinaron la expresión tumoral de TS por inmunohistoquímica y en pacientes que sólo recibían 5-fu o capecitabina en monoterapia, eliminando el posible sesgo por la interacción del cisplatino en la serie anteriormente presentada (157-159).

La expresión de TS se ha correlacionado también con el pronóstico en pacientes sometidos a gastrectomías con intención curativa, adoptando un posible papel a la hora de seleccionar los casos con indicación de tratamiento adyuvante (160, 161).

También se ha publicado el carácter predictivo de la respuesta al tratamiento quimioterápico basado en 5-fu de los niveles de Timidina Fosforilasa (TP) y Dihidropirimidin Deshidrogenasa (DPD) (160).

**Dihidropirimidin deshidrogenasa.** La dihidropirimidin deshidrogenasa (DPD) es la enzima principal en el catabolismo del 5-fu responsable de la conversión a metabolito inactivo, el dihidrofluorouracilo (DHFU). Su valor como predictor de toxicidad a las fluoropirimidinas es reconocido por lo que su determinación es recomendada. Existe una variabilidad interindividual importante (8-21 veces) en el nivel de actividad de la DPD. Niveles más bajos de DPD se correlacionan con mayor toxicidad de las fluoropirimidinas (162).

Entre el 4-7% de la población padece un síndrome de deficiencia de DPD que sólo se manifiesta cuando los pacientes son tratados con fluoropirimidinas, desarrollando una importante toxicidad gastrointestinal, hematológica y neurológica que puede ser incluso letal (163). Aun así la utilidad de DPD como biomarcador de respuesta a las fluoropirimidinas no está clara (164).

Los pacientes con CG difuso presentan una peor respuesta a la quimioterapia comparada con otros subtipos histológicos. En el análisis por subgrupos del ensayo clínico FLAGS, que evaluaba S-1 y cisplatino vs. 5-fu y cisplatino en CG avanzado, se vieron diferencias en la respuesta según el tipo histológico, evidenciando mayor SG en pacientes con CG de histología difusa cuando se trataban con S-1 y Cisplatino en comparación con 5-Fu y cisplatino (165).

La expresión de DPD en muestras de adenocarcinoma gástrico de histología difusa es mayor que en los casos de histología no difusa. En el análisis por subgrupos S-1 fue más efectivo que 5-fu en pacientes con alta expresión de DPD (166, 167). Estos resultados sugieren que una mayor expresión intratumoral de DPD podría condicionar mejor respuesta a las fluoropirimidinas que incorporan un inhibidor de DPD, como son el UFT o el S-1, que a aquellas que no lo incorporan, como el 5-fu, la capecitabina o el tegafur. Sin embargo, con los datos que disponemos actualmente no es recomendable la determinación de DPD como marcador predictivo de respuesta fuera de ensayos clínicos, aunque sí lo sea como predictor de toxicidad.

**E-cadherina.** A nivel preclínico, la E-cadherina es un marcador predictivo de respuesta a diversos tratamientos. Su alteración reduce la sensibilidad de la célula tumoral a las terapias citotóxicas convencionales y a nuevas terapias

dirigidas frente a dianas moleculares mediante la adquisición de una resistencia a la apoptosis (168, 169).

Dentro de los estudios preclínicos, algunos datos sugieren un papel fundamental de la expresión de E-cadherina en la sensibilidad de las células tumorales a los agentes inhibidores de EGFR (169-173).

A nivel clínico aún no existen datos sólidos que avalen el papel de la E-cadherina como biomarcador predictivo y se requiere su validación prospectiva dentro de ensayos clínicos.

**Inestabilidad de microsatélites.** Aunque diversos estudios han establecido la relación entre MSI y los beneficios o la ausencia de ellos del tratamiento quimioterápico adyuvante basado en 5-fu en el cáncer de colon, especialmente en estadios iniciales (II/III) (174), los datos en cáncer gástrico son limitados y con resultados contradictorios (175, 176). Por ello, son varios los estudios actualmente en marcha para investigar el valor pronóstico de la MSI en CG. Específicamente en el contexto de la enfermedad resecable, Smyth y cols (98) reportaron el impacto del fenotipo MSI en los resultados del tratamiento perioperatorio, postulando su determinación sistemática en estos pacientes al presentar una mayor supervivencia frente a los tumores MSS cuando tratados sólo con cirugía. Un análisis *post hoc* del estudio CLASSIC confirma los resultados del análisis de la inestabilidad de microsatélites descrita en el estudio MAGIC, expandiendo este hallazgo a la población asiática (177).

**Familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR, HER1).** Además de su carácter pronóstico en CG, la sobreexpresión de EGFR ha sido estudiada como posible factor predictivo de respuesta al tratamiento con fármacos dirigidos específicamente frente a esa vía. A pesar de los primeros resultados negativos de los ensayos clínicos que emplearon pequeñas moléculas dirigidas frente al dominio intracelular del EGFR (erlotinib y gefitinib), numerosos estudios han explorado el bloqueo de esta vía de señalización mediante el empleo por ejemplo de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a la porción extracelular del receptor. En un estudio Rojo F y cols determinaron mediante inmunohistoquímica la expresión de EGFR, la forma activada por fosforilación del receptor o pEGFR,

pMAPK, pAkt y Ki67 en muestras obtenidas antes y después del tratamiento con Gefitinib (178). La sobreexpresión de EGFR se encontró en un 62,5% de los casos con una reducción significativa de los niveles de pEGFR tras el tratamiento con gefitinib. A pesar de ello se observó un descenso en la proliferación celular sólo en los casos con niveles bajos de pAkt, lo que induce a pensar en el papel fundamental de la vía PI3K/Akt y su correlación con EGFR como regulador de la respuesta o resistencia a los inhibidores de EGFR.

Datos de diferentes estudios sugieren que la expresión de EGFR, el número de copias de *EGFR*, la expresión de ligandos de EGFR como epirregulina y amfiregulina, o un descenso en los componentes de esta vía de señalización, podrían ser biomarcadores candidatos para la eficacia de los anticuerpos dirigidos frente a EGFR (179, 180).

El valor pronóstico y predictivo de EGFR sí ha sido demostrado en un estudio para pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (181), en el cual niveles de alta expresión de EGFR se consideran un biomarcador que puede predecir el beneficio en supervivencia al añadir cetuximab a la quimioterapia.

Por el contrario, en CG el tratamiento con pequeñas moléculas inhibitoras de tirosina quinasa contra EGFR como lapatinib y erlotinib se ha explorado en diversos ensayos clínicos, todos de tamaño muestral pequeño y sin incluir la sobreexpresión o amplificación de *EGFR* como criterio de selección de pacientes de cara a su inclusión en el estudio (182).

Igualmente en los estudios EXPAND y REAL-3, los anticuerpos contra EGFR panitumumab y cetuximab no lograron demostrar ningún beneficio en supervivencia global, siendo estudios de mayor tamaño pero en los que los pacientes no eran seleccionados según el estado de expresión de EGFR (183, 184).

**Human Epidermal Growth Factor 2 (HER2).** A pesar de su dudoso valor pronóstico, el valor predictivo de HER2 ha sido demostrado para el cáncer gástrico y de la unión gastroesofágica. De los diversos agentes dirigidos frente a HER2 investigados en CG, trastuzumab (Hercpetin®) es el fármaco mejor conocido y con un desarrollo clínico más amplio hasta la fecha. Se trata de un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado de la clase IgG1 dirigido

frente a la porción extracelular de HER2, cuyos mecanismos de acción se pueden resumir en:

- inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), promover la degradación de HER2 por internalización y degradación del receptor mediante activación de la ubiquitina-ligasa c-Cbl (185)
- interferir con las vías de señalización intracelular de MAPK y PI3K/Akt/mTOR (186, 187)
- impedir la formación de la forma truncada p85HER2 al interferir la acción de las metaloproteínas de la matriz extracelular sobre la porción extracelular del receptor (188)
- inhibir la activación de las rutas dependientes de HER2 impidiendo la transcripción de genes implicados en mecanismos de angiogénesis tumoral como por ejemplo la transcripción y posterior aumento de niveles de VEGF (189).

El estudio que estableció la utilidad de añadir trastuzumab a una primera línea de quimioterapia basada en la combinación de fluoropirimidina y platino en pacientes con cáncer gástrico o de la unión gastroesofágica avanzado HER2 positivo ha sido el estudio de fase III ToGA (108).

En este ensayo se analizó el estado de HER2 en 3807 pacientes de los cuales el 22,1% fueron HER2 positivos. Se aleatorizaron 584 pacientes a recibir quimioterapia sola o con trastuzumab. En el brazo con trastuzumab se observó un aumento estadísticamente significativo en la supervivencia global (mediana 13,8 meses vs. 11,1 meses, HR 0,74,  $p=0,0048$ ), objetivo principal del estudio, y también en las respuestas (47,3% vs. 34,5%,  $p=0,0017$ ). Es importante destacar que en este estudio se consideraron HER2 positivos los casos con IHQ 3+ y/o FISH+. Sin embargo la adicción de trastuzumab no aportó beneficios en términos de supervivencia en el análisis por subgrupos en el caso de FISH positivo y IHQ negativa o IHQ 1+ (22,8% de los pacientes incluidos, HR 1.07, IC95%: 0,7-1,62). El beneficio fue más evidente en los pacientes con alta sobreexpresión de HER2 definidos como IHQ 3+ o IHQ 2+ y FISH positivo, con medianas de supervivencia global de 17,9 y 16 meses respectivamente.



Ante estos resultados la *European Medicines Agency* (EMA) y la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) aprobaron el uso de trastuzumab en combinación con quimioterapia como tratamiento estándar en primera línea con CG avanzado HER2 positivo, considerando como HER2 positivo IHQ 3+ o IHQ 2+ con FISH positivo.

El estudio de Gómez-Martín y cols sugiere que en pacientes con adenocarcinoma gástrico avanzado HER2 positivo por los criterios habituales, tratados con Trastuzumab en primera línea, el nivel de amplificación de *HER2* (SISH o FISH) predice la respuesta y la supervivencia de forma más precisa y propone que, si se validan estos hallazgos en otros estudios, la amplificación de *HER2* sea el criterio de selección para el tratamiento con trastuzumab (40). En este estudio se identificó el valor 4,7 del ratio *HER2/CEP17* como punto de corte óptimo para la identificación de los pacientes sensibles o refractarios a trastuzumab.

También se ha investigado el papel predictivo de respuesta del estudio de HER2 en ensayos clínicos con otros inhibidores de HER2 en cáncer gástrico. Lapatinib es un inhibidor tirosina quinasa oral de EGFR1 y HER2. El estudio de primera línea TRIO-013/LOGIC exploró la combinación de lapatinib con capecitabina y oxaliplatino. El objetivo primario de supervivencia global fue negativo y no se evidenció ningún biomarcador que definiera un subgrupo en el que el beneficio fuese significativo (190).

En el estudio TYTAN de lapatinib en segunda línea sólo se vio una tendencia hacia mejor supervivencia pero no estadísticamente significativa. Sin embargo, en el análisis de subgrupos pre-planificado se vio un aumento significativo de la supervivencia en los pacientes con HER2 IHQ 3+, no estableciéndose el papel de la amplificación o sobreexpresión de EGFR (191).

Resumiendo, en la actualidad no existe un biomarcador predictivo de beneficio a lapatinib en el tratamiento del CG, al contrario de lo establecido para trastuzumab.

Trastuzumab-emtansina (T-DM1) es un fármaco que conjuga trastuzumab y DM1, un potente agente antimicrotúbulo. La unión de DM-1 a HER2 hace que una proporción de receptores sean internalizados en el proceso de endocitosis

del receptor con la consecuente liberación intracelular de DM1 y muerte celular. TDM-1 está actualmente aprobado en cáncer de mama metastásico HER2 positivo que ha progresado a otras terapias anti-HER2. En cáncer gástrico HER2 positivo, T-DM1 mostró alta efectividad en modelos preclínicos (192). El estudio de fase II/II con T-DM1 en segunda línea en CG avanzado, mostró una ausencia de beneficio de T-DM1 frente a los taxanos “clásicos” (paclitaxel o docetaxel) (193).

Otro anticuerpo monoclonal frente a HER2 es pertuzumab, anticuerpo monoclonal que se une a HER2 impidiendo la dimerización del receptor y que ha sido aprobado en el tratamiento del cáncer de mama metastásico y neoadyuvante (194, 195). No se ha determinado ningún factor predictivo de respuesta al tratamiento con estos anticuerpos en los estudios realizados en cáncer gástrico.

Los mecanismos de resistencia a las terapias anti-HER2, especialmente a Trastuzumab, han sido ampliamente estudiadas en cáncer de mama (196) y empiezan a dilucidarse en cáncer gástrico. Entre los mejor caracterizados se encuentran:

- Mutaciones en *HER2* pueden inducir la proteólisis del dominio extracelular generando una isoforma truncada de HER2 denominada p95HER2, con actividad quinasa constitutiva (197)
- Expresión elevada de Mucina 4, una glicoproteína de membrana que recubre el dominio extracelular de HER2, con la resistencia a trastuzumab (198)
- Aumento de expresión de otros receptores tirosina quinasa (199)
- Sobreexpresión de EGFR (199-201)
- Interacción entre HER2 e Insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-R1) (202, 203)
- Sobreexpresión de c-MET (204, 205)
- Alteración en rutas de señalización intracelular. En cáncer de mama la vía PI3K/Akt/mTOR parece tener un papel importante en la resistencia al tratamiento con trastuzumab, aunque en el momento actual la mayoría de datos proceden de estudios preclínicos y estudios clínicos retrospectivos

(196, 206, 207). Tanto la pérdida de expresión de *PTEN* como las mutaciones activadoras de *PIK3CA* resultan en una activación continua de la vía de señalización intracelular, independientemente del bloqueo de HER2 (208).

En cáncer esófago-gástrico los datos a este respecto son más escasos, aunque existen algunos datos en el ámbito preclínico y estudios retrospectivos de pequeño tamaño que implican a la vía PI3K/Akt/mTOR en la resistencia a la terapia anti-HER2 también en esta patología y diversas estrategias terapéuticas con inhibidores de la vía están bajo investigación (209-214).

Zhan y cols describen la alteración de la proteína SRC como factor central de la resistencia a trastuzumab, dada su interrelación con receptores tirosina quinasa y la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR entre otras, proponiendo actuar terapéuticamente inhibiendo SRC para actuar sobre varios mecanismos concomitantes de resistencia a la terapia anti-HER2 (186).

**KRAS.** En CG la presencia de mutaciones en KRAS se restringe principalmente a los tumores con MSI (32, 215, 216). Teniendo en cuenta la asociación de resistencia a inhibidores de EGFR en cáncer colorrectal y en otros tipos tumorales, los resultados negativos del estudio EXPAND con cetuximab asociado a quimioterapia en primera línea de CG avanzado, pudieran estar asociados a la presencia de un 4-10% de mutaciones en KRAS (184), así como a la heterogeneidad intratumoral respecto a la presencia de clones con mutaciones de KRAS simultáneamente a clones no mutados (217). Por ello, son necesario más estudios para determinar el papel predictivo de no respuesta a anti-EGFR de las mutaciones de KRAS en este contexto.

**Angiogenesis y Receptor del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular.** El valor predictivo de los marcadores de la angiogénesis en los estudios realizados hasta la fecha ha sido discordante. En el ensayo clínico AVAGAST se estudió el efecto en la supervivencia global de la adición de bevacizumab a capecitabina y cisplatino, mostrándose un beneficio en tasa de respuesta y supervivencia libre de progresión pero no un beneficio significativo en supervivencia global. En el análisis por subgrupo para la investigación de

biomarcadores, realizado dentro de este mismo estudio, se incluyeron VEGF, VEGFR1, VEGFR2 y neurofilina-1. Este estudio no demostró el valor pronóstico ni predictivo de respuesta a bevacizumab de los niveles de expresión de ninguno de los marcadores estudiados, aunque en población caucásica niveles altos de VEGFA y bajos de neurofilina-1 se identificaron como factores potencialmente predictores de forma estadísticamente no significativa (119).

Los recientes resultados positivos de los estudios REGARD y RAINBOW respecto a ramucirumab, anticuerpo monoclonal frente a VEGFR2, en monoterapia y combinado con paclitaxel en segunda línea de CG avanzado, tampoco han permitido establecer un biomarcador predictivo de beneficio al tratamiento antiangiogénico (41, 42).

Estudios preclínicos sugieren que una hiperactivación de las vías de PDGF y FGFR podría tratarse de un mecanismo de escape para la progresión durante el bloqueo VEGF-VEGFR (218, 219). Sin embargo, los estudios con los inhibidores multiquinasa sorafenib y sunitinib en cáncer gástrico avanzado han sido negativos en población no seleccionada, sin existir datos acerca de potenciales biomarcadores de beneficio a estos fármacos en el ámbito clínico (220, 221).

De esta forma, desafortunadamente en la actualidad no disponemos de un marcador molecular que permita seleccionar a la subpoblación de pacientes con cáncer gástrico que se beneficiaría del tratamiento antiangiogénico.

**Receptor del Factor de Crecimiento Fibroblástico.** Agentes dirigidos frente a FGFR han demostrado eficacia en modelos preclínicos en líneas celulares y en modelos animales (120, 222). Actualmente diversos inhibidores selectivos y no selectivos de FGFR2 (dovitinib, brivatinib), están siendo evaluados dentro de ensayos clínicos por lo que su papel dentro del tratamiento del CG y el valor predictivo de este receptor está por determinar (82).

Aunque bien tolerado, el inhibidor selectivo de FGFR 1/2/3 AZD4547 no mejoró significativamente la supervivencia libre de progresión frente a paclitaxel en pacientes con amplificación/polisomía de *FGFR2* en CG. La considerable

heterogeneidad intratumoral para la amplificación del gen *FGFR2* y la escasa concordancia entre amplificación/polisomía de *FGFR2* y la expresión de *FGFR2* indican la necesidad de búsqueda de biomarcadores predictivos alternativos (223).

**MET y Factor de Crecimiento Hepatocitario.** Rilotumumab es un anticuerpo monoclonal dirigido frente al factor de crecimiento hepatocitario HGF y que previene su unión al receptor tirosina quinasa MET. Un ensayo clínico fase II, que estudió la adición de rilotumumab a quimioterapia de primera línea en CG avanzado, demostró un beneficio en supervivencia libre de progresión (224).

El análisis de biomarcadores realizado a partir de este estudio, demostró que la sobreexpresión de MET es un marcador tanto pronóstico como predictivo. Los pacientes con alta expresión de MET que recibieron la combinación comentada presentaron mayor supervivencia global en comparación con quimioterapia sola (11,1 vs. 5,7 meses) (225, 226). No obstante, el fase III RILOMET-1 finalizó precozmente por aumento del número de muertes en el brazo de rilotumumab en comparación con el brazo de quimioterapia sola (227).

Los estudios con foretinib, inhibidor oral de MET, y onartuzumab, anticuerpo monoclonal que impide la unión de HGF a MET, resultaron negativos para sus objetivos primarios, incluso en pacientes con *MET* amplificado o elevación de pMET en tumor (228, 229).

Datos preliminares indican que pacientes con amplificación de *MET* (<5% de los CG) pueden alcanzar respuestas completas con inhibidores de MET como crizotinib (125).

**Vía de PI3K/Akt/mTOR y PTEN.** Los inhibidores de PI3K y Akt han mostrado efectos prometedores en ensayos clínicos fase I-II, no obstante en el ensayo clínico fase III GRANITE-1 el empleo de everolimus fue negativo para supervivencia global en pacientes con CG avanzado en segunda o tercera línea de tratamiento (230). Actualmente, un ensayo clínico fase III está evaluando la eficacia de añadir everolimus a paclitaxel en pacientes previamente tratados con fluoropirimidinas (NCT01248403).

Además, la activación constitutiva de PI3K causada por mutaciones activadoras de *PIK3CA*, expresión reducida de PTEN o desregulación de la señal puede

inducir resistencia a la inhibición de HER2 (231), por lo que el uso combinado de fármacos frente a ambas vías podría ser una estrategia a seguir(232).

**PD-1/PD-L1 y PD-L2.** Según los resultados del TCGA, el subtipo VEB evidencia una alta expresión de PD-L1 (32). Por ello, numerosos estudios con inmunoterapia se encuentran en marcha en CG, bien en monoterapia o bien en combinación con quimioterapia u otros agentes como ramucirumab.

La expresión de PD-L1 (B7-H1) ha sido ampliamente estudiada en cáncer. Publicaciones recientes sugieren que la alta expresión de PD-L1 en las células inmunes asociadas al tumor se relaciona con mejor respuesta a fármacos anti-PD-1/PD-L1 (233-235). Sin embargo, diferentes estudios han resultado negativos para dicha correlación, corroborando también la respuesta a agentes anti-PD-L1 en pacientes con expresión negativa, lo que pone en entredicho su utilidad como biomarcador (236, 237).

La disparidad de resultados podría deberse, al menos en parte, al uso de tests no estandarizados, así como a las posibles diferencias derivadas de la heterogeneidad de las muestras empleadas en los diferentes estudios (biopsias en fresco frente a muestras conservadas en parafina) (234, 238).

Dados los resultados, en cáncer gástrico en el momento actual no podemos considerar que exista un biomarcador predictivo de respuesta claramente validado con respecto al empleo de inhibidores de los puntos de regulación inmunológica.

## INFLAMACIÓN SISTÉMICA Y CÁNCER

En el curso de la curación normal de heridas y de la lucha contra las infecciones, las células inmunoinflamatorias aparecen transitoriamente y luego desaparecen, en contraste con su persistencia en sitios de inflamación crónica donde su presencia se ha asociado con diversas patologías tisulares como la fibrosis, la angiogénesis aberrante y las neoplasias.

Algunos tumores son densamente infiltrados por células de la respuesta innata y de la respuesta adaptativa del sistema inmunitario y por lo tanto reflejan las condiciones inflamatorias que surgen en los tejidos no neoplásicos. No obstante, cualquier lesión neoplásica contiene células inmunes presentes en densidades que van desde infiltraciones sutiles, detectables solamente mediante anticuerpos específicos, hasta inflamaciones graves que son evidentes incluso mediante técnicas de tinción histoquímica estándar (239).

Además de la inflamación localizada en el área de desarrollo del tumor, en los últimos años se ha reconocido la importancia de los factores relacionados con el paciente, en particular de la respuesta inflamatoria sistémica de los pacientes con tumores en estadios tempranos. Con frecuencia estos pacientes presentan cambios en numerosos parámetros sistémicos que podrían considerarse como candidatos para predecir la supervivencia de los mismos (240). Tales parámetros incluyen cambios en el número de células sanguíneas periféricas, fenotipos y patrones de expresión génica particulares, cambios en la velocidad de sedimentación de eritrocitos y alteraciones en el nivel de citocinas inflamatorias séricas, reactantes p de fase aguda y albúmina sérica total. Aunque tales cambios sean similares a los observados en pacientes con enfermedades infecciosas o inflamatorias, en los pacientes oncológicos la inflamación genera no solo cambios en el microambiente que promueven el cáncer, sino también cambios sistémicos que son favorables para la progresión del mismo.

Durante la última década, varios parámetros séricos han sido investigados como potenciales biomarcadores inflamatorios en los pacientes con cáncer: la concentración de los leucocitos, el recuento absoluto de neutrófilos, linfocitos y

monocitos, el recuento absoluto de plaquetas, los niveles séricos de reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva (PCR), la albúmina o nivel de lactato deshidrogenasa (LDH), el Glasgow Prognostic Score (GPS), así como diversas combinaciones de los anteriores (241-248).

La **Lactato Deshidrogenasa (LDH)** es una enzima citoplasmática que cataliza reversiblemente la conversión del piruvato en lactato, el último paso en el proceso de la glicólisis. Hay varios tejidos en los que la LDH se expresa y, si bien es abundante en las células de esos tejidos, los niveles en la sangre son por lo general bajos. Sin embargo, cuando los tejidos se dañan a causa de una lesión o una enfermedad, liberan más LDH al torrente sanguíneo.

Niveles elevados de LDH en suero se han descrito como un indicador de mal pronóstico en el cáncer de pulmón de células no pequeñas, linfoma maligno, carcinoma pancreático y cáncer colorrectal (249-252).

Además, una alta expresión de LDH se correlaciona con un mal pronóstico y desarrollo de metástasis en muchos tumores sólidos, así como la determinación de los niveles de LDH en suero es recomendada por la AJCC como marcador de estadificación y progresión en melanoma (253-256).

El **GPS** se basa en la combinación de concentraciones elevadas de PCR e hipoalbuminemia (257). La presencia de hipoalbuminemia aislada sin elevados niveles de PCR, no se relaciona por sí sola con pobre supervivencia en pacientes con cáncer (244).

Respecto a la **PCR (Proteína C Reactiva)**, en una gran cohorte internacional de pacientes con cáncer avanzado (n = 1466), Laird y cols (258) evidenciaron como este parámetro se asociaba significativamente con todos los componentes funcionales relacionados con la calidad de vida del paciente oncológico medidos mediante la EORTC QLQ-C30, la cual estima parámetros de función cognitiva, física, emocional y social. Asimismo se encontró una asociación significativa de los niveles de PCR con la pérdida de apetito, el dolor y la fatiga. Sin embargo, no se pudo establecer claramente que la reducción de los marcadores de la respuesta inflamatoria sistémica como la PCR se acompañara de una mejora clínicamente relevante en los síntomas y en la supervivencia de estos pacientes.



El parámetro **NLR (Ratio Neutrófilos/Linfocitos)** es seguramente la combinación más estudiada en distintos tipos de cáncer y en diferentes puntos temporales. Basado en las funciones opuestas de neutrófilos y linfocitos, el NLR podría aportar más información pronóstica sobre la progresión tumoral.

Se considera que los neutrófilos desempeñen un papel clave tanto en la angiogénesis fisiológica normal y como en la angiogénesis tumoral (259). Los neutrófilos activados pueden liberar metaloproteinasas de la matriz (MMPs), en particular a MMP-9, las cuales activan potentes factores angiogénicos como son el factor de crecimiento endotelial vascular y el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (260, 261).

El aumento en el recuento de neutrófilos conduce también a la inducción de la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis a través de la secreción de citoquinas como son el factor de necrosis tumoral (TNF), la IL-1 y la IL-6 (262, 263).

Por el contrario, los linfocitos constituyen un factor importante para la supresión de la progresión del cáncer. Los linfocitos citotóxicos, que en última instancia son los responsables de matar a las células cancerígenas y erradicar el tumor, son fundamentales en la inmunoterapia contra el cáncer (264).

Aún así, los mecanismos precisos por los cuales la relación entre neutrófilos y linfocitos podría predecir relevantes resultados clínicos, no se comprende completamente.

Aunque se dispongan de menos estudios al respecto, el valor del **dNLR (Ratio derivado Neutrófilos/Linfocitos)** podría ser más relevante que el del NLR dado que además de los linfocitos incluye también monocitos y otras subpoblaciones de granulocitos. Altos valores de dNLR han sido asociados a pobres supervivencias en pacientes con diferentes tumores (265-268).

Proctor MJ y cols estudiaron el posible carácter pronóstico de varios parámetros inflamatorios entre los cuales mGPS (Glasgow pronostic Score Modificado), NLR (Ratio Neutrófilos/Linfocitos) y PLR (Ratio Plaquetas/Linfocitos), en pacientes con cáncer, observando el valor pronóstico de los tres parámetros citados en más de 27.000 pacientes independientemente de la localización del tumor primario (cáncer de mama,

vejiga, ovario, próstata, cáncer gastroesofágico, hematológico, renal, colorrectal, hepatopancreaticobiliar y cáncer de pulmón) (269).

En la literatura científica hay más de 120 estudios (incluyendo 460 000 pacientes) que han examinado la utilidad clínica de NLR y/o el GPS para predecir la supervivencia de pacientes con diferentes tipos de cánceres (270). Un último meta-análisis realizado en pacientes con cáncer avanzado, ha evidenciado como ambos parámetros tienen un valor pronóstico fiable (271).

El valor pronóstico del **Ratio Plaquetas/Linfocitos (PLR)** se ha relacionado con una pobre supervivencia global en pacientes con algunas neoplasias sólidas como los carcinomas colorrectal, gastroesofágico, ovárico, pancreático y hepatocelular (247).

El valor de PLR como marcador pronóstico y su comparación al respecto con el NLR ha sido estudiado con resultado positivo en pacientes con cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, adenocarcinoma ductal pancreático y carcinoma medular tiroideo (272-275). No obstante, otros trabajos han publicado resultados opuestos (276-279). Más recientemente Cho U. y cols reportaron que, como factor pronóstico independiente, un elevado valor preoperatorio de PLR es superior a NLR, dNLR y LMR a la hora de predecir SLP en los pacientes con cáncer de mama (280).

Otro parámetro que ha demostrado tener un elevado valor pronóstico en algunos tumores sólidos ha sido el **Índice Inmuno-Inflamatorio Sistémico o SII (Systemic Immune Index)** (281-284). Este índice se obtiene del cálculo (plaquetas x neutrófilos)/ linfocitos, combinando por tanto los valores de PLR y NLR, demostrando ser más prometedor que NLR y PLR de manera individual en distintos tumores y puntos temporales (281, 285-287). Estos resultados se confirman también en un reciente metaanálisis (288).

Con respecto al **LMR (Ratio Linfocitos/Monocitos)**, también este parámetro ha demostrado tener un valor pronóstico en varias neoplasias (289, 290). Concretamente Ni y cols demostraron que valores elevados de LMR se asociaban con una favorable Supervivencia libre de Enfermedad (SLE) en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado (291).

De manera similar Hirahara (292) y cols encontraron que el LMR podría ser un predictor de CSS (Supervivencia Cáncer Específica) post-operatorio y de Supervivencia Global en pacientes con cáncer de esófago, además de resultar una herramienta útil para identificar pacientes con mal pronóstico incluso después de la esofagectomía radical.

Además de su papel en los diferentes ratio e índices mencionados anteriormente, está demostrado que las plaquetas también juegan un papel importante en las enfermedades inflamatorias y en los tumores malignos aparte de su papel fisiológico en la hemostasis. Si las plaquetas contribuyen a mantener las señales proliferativas, las células tumorales producen factores de crecimiento derivados de las plaquetas en grandes cantidades. Estos factores de crecimiento promueven la progresión tumoral (293). Un recuento elevado de plaquetas en sangre periférica se ha asociado a un peor pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón (294).

En el momento actual y con la excepción de los pacientes diagnosticados de melanoma, el valor pronóstico y predictivo de los biomarcadores inflamatorios séricos y su teóricamente lógica relación con la respuesta a los tratamientos con inhibidores de los puntos de control inmunitario es desconocido en muchos tipos de tumores. Hasta el momento sólo dos grandes estudios retrospectivos de pacientes con melanoma y un estudio retrospectivo de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas han reflejado como un estado pro-inflamatorio se correlaciona con pobres resultados en pacientes tratados con ciertos inhibidores de los puntos de control inmunitario (266, 295, 296).

Este último estudio ha evidenciado que la combinación de dNLR y LDH basales elevados se correlacionan con resistencia a terapias basadas en inhibidores de puntos de control inmunitario y que ambos parámetros pueden ser usados para desarrollar un índice pronóstico inmune (LIPI, *Lung Immune Prognostic Index*). De esta manera, altos valores de LIPI basal (dNLR>3 y LDH>LSN) se correlacionan de manera estadísticamente significativa con peores resultados en términos de supervivencia en pacientes tratados con inhibidores de puntos

de control inmunitario. Sin embargo, esta correlación no se ha visto en aquellos pacientes tratados con quimioterapia citotóxica estándar.

## INFLAMACIÓN SISTÉMICA Y CÁNCER GÁSTRICO

Varios estudios han investigado la relación entre inflamación sistémica, progresión tumoral y supervivencia en pacientes con CG, evaluándose diferentes *scores* pronósticos basados en variables de inflamación sistémica. La gran mayoría de los estudios publicados hasta la fecha tienen carácter retrospectivo e incluyen pacientes orientales.

Zhao Z y cols. sugieren como elevados valores de LDH en suero podrían ser un marcador independiente de mal pronóstico en pacientes con cáncer gástrico (297). En otro estudio Wang y cols. (298) observaron como los valores elevados en suero de LDH pre-cirugía se asociaban de manera independiente con pobres supervivencias global (SG) y libre de progresión (SLP) en pacientes con cáncer gástrico resecable que se sometieron a una linfadenectomía D2.

También los niveles de fibrinógeno (FBG) han sido investigados en este contexto. La hiperfibrinogenemia pre-operatoria se ha asociado a progresión tumoral en pacientes con CG, y los niveles de FBG han sido reportados como un factor de riesgo independiente para la supervivencia de pacientes con CG operable (299).

El NLR ha sido publicado en varios estudios como un factor pronóstico útil en pacientes con cáncer gástrico (300-306). De manera específica en cáncer gástrico operable, Hirashima y cols. sugirieron que altos valores de NLR se pueden asociar a una pobre supervivencia global, y Jung y cols. mostraron como el aumento en el NLR pre-operatorio es un factor predictor de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global tras resección en pacientes con cáncer gástricos en estadios avanzados (301, 303).

En otro estudio Min y cols. reportaron como los cambios en los valores del NLR post-cirugía reflejan el cambio dinámico de la respuesta inmune después del tratamiento y como el aumento del NLR post-cirugía tenía más fiabilidad que el NLR pre-cirugía en predecir SLP y SG (307).

En un reciente estudio se ha publicado que valores altos de NLR pre-neoadyuvancia y pre-cirugía predicen una peor supervivencia libre de progresión en pacientes con cáncer gástrico en estadios III-IV tratados con

quimioterapia neoadyuvante. Además en este mismo estudio se evidenció como la normalización del NLR tras la terapia neoadyuvante fue un factor predictivo de respuesta y se correlacionaba con un aumento de la supervivencia, sugiriendo que el NLR pre-tratamiento podría ayudar a identificar aquellos pacientes que con mayor probabilidad se beneficiarían de la quimioterapia neoadyuvante, y como la normalización de NLR a lo largo del tratamiento neoadyuvante podría representar un buen indicador pronóstico y predictivo (302).

Varias combinaciones del NLR con otros parámetros inflamatorios y clínicos han sido investigadas tanto para pacientes con tumores potencialmente resecables tanto para pacientes con enfermedad metastásica, reportando en algunos casos resultados prometedores (308-311).

Recientemente un estudio de Song y cols. que analizaba el valor pronóstico de NLR (ratio neutrófilos/linfocitos), dNLR (ratio derivado neutrófilo/linfocitos), MLR (ratio monocitos/linfocitos), PLR (ratio plaquetas/linfocitos) y PNI (índice nutricional pronóstico) pre-quirúrgicos, evidenció como dNLR y MLR podrían ser mejores biomarcadores en predecir la SG, sobre todo en aquellos pacientes con cáncer gástrico avanzado (312).

En otro estudio, en el que se estudiaba el valor pronóstico de distintos biomarcadores de respuesta inflamatoria en el contexto pre-operatorio, Deng y cols. (313) reportaron la superioridad de dNLR y NLR como indicadores pronósticos independientes para SG y SLP respectivamente, pero afirmando la superioridad de NLR como factor pronóstico independiente para la supervivencia cáncer específica (CSS).

Respecto al parámetro PLR, en un reciente metaanálisis se han asociado elevados valores de PLR con una pobre SG en pacientes con cáncer gástrico (314). No obstante, el valor pronóstico de este biomarcador ha sido investigado en diferentes estudios con resultados contradictorios. Zhang y cols, identificaron los parámetros NLR y PLR como factores relacionados con pobre SG y SLP en pacientes con cáncer gástrico, siendo solamente el NLR un factor independiente de supervivencia para SG en pacientes con cáncer gástrico en estadios I-IV (315).

Kim y cols. reportaron resultados parecidos en otro estudio para pacientes con cáncer gástrico sometidos a cirugía con intención curativa y, en una muestra más pequeña de pacientes, Toyokawa y cols. reportaron como el PLR podría ser un factor pronóstico independiente en pacientes en estadios III tratados con cirugía R0 (316, 317).

Por otro lado, también se ha estudiado el potencial valor diagnóstico de estos biomarcadores. Fang y cols. identificaron PLR y NLR como marcadores diagnósticos superiores a los marcadores tumorales CEA y CA19,9 en pacientes con cáncer gástrico en estadio temprano (318).

Respecto al valor del ratio Linfocito/Monocito como marcador pronóstico, Lieto y cols. describieron que los pacientes con valores de LMR bajos, tenían una Hazard Ratio mayor tanto para SG que SLE, respecto a pacientes con valores más elevados de LMR (319). Asimismo, Hsu y cols. (320) reportaron que los pacientes con LMR más bajo tenían tumores más agresivos, tasas de mortalidad quirúrgica más elevadas y peor supervivencia a largo plazo.

Recientemente, Pan YC y cols. analizaron varios parámetros séricos en pacientes chinos con CG sometidos a tumorectomía radical: recuento de leucocitos, linfocitos, neutrófilos, monocitos, plaquetas, NLR, PLR, NWR (ratio neutrófilo/leucocitos), MWR (ratio monocitos/leucocitos), LWR (ratio linfocitos/leucocitos) y LMR. Al igual que lo descrito en los estudios anteriormente citado, valores bajos de LMR se asociaban de manera independiente con pobre SG en esa población de pacientes (321).

Además de los ratios mencionados, un estudio reciente ha evaluado con resultado positivo el valor pronóstico de un nuevo Índice Sistémico Inmunoinflamatorio (SII) basado en el recuento absoluto de neutrófilos (N), plaquetas (P) y linfocitos (L) ( $SII=N \times P/L$ ) en pacientes con cáncer gástrico candidatos a quimioterapia neoadyuvante (322).

En otro estudio, Wang y cols. (323) reportaron como los niveles de SII preoperatorios son un factor pronóstico independiente para SG en pacientes con cáncer gástrico, siendo superior al valor de los parámetros NLR y de PLR.

## INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES E INFLAMACIÓN EN CÁNCER GÁSTRICO

Los cuatro subgrupos de CG descritos en el estudio del *Cancer Genome Atlas Research Network* no mostraron diferencias significativas en supervivencia entre ellos, pero un estudio posterior que agrupaba los pacientes en grupos equivalentes a los descritos previamente pero con una metodología más reproducible en la práctica diaria, sí logró encontrar diferencias significativas en la supervivencia entre los distintos grupos (324).

Los subgrupos de tumores con MSI y CIN se han relacionado con peores cifras de SG comparados con el subtipo EBV, pero con supervivencias más favorables en comparación con los pacientes GS. Estos resultados han sido principalmente atribuidos a las diferencias en el microambiente inflamatorio y a la respuesta inmune observada en los subtipos con mejor pronóstico, más concretamente al desarrollo de una respuesta inmune potenciada por la infección viral en el subtipo EBV y como consecuencia de una mayor tasa de mutaciones y por tanto de neoantígenos en el grupo MSI.

Se ha postulado que estos eventos pueden prevenir el crecimiento de células cancerosas y promover su apoptosis, lo que resultaría en un aumento de la SG.

Como hemos mencionado anteriormente, los tumores MSI-H están fuertemente asociados con un importante infiltrado inmunológico (64, 98, 325-327), el cual parece suprimir las micrometástasis residuales después de la cirugía. A pesar de la falta de una validación sólida de esa premisa, la administración de la quimioterapia y su efecto negativo sobre el sistema inmunitario reduciría el efecto positivo innato del fenotipo MSI-H sobre el pronóstico, mientras que los inhibidores de los puntos de control inmunológico aparentan tener una actividad sinérgica con la respuesta inmunitaria (328-332).

Shin y col. (333) analizaron retrospectivamente una base de datos de pacientes con CG que se sometieron a gastrectomía con intención curativa desde enero de 1996 hasta diciembre de 2011, describiendo como la asociación entre respuesta inmune sistémica/local y el pronóstico del paciente difería según el estado MSI o no del tumor. El diferente pronóstico en los tumores con MSI



podría estar asociado con la inmunogenicidad causada por la inestabilidad de microsatélites y la subsiguiente respuesta inmune del huésped frente a la aparición de neoantígenos. Sin embargo en esa serie no se identificó ninguna correlación entre los parámetros de respuesta inflamatoria sistémica (recuento absoluto de neutrófilos o ANC, recuento absoluto de linfocitos o ALC, NLR, y index pronóstico nutricional PNI) y el estado MSI. Además, se encontró una pobre correlación entre la respuesta inmunitaria local determinada por los Linfocitos Infiltrantes de Tumor (TILs) y la respuesta inmunitaria sistémica (ANC, ALC, NLR, y PNI), con solo una asociación negativa marginal entre PNI y granzima B (GZB) ( $p=0,036$ ).

## TRATAMIENTO DEL CÁNCER GÁSTRICO LOCALIZADO Y LOCALMENTE AVANZADO

La resección quirúrgica del tumor primario y de los ganglios linfáticos locoregionales en estadios precoces sigue siendo a día de hoy el único tratamiento potencialmente curativo en el CG. En el éxito del tratamiento quirúrgico no solamente influyen la extensión de la enfermedad, sino también el tipo de cirugía practicada, la correcta selección de los pacientes y la experiencia del personal involucrado en la misma.

No obstante, y a pesar de la intención potencialmente curativa de la resección quirúrgica, la mayoría de los pacientes que se someten a cirugía recaen.

Los tratamientos neoadyuvante y adyuvante perioperatorios basados en la quimioterapia y/o radioterapia, han sido incorporados dentro del abordaje multidisciplinar del CG para la enfermedad localmente avanzada e incluso en el contexto del CG precoz. Sin embargo, aún no existe consenso universal acerca de cuál debe ser el esquema óptimo y la secuencia de los tratamientos empleados.

---

### TRATAMIENTO QUIRURGICO DEL CÁNCER GÁSTRICO LOCALIZADO

#### **Tratamiento endoscópico del cáncer gástrico precoz**

Según la Clasificación Japonesa, el CG precoz es aquel cuya invasión tumoral está limitada a la mucosa o submucosa gástrica, independientemente de si se acompaña o no de metástasis en los ganglios linfáticos locoregionales, correspondiéndose a la categoría T1 de la clasificación TNM. Tal y como se detallaba en apartados anteriores, en la 7ª edición UICC-TNM los tumores T1 se subdividen en T1a y T1b dependiendo de si la invasión se extiende solamente a la lámina propia y/o muscularis mucosa o afecta también a la submucosa.

En el caso de que se emplee el concepto de cáncer gástrico precoz como el correspondiente al estadio I según la clasificación UICC-TNM, éste englobará los tumores T1N0M0 (estadio IA), T1N1M0 y T2N0M0 (estadio IB).

El riesgo de afectación ganglionar en los tumores T1 es bajo, sobre todo en el caso de tumores bien o moderadamente diferenciados, inferiores a 2 cm de diámetro y sin invasión de la submucosa ni de los vasos linfáticos en la biopsia diagnóstica.

En un estudio, Hölscher y cols. compararon la frecuencia de metástasis ganglionares en pacientes con tumores pT1 en países asiáticos y europeos, siendo en Europa del 6.5% para los carcinomas limitados a la mucosa y del 23.9% para los carcinomas con afectación submucosa frente al 2.7% y 22.9% respectivamente en los pacientes asiáticos (334). Posibles causas de las diferencias en la afectación ganglionar en tumores pT1 pueden ser la profundidad en la afectación de la mucosa (superficial o profunda) que con mayor frecuencia es superficial en los países asiáticos, la localización del tumor primario (en Asia son más frecuentes los tumores del tercio medio e inferior del estómago mientras que en países occidentales son más frecuentes los del tercio superior), y las diferencias biológicas o cambios genómicos o epigenómicos (335, 336). No obstante, estos últimos al no estar realmente bien validados, son aún motivo de futuros estudios.

Las opciones terapéuticas en el CG precoz pasan por la resección mucosa endoscópica (EMR), la disección endoscópica submucosa (ESD), la gastrectomía distal y la gastrectomía con disección ganglionar radical.

En los últimos 15 años la EMR ha sido considerada el tratamiento de elección en países con alta incidencia de CG como Japón (337, 338), a pesar de la falta de estudios randomizados que comparen la resección endoscópica frente a cirugía abierta, lográndose supervivencias libres de enfermedad superiores al 95% a los 10 años y tasas de recidivas locales inferiores al 6%, con un perfil de complicaciones aceptable e inferior al que presenta la cirugía tradicional (0.6% de perforaciones, 14% de sangrado post-resección).

En los países occidentales, la baja frecuencia de CG precoz y la alta frecuencia de metástasis ganglionares, además de la dificultad para descartar radiológicamente la afectación ganglionar y la falta de ensayos clínicos randomizados, hacen que el estándar de tratamiento continúe siendo la gastrectomía.

Las últimas guías de ESMO (339) recomiendan la resección endoscópica solamente para tumores gástricos en estadios muy precoces, que afectan la mucosa (T1a), que sean bien diferenciados, inferiores a 2 cm y no ulcerados, coincidiendo con las indicaciones de la última versión del guías para el tratamiento del CG de la *Japan Gastric Cancer Association* (JGCA). En la misma se recomienda el empleo de gastrectomía D1 para tumores gástricos cT1b, bien diferenciados, inferiores o iguales a 1.5 cm (338).

### **Tratamiento quirúrgico del tumor primario**

La extensión de la resección gástrica a implementar depende de la localización del tumor primario y del tipo histológico, y las guías mencionadas la recomiendan para pacientes con CG en estadios IB-III, en los cuales el tratamiento quirúrgico se recomienda como parte de un abordaje multidisciplinar. En estos casos, las técnicas quirúrgicas que pueden emplearse incluyen:

- Gastrectomía total (GT) - para tumores del tercio proximal, tercio medio o en aquellos casos de tipo difuso de la Clasificación de Lauren
- Gastrectomía subtotal (GsT) – para tumores del tercio distal, excepto para tumores de grande tamaño
- Gastrectomía proximal – para tumores T1 de cardias que afectan los primeros 4-5 cm del mismo
- Gastrectomía con preservación pilórica – para tumores T1 distales que afectan los primeros 3-4 del antro

La extirpación en continuidad de órganos vecinos está indicada únicamente en tumores con invasión transmural (T4), sin carcinomatosis ni enfermedad a distancia, en los que se pueda garantizar una resección R0, pues la afección microscópica de los márgenes quirúrgicos (R1) tiene un impacto negativo en la supervivencia. La distancia aconsejada entre margen de resección de la pieza de gastrectomía y el borde palpable del tumor debe ser de entre 5 y 8 cm.

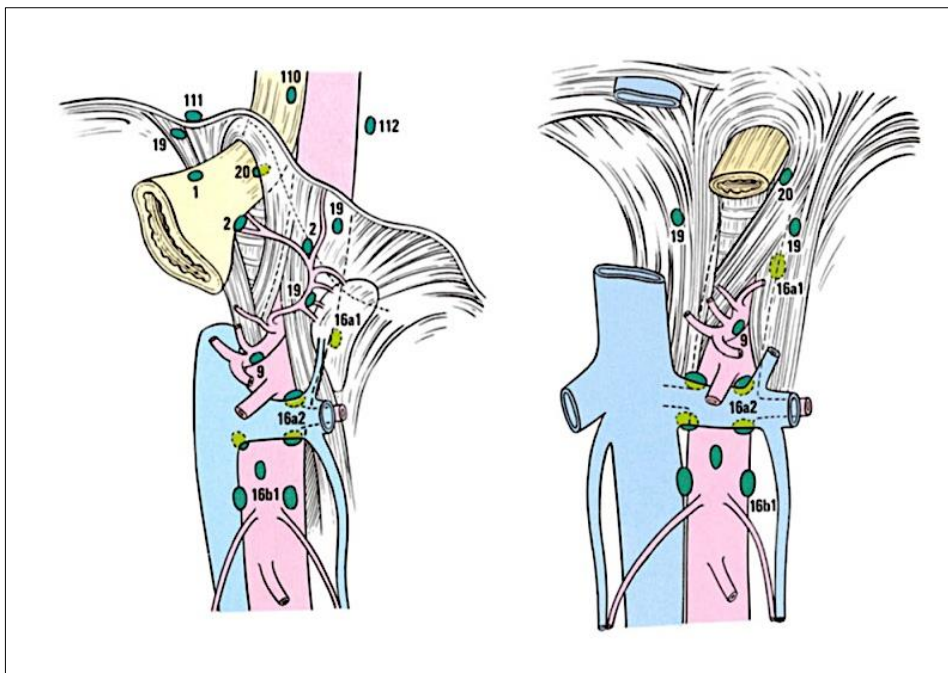
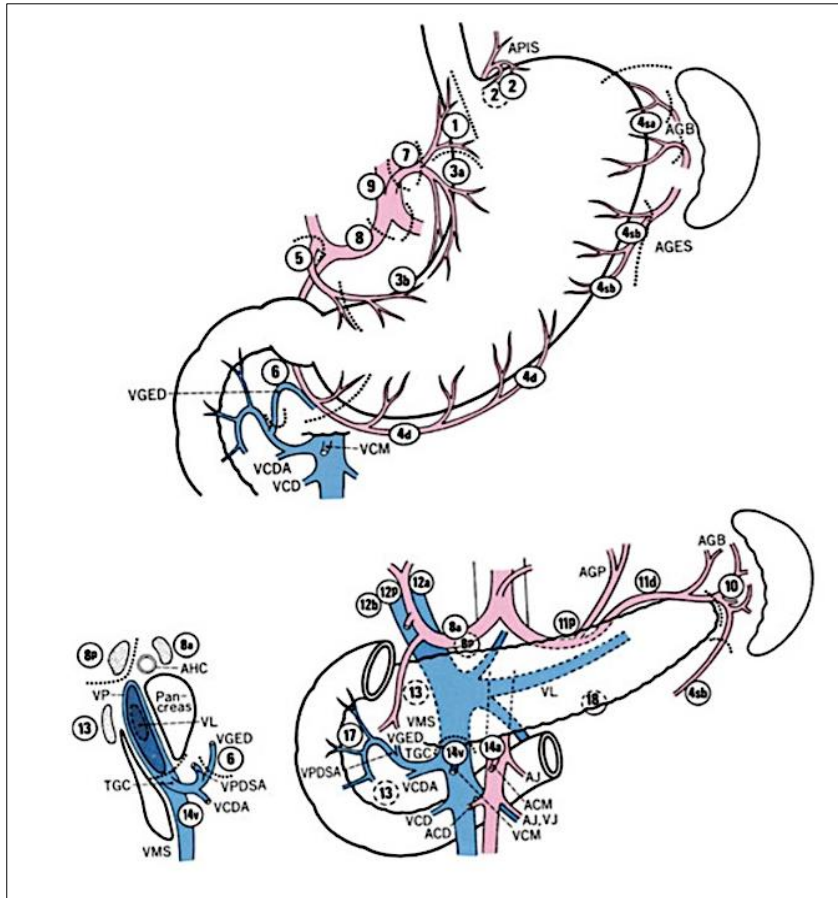
Los pacientes candidatos a cirugía radical deberían someterse a resecciones D2 en centros quirúrgicos especializados, habiéndose publicado como a mayor

experiencia del equipo quirúrgico, se obtienen mejores resultados en términos de morbimortalidad.

En los últimos 15 años, diferentes ensayos clínicos randomizados y un metanálisis han avalado la eficacia y seguridad de la gastrectomía asistida por laparoscopia (340-342). Un metaanálisis recientemente publicado en el que se comparaba la gastrectomía total laparoscópica frente a la gastrectomía abierta (343), y que incluye 1532 pacientes procedentes de un único ensayo clínico randomizado y pacientes de 12 estudios observacionales, se concluye que el abordaje laparoscópico ofrece resultados equiparables respecto a número de ganglios linfáticos resecados, tasas de recurrencia y de supervivencia, con menor morbilidad postoperatoria y con recuperación más rápida. No obstante estos resultados, se enfatizaba la necesidad de más estudios randomizados en este contexto y con mayor seguimiento a largo plazo.

**Linfadenectomía locorregional.** La extensión de la linfadenectomía locorregional, necesaria como parte de la extirpación de un carcinoma gástrico, sigue siendo motivo de debate. En la última versión de las guías para el tratamiento del CG de la *Japan Gastric Cancer Association* (JGCA), se redefinen los 4 tipos de abordajes quirúrgicos de acuerdo con el tipo de gastrectomía empleado y la extensión de las estaciones ganglionares resecadas en la linfadenectomía de acuerdo a la descripción de las mismas en la *Japanese Classification of Gastric Carcinoma* (JCGC) (21).

Figura 6. Estaciones ganglionares definidas por el JCGC.



- **Gastrectomía total**

D0: Linfadenectomía inferior a linfadenectomía D1

D1: Nos. 1-7

D1+: D1 + No. 8a, 9, 11p

D2: D1 + No. 8a, 9, 10, 11p, 11d, 12a

En el caso de tumores que invaden el esófago, la D1+ incluye No. 11 y la D2 incluye No. 19, 20, 110 y 111

- **Gastrectomía distal**

D0: Linfadenectomía inferior a linfadenectomía D1

D1: No. 1, 3, 4sb, 4d, 5, 6, 7

D1+: D1 + No. 8a, 9

D2: D1 + No. 8a, 9, 11p y 12a

- **Gastrectomía proximal**

D0: Linfadenectomía inferior a linfadenectomía D1

D1: No. 1, 2, 3a, 4sa, 4sb, 7

D1+: D1 + No. 8a, 9, 11p

En el caso de tumores que invaden el esófago, la D1+ incluye No. 110.

- **Gastrectomía con preservación pilórica**

D0: Linfadenectomía inferior a linfadenectomía D1

D1: No. 1, 3, 4sb, 4d, 6, 7

D1+: D1 + No. 8a, 9

En principio y de manera global, la linfadenectomía D1 está indicada en tumores gástricos T1a que no cumplen criterios para EMR/ESD y en aquellos cT1bN0 de histología diferenciada y de diámetro inferior a 1.5 cm. La linfadenectomía D1+ está indicada en los tumores gástricos cT1N0 que no entran dentro de lo mencionado para la linfadenectomía D1, mientras que la linfadenectomía D2 se destina a tumores gástricos potencialmente curables cN+ o T2-T4. De modo general, la linfadenectomía D2 debería ser el procedimiento de elección siempre que haya sospecha de invasión ganglionar.

Si en Japón la gastrectomía con linfadenectomía D2 es el tratamiento estándar del cáncer gástrico potencialmente curable (344), en los países occidentales su posible beneficio con respecto a la supervivencia del paciente sigue considerándose un tema controvertido. Esta controversia viene motivada por

los resultados negativos obtenidos en cuatro ensayos randomizados que comparaban específicamente el impacto en la supervivencia de los pacientes que eran sometidos a una linfadenectomía D2 frente a pacientes sometidos a una linfadenectomía D1.

Los dos primeros estudios fueron realizados por Dent y cols. en Sudáfrica (345) y por Robertson y cols. en Hong Kong (346). Dado el escaso tamaño muestral, se consideraron insuficientes, y motivaron dos estudios amplios a nivel europeo.

El primero fue realizado por el *British Medical Research Council* (MRC) e incluyó 400 pacientes con CG reseccable (347). Aleatorizados a linfadenectomía D1 o D2, el grupo sometido a una resección más amplia mostró una mayor mortalidad operatoria (13% vs. 6.5%,  $p= 0,04$ ) y mayores complicaciones postoperatorias (46% vs. 28%,  $p< 0.001$ ), sin obtener ningún beneficio en términos de supervivencia global (33% vs. 35%, HR 1,10, IC95% 0,87-1,39).

El segundo estudio fue llevado a cabo por el grupo Holandés de Cáncer Gástrico e incluyó 996 pacientes reclutados en 80 distintos hospitales (348). Tanto la morbilidad como la mortalidad postoperatoria fueron superiores en el grupo de linfadenectomía D2 (43% vs. 25%,  $p< 0,001$  y 10% vs. 4%,  $p= 0,004$  respectivamente). A pesar de un seguimiento de 11 años, los resultados a largo plazo no demostraron una mejoría en la supervivencia de los pacientes sometidos a linfadenectomía D2, aunque sí se observó un modesto beneficio en el subgrupo de pacientes con estadio II y IIIA de la clasificación TNM (349).

El análisis comparativo de la morbimortalidad entre ambos tipos de linfadenectomía en los diferentes estudios, ha permitido concluir que los excelentes resultados obtenidos en los centros japoneses (menos del 1% de mortalidad) sólo son igualados en los países occidentales por cirujanos con amplia experiencia en este tipo de intervenciones. La falta de experiencia quirúrgica en el ensayo británico y la realización rutinaria de esplenopancreatectomías distales en el ensayo holandés se consideraron factores fundamentales que contribuyeron al incremento de la morbimortalidad en los grupos sometidos a linfadenectomía D2 y a los resultados negativos obtenidos en ambos estudios (350).



Recientemente se ha publicado un metaanálisis incluyendo ocho ensayos clínicos randomizados que incluyen un total de 2.515 pacientes, en el que se concluye que la linfadenectomía D2 se asocia a un aumento de la mortalidad postoperatoria, lo que en última instancia reduce el beneficio terapéutico (351). Sin embargo, se describen también los beneficios y riesgos asociados a la linfadenectomía D2 comparada con la D1 mediante el cálculo de la diferencia entre las muertes evitadas (71/1000) frente a las muertes causadas (38/1000) por la disección ganglionar extensa, lo cual se traduce en un beneficio neto de 33 muertes evitadas por cada 1.000 linfadenectomía D2 realizadas.

Las guías de la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) y de la *European Society for Medical Oncology* (ESMO) recomiendan la realización de una linfadenectomía D2 modificada (sin esplenectomía ni pancreatectomía) siempre que el estado fisiológico del paciente sea adecuado y el procedimiento se lleve a cabo por cirujanos expertos. En la actualidad se recomienda realizar la esplenectomía sólo en casos en que haya infiltración del bazo o ganglios sospechosos en el hilio esplénico.

Esta limitación en la realización de esplenectomías como parte de la linfadenectomía D2 se basa en el impacto de la esplenectomía en la morbimortalidad perioperatoria y la supervivencia de los pacientes. Tanto el estudio del MRC como el del grupo holandés que compararon linfadenectomía D1 y D2 mostraron un efecto negativo de la esplenectomía en la supervivencia de los pacientes sometidos a este procedimiento. Técnicamente, para llevar a cabo la esplenectomía muchas veces se precisa de la realización de una pancreatectomía córporocaudal o distal que permite asegurar una correcta exposición y limpieza de los ganglios linfáticos situados a lo largo de la arteria esplénica. Este abordaje quirúrgico se demostró como un factor de riesgo de mayores complicaciones quirúrgicas en el estudio holandés antes mencionado y de mayor morbimortalidad y peor supervivencia en el estudio británico. Sin embargo, un análisis del subgrupo de pacientes de este último estudio sometidos a linfadenectomía D2 sin esplenopancreatectomía, mostró una supervivencia global superior al grupo que se sometió a linfadenectomía D1.

## TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO Y/O RADIOTERÁPICO EN ENFERMEDAD LOCALIZADA O LOCALMENTE AVANZADA POTENCIALMENTE RESECABLE

A lo largo de los años, junto a la cirugía se han ido incorporando diferentes secuencias de tratamiento quimioterápico y/o radioterápico perioperatorio en la enfermedad localizada y localmente avanzada del CG. Sin embargo, a día de hoy sigue sin haber un consenso universalmente aceptado acerca de cuál es la mejor estrategia terapéutica, y el tratamiento complementario a la cirugía va a variar según el área geográfica. De manera resumida, se puede decir que frente al empleo exclusivo de la cirugía como tratamiento del paciente con cáncer gástrico resecable, en Asia se emplea la quimioterapia adyuvante de manera rutinaria, en Norteamérica el tratamiento con quimio-radioterapia adyuvante, y en la mayoría de los centros europeos el tratamiento quimioterápico perioperatorio es el estándar. Todos estos abordajes han demostrado un beneficio significativo en términos de supervivencia en ensayos clínicos aleatorizados.

**Tratamiento quimioterápico perioperatorio.** En los países occidentales, la mayoría de los pacientes tienen un CG localmente avanzado al diagnóstico. En estos casos la práctica de una cirugía completa con márgenes quirúrgicos libres de neoplasia (R0) es posible sólo en la mitad de los casos, con más de un 60% de recaídas tumorales en los 3 años sucesivos a la intervención quirúrgica (352).

La administración de un tratamiento preoperatorio o neoadyuvante en estos pacientes puede permitir la erradicación de las metástasis ocultas responsables de un alto porcentaje de recidivas precoces a distancia, permitiendo además la realización de cirugías completas con intención curativas en casos inicialmente no resecables o dudosos. Para ello es fundamental una correcta estadificación preoperatoria que permita definir con exactitud la profundidad de la infiltración tumoral de la pared gástrica y la presencia o no de afectación de los ganglios linfáticos locoregionales mediante ecoendoscopia, TC toracoabdominopélvica y/o PET-TC.

El estudio pivotal que estableció esta aproximación terapéutica con un nivel de evidencia 1, ha sido el ensayo clínico randomizado de fase III MAGIC publicado en 2006 (353). En este ensayo los pacientes con adenocarcinoma gástrico o del tercio inferior esofágico resecables se aleatorizaron a ser sometidos a cirugía de entrada o a recibir 3 ciclos de quimioterapia neoadyuvante (preoperatoria) con Epirrubicina, Cisplatino y 5-Fluorouracilo seguidos de cirugía y 3 ciclos adyuvantes del mismo esquema quimioterápico. Sólo el 42% de los pacientes lograron recibir el tratamiento propuesto inicialmente y sólo el 86% de los pacientes que completaron la quimioterapia preoperatoria completaron el tratamiento postquirúrgico. A pesar de ello, el grupo asignado a recibir quimioterapia perioperatoria logró un incremento clínico y estadísticamente significativo tanto en términos de supervivencia global (porcentaje de vivos a los 5 años 36% vs. 23%, HR 0,75, IC95% 0,6-09,  $p=0,009$ ) como de supervivencia libre de enfermedad (HR 0,66, IC95% 0,53-0,81,  $p=0,001$ ). Asimismo la tasa de resecciones consideradas curativas (R0) fueron superiores en el grupo que recibió tratamiento perioepratorio (79,3% vs. 70%,  $p=0,03$ ), no evidenciándose ningún incremento en la morbimortalidad perioperatoria.

Posteriormente el grupo francés presentó sus resultados de un estudio de fase III randomizado (354) en el que los pacientes recibían 2-3 ciclos de Cisplatino y 5-Fluorouracilo de manera preoperatoria y 3-4 ciclos posteriores frente al tratamiento quirúrgico exclusivo. De manera similar a lo observado en el estudio MAGIC, la administración de quimioterapia perioperatoria según el esquema Cisplatino/5-Fluorouracilo logró un aumento significativo en la supervivencia global de los pacientes.

El estudio FLOT4-AIO, en el que se aleatorizaron 716 pacientes con adenocarcinoma gástrico y de la UGE resecables, ha sido el más reciente en este sentido y ha demostrado la superioridad del esquema FLOT (Docetaxel, Leucovorin, Oxaliplatino, 5-fluorouracilo) frente al esquema ECF/ECX (empleado en el estudio MAGIC) en términos de supervivencia global. Con un seguimiento de 43 meses, la mediana de SG fue de 50 meses vs. 35 meses, con una SG a los 3 años del 57% vs. 48% a favor del esquema FLOT. El

beneficio en supervivencia se mantenía en el tiempo con una SG a 5 años del 45% vs. 36%. Cabe remarcar que en todos los estudios de subgrupos realizados el beneficio era claramente significativo o con una tendencia a ser significativo a favor del esquema FLOT (355).

Recientemente se han publicado dos estudios de fase III asiáticos que han evaluado la eficacia del tratamiento perioperatorio en esta misma población.

El estudio RESOLVE, que evaluaba pacientes cT4aN+M0 o cT4bNxM0 con carcinomas gástricos o de la UGE, constaba de tres brazos: brazo A, adyuvancia con CAPOX tras cirugía D2; brazo B, adyuvancia con SOX (S1 y Oxaliplatino) tras cirugía D2; brazo C, tres ciclos de SOX pre-operatorio seguido de cinco ciclos de SOX post-operatorios. SOX perioperatorio fue superior a CAPOX adyuvante (SLP a los 3 años del 62% vs. 54,8%, HR 0,79: IC95% 0,62-0,99, p=0,045), y SOX post-operatorio no fue superior a CAPOX post-operatorio (SLP a los 3 años del 60,3% vs. 54,8%, HR 0,85: IC95% 0,67-1,07, p=0,162) (356).

El estudio PRODIGY evaluó en 484 pacientes diagnosticados de adenocarcinoma gástrico o de la UGE cT2/3N+M0 o cT4/NxM0 el tratamiento con tres ciclos de Docetaxel, Xxaliplatino y S1 (DOS) seguido de cirugía D2 y S1 adyuvante (ocho ciclos) frente a cirugía y adyuvancia con S1 (ocho ciclos). El objetivo principal fue la SLP a 3 años. El esquema preoperatorio condujo a un mayor porcentaje de resecciones R0 (96,4 % vs. 85,8 %, p<0,001) y una mayor SLP a 3 años (66,3 % vs. 60,2%, HR 0,70: IC95% 0,52-0,95, p=0,023) (357).

**Tratamiento quimio-radioterápico neoadyuvante.** El tratamiento neoadyuvante ha demostrado conseguir la reducción del tumor primario permitiendo resecciones potencialmente curativas en casos inicialmente de resecabilidad dudosa, sin comprometer por ello la supervivencia a largo plazo de los pacientes además de permitir un tratamiento precoz de la enfermedad micrometastásica.

Además de los esquemas de tratamiento exclusivamente quimioterápico previamente comentados, el tratamiento sistémico neoadyuvante se ha

asociado a la radioterapia de forma concomitante, siendo esta combinación más frecuentemente usada en los tumores de esófago y de la UGE mientras que sigue siendo poco explorada en los tumores gástricos distales.

Los estudios CROSS (358, 359), CALGB9781 (360) y el estudio irlandés (361), incluían pacientes con tumores de esófago y de la UGE y obtuvieron resultados positivos para el tratamiento con QT/RT preoperatoria frente a la cirugía sola.

Diversos metaanálisis han objetivado beneficio del tratamiento de QT/RT concomitante comparado con cirugía sola en el cáncer de esófago y de la UGE (362, 363). Aun así no hay estudios que comparen directamente entre si los esquemas de quimioterápicos utilizados en los estudios comentados.

Existe un metaanálisis de 10 estudios clínicos que analizaba los resultados de la cirugía sola, el tratamiento preoperatorio concomitante con taxano y platino o con platino y 5-FU (364). La combinación de taxano/platino comparada con platino/5-FU fue significativamente mejor solo para los tumores escamosos (HR 0,61; IC95% 0,41-0,91), sin encontrar diferencias en los adenocarcinomas (HR 0,91; IC95% 0,61-1,36).

Entre los estudios que han comparado el uso de quimiorradioterapia (QT/RT) *versus* quimioterapia neoadyuvantes seguidas de cirugía se encuentran el estudio POET (365, 366), cerrado de forma prematura por bajo reclutamiento, así como un estudio randomizado sueco (367) y otro australiano (368). Ninguno de ellos lograron demostrar un aumento de la supervivencia global en ninguno de los dos grupos de pacientes analizados.

Un metaanálisis de los tres estudios concluyó que no había beneficio en la SG del tratamiento neoadyuvante con QT/RT sobre el tratamiento con quimioterapia sola. Tampoco se obtuvo mejores resultados con las respuestas patológicas y las resecciones R0 (369).

Varios estudios se encuentran en marcha en el momento actual para responder de manera definitiva a la cuestión de qué tratamiento es mejor, si la QT neoadyuvante o bien la QT/RT neoadyuvante. El estudio ESOPEC evalúa la estrategia FLOT perioperatorio *versus* la administración de Carboplatino y Paclitaxel concomitantes con Radioterapia neoadyuvante en adenocarcinomas

del esófago y de la UGE (NCT02509286). El estudio TOPGEAR asimismo evalúa la quimiorradioterapia preoperatoria y la quimioterapia perioperatoria (NCT01924819). Finalmente, el estudio NCT01726452 compara los esquemas del estudio MAGIC (quimioterapia perioperatoria) con los del estudio CROSS (quimiorradioterapia preoperatoria).

Aparte del estudio de diferentes abordajes terapéuticos multimodales son precisos los resultados de estudios con biomarcadores, como los del estudio INNOVATION (NCT02205047), que evalúa el papel de Trastuzumab en enfermedad HER2 resecable y el papel que podría tener la inmunoterapia en esta enfermedad.

**Tratamiento quimioterápico adyuvante.** La necesidad de un tratamiento sistémico postoperatorio se justifica por la estrecha relación entre la supervivencia de los pacientes y su estadio patológico al diagnóstico. Los pacientes con CG precoz presentan tasas de curación del 80% sólo con tratamiento quirúrgico mientras que la tasa de supervivencia global a los 5 años es inferior al 50% para pacientes con estadio II e inferior al 20% para aquellos diagnosticados en estadio III (370).

Este pronóstico infausto hace que sea necesaria la búsqueda de tratamientos postoperatorios que mejoren los resultados alcanzados con la cirugía. En este sentido, en Europa destacan dos trabajos con 228 y 400 pacientes respectivamente que no consiguieron demostrar beneficios estadísticamente significativos en supervivencia global (371, 372). Ambos estudios evidenciaron un pobre cumplimiento terapéutico de los esquemas postoperatorios. Posteriormente otros estudios europeos como el del grupo francés (373) tampoco han conseguido demostrar beneficio de la quimioterapia adyuvante.

Al contrario de lo ocurrido con los estudios europeos, un estudio japonés ha logrado un impacto positivo en la supervivencia mediante el uso de un derivado fluoropirimidínico de 4ª generación, el S-1 (374). Tras demostrar su actividad antitumoral en los casos de cáncer gástrico avanzado, se llevó a cabo un ensayo clínico en el que se incluyeron 1059 pacientes sometidos a cirugía con intención curativa y linfadenectomía D2. Los participantes fueron randomizados a recibir cirugía aislada o cirugía seguida de S-1 en monoterapia durante 1 año.

La supervivencia global a los 3 años fue estadísticamente significativa y a favor del grupo que recibía S-1 (80,1% vs. 70,1%, HR 0,69, IC95% 0,52-0,87,  $p=0,003$ ). Además el cumplimiento terapéutico fue notablemente superior (65,8%) a lo publicado en estudios anteriores, por lo que los autores recomiendan el empleo de S-1 como terapia adyuvante tras resección curativa con linfadenectomía D2 de una neoplasia gástrica. En Japón este esquema terapéutico es de hecho el estándar actual en el tratamiento de estos pacientes.

Otro estudio asiático coincidente en el valor del tratamiento adyuvante postoperatorio con quimioterapia es el estudio CLASSIC, que randomizó 1035 pacientes sometidos a gastrectomía con linfadenectomía D2 a recibir quimioterapia con Capecitabina y Oxaliplatino durante 6 meses o a simple observación (375). En este estudio se demostró un beneficio en supervivencia libre de progresión a los 5 años para el grupo de pacientes tratados con quimioterapia postoperatoria con una HR de 0,58 (IC95% 0,47-0,72,  $p<0,0001$ ). Los datos maduros de supervivencia global publicados en 2014 corroboran el beneficio en supervivencia global, con una disminución del riesgo de muerte del 34% (HR 0,66, IC95% 0,51-0,85,  $p<0,0015$ ), con tasas estimadas de supervivencia a 5 años del 78% frente al 69% a favor de la rama de quimioterapia (376).

Ante la falta de resultados concluyentes y globales sobre el uso de la quimioterapia adyuvante en CG, en los últimos 20 años se han publicado múltiples metaanálisis que incluyen la mayoría de los estudios realizados. En un metaanálisis publicado en 2013 (377), se analizan 34 ensayos clínicos por un total de 7825 pacientes, mostrando un beneficio estadísticamente significativo con una reducción del riesgo de muerte del 15% (HR 0,85 IC95% 0,80-0,90) y del 21% del riesgo de recidiva (HR 0,79 IC95% 0,72-0,87). Estos resultados son coincidentes con otras revisiones realizadas en los últimos años (378, 379), aunque se reconozca que existe un alto riesgo de sesgo en los resultados debido a las limitaciones metodológicas y de presentación de resultados en los estudios incluidos. En el análisis por subgrupos, este beneficio parece ser

mayor, pero no exclusivo, en los pacientes con afectación ganglionar tumoral en la pieza quirúrgica.

**Tratamiento quimio-radioterápico adyuvante.** En el año 2001 MacDonald y cols. publicaron los resultados del estudio INT116 del *Southwest Oncology Group* (SWOG) (380). En este ensayo clínico 556 pacientes sometidos a una resección potencialmente curativa de su neoplasia gástrica eran randomizados a tratamiento quimio-radioterápico adyuvante basado en 5-Fluorouracilo hasta alcanzar una dosis radioterápica total de 45 Gy frente a seguimiento exhaustivo. Tras un seguimiento medio de 5 años, el grupo que recibió tratamiento quimio-radioterápico adyuvante logró un aumento de la supervivencia global a los 5 años del 11,6% (40% vs. 28,4%  $p=0,001$ ), así como un incremento en la supervivencia libre de recaída a los 5 años (25% vs. 31%  $p=0,001$ ). La actualización de los datos de este estudio en 2012 están en concordancia con los primeramente publicados (381). Estos resultados llevan a los autores a concluir que el tratamiento quimioradioterápico concomitante postoperatorio debe considerarse el tratamiento estándar en los pacientes intervenidos con intención curativa por un CG, abordaje que de facto se considera estándar para esos pacientes en los Estados Unidos de Norteamérica (EEUU).

Es importante destacar que diversos problemas metodológicos han llevado a cuestionar en Europa y Asia la validez de estas conclusiones. Lo más discutido es el escaso número de pacientes que fueron sometidos a gastrectomía con una linfadenectomía adecuada (el 54% de los pacientes fueron sometidos a gastrectomía sin linfadenectomía, es decir D0). Además el beneficio parece lograrse por una disminución de las recidivas locoregionales, por cuanto las recaídas a distancia sean idénticas entre los 2 grupos del estudio, poniendo en duda el papel de la radioterapia adyuvante en pacientes sometidos a resecciones D2.

En 2012 se publicaron los resultados del estudio ARTIST (382) en el que se randomizaron 458 pacientes asiáticos sometidos a gastrectomía R0 y con al menos una linfadenectomía D2 a recibir 6 ciclos de quimioterapia adyuvante con Capecitabina y Cisplatino o quimio-radioterapia con Capecitabina asociada



a 2 ciclos previos y 2 ciclos posteriores de quimioterapia con Capecitabina y Cisplatino. Este estudio fue finalmente negativo, no evidenciándose diferencias estadísticamente significativas entre los dos brazos de pacientes (SLP a los 3 años 74,2% vs. 78,2%,  $p=0,0086$ ). En el análisis por subgrupos se detectó una ventaja en SLP a los 3 años en los pacientes con afectación ganglionar a favor de la quimio-radioterapia (72,3% vs. 77,5%,  $p=0,0365$ ), estando pendiente el desarrollo de un ensayo clínico, el ARTIST-II, en este subgrupo de pacientes. Los datos maduros de supervivencia global están pendientes de publicación. Es importante destacar que la adición de radioterapia no mostró diferencias estadísticamente significativas en la tasa de recurrencias locorregionales ni de metástasis a distancia entre los 2 grupos de pacientes.

El estudio CRITICS, realizado en Holanda en pacientes con adenocarcinoma gástrico con estadios IB-IV potencialmente resecable, no logró demostrar diferencias significativas en la supervivencia global a los 5 años entre los dos grupos de pacientes (mediana de seguimiento 4,2 años, 40,8% para QT vs. 40,9% para QT/RT) (383). Los pacientes recibían tres ciclos de ECX/EOX de inducción seguidos de cirugía radical y posteriormente se aleatorizaban a quimioterapia con el mismo esquema de la inducción, o a quimiorradioterapia con 45 Gy en 25 fracciones con cisplatino semanal y capecitabina diaria. Todos los pacientes debían tener linfadenectomía D1 o superior, con 15 o más ganglios estudiados. Es importante además destacar que solo la mitad de los pacientes en ambos grupos pudieron completar el tratamiento especificado.

Otro metaanálisis de 6 estudios concluía que la quimiorradioterapia se asociaba a una mejoría significativa de la SLP a 5 años (OR 1,56; IC95% 1,09-2,24) y menos recidivas locorregionales (OR 0,46; IC95% 0,32-0,67). Había sin embargo una mejoría no significativa de la SG (OR 1,32; IC95% 0,92-1,99) (384).

Por todo lo anteriormente explicado, en el momento actual no hay un consenso sobre que esquema utilizar. Tampoco hay un consenso sobre cuando debe iniciarse el tratamiento adyuvante después de la cirugía. Se asume que se debería iniciar antes de las 8 semanas tras la intervención quirúrgica, basándose en los periodos de inclusión permitidos en los ensayos clínicos

publicados. Este marco temporal no tiene en cuenta sin embargo el hecho de que muchos de estos pacientes no logran un estado óptimo de recuperación antes de las 8 semanas, por lo que muchos clínicos asumen como indicado iniciarlo antes de las 12 semanas (385). Se desconoce si este retraso de las 8 a las 12 semanas pueda tener un impacto en la supervivencia de los pacientes (386).

En definitiva, a pesar de los avances logrados con el tratamiento multidisciplinario que incluye la cirugía con intención curativa y la quimioterapia en los pacientes con cáncer gástrico o de la unión gastroesofágica, el cumplimiento del tratamiento postquirúrgico y la supervivencia a largo plazo siguen siendo insuficientes y determinan un mal pronóstico en la mayoría de estos pacientes. Es por ello que se hace necesaria la búsqueda de biomarcadores pronósticos y predictivos fiables, que permitan clasificar de manera más adecuada los pacientes para poder elegir el mejor tratamiento para cada uno de ellos, mejorando el cumplimiento terapéutico y consecuentemente su supervivencia global y libre de enfermedad.

# HIPÓTESIS



El estudio de los parámetros inflamatorios séricos y de la inestabilidad de microsatélites (IMS) en pacientes con adenocarcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica candidatos a tratamiento con intención curativa, puede ayudar a establecer nuevos factores pronósticos que permitan identificar una terapia personalizada en estos pacientes. Si esta hipótesis se confirmara, nuestros datos podrían contribuir al cambio de paradigma que supone la búsqueda de dianas terapéuticas en pacientes diagnosticados en estadios iniciales.



# OBJETIVOS





1. Describir las características clínico-patológicas de la población de pacientes con adenocarcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica candidatos a tratamiento con intención curativa.
2. Describir los parámetros de inflamación sistémica y la incidencia de la inestabilidad de microsatélites en esta población.
3. Determinar las posibles relaciones entre las variables clínico-patológicas, los parámetros de inflamación sistémica y la inestabilidad de microsatélites en la misma población.
4. Determinar el papel pronóstico de las variables clínico-patológicas y de la inestabilidad de microsatélites en la supervivencia global y en la supervivencia libre de progresión.
5. Determinar el papel pronóstico de los parámetros de inflamación sistémica en la supervivencia global y en la supervivencia libre de progresión.
6. Identificar subgrupos de pacientes con diferente pronóstico dentro de la misma población mediante un estudio molecular extenso.



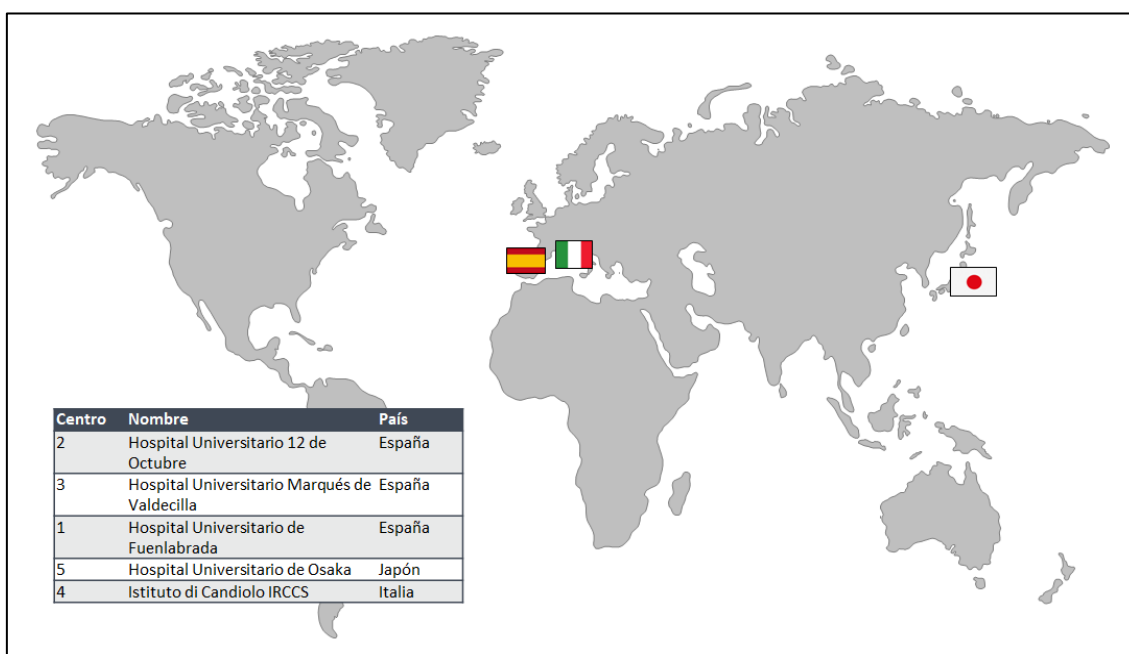
# MATERIAL Y MÉTODOS



## SELECCIÓN DE CASOS Y RECOGIDA DE VARIABLES

Los pacientes con cáncer gástrico o de la unión gastroesofágica candidatos a tratamiento sistémico perioperatorio y cirugía con intención curativa estudiados en este proyecto de tesis, proceden de diferentes centros hospitalarios de España, Italia y Japón. En concreto se obtuvieron pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, España), Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, España), Hospital Universitario de Fuenlabrada (Fuenlabrada, España), Hospital Universitario de Osaka (Osaka, Japón), Istituto di Candiolo IRCCS (Candiolo, Italia).

**Figura 7. Mapa de centros hospitalarios participantes.**



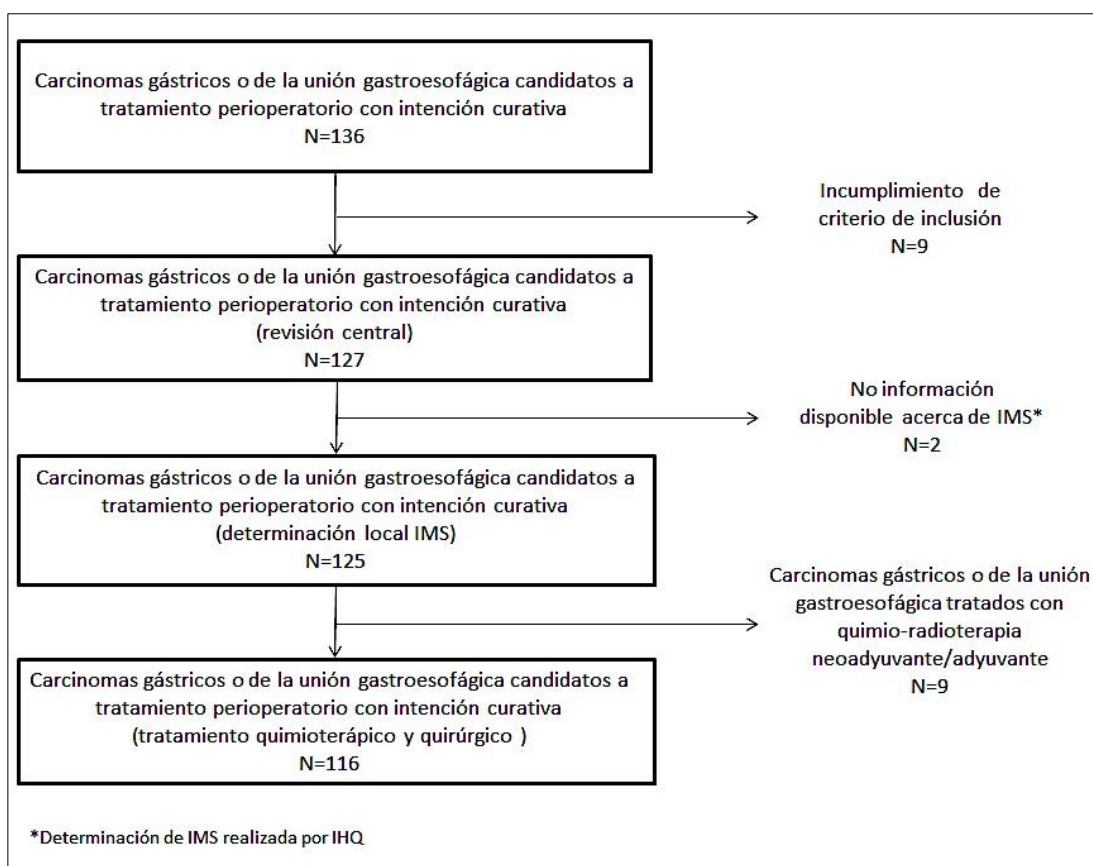
Todas las muestras y los datos demográficos, clínicos e histopatológicos recogidos para el desarrollo de esta tesis pertenecen a pacientes diagnosticados y tratados en los hospitales antes mencionados entre los años 2013 y 2017. Se ha realizado posteriormente un seguimiento del estado de los pacientes incluidos hasta el 31 de diciembre de 2019, excepto para el subgrupo del Hospital Universitario 12 de Octubre en el cual se ha hecho un sub-análisis incluyendo datos actualizados hasta el 31 de diciembre de 2020.

Los criterios para la selección de casos a incluir fueron:

1. Diagnóstico de adenocarcinoma gástrico o de unión gastroesofágica entre los años 2013-2017
2. Confirmación histológica de adenocarcinoma gástrico o de unión gastroesofágica
3. Enfermedad localizada o localmente avanzada potencialmente resecable en el momento del diagnóstico según la 7ª edición de la estadificación TNM
4. Administración de tratamiento sistémico con intención neoadyuvante pre o perioperatorio
5. Disponibilidad de todos los datos clínicos e histopatológicos, así como el adecuado seguimiento de cada caso para su posterior análisis, incluyendo la evaluación de respuesta tumoral según criterios RECIST 1.1 (Anexo I)
6. Disponibilidad de material histopatológico suficiente para su revisión y para la realización de las determinaciones moleculares precisas y detalladas más adelante en esta tesis.

Se valoraron un total de 136 pacientes. Tras su revisión central, se excluyeron inicialmente 9 pacientes al incumplir al menos uno de los criterios de inclusión arriba mencionados. De los 127 pacientes restantes con enfermedad potencialmente resecable y tratados con un régimen perioperatorio fueron finalmente estudiados 116 pacientes. Se excluyeron específicamente los pacientes que recibieron quimio-radioterapia concurrente preoperatoria al tratarse de un grupo de pacientes con carcinomas esencialmente de esófago distal y en los cuales los fármacos y las dosis empleadas no pueden ser considerados como un tratamiento sistémico completo sino esencialmente como una terapia radiosensibilizante (Figura 8).

**Figura 8. Diagrama de flujo de los pacientes del estudio.**



El análisis histopatológico de las muestras, la estadificación tumoral y el tratamiento de cada caso se realizaron dentro de la práctica clínica asistencial en cada uno de los centros participantes, siguiendo las recomendaciones de las correspondientes Sociedades Nacionales de Anatomía Patológica y Oncología Médica, así como las guías clínicas de tratamiento de la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) en el caso de los centros europeos(339).

Para la estadificación pronóstica de la enfermedad se ha utilizado la 7ª edición del *American Joint Committee on Cancer Tumor, node and metastasis* (TNM) al ser la clasificación vigente en los años de inclusión de casos en esta tesis (44).

En la valoración de los parámetros séricos inflamatorios se tuvieron en consideración los rangos normales del laboratorio de cada centro participante.

El estudio de la posible pérdida de expresión de las proteínas reparadoras del ADN (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) en la muestra tumoral, se obtuvo mediante

técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) sobre la muestra endoscópica del diagnóstico o, en su ausencia, de la pieza quirúrgica. Este estudio se realizó por patólogos experimentados de cada centro empleando anticuerpos y plataformas validados y comerciales. Se han considerado como tumores inestables aquellos con pérdida de expresión nuclear de uno o más de uno de los antígenos anteriormente reseñados.

En el subgrupo de pacientes procedente del Hospital Universitario 12 de Octubre se llevó a cabo un estudio molecular más exhaustivo que incluyó la determinación mediante hibridación *in situ* de la presencia de genoma de virus de Epstein-Barr en las células tumorales, la amplificación de los genes *HER2*, *MET* y *FGFR2*, así como la expresión de E-cadherina y PD-L1 mediante inmunohistoquímica. Asimismo se completó la caracterización de este subgrupo mediante el estudio de mutaciones puntuales e inserciones-delecciones mediante secuenciación masiva utilizando la plataforma *Oncomine Comprehensive Assay Plus*, junto con el análisis de posibles alteraciones en el número de copias de genes relevantes y el cálculo de la carga mutacional de cada caso.

Para cada sujeto se recogieron las siguientes variables:

- Epidemiológicas (edad, género, país de origen)
- Anatomopatológicas (TNM, estadio, tipo histológico, grado de diferenciación, estadio patológico tras el tratamiento preoperatorio)
- Clínicas (tratamiento neoadyuvante recibido, fechas de administración, fecha de cirugía y tipo de la misma, administración tratamiento adyuvante, fecha de recidiva/progresión, fecha de éxitus o de último seguimiento)
- Séricas (neutrófilos, leucocitos, linfocitos, plaquetas y LDH). A partir de estos valores absolutos, se calcularon para cada paciente los parámetros de inflamación sistémica (NLR, dNLR, SII)
- Moleculares (estudio de pérdida de la expresión nuclear de las proteínas reparadoras del ADN (proteínas *Mismatch Repair* o MMR) MLH1, PMS2, MSH2 y MSH6 mediante técnicas de inmunohistoquímica como



marcadores de un posible fenotipo de inestabilidad de microsatélites (IMS)

- En el subgrupo de casos procedentes del Hospital Universitario 12 de Octubre se recogieron asimismo las variables referentes al análisis de EBER, *HER2*, *MET*, *FGFR2*, E-cadherina y PD-L1 mencionados anteriormente así como los resultados de la secuenciación masiva.

Al tratarse de un estudio observacional, retrospectivo y multicéntrico, y dada la necesidad de recoger datos confidenciales de los pacientes incluidos, este proyecto fue aprobado el Comité Ético y de Investigación Clínica del Hospital Universitario “12 de Octubre” de Madrid (nº CEIm 18/415), valorándose de manera positiva y autorizándose posteriormente su realización por cada uno de los Comités Éticos pertinentes del resto de centros participantes. Todos los datos clínicos e histológicos recogidos fueron anonimizados para asegurar en todo momento la confidencialidad de los datos de los pacientes incluidos.

## ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA

Se recogieron para todos los pacientes incluidos en esta tesis los valores absolutos de neutrófilos, leucocitos, linfocitos, lactato deshidrogenasa (LDH) y plaquetas, calculándose posteriormente a partir de estos los valores de los siguientes parámetros de inflamación sistémica:

- NLR (*Neutrophil to Lymphocyte Ratio*): ratio resultante del cociente recuento absoluto de neutrófilos partido por recuento absoluto de linfocitos
- dNLR o NLR derivado (*derived Neutrophil to Lymphocyte Ratio*): ratio resultante del cociente recuento absoluto de neutrófilos partido por la diferencia entre recuento absoluto de leucocitos y recuento absoluto de neutrófilos
- SII (*Systemic Inflammatory Index*): resultado del cociente entre el producto de recuento absoluto de neutrófilos y recuento absoluto de plaquetas partido por recuento absoluto de linfocitos.

Los valores para el análisis de los parámetros arriba mencionados se obtuvieron, teniendo en cuenta de los rangos de cada laboratorio local, en dos puntos temporales del tratamiento de los pacientes: pre-neoadyuvancia (dentro de los 30 días previos al tratamiento pre-operatorio) y pre-cirugía (última analítica disponible dentro de los 30 días previos a la cirugía o, en ausencia, analítica previa al último ciclo de tratamiento pre-operatorio).

## ESTUDIO DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

El estudio de inestabilidad de microsatélites (IMS) se realizó en cada centro participante prefiriendo las muestras endoscópicas del diagnóstico frente a las piezas quirúrgicas de gastrectomías, seleccionando en aquellos casos en que se disponía de más de una muestra por paciente aquella en mejor estado de conservación y mayor contenido de tejido tumoral. En todos los casos incluidos procedentes de países occidentales, el estudio de la IMS se realizó mediante técnicas automatizadas de inmunohistoquímica (IHQ), estudiándose la pérdida de expresión de proteínas reparadoras del ADN (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2) en el tejido tumoral mediante anticuerpos monoclonales específicos y de acuerdo a las especificaciones del fabricante y con los reactivos y plataformas detallados en la Tabla 7. El estudio de las proteínas reparadoras del ADN en los casos procedentes de la Universidad de Osaka, se limitó al estudio de la expresión de la proteína MLH. Además, el estudio no se realizó mediante el uso de anticuerpos comerciales sino de un anticuerpo propio desarrollado por la misma universidad.

Para el estudio de expresión de las proteínas reparadoras de ADN se emplearon secciones tumorales de 4 µm de grosor cada una. Una de las secciones se empleó en la valoración mediante tinción con hematoxilina-eosina (H-E) de la presencia de tejido sano y tumoral en la muestra a estudiar, empleándose posteriormente 4 laminillas más para la detección de las distintas proteínas mencionadas.

Una tinción nuclear positiva en las células tumorales sugiere que la proteína en estudio está intacta. Por el contrario, la ausencia de tinción nuclear en las células tumorales de cualquiera de las proteínas mencionadas es sinónimo de pérdida de expresión de la misma y el caso se considera como inestable (IMS) (387).

**Tabla 7. Anticuerpos y plataformas empleados en los centros occidentales.**

Centro	Anticuerpo MLH1	Anticuerpo MSH2	Anticuerpo MSH6	Anticuerpo PMS2	Plataforma
H. Univ 12 de Octubre	Biocare	Biocare	Biocare	Biocare	Leica Bond-III stainer (Leica Biosystems, Newcastle, UK)
H. Univ M. Valdecilla	Dako-Agilent	Dako-Agilent	Dako-Agilent	Dako-Agilent	Autostainer Link 48 (Dako-Agilent, Santa Clara, CA, United States)
H. Univ Fuenlabrada	DAKO	DAKO	DAKO	DAKO	DAKO Omnis (Agilent, Santa Clara, CA, United States)
Istituto di Candiolo IRCCS	Pharmigen	Oncogene	Trasduction Laboratories	BD-Pharmigen	Autostainer Link 48 (Dako-Agilent, Santa Clara, CA, United States)

En el subgrupo de casos procedentes del Hospital Universitario 12 de Octubre, el estudio de la posible inestabilidad de microsatélites se realizó asimismo mediante secuenciación empleando el panel *Oncomine Comprehensive Assay Plus*. Este emplea 77 marcadores que identifican una forma de inestabilidad genómica en la replicación del ADN repetitivo. La puntuación  $IMS \geq 20$ , se considera alta y aquella que se encuentra por debajo de 20 se considera EMS (estabilidad de microsatélites).

Los marcadores empleados se reportan en la siguiente página.

BAT25, BAT26, CAT25, D10MS120896686, D11MS106695515,  
D12MS107420548, D12MS112388274, D13MS31722621, D13MS79216357,  
D14MS31191669, D15MS40891992, D15MS45897772, D15MS63075924,  
D15MS73057338, D16MS18882660, D17MS13981240, D17MS19314918,  
D17MS4996471, D17MS56435162, D17MS68175206, D18MS22642717,  
D18MS59942587, D19MS2591452, D19MS39327239, D1MS14108750,  
D1MS145002892, D1MS151590355, D1MS201754411, D1MS231094051,  
D1MS235507467, D1MS236714293, D1MS27992801, D1MS32381593,  
D1MS65306997, D1MS78414311, D1MS78432507, D20MS37146132,  
D20MS47995878, D2MS120714402, D2MS14778338, D2MS173686466,  
D2MS201778718, D2MS48033891, D2MS62063094, D3MS111873903,  
D3MS123332876, D3MS128292319, D3MS140678385, D3MS51417604,  
D3MS52620765, D4MS38134424, D4MS41648508, D5MS14485162,  
D5MS145883505, D5MS172421761, D5MS17276743, D5MS52358762,  
D5MS78671728, D6MS136172997, D6MS142691951, D6MS152740682,  
D7MS1787520, D7MS23545120, D7MS74608741, D8MS103287851,  
D8MS130874615, D8MS95686611, D9MS135773001, D9MS79999549,  
DXMS49646948, MON27, NR21, NR22, NR24 y NR27.

## IDENTIFICACIÓN DE OTROS BIOMARCADORES MOLECULARES EN EL SUBGRUPO DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE

Basándose en la disponibilidad de material endoscópico/quirúrgico tumoral adecuado y suficiente de cada caso, se seleccionaron 36 muestras en total para el análisis de otros biomarcadores moleculares mediante los métodos de secuenciación masiva, inmunohistoquímica e hibridación *in situ*. De cada una de las 36 muestras se evaluaron todas las preparaciones histológicas disponibles, seleccionando aquellas áreas que contuviesen una cantidad óptima de tumor y excluyendo las zonas con necrosis o inflamación. Una vez elegidas las preparaciones más representativas de cada caso, se seleccionaron sus respectivos bloques. Se realizaron cortes mediante la técnica tradicional de microtomía obteniéndose secciones de 4 µm de grosor cada una representativas del tejido, las cuales fueron teñidas con hematoxilina-eosina (H-E) y revisadas por un único patólogo experimentado para determinar el porcentaje de células tumorales, marcando el área tumoral con un rotulador permanente.

---

### ESTUDIO MEDIANTE NGS DE ALTERACIONES GENÓMICAS

En este proyecto se empleó el panel comercial de genes de *Ion Torrent OncoPrint Comprehensive Assay Plus*, que permite la detección de biomarcadores específicos e inmuno-oncológicos.

Este panel cubre más de 500 genes significativos en tumores sólidos malignos, detectando variantes de un solo nucleótido (SNV o *Single Nucleotide Variant*), de varios nucleótidos (MNV o *Multi-Nucleotide Variant*), InDels (inserciones y deleciones pequeñas), variantes de número de copias (CNV o *Copy Number Variant*), y permitiendo la evaluación de la inestabilidad de microsatélites IMS (MSI o *Microsatellite Instability*) y de la carga mutacional tumoral (TMB o *Tumor Mutational Burden*). Los genes cubiertos en este panel se resumen en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8. Genes incluidos en el panel *Oncomine Comprehensive Assay Plus* para los cuales se determinan ganancias en el número de copias y mutaciones puntuales.

Oncomine Comprehensive Assay Plus   DNA Gain of Function Content							
CNV gain and Hotspot Genes							
CNV gain only (n=19)	CNV and hotspot (n=99)				Hotspot only (n=57)		
ABCB1	ABL1	ERBB2	MDM4	PXDNL	ACVR1	HIST1H2BD	PIK3CD
CTNND2	AKT1	ERBB3	MECOM	RAC1	ATP1A1	HIST1H3B	PIK3CG
DDR1	AKT2	ERBB4	MEF2B	RAF1	BCR	HRAS	PTPRD
EMSY	AKT3	ESR1	MET	RARA	BMP5	IDH1	RG57
FGF19	ALK	EZH2	MPL	RET	BTK	IL6ST	RHOA
FGF23	AR	FAM135B	MTOR	RHEB	CACNA1D	IRF4	RPL10
FGF3	ARAF	FGFR1	MYC	RICTOR	CD79B	IRS4	SK1
FGF4	AURKA	FGFR2	MYCN	RIT1	CSF1R	KLF4	SK2
FGF9	AURKC	FGFR3	MYD88	ROS1	CTNNB1	KNSTRN	SNCAIP
FYN	AXL	FGFR4	NFE2L2	SETBP1	CUL1	MAP2K2	SOS1
GLI3	BCL2	FLT3	NRAS	SF3B1	CYSLTR2	MED12	SOX2
IGF1R	BCL2L12	FLT4	NTRK1	SLCO1B3	DGCR8	MYO1	SRSF2
MCL1	BCL6	FOXA1	NTRK3	SMC1A	DROSHA	NSD2	STAT5B
MDM2	BRAF	GATA2	PCBP1	SPOP	E2F1	NTRK2	TAF1
MYCL	CARD11	GNAS	PDGFRA	SRC	EPAS1	NTRK2	TGFR1
RPS6KB1	CCND1	H3F3A	PDGFRB	STAT3	FGF7	NUP93	TRRAP
RPTOR	CCND2	H3F3B	PIK3C2B	STAT6	FOXL2	PAX5	TSHR
YAP1	CCND3	IKKB	PIK3CA	TERT	FOXO1	PIK3CD	WAS
YES1	CCNE1	IL7R	PIK3CB	TOP1	GLI1	PIK3CG	
	CDK4	KIT	PIK3R2	TPMT	GNA11	PTPRD	
	CDK6	KLF5	PIM1	UZAF1	GNAQ	RG57	
	DDR2	KRAS	PLCG1	USP8	HIF1A		
	EGFR	MAGOH	PPP2R1A	XPO1			
	EIF1AX	MAPK1	PPP6C	ZNF217			
		MAX	PTPN11	ZNF429			

Tabla 9. Genes incluidos en el panel *Oncomine Comprehensive Assay Plus* para los cuales se realiza la secuenciación completa y se determinan pérdidas en el número de copias.

Oncomine Comprehensive Assay Plus   DNA Loss of Function Content							
CNV Loss and CDS (n=206)							CDS Only (n=21)
ABRAXA51	CD274	DSC3	HLA-A	MTAP	PRDM1	SMAD4	CALR
ACVR1B	CD276	ELF3	HLA-B	MUTYH	PRDM5	SMARCA4	CeTA
ACVR2A	CDC73	ENO1	HLA-F	NBN	PRKAR1A	SMARCB1	CYP2D6
ADAMTS12	CDH1	EP300	INPP4B	NCOR1	PTCH1	SOX9	ERCC5
ADAMTS2	CDH10	EPCAM	JAK1	NF1	PTEN	SPEN	FAS
AMER1	CDK12	EPHA2	JAK2	NF2	PTPR	STAG2	ID3
APC	CDKN1A	ERAP1	JAK3	NOTCH1	RAD50	STK11	KLHL13
ARHGAP35	CDKN1B	ERAP2	KDM5C	NOTCH2	RAD51	SUFU	MTUS2
ARID1A	CDKN2A	ERCC2	KDM6A	NOTCH3	RAD51B	TAP1	PSMB10
ARID1B	CDKN2B	ERCC4	KEAP1	NOTCH4	RAD51C	TAP2	PSMB8
ARID2	CDKN2C	ERRF1	KMT2A	PALB2	RAD51D	TBX3	PSMB9
ARID5B	CHEK1	ETV6	KMT2B	PARP1	RAD52	TCF7L2	RNA5EH2C
ASXL1	CHEK2	FANCA	KMT2C	PARP2	RAD54L	TET2	RPL22
ASXL2	CIC	FANCC	KMT2D	PARP3	RASA1	TGFBR2	RPL5
ATM	CREBBP	FANCD2	LARP4B	PARP4	RASA2	TNFAIP3	RUNX1T1
ATR	CSDM3	FANCE	LATS1	PBRM1	RB1	TNFRSF14	SDHC
ATRX	CTCF	FANCF	LATS2	PDCD1	RBM10	TP53	SOC51
AXIN1	CTLA4	FANCG	MAP2K4	PDCD1LG2	RECQL4	TP63	STAT1
AXIN2	CUL3	FANCI	MAP2K7	PDI3	RNA5EH2A	TPP2	TMEM132D
B2M	CUL4A	FANCL	MAP3K1	PGD	RNA5EH2B	TSC1	UGT1A1
BAP1	CUL4B	FANCM	MAP3K4	PHF6	RNF43	TSC2	ZBTB20
BARD1	CYLD	FAT1	MAPK8	PIK3R1	RPA1	USP9X	
BCOR	CYP2C9	FBXW7	MEN1	PMS1	RUNX1	VHL	
BLM	DAXX	FUBP1	MGA	PMS2	SDHA	WT1	
BMPR2	DDX3X	GATA3	MLH1	POLD1	SDHB	XRCC2	
BRCA1	DICER1	GNA13	MLH3	POLE	SDHD	XRCC3	
BRCA2	DNMT3A	GPS2	MRE11	POT1	SETD2	ZFX3	
BRIP1	DOCK3	HDAC2	MSH2	PPM1D	SLX4	ZMYM3	
CASP8	DPYD	HDAC9	MSH3	PPP2R2A	SMAD2	ZRSR2	
CBFB	DSC1		MSH6				

La secuenciación mediante la plataforma *Ion Torrent* es un método de secuenciación del ADN basado en la detección de protones liberados durante el proceso de polimerización del ADN.

El procedimiento, de manera resumida, se inicia con la creación de nuestras librerías mediante la amplificación de los fragmentos de ADN requeridos en nuestro análisis. Posteriormente estas librerías se cargan en el *Ion Chip 550* mediante el *Ion Chef* y se procede a la secuenciación de este *Chip* mediante el Secuenciador S5.

Los resultados de la secuenciación obtenidos del S5 son procesados mediante el programa *Torrent Suite Software* que genera un archivo FASTQ de cada muestra y procede al alineamiento de este con la secuencia de referencia Hg19, generando así un archivo BAM de cada muestra denominado *Variant calling*. Tras esto, el *Ion Reporter Software* (5.12) con el flujo de análisis (*workflow*) *Oncomine Comprehensive Plus – w1.0 – DNA – Single Sample* permite anotar las variantes encontradas y calcular biomarcadores como la Carga Mutacional Tumoral (TMB) o la Inestabilidad de Microsatélites (IMS).

Se ha empleado *VarSome Clinical* (una plataforma clínicamente certificada para la interpretación de datos NGS) para clasificar las distintas variantes encontradas en nuestras muestras en benignas, patogénicas y variantes de significado desconocido (VUS). Además de esto, hemos empleado la base de datos COSMIC para la comprobación de los resultados obtenidos.

Específicamente para el cálculo de la TMB se ha usado el filtro denominado *TMB Algorithm Version 3.0*. Este análisis se ha realizado mediante *Ion Reporter*, teniendo en cuenta a la hora de su interpretación que la frecuencia mínima empleada en este análisis del TMB es de 0,05. Se incluyen exclusivamente regiones exónicas y solo se emplean SNVs e InDels así como todo tipo de efectos de las variantes (*frameshiftDeletion*, *frameshiftInsertion*, *nonframeshiftDeletion*, *nonframeshiftInsertion*, *nonsense*).

El valor del TMB se considera alto por encima de 10 mutaciones/megabase y bajo por debajo de 5 mutaciones/megabase, siendo medio entre 5 y 10 mutaciones por megabase.



Para calcular el TMB aproximadamente el número de bases leídas en este panel es de 1.000.000, por lo que el TMB será aproximadamente el número de variantes encontradas en cada muestra.

Tras esto también se ha empleado el visualizador de los datos genómicos de la NGS llamado *Integrative Genome Viewer* (IGV), para eliminar así algunos de los artefactos de la secuenciación. Las variantes se han clasificado como artefactos cuando no llegan a un total de 100 lecturas, y en el caso en el que estas variantes se encuentren en 2 o más muestras del ensayo. También se han clasificado como artefactos aquellas variantes que no llegan a un 5% de frecuencia alélica, esto nos ha permitido eliminar muchas de las variantes presentes tras el filtro *OncoPrint Extended* (5.12), que no tenía ningún filtro de frecuencia alélica.

Para la medición de los CNVs, se empleó como referencia *OncoPrint Comprehensive Plus DNA MSI v1.0* y *OncoPrint Comprehensive Plus DNA MSI In-Silico Control v1.0*. Para detectar variaciones en el número de copias, se proporcionan valores de ploidía de cada gen, donde el valor de ploidía 2 sería el esperado para muestras de tipo salvaje, siendo los valores mayores de 2 aquellos con amplificación (sobrexpresión) y los menores de 2 aquellos que indicarían delección (supresión génica).

---

## ESTUDIO POR INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA EXPRESIÓN DE PD-L1, E-CADHERINA Y DE GENOMA DE VIRUS DE EPSTEIN-BARR EN LAS CÉLULAS TUMORALES

El estudio de la expresión por inmunohistoquímica de PD-L1 (388) se realizó mediante el kit PD-L1 IHC 22C3 *pharmDx*, anticuerpo monoclonal antiPD-L1 clon 22C3 y su lectura mediante el sistema de visualización *EnVision FLEX* en la plataforma *Autostainer Link48* (Dako-Agilent, Santa Clara, CA, United States). La expresión de la proteína PD-L1 se cuantificó mediante el denominado *Combined Positive Score* (CPS), en el cual la expresión de PD-L1 se cuantifica mediante el cociente entre el número de células con tinción de

PD-L1 (incluyendo células tumorales, linfocitos y macrófagos) dividido por el número total de células tumorales viables en la preparación analizada y el resultado multiplicado por 100. Aunque el resultado del cálculo puede exceder de 100, la puntuación máxima se define como CPS 100. Se consideraron como casos positivos, es decir con expresión de PD-L1, aquellos con un CPS superior a 1.

El estudio de la expresión por inmunohistoquímica de E-cadherina y EBER se realizó empleando el kit *Bond Polymer Refine Detection* en la plataforma *BOND III stainer* (Leica Biosystems, Newcastle, UK).

Para la determinación de E-cadherina se usó un anticuerpo frente al clon 36B5 (NCL-L-E-Cad, Leica Biosystems). La técnica se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante e utilizando un protocolo de desenmascaramiento a pH alto y una dilución de 1/25.

Los casos se graduaron en una escala de 0 a 3 según el sistema propuesto por Jawhari y cols:

- 0 ninguna célula teñida
- 1 tinción citoplasmática sin tinción membranosa
- 2 tinción citoplasmática y membranosa en el mismo caso
- 3 tinción membranosa normal

Se consideraron patrones anormales de tinción los casos considerados 0, 1 y 2, es decir aquellos con expresión distinta de la exclusivamente membranosa(389, 390).

Para la detección de la presencia de ARN del Virus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr encoded R*, EBER) se usó una sonda RNA específica para hibridación *in situ* fluorescente (PB0589, Leica Biosystem), empleando para su lectura posterior un anticuerpo primario anti-fluoresceína (AR0833, Leica Biosystem).

---

## ESTUDIO MEDIANTE HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE *IN SITU* DE LA AMPLIFICACIÓN DE *HER2*

El estudio de la posible amplificación de los genes *HER2*, *MET* y *FGFR2* se realizó mediante hibridación dual fluorescente *in situ* sobre cortes histológicos de muestras parafinadas de 4 µm mediante el uso de sondas específicas para *HER2*, *MET* y *FGFR2* probes.

En el protocolo para *HER2* se automatizó el procedimiento mediante el empleo de la plataforma automatizada *BondMax* (Leica Biosystem). Este incluye el uso de sondas para detección de *HER2 PathVysion*® (Abbott Molecular Inc).

*MET* y *FGFR2* se realizaron manualmente siguiendo el protocolo del fabricante (Leica Biosystem).

Para cada muestra solo se analizaron los núcleos bien definidos y se determinaron el número de copias individuales del gen diana, así como el número de copias del centrómero del cromosoma correspondiente y el ratio resultante del cociente entre ambos.

Las señales de fluorescencia para *HER2* se puntuaron siguiendo las guías ASCO/CAP 2018 (391).

La amplificación de *HER2* se definió como la presencia de al menos 6 señales rojas para *HER2* y/o un ratio  $HER2/CEP17 \geq 2$  en más del 5% de las células tumorales.

---

## ESTUDIO MEDIANTE HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE *IN SITU* DE LA AMPLIFICACIÓN DE *MET* Y *FGFR2*

La hibridación *in situ* fluorescente dual de los genes *MET* y *FGFR2* se realizó manualmente siguiendo las instrucciones el protocolo del fabricante (Leica Biosystem).

El estudio de la amplificación de *MET* se realizó mediante las sondas *MET* (7q31) y SE7 (D7Z1) en la plataforma automatizada *BondMax* (Leica Biosystem). La sonda *MET* (7q31) - XL está optimizada para la detección del número de copias del gen *MET* en la región 7q31. SE7 (D7Z1) - XL detecta por su parte el número de copias del centrómero del cromosoma 7. El uso de

ambas sondas de manera combinada permite detectar la amplificación de *MET* usando la sonda centromérica como control.

El estudio de la amplificación de *FGFR2* se realizó en la misma plataforma automatizada empleando las sondas *FGFR2* (10q26) FISH y SE 10. La sonda *FGFR2* permite determinar el número de copias del gen *FGFR* en la región 10q26. La sonda SE 10 se emplea de manera combinada con la anterior pues determina el número de copias del centrómero del cromosoma 10.

La amplificación de *FGFR2* o de *MET* se consideró presente en los casos de detectarse un ratio  $MET/CEP7$  o  $FGFR2/CEP10 \geq 2$  en más del 5% de las células tumorales en ambos casos.

## ALMACENAMIENTO DE LOS DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se recogieron en una base de datos Excel (Microsoft Office Professional Plus 2010) optimizada y traducida para cada centro participante según el idioma del centro. La recogida de los datos clínicos y anatomopatológicos ha sido llevada a cabo de manera individual en cada uno de los centros participantes y enviada posteriormente al centro coordinador de este proyecto para la creación de una única base de datos homogénea. De todos los 116 pacientes incluidos en el análisis final se dispuso de los datos clínicos, patológicos, de seguimiento y de supervivencia necesarios.

El análisis estadístico se ha realizado utilizando las aplicaciones informáticas SPSS Statistics Versión 20 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) y Stata Version 16 (StataCorp. 1985 [<http://www.stata.com>]). Se han considerado diferencias estadísticamente significativas aquellas con una  $p \leq 0,05$ .

El estudio estadístico se subdivide en las siguientes partes.

**Estadística Descriptiva.** En primer lugar se efectuó un análisis descriptivo de las diferentes variables cualitativas y cuantitativas objeto del estudio:

- Análisis de frecuencia o porcentajes de las variables cualitativas
- Determinación de media  $\pm$  desviación estándar, mediana y rango de las variables cuantitativas

### **Estadística inferencial.**

Para todos los análisis realizados se estableció un riesgo bilateral o nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . En el caso de las variables cuantitativas objeto de estudio, la comprobación de la hipótesis de normalidad se realizó mediante los tests estadísticos de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk.

La comparación entre grupos independientes, de una variable cuantitativa respecto a una variable categorica, se realizó mediante la aplicación del test t de Student (variable categórica dicotómica), o Análisis de la Varianza ANOVA (variable cualitativa  $\geq 2$  categorías) cuando la variable cuantitativa seguía una distribución normal. En aquellos casos en los que la variable cuantitativa no seguía una distribución normal, se aplicó el test no paramétrico Wicoxon-Mann-

Whitney (variable categórica dicotómica) o el test no paramétrico Kruskal-Wallis (variable cualitativa  $\geq 2$  categorías).

En las variables categóricas, la posible asociación entre el resultado del análisis molecular y los distintos parámetros clínico-patológicos se analizó mediante el test Chi-cuadrado o, cuando se requería, mediante el test exacto de Fisher.

La supervivencia global (SG) se definió como el tiempo transcurrido desde el momento del diagnóstico inicial de la enfermedad hasta la muerte del paciente por cualquier causa. Un paciente no fallecido se considera censurado en la fecha del último contacto.

La supervivencia libre de progresión (SLP) por definición se mide desde la fecha del diagnóstico de certeza de la neoplasia mediante biopsia y hasta la progresión de la enfermedad o la muerte del paciente por cualquier causa. Un paciente se censura si no progresa. En este caso la SLP se calcula como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la fecha de último contacto.

El análisis de la supervivencia global y del tiempo hasta la progresión tumoral se realizaron aplicando un modelo de Kaplan-Meier, estimando la mediana y el intervalo de confianza (IC) al 95%. Las diferencias en las curvas de supervivencias fueron analizadas mediante el test de Log-Rank o de Mantel-Haenzel. Se aplicó también un modelo de regresión de Cox para identificar aquellas variables con valor pronóstico en la supervivencia y analizar el mismo, estimándose la Hazard Ratio (HR) y sus intervalos de confianza.

Asimismo se realizó un análisis multivariante de la SG y de la SLP, determinando el impacto de dichas alteraciones de forma independiente respecto a otras variables que pudieran estar influyendo como variables de confusión o variables modificadoras del efecto. Para ello hemos construido un modelo de regresión de Cox ajustado a dichas variables según el método explicado en Domenech Massons JM y cols (392). Las variables incluidas en el modelo máximo inicial fueron aquellas variables que han resultado estadísticamente significativas en el modelo univariante. A continuación se ha realizado un análisis por pasos: 1) Evaluación del global de los términos de

interacción mediante pruebas de significación estadística, en base a la razón de verosimilitud (chunk test) y análisis de cada uno de los términos de interacción por separado; 2) Evaluación del modelo que incluye todos los términos de confusión y los términos de interacción estadísticamente significativos; 3) Evaluación de los términos de confusión en base a la existencia de un cambio prácticamente importante según el criterio de Maldonado y Greenland (considerando que el ajuste es necesario para corregir el factor de confusión si el cambio entre el efecto ajustado y el efecto no ajustado es superior al 10%).





# RESULTADOS



## CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS

Del total de 136 pacientes inicialmente evaluados, se estudiaron al final 116 casos que reunían todos los requisitos necesarios para su análisis. De estos 116 pacientes, 91 de ellos (78,4%) procedían de centros europeos conformando la cohorte denominada Oeste y 25 (21,6%) de la Universidad de Osaka en Japón componiendo la cohorte Este.

En la Tabla 10 se recogen las características clínico-patológicas de los pacientes estudiados. En el 100% se disponía del resultado de la expresión de las proteínas reparadoras de ADN (proteínas MMR) y solamente 6 casos (5,2%) mostraban pérdida de expresión de alguna de ellas (MMR deficientes).

**Tabla 10. Características clínico-patológicas de los pacientes del estudio.**

Características clínico-patológicas	Totales N=116	Oeste N=91	Este N=25
<b>Edad diagnóstico, mediana (rango)</b>	63,50 (36-85)	63 (41-85)	63,36 (36-80)
<b>Género, n (%)</b>			
Hombre	87 (75)	72 (79,1)	15 (60)
Mujer	29 (25)	19 (20,9)	10 (40)
<b>Origen, n (%)</b>			
España	84 (72,4)	84 (92,3)	-
Italia	7 (6)	7 (7,7)	-
Japón	25 (21,6)	-	25 (100)
<b>Localización del tumor primario, n(%)</b>			
UGE/cardias	33 (28,4)	23 (25,3)	10 (40)
Cuerpo/fundus	31 (26,7)	27 (29,7)	4 (16)
Cuerpo/antro	10 (8,6)	10 (11)	0 (0)
Antro/píloro	42 (36,2)	31 (34,1)	11 (44)
<b>Clasificación de Lauren, n (%)</b>			
Intestinal	45 (38,8)	39 (42,9)	6 (24)
Difuso	41 (35,3)	22 (24,2)	19 (76)
Mixto	7 (6)	7 (7,7)	0 (0)
Indeterminado	5 (4,3)	5 (5,5)	0 (0)
No realizado	18 (15,5)	18 (19,8)	0 (0)
<b>Expresión proteínas MMR, n (%)</b>			
Presente	110 (94,8)	87 (95,6)	23 (92)
Ausente	6 (5,2)	4 (4,4)	2 (8)
<b>Resecabilidad al diagnóstico, n (%)</b>			
Resecable	104 (89,7)	79 (86,8)	25 (100)
Irresecable	12 (10,3)	12 (13,2)	0 (0)

UGE: Unión gastroesofágica; MMR: *Mismatch Repair*.

El 89,7% del total de pacientes fueron resecables al diagnóstico. Al ser criterio de inclusión, todos los pacientes recibieron tratamiento sistémico con quimioterapia con carácter neoadyuvante. De cara al análisis estadístico, los regímenes de quimioterapia administrados se reagruparon en tripletes con antraciclinas, tripletes con taxanos y dobletes.

Dentro de los tripletes con antraciclinas se incluían los esquemas: ECF (epirubicina, cisplatino, fluorouracilo), ECX (epirubicina cisplatino, capecitabina), EOF, (epirubicina, oxaliplatino, fluorouracilo), EOX (epirubicina, oxaliplatino, capecitabina). Por otro lado los tripletes con taxanos incluían los esquemas FLOT (fluorouracilo, ácido folínico, oxaliplatino, docetaxel), miniDOX (docetaxel, oxaliplatino, capecitabina), DOF (docetaxel, oxaliplatino, fluorouracilo), cisplatino/docetaxel/Utefos, DCS (docetaxel, cisplatino, S-1), DOS (docetaxel, oxaliplatino, S-1).

Por su parte, los dobletes utilizados en los pacientes de esta tesis incluían los esquemas XELOX (oxaliplatino, capecitabina), cisplatino/docetaxel, cisplatino/capecitabina, oxaliplatino/Utefos, FOLFOX (fluorouracilo, ácido folínico, oxaliplatino), cisplatino/fluorouracilo, CS (cisplatino, S-1), DS (docetaxel, S-1).

La mediana de número de ciclos de tratamiento neoadyuvante administrados fue de 3 (rango: 1-9 ciclos).

Del total de pacientes analizados, solamente 3 de ellos (2,6%) no pudieron ser sometidos a cirugía con intención curativa por progresión de la enfermedad y volverse irreseables tras recibir el tratamiento neoadyuvante (media 2,67 ciclos). En los 3 casos el tratamiento administrado fue el esquema EOX.

De los 116 pacientes, el 68,1 % recibió tratamiento adyuvante postoperatorio.

Un total de 61 (52,6%) pacientes recidivaron durante el periodo de seguimiento, siendo en 49 casos (42,2% del total) en forma de metástasis a distancia. La distribución y frecuencia de los distintos tipos de recidiva se muestra en la Tabla 11.

**Tabla 11. Tratamientos empleados y respuestas obtenidas en la población del estudio.**

<b>Características clínico-patológicas</b>	<b>Totales N=116</b>	<b>Oeste N=91</b>	<b>Este N=25</b>
<b>Mediana ciclos neoadyuvancia, rango ( )</b>	3 (1-9)	3 (1-9)	2 (1-4)
<b>Esquema neoadyuvante, n (%)</b>			
Tripletas antraciclina	52 (44,8)	52 (57,1)	0 (0)
Tripletas taxanos	35 (30,2)	12 (13,2)	23 (92)
Dobletes	29 (25)	27 (29,7)	2 (8)
<b>Resultado resección, n (%)</b>			
R0	99 (85,3)	76 (83,5)	23 (92)
R1	13 (11,2)	11 (12,1)	2 (8)
R2	1 (0,9)	1 (1,1)	0 (0)
No resección	3 (2,6)	3 (3,3)	0 (0)
<b>Respuesta patológica en pieza quirúrgica, n (%)</b>			
ypN0	36 (31)	32 (35,2)	4 (16)
ypT0 ypN0	4 (3,4)	4 (4,4)	0 (0)
<b>Adyuvancia, n (%)</b>	79 (68,1)	60 (65,9)	19 (76)
<b>Recidiva, n (%)</b>	61 (52,6)	47 (51,6)	14 (56)
<b>Localización de la recidiva, n (%)</b>			
No recidiva	55 (47,4)	44 (48,4)	11 (44)
Locoregional	12 (10,3)	8 (8,8)	4 (16)
Metástasis a distancia exclusivas	31 (26,7)	21 (23,1)	10 (40)
Locoregional + Metástasis a distancia	18 (15,5)	18 (19,8)	0 (0)
<b>Localización de la metástasis, n (%)</b>			
Recidiva peritoneal	23 (19,8)	16 (17,6)	7 (28)
Recidiva hepática	14 (12,1)	12 (13,2)	2 (8)
Recidiva pleuro-pulmonar	3 (2,6)	3 (3,3)	0 (100)

R0: Resección sin afectación microscópica del borde de resección; R1: Afectación microscópica del borde de resección; R2: Afectación macroscópica del borde de resección; ypN0: Sin afectación ganglionar en la pieza quirúrgica post-neoadyuvancia; ypT0ypN0: Sin tumor residual en la pieza quirúrgica post-neoadyuvancia.

A diferencia de lo encontrado en el grupo de pacientes occidentales, en los pacientes asiáticos no se diagnosticó ningún caso de tumor localizado en el cuerpo o antro gástricos ni recibieron en ningún caso esquemas que incluyeran antraciclina en el contexto de la neoadyuvancia.

## CARACTERÍSTICAS DE LOS PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA

En las siguientes tablas (Tabla 12, 13, 14) se detallan, del total de los pacientes y de manera individualizada para cada cohorte (Oeste y Este), los valores de los parámetros séricos inflamatorios analizados en este proyecto y determinados en 2 momento concretos del tratamiento de acuerdo a lo descrito en el apartado de Material y Métodos (pre-neoadyuvancia y pre-cirugía).

**Tabla 12. Parámetros séricos de inflamación sistémica en la serie total.**

		Pre-neoadyuvancia N=112	Pre-cirugía N=115
<b>Neutrófilos <math>\times 10^3/\text{mm}^3</math></b>	Media (DE)	5,11 (2,19)	3,76 (2,07)
	Mediana	4,74	3,30
	Rango (Min-Max)	15,07 (2,10 - 17,17)	13,20 (0,80 - 14,00)
<b>Leucocitos <math>\times 10^3/\text{mm}^3</math></b>	Media (DE)	7,83 (2,49)	6,45 (2,47)
	Mediana	7,37	5,90
	Rango (Min-Max)	15,09 (3,37 - 18,46)	13,80 (2,60 - 16,40)
<b>Linfocitos <math>\times 10^3/\text{mm}^3</math></b>	Media (DE)	1,86 (0,70)	1,92 (1,28)
	Mediana	1,80	1,64
	Rango (Min-Max)	3,90 (0,60 - 4,50)	12,10 (0,60 - 12,70)
<b>Plaquetas <math>\times 10^3/\text{mm}^3</math></b>	Media (DE)	279,11 (87,15)	214,94 (80,50)
	Mediana	268,50	205,00
	Rango (Min-Max)	444,00 (93,00 - 537,00)	529,00 (44,00 - 573,00)
<b>NLR</b>	Media (DE)	3,15 (2,08)	2,32 (1,98)
	Mediana	2,60	1,85
	Rango (Min-Max)	15,96 (0,87 - 16,83)	15,42 (0,14 - 15,56)
<b>dLNR</b>	Media (DE)	2,07 (1,38)	1,52 (0,97)
	Mediana	1,73	1,25
	Rango (Min-Max)	12,69 (0,62 - 13,31)	5,78 (0,05 - 5,83)
<b>SII</b>	Media (DE)	677,18 (658,56)	509,94 (514,92)
	Mediana	522,58	368,14
	Rango (Min-Max)	3651,05 (18,62 - 3669,67)	4330,41 (25,14 - 4355,56)

NLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos; dLNR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos derivado; SII: Índice de Inflamación Sistémica.

Tabla 13. Parámetros séricos de inflamación sistémica en la cohorte de pacientes occidentales.

		Pre-neoadyuvancia N=87	Pre-cirugía N=90
<b>Neutrófilos x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	Media (DE)	5,35 (2,30)	3,97 (2,15)
	Mediana	4,79	3,70
	Rango (Min-Max)	14,95 (2,22 – 17,7)	13,20 (0,80 – 14,00)
<b>Leucocitos x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	Media (DE)	8,23 (2,57)	6,81 (2,54)
	Mediana	7,70	6,55
	Rango (Min-Max)	13,96 (4,50 – 18,46)	13,80 (2,60 – 16,40)
<b>Linfocitos x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	Media (DE)	1,94 (0,70)	2,03 (1,42)
	Mediana	1,90	1,75
	Rango (Min-Max)	3,90 (0,60 – 4,50)	12,10 (0,60 – 12,70)
<b>Plaquetas x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	Media (DE)	279,62 (90,69)	218,48 (85,72)
	Mediana	264,00	204,50
	Rango (Min-Max)	384,00 (153,00 – 537,00)	529,00 (44,00 – 573,00)
<b>NLR</b>	Media (DE)	3,14 (2,17)	2,45 (2,20)
	Mediana	2,63	1,85
	Rango (Min-Max)	15,95 (0,87 – 16,83)	14,99 (0,57 – 15,56)
<b>dLNR</b>	Media (DE)	2,03 (1,43)	1,55 (1,07)
	Mediana	1,71	1,28
	Rango (Min-Max)	12,69 (0,62 – 13,31)	5,84 (0,44 – 6,29)
<b>SII</b>	Media (DE)	747,76 (691,86)	556,50 (655,42)
	Mediana	656,13	385,96
	Rango (Min-Max)	3483,28 (186,39 – 3669,67)	4330,41 (25,14 – 4355,56)

NLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos; dLNR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos derivado; SII: Índice de Inflamación Sistémica.

**Tabla 14. Parámetros séricos de inflamación sistémica en la cohorte de pacientes orientales.**

		Pre-neoadyuvancia N=25	Pre-cirugía N=25
<b>Neutrófilos x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	Media (DE)	4,29 (1,52)	3,00 (1,58)
	Mediana	4,43	2,64
	Rango (Min-Max)	5,06 (2,10 – 7,15)	5,88 (1,41 – 7,29)
<b>Leucocitos x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	Media (DE)	6,48 (1,56)	5,13 (1,69)
	Mediana	6,53	4,60
	Rango (Min-Max)	5,92 (3,37 – 9,29)	6,55 (3,24 – 9,79)
<b>Linfocitos x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	Media (DE)	1,58 (0,62)	1,50 (0,30)
	Mediana	1,45	1,48
	Rango (Min-Max)	2,52 (0,74 – 3,26)	1,15 (1,00 – 2,15)
<b>Plaquetas x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	Media (DE)	277,32 (75,18)	202,20 (57,61)
	Mediana	275,00	210,00
	Rango (Min-Max)	363,00 (93,00 – 456,00)	279,00 (67,00 – 346,00)
<b>NLR</b>	Media (DE)	3,13 (1,84)	14,05 (60,42)
	Mediana	2,57	1,84
	Rango (Min-Max)	7,48 (1,02 – 8,50)	303,86 (0,14 – 304,00)
<b>dLNR</b>	Media (DE)	2,20 (1,20)	1,39 (0,80)
	Mediana	1,87	1,22
	Rango (Min-Max)	4,59 (0,74 – 5,33)	3,35 (0,05 – 3,40)
<b>SII</b>	Media (DE)	899,56 (641,76)	434,82 (328,83)
	Mediana	726,60	333,24
	Rango (Min-Max)	2525,13 (186,15 – 2711,29)	1409,30 (101,72 – 1511,02)

NLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos; dNLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos derivado; SII: Índice de Inflamación Sistémica.



Respecto al resultado del análisis de los valores de LDH, se tuvieron en cuenta con efecto homogeneizador los valores de referencia del laboratorio de cada hospital participante, por lo que se categorizaron los casos con respecto al límite superior de la normalidad (LSN) de cada centro.

**Tabla 15. Resultados de los niveles de LDH en la población del estudio.**

Pre-neoadyuvancia		Totales N=104	Oeste N=79	Este N=25
Valor LDH $\geq$ LSN, n (%)	Sí	7 (6)	6 (6)	1 (4)
	No	97 (83,6)	73 (80,2)	24 (96)
Pre-cirugía		Totales N=106	Oeste N=81	Este N=25
Valor LDH $\geq$ LSN, n (%)	Sí	37 (31,9)	36 (39,6)	1 (4)
	No	69 (59,5)	45 (49,5)	24 (96)

LDH: Lactato Deshidrogenasa; LSN: Límite Superior de la Normalidad.

## RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

En los 91 casos de los pacientes occidentales (78,4% del total) se dispuso para su análisis del resultado de la expresión de las proteínas responsables del mecanismo de reparación por apareamiento erróneo del ADN (MMR). De los 91 pacientes, solamente 4 pacientes (4,4%) presentaron un fenotipo de casos con inestabilidad de microsatélites (IMS) es decir, con pérdida de expresión nuclear de alguna de las proteínas reparadoras (casos MMR deficientes o MMRD). En la Tabla 16 se detalla el resultado del estudio inmunohistoquímico respecto a la pérdida de expresión de las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2.

**Tabla 16. Expresión de proteínas reparadoras del ADN en la cohorte Occidental.**

Expresión de las proteínas reparadoras del ADN		Totales N=91
<b>MLH1, n (%)</b>	presente	87 (95,6)
	<b>ausente</b>	<b>4 (4,4)</b>
	no determinado	0 (0)
<b>MSH2, n (%)</b>	presente	91 (100)
	ausente	0 (0)
	no determinado	0 (0)
<b>MSH6, n (%)</b>	presente	90 (98,9)
	ausente	0 (0)
	no determinado	1 (1,1)
<b>PMS2, n (%)</b>	presente	86 (94,5)
	<b>ausente</b>	<b>5 (5,5)</b>
	no determinado	0 (0)

MLH1: *MutL Homolog 1*; MSH2: *MutS Homolog 2*; MSH6: *MutS Homolog 6*; PMS2: *PMS1 Homolog 2*.

Los 4 pacientes con inestabilidad de microsatélites pertenecían a dos de los tres centros hospitalarios españoles participantes en este estudio: 1 paciente procedente del Hospital Universitario de Fuenlabrada y 3 pacientes procedentes del Hospital Universitario 12 de Octubre. En los 4 casos se evidenció ausencia de la expresión de ambas proteínas MLH1 y PMS2.

Ninguno de los 4 pacientes con fenotipo IMS presentaba en la historia clínica una mutación previamente conocida en línea germinal de los genes que

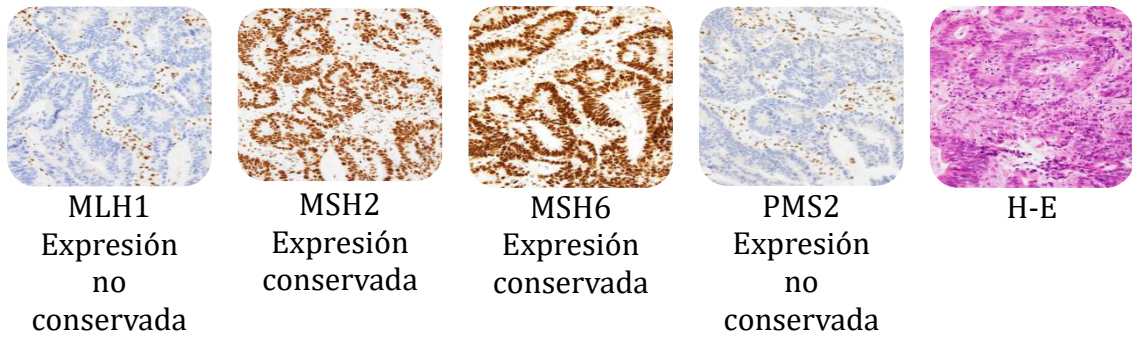
codifican las proteínas reparadoras del ADN ni antecedente familiares compatibles con la existencia de un Síndrome de Lynch.

La ausencia de expresión aislada de la proteína PMS2 se observó en 1 paciente procedente del centro Italiano. De este mismo paciente la expresión de la proteína MSH6 no estaba estudiada, por lo que no pudo considerarse como correctamente analizado y no se ha considerado como un caso con inestabilidad de microsatélites demostrada.

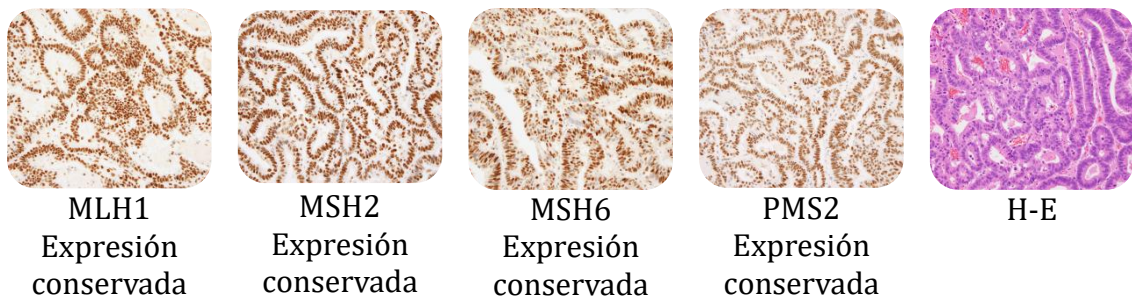
Respecto a los datos relativos a la expresión de las proteínas responsables del mecanismo MMR en los pacientes asiáticos, solo se pudieron obtener los resultados relativos a la expresión de la proteína MLH1. De los 25 pacientes estudiados, en 2 (8%) de ellos se evidenció pérdida de expresión de MLH1 siendo considerados por tanto como casos con inestabilidad de microsatélites. Desafortunadamente no se han podido estudiar el resto de proteínas reparadoras del ADN al no ser viable la remisión de muestras desde su centro de procedencia en Japón a nuestro laboratorio para realizar un estudio homogéneo de las mismas.

En las Figuras 9, 10, 11 y 12 se muestran las imágenes del estudio inmunohistoquímico (IHQ) de expresión de las proteínas reparadoras del ADN (proteínas MMR) en los 3 casos procedentes del Hospital Universitario 12 de Octubre, junto con una muestra con expresión conservada de las 4 proteínas. En las imágenes correspondientes a los pacientes 002, 023 y 039 se muestra la ausencia de tinción nuclear para MLH1 y PMS2 en las células tumorales, observándose tinción nuclear positiva de los linfocitos que acompañan al tumor (control interno). Se observa asimismo la tinción nuclear positiva para MSH2 y MSH6 en las células tumorales. En el paciente 013, caso sin inestabilidad de microsatélites, se evidencia la tinción nuclear positiva para MHL1, MSH2, MSH6 y PMS2 en las células tumorales.

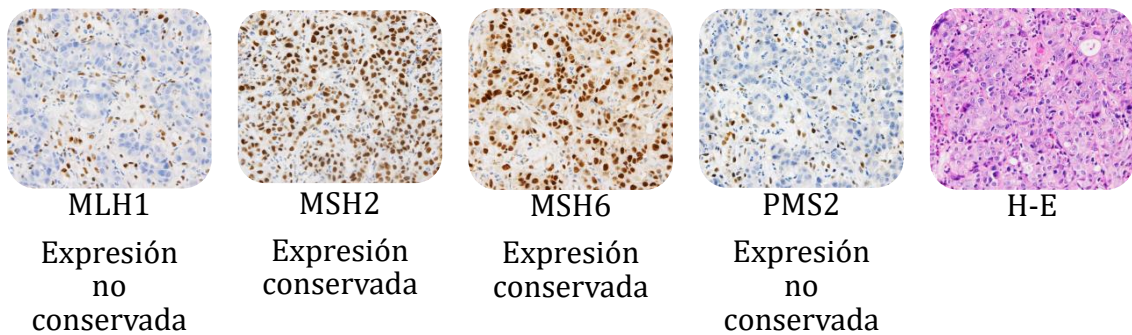
**Figura 9. Estudio de la expresión de las proteínas MMR del paciente 002.**



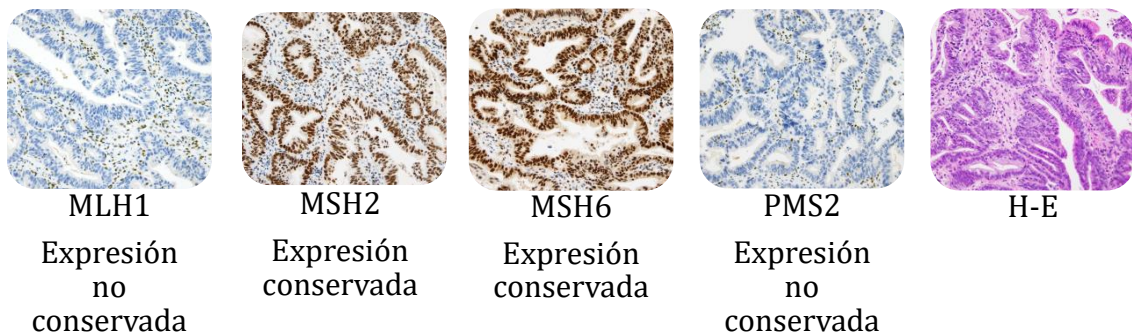
**Figura 10. Estudio de la expresión de las proteínas MMR del paciente 013.**



**Figura 11. Estudio de la expresión de las proteínas MMR del paciente 023.**



**Figura 12. Estudio de la expresión de las proteínas MMR del paciente 039.**



## ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE EL ORIGEN GEOGRÁFICO Y LAS VARIABLES ESTUDIADAS

En las Tablas 17, 18 y 19 se muestran los resultados del análisis de las posibles diferencias en las características clínico-patológicas en la incidencia de inestabilidad de microsatélites y en los parámetros de inflamación sistémica de acuerdo al origen geográfico de los pacientes divididos en Oeste y Este.

Esta posible relación se ha estudiado mediante el test de Chi-Cuadrado de Pearson o el test exacto de Fisher, según correspondía, así como mediante la t de Student o la prueba de Mann-Whitney en el caso de variables cuantitativas según procedía.

Como se describe en la Tabla 17 se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los resultados entre ambas poblaciones en lo referente a la distribución de casos según la clasificación de Lauren, las distintas combinaciones de quimioterapia empleadas en el tratamiento neoadyuvante, el número de ciclos administrados como neoadyuvancia y la localización de la recidiva.

El análisis de la incidencia de la inestabilidad de microsatélites (Tabla 18) no ha mostrado una diferencia estadísticamente significativa, detectándose 2 casos en la población asiática y 4 casos en la occidental. Estos resultados deben interpretarse con cautela debido a la diferente metodología empleada, dado que en los casos de Japón solo se estudió la pérdida de expresión de MLH1 mientras que en los casos occidentales se estudió la pérdida de expresión también de MSH2, MSH6 y PMS2. Todos los casos occidentales con inestabilidad de microsatélites mostraban pérdida de MLH1 y PMS2, sin detectarse ningún caso de pérdida de expresión de MSH2 o MSH6.

Finalmente la Tabla 19 resume los resultados del análisis de las diferencias en los parámetros de inflamación sistémica entre ambas poblaciones. En este caso se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la variable LDH pre-cirugía.

Al no ser poblaciones equiparables en parámetros esenciales para hacer un análisis conjunto de las mismas, se decidió continuar el estudio analizando la

cohorte de pacientes más amplia, la constituida por los pacientes de origen occidental.

**Tabla 17. Comparación de las características clínico-patológicas entre cohorte Occidental y Oriental.**

Características clínico-patológicas		Oeste N=91	Este N=25	p-valor*
Edad, media (IC)		64,4 (62,4 - 66,3)	63,36 (58,2 - 68,4)	0,64
Género, n (%)	Hombre	72 (79,1)	15,0 (60,0)	0,06
	Mujer	19 (20,9)	10 (40,0)	
Localización del tumor primario, n (%)	Proximal	23 (25,3)	10 (40,0)	0,21
	Distal	68 (74,7)	15 (60,0)	
Clasificación de Lauren, n (%)	Intestinal	39 (53,4)	6 (24,0)	<b>0,01</b>
	No intestinal	34 (46,6)	19 (76,0)	
Resecabilidad al diagnóstico, n (%)	Resecable	79 (86,8)	25 (100,0)	0,06
	No resecable	12 (13,2)	0 (0,00)	
Esquema neoadyuvancia, n (%)	Dobletes	27 (29,7)	2 (8,0)	<b>0,03</b>
	Tripletes	64 (70,3)	23 (92,0)	
Nº ciclos neoadyuvancia, media (IC)		3,46 (3,21 - 3,71)	2,16 (1,88 - 2,44)	<b>0,00</b>
Resultado resección, n (%)	R0	76 (83,5)	23 (92,0)	0,49
	R1, R2	12 (13,2)	2 (8,0)	
	No resección	3 (3,3)	0 (0,0)	
ypN0, n (%)	Sí	32 (35,2)	4 (16,0)	0,08
	No	59 (64,8)	21 (84,0)	
Adyuvancia, n (%)	Sí	60 (67,4)	19 (76,0)	0,47
	No	29 (32,6)	6 (24,0)	
Recidiva, n (%)	Sí	48 (52,7)	14 (56,0)	0,82
	No	43 (47,3)	11 (44,0)	
Localización de la recidiva, n (%)	No recidiva	43 (47,3)	11 (44,0)	<b>0,03</b>
	Locoregional	8 (8,8)	4 (16,0)	
	Distancia	21 (23,1)	10 (40,0)	
	LR+Distancia	19 (20,9)	0 (0,0)	
Recidiva peritoneal, n (%)	Sí	16 (17,6)	7 (28,0)	0,26
	No	75 (82,4)	18 (72,0)	
Recidiva hepática, n (%)	Sí	13 (14,3)	2 (8,0)	0,51
	No	78 (85,7)	23 (92,0)	
Recidiva pleuro-pulmonar, n (%)	Sí	3 (3,3)	0 (0,0)	1,00
	No	88 (96,7)	25 (100,0)	

\* p-valor determinado mediante test de Chi-Cuadrado de Pearson, test exacto de Fisher o t de Student según correspondía. R0: Resección sin afectación microscópica del borde de resección; R1: Afectación microscópica del borde de resección; R2: Afectación macroscópica del borde de resección; ypN0: Sin afectación ganglionar en la pieza quirúrgica post-neoadyuvancia; LR: Locoregional.

**Tabla 18. Comparación de la variable MMR entre cohorte Occidental y Oriental.**

Expresión MLH1, n (%)	Oeste N=91	Este N=25	p-valor*
Presente	87 (95,6)	23 (92,0)	0,47
Ausente	4 (4,4)	2 (8,0)	

\* p-valor determinado mediante test Chi-Cuadrado de Pearson.

**Tabla 19. Comparación de los parámetros de inflamación sistémica entre cohorte Occidental y Oriental.**

		Oeste N=91	Este N=25	p-valor*
LDH pre-neoadyuvancia, n (%)	≥ LSN	6 (7,8)	1 (4,0)	1,00
	< LSN	71 (92,2)	24 (96,0)	
NLR pre-neoadyuvancia, media (IC)		3,14 (2,68 - 3,61)	3,13 (2,37 - 3,89)	0,93
dNLR pre-neoadyuvancia, media (IC)		2,02 (1,71 - 2,33)	2,20 (1,71 - 2,69)	0,49
SII pre-neoadyuvancia, media (IC)		896,18 (747,78 - 1044,46)	899,56 (634,65 - 1164,48)	0,88
LDH pre-cirugía, n (%)	≥ LSN	36 (44,4)	2 (8,0)	<b>0,00</b>
	< LSN	45 (55,6)	23 (92,0)	
NLR pre-cirugía, media (IC)		1,85 (1,28 - 2,88)	1,84 (1,21 - 2,30)	0,52
dNLR pre-cirugía, media (IC)		1,28 (0,96 - 1,78)	1,22 (0,86 - 1,70)	0,55
SII pre-cirugía, media (IC)		556,50 (415,98 - 697,02)	434,82 (299,09 - 570,55)	0,32

\* p-valor determinado mediante Chi-Cuadrado de Pearson o prueba de Mann-Whitney según correspondía. LSN: Límite Superior de la Normalidad; NLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos; dNLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos derivado; SII: Índice de Inflamación Sistémica; LDH: Lactato Deshidrogenasa.



## RELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

En el análisis de la relación entre las características clínico-patológicas y los parámetros de inflamación sistémica determinados al inicio del tratamiento neoadyuvante se ha encontrado una diferencia estadísticamente significativa en el valor de la variable SII pre-neoadyuvancia respecto a la edad al diagnóstico de los pacientes. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Por el contrario, el análisis de la relación entre los parámetros de inflamación sistémica determinados antes de la cirugía y las características clínicas y patológicas, realizado igualmente mediante test de U de Mann-Whitney, test de Chi-Cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher según correspondía, no detectó diferencias estadísticamente significativas. Los resultados se muestran en la Tabla 21.



Tabla 20. Relación entre parámetros de inflamación sistémica pre-neodyuvancia y características clínico-patológicas.

	Género		Edad		Localización		Tipo Histológico Lauren	
	Hombre	Mujer	≥ 64,42	< 64,42	Proximal	Distal	Intestinal	No intestinal
<b>NLR, Media (IC)</b>	3,34 (2,78 - 3,90)	2,43 (1,91 - 2,94)	3,03 (2,17 - 3,89)	3,25 (2,76 - 3,74)	3,34 (2,51 - 4,16)	3,09 (2,52 - 3,65)	2,97 (2,12 - 3,82)	2,91 (2,29 - 3,53)
<b>p-valor*</b>	0,053		0,120		0,319		0,795	
<b>dNLR, Media (IC)</b>	2,12 (1,74 - 2,49)	1,69 (1,41 - 1,98)	2,05 (1,40 - 2,69)	2,02 (1,80 - 2,24)	2,04 (1,68 - 2,40)	2,02 (1,62 - 2,42)	2,03 (1,37 - 2,70)	1,82 (1,54- 2,09)
<b>p-valor*</b>	0,351		0,139		0,603		0,477	
<b>SII, Media (IC)</b>	975,33 (795,49 - 1155,16)	636,77 (485,67 - 787,87)	801,22 (563,22 - 1039,22)	989,83 (800,10 - 1179,55)	911,88 (672,97 - 1150,78)	902,91 (717,79 - 1088,02)	824,66 (620,83 - 1028,49)	850,34 (554,59 - 1146,09)
<b>p-valor*</b>	0,086		<b>0,036</b>		0,386		0,507	
<b>LDH ≥ LSN, n (%)</b>	3 (4,9)	3 (18,8)	2 (5,9)	4 (9,3)	0 (0,0)	6 (10,7)	1 (2,8)	2 (8,0)
<b>p-valor**</b>	0,100		0,689		0,181		0,562	

\* p-valor determinado mediante prueba de Mann-Whitney; \*\* p-valor determinado mediante test exacto de Fisher. LSN: Límite Superior de la Normalidad; NLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos; dNLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos derivado; SII: Índice de Inflamación Sistémica; LDH: Lactato Deshidrogenasa.

Tabla 21. Relación entre parámetros de inflamación sistémica pre-cirugía y características clínico-patológicas.

	Género		Edad		Localización		Tipo Histológico Lauren	
	Hombre	Mujer	≥ 64,42	< 64,42	Proximal	Distal	Intestinal	No intestinal
<b>NLR, Media (IC)</b>	2,63 (2,06 - 3,20)	1,75 (1,41 - 2,09)	2,17 (1,74 - 2,59)	2,68 (1,90 - 3,46)	1,98 (1,63 - 2,34)	2,60 (2,00 - 3,21)	2,00 (1,72 - 2,28)	3,09 (1,93 - 4,25)
<b>p-valor*</b>	0,143		0,525		0,694		0,682	
<b>dNLR, Media (IC)</b>	1,64 (1,36 - 1,92)	1,19 (0,99 - 1,39)	1,40 (1,14 - 1,67)	1,66 (1,31 - 2,02)	1,29 (1,10 - 1,47)	1,63 (1,34 - 1,93)	1,38 (1,15 - 1,61)	1,81 (1,28 - 2,34)
<b>p-valor*</b>	0,182		0,351		0,637		0,732	
<b>SII, Media (IC)</b>	587,05 (418,65 - 755,45)	421,90 (315,48 - 528,31)	439,77 (354,65 - 524,88)	646,25 (408,60 - 883,90)	375,83 (296,74 - 454,92)	612,72 (435,04 - 790,41)	440,41 (352,99 - 527,84)	697,25 (369,57 - 1024,92)
<b>p-valor*</b>	0,763		0,269		0,220		0,465	
<b>LDH ≥ LSN, n (%)</b>	27 (42,9)	9 (50,0)	15 (41,7)	21 (46,7)	6 (28,6)	30 (50,0)	13 (37,1)	16 (53,3)
<b>p-valor**</b>	0,603		0,822		0,126		0,219	

\* p-valor determinado mediante prueba de Mann-Whitney; \*\* p-valor determinado mediante test exacto de Fisher. LSN: Límite Superior de la Normalidad; NLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos; dNLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos derivado; SII: Índice de Inflamación Sistémica; LDH: Lactato Deshidrogenasa.

## RELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE

En el análisis de la relación entre la respuesta al tratamiento neoadyuvante, determinada por la tasa de resecciones con márgenes libres de enfermedad tumoral microscópica (R0), la tasa de piezas quirúrgicas sin infiltración tumoral en los ganglios aislados en la linfadenectomía (ypN0), y los porcentajes de recaídas global y hepáticas o peritoneales, y los parámetros de inflamación sistémica determinados en los puntos pre-neoadyuvancia y pre-cirugía, no se ha detectado ninguna relación estadísticamente significativa. Para el análisis se han utilizado los test de U de Mann-Whitney, test de Chi-Cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher según correspondía. Los resultados se detallan en Tablas 22 y 23.

**Tabla 22. Relación entre parámetros de inflamación sistémica pre-neoadyuvancia y respuesta al tratamiento neoadyuvante.**

	Resección		Afectación N		Recidiva		Recidiva hepática		Recidiva peritoneal	
	R0	No R0	ypN0	No ypN0	Sí	No	Sí	No	Sí	No
<b>NLR, Media (IC)</b>	3,14 (2,61 - 3,67)	3,22 (2,37 - 4,07)	3,27 (2,10 - 4,43)	3,09 (2,70 - 3,48)	2,99 (2,52 -3,45)	3,32 (2,50 - 4,14)	3,30 (2,23 - 4,37)	3,13 (2,62 - 3,64)	2,66 (1,82 - 3,51)	3,25 (2,72 - 3,79)
<b>p-valor*</b>	0,415		0,278		0,946		0,278		0,296	
<b>dNLR, Media (IC)</b>	2,03 (1,67 - 2,39)	2,01 (1,57 - 2,46)	2,13 (1,30- 2,96)	1,98 (1,77 - 2,18)	1,93 (1,69 -2,16)	2,13 (1,55 - 2,72)	2,08 (1,57 - 2,60)	2,02 (1,68 - 2,37)	1,79 (1,32 - 2,25)	2,08 (1,72 - 2,44)
<b>p-valor*</b>	0,518		0,226		0,773		0,447		0,574	
<b>SII, Media (IC)</b>	906,44 (738,21 - 1074,67)	899,22 (583,68 - 1214,75)	938,63 (652,56 - 1224,71)	887,72 (713,14 - 1062,31)	845,22 (637,47 - 1052,96)	966,74 (749,55 - 1183,92)	1004,89 (417,77 - 1592,00)	890,86 (738,02 - 1043,70)	633,90 (439,77 - 828,03)	961,82 (789,32 - 1134,32)
<b>p-valor*</b>	0,571		0,957		0,401		0,646		0,118	
<b>LDH ≥ LSN, n (%)</b>	5 (7,8)	1 (7,7)	4 (14,3)	2 (4,1)	2 (5,4)	4 (10,0)	0 (0,0)	6 (9,0)	2 (16,7)	4 (6,2)
<b>p-valor**</b>	1,000		0,182		0,676		1,000		0,234	

\* p-valor determinado mediante prueba de Mann-Whitney; \*\* p-valor determinado mediante test exacto de Fisher. R0: Resección sin afectación microscópica del borde de resección; ypN0: Sin afectación ganglionar en la pieza quirúrgica post-neoadyuvancia; LSN: Límite Superior de la Normalidad; NLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos; dNLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos derivado; SII: Índice de Inflamación Sistémica; LDH: Lactato Deshidrogenasa.

**Tabla 23. Relación entre parámetros de inflamación sistémica pre-cirugía y respuesta al tratamiento neoadyuvante.**

	Resección		Afectación N		Recidiva		Recidiva hepática		Recidiva peritoneal	
	R0	No R0	ypN0	No ypN0	Sí	No	Sí	No	Sí	No
<b>NLR, Media (IC)</b>	2,34 (1,87 - 2,82)	3,00 (1,41 - 4,59)	1,97 (1,62 - 2,32)	2,71 (2,02 - 3,39)	2,71 (1,93 - 3,49)	2,15 (1,68 - 2,62)	2,42 (1,78 - 3,06)	2,45 (1,92 - 2,98)	2,94 (0,94 - 4,94)	2,34 (1,94 - 2,73)
<b>p-valor*</b>	0,664		0,278		0,946		0,278		0,296	
<b>dNLR, Media (IC)</b>	1,50 (1,27 - 1,72)	1,80 (0,95 - 2,66)	1,42 (1,14 - 1,70)	1,61 (1,30 - 1,93)	1,65 (1,28 - 2,01)	1,43 (1,18 - 1,69)	1,60 (1,25 - 1,95)	1,54 (1,28 - 1,79)	1,71 (0,86 - 2,56)	1,51 (1,29 - 1,73)
<b>p-valor*</b>	0,925		0,686		0,689		0,257		0,551	
<b>SII, Media (IC)</b>	545,07 (393,56 - 696,58)	590,80 (281,81 - 899,80)	474,53 (327,34 - 621,73)	595,03 (400,33 - 789,72)	625,20 (387,79 - 862,62)	472,37 (354,92 - 589,83)	499,35 (334,16 - 664,54)	560,31 (406,28 - 714,34)	658,28 (121,04 - 1195,52)	529,24 (404,24 - 654,25)
<b>p-valor*</b>	0,570		0,385		0,488		0,858		0,841	
<b>LDH ≥ LSN, n (%)</b>	30 (44,1)	6 (46,2)	11 (40,7)	25 (46,3)	20 (48,8)	16 (40,0)	5 (55,6)	31 (43,1)	5 (33,3)	31 (47,0)
<b>p-valor**</b>	1,000		0,813		0,505		0,501		0,398	

\* p-valor determinado mediante prueba de Mann-Whitney; \*\* p-valor determinado mediante test exacto de Fisher. R0: Resección sin afectación microscópica del borde de resección; ypN0: Sin afectación ganglionar en la pieza quirúrgica post-neoadyuvancia; LSN: Límite Superior de la Normalidad; NLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos; dNLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos derivado; SII: Índice de Inflamación Sistémica; LDH: Lactato Deshidrogenasa.

## RELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA E INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

En el análisis de la relación entre los parámetros de inflamación sistémica y la inestabilidad de microsatélites, determinada por la pérdida de expresión nuclear de las proteínas reparadoras del ADN, no se han detectado diferencias estadísticamente significativas ni en las determinaciones pre-neoadyuvancia ni en las realizadas antes de la resección quirúrgica. Para el análisis se han utilizado los test de U de Mann-Whitney, test de Chi-Cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher según correspondía (Tablas 24 y 25).

**Tabla 24. Relación entre los parámetros de inflamación sistémica pre-neoadyuvancia e inestabilidad de microsatélites en la cohorte Occidental.**

	Expresión proteínas MMR	
	Conservada	Perdida
<b>NLR, Media (IC)</b>	3,15 (2,67 - 3,63)	3,09 (0,96 - 5,23)
<b>p-valor*</b>	0,855	
<b>dNLR, Media (IC)</b>	2,03 (1,71 - 2,35)	2,06 (0,78 - 3,33)
<b>p-valor*</b>	0,670	
<b>SII, Media (IC)</b>	891,28 (738,78 - 1043,79)	1195,74 (294,83 - 2096,65)
<b>p-valor*</b>	0,134	
<b>LDH ≥ LSN, n (%)</b>	6 (8,2)	0 (0,0)
<b>p-valor**</b>	1,000	

\* p-valor determinado mediante prueba de Mann-Whitney; \*\* p-valor determinado mediante test exacto de Fisher. LSN: Límite Superior de la Normalidad; NLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos; dNLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos derivado; SII: Índice de Inflamación Sistémica; LDH: Lactato Deshidrogenasa.

**Tabla 25. Relación entre los parámetros de inflamación sistémica pre-cirugía e inestabilidad de microsatélites en la cohorte Occidental.**

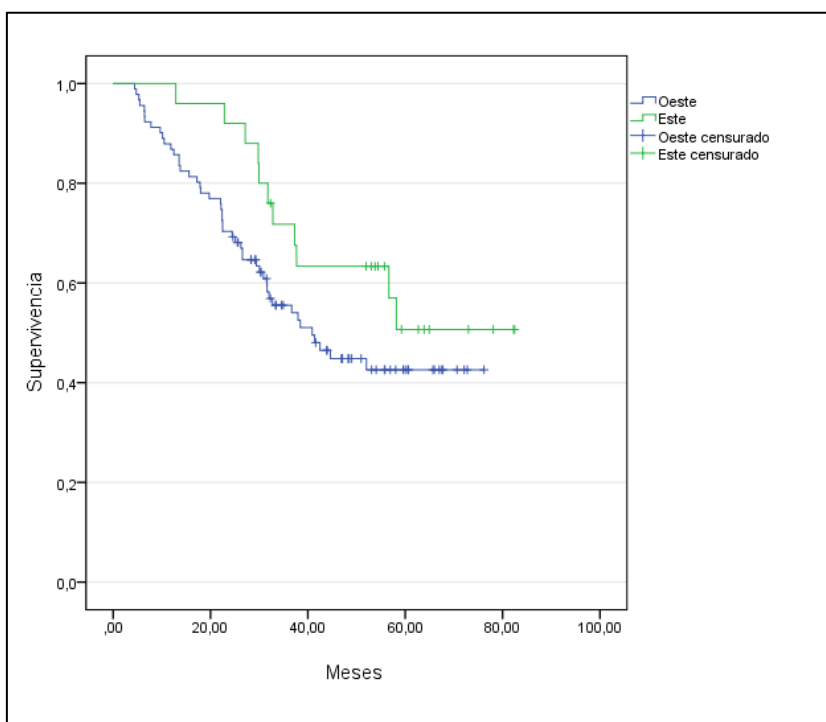
	Expresión proteínas MMR	
	Conservada	Perdida
<b>NLR, Media (IC)</b>	2,44 (1,97 - 2,92)	2,48 (0,83 - 4,14)
<b>p-valor*</b>	0,386	
<b>dNLR, Media (IC)</b>	1,54 (1,31 - 1,78)	1,58 (0,67 - 2,48)
<b>p-valor*</b>	0,399	
<b>SII, Media (IC)</b>	549,93 (410,94 - 688,91)	617,61 (-23,96 - 1259,20)
<b>p-valor*</b>	0,275	
<b>LDH ≥ LSN, n(%)</b>	34 (43,6)	2 (66,7)
<b>p-valor**</b>	0,582	

\* p-valor determinado mediante prueba de Mann-Whitney; \*\* p-valor determinado mediante test exacto de Fisher. LSN: Límite Superior de la Normalidad; NLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos; dNLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos derivado; SII: Índice de Inflamación Sistémica; LDH: Lactato Deshidrogenasa.

## ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL

La mediana de supervivencia global estimada en la cohorte Occidental ha sido de 40,90 meses (IC95% 28,82-52,98 meses), no alcanzándose la mediana en la cohorte Oriental. En este último grupo de pacientes solo se habían producido, en el momento de cerrar el seguimiento para esta tesis, 11 fallecimientos, es decir, el 56% de los pacientes de la cohorte Oriental seguían vivos. La Figura 13 muestra las curvas de supervivencia global (SG) en meses de las cohortes Occidental y Oriental calculadas mediante el método de Kaplan-Meier (K-M).

**Figura 13. Supervivencia global en meses de las cohortes Occidental y Oriental.**



La diferencia entre las medianas de supervivencia global en las dos cohortes no es estadísticamente significativa ( $p$ -valor=0,139).

Debido a las diferencias encontradas en las características clínico-patológicas esenciales entre los grupos de pacientes occidentales y orientales, como se ha mostrado anteriormente en esta tesis, y debido al pequeño tamaño muestral de la serie procedente de Japón, los análisis de SG que se describen a continuación se han realizado solamente en la cohorte Occidental.



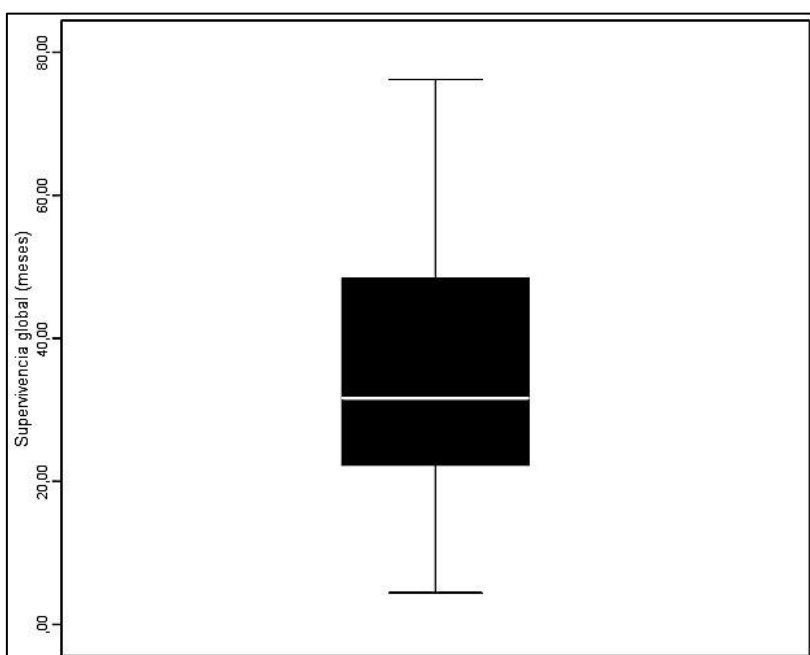
## ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL EN LA COHORTE OCCIDENTAL

Como previamente comentado, la mediana de la supervivencia global de los pacientes en la cohorte Occidental ha sido de 40,90 meses (IC95% 28,82-52,98 meses), habiendo fallecido 43 pacientes (47,25% del total) durante el periodo del estudio incluido en este proyecto. El percentil 25 se situó en 22,17 meses (DE=2,99) y el percentil 75 aún no se había alcanzado.

La supervivencia a los 3 años del diagnóstico fue del 58% y alcanzaba el 48% a los 5 años. En el último seguimiento, casi la mitad de los pacientes seguían vivos (48,36%), sin haberse producido ninguna pérdida de seguimiento.

En la Figura 14 observa la distribución de las medianas de supervivencia en la cohorte Occidental estudiada. No se han detectado pacientes *outliers*.

**Figura 14. Diagrama de caja: supervivencia global de la cohorte Occidental.**



## SUPERVIVENCIA GLOBAL SEGÚN LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Con el fin de explorar de manera inicial las posibles diferencias en supervivencia global entre los pacientes de acuerdo a sus características clínico-patológicas, se ha utilizado el test Log-Rank que tiene en cuenta de las diferencias de supervivencia entre los grupos de una misma variable en todos los puntos que dura el seguimiento.

Este análisis ha mostrado como la edad del paciente en el momento del diagnóstico, la clasificación histológica tumoral de Lauren, el tipo de resección practicada, la ausencia de afectación ganglionar en la pieza quirúrgica, el empleo de tratamiento post-operatorio complementario y la ausencia de recidiva, se relacionaron de manera estadísticamente significativa con la supervivencia global como se describe en la Tabla 26. Dentro de los pacientes que recaen, las recidivas peritoneales o hepáticas se asocian asimismo a una peor supervivencia global (Tabla 27).

**Tabla 26. Supervivencia global en la cohorte Occidental según las características clínico-patológicas estudiadas.**

		Mediana SG, meses (IC95%)**	p-valor*
<b>Edad al diagnóstico, años</b>	< 64,42	<i>No alcanzada</i>	<b>0,018</b>
	≥ 64,42	31,63 (28,99 - 34,28)	
<b>Género</b>	Hombre	41,39 (23,40 - 59,38)	0,667
	Mujer	37,97 (25,13 - 50,82)	
<b>Localización del tumor primario</b>	UGE/cardias	32,03 (1,72 - 62,33)	0,622
	Cuerpo/fundus	40,90 (23,39 - 58,41)	
	Cuerpo/antra	<i>No alcanzada</i>	
	Antra/píloro	41,39 ( <i>No determinados</i> )	
<b>Clasificación de Lauren</b>	Intestinal	<i>No alcanzada</i>	<b>0,003</b>
	No intestinal	26,54 (20,78 - 32,30)	
<b>Resecabilidad al diagnóstico</b>	Resecable	40,90 (29,72 - 52,07)	0,977
	Irresecable	26,54 ( <i>No determinados</i> )	
<b>Tratamiento neoadyuvante</b>	Doblete	36,69 (26,45 - 46,93)	0,525
	Triplete	44,61 ( <i>No determinados</i> )	
<b>Resultado de la resección</b>	R0	52,04 ( <i>No determinados</i> )	<b>0,000</b>
	R1-R2	12,45 (9,16 - 15,74)	
	No resección	10,15 (4,15 - 16,14)	
<b>ypN0</b>	Sí	<i>No alcanzada</i>	<b>0,000</b>
	No	30,88 (23,32 - 38,43)	
<b>Tratamiento adyuvante</b>	Sí	<i>No alcanzada</i>	<b>0,004</b>
	No	26,54 (19,68 - 33,40)	
<b>Recidiva</b>	Sí	26,54 (20,35 - 32,73)	<b>0,000</b>
	No	<i>No alcanzada</i>	

\* p valor según test de Log-Rank; \*\*Medianas estimadas según método de Kaplan-Meier.  
 UGE: Unión gastroesofágica; R0: Resección sin afectación microscópica del borde de resección;  
 R1: Afectación microscópica del borde de resección; R2: Afectación macroscópica del borde de resección;  
 ypN0: Sin afectación ganglionar en la pieza quirúrgica post-neoadyuvancia.

**Tabla 27. Supervivencia global en la cohorte Occidental según tipo de recidiva.**

		Mediana SG, meses (IC95%)**	p-valor*
<b>Localización de la recidiva</b>	No recidiva	<i>No alcanzada</i>	<b>0,000</b>
	Locoregional	22,07 (18,29 - 25,85)	
	Distancia	30,88 (22,76 - 39,00)	
	Locoregional + Distancia	26,54 (15,61 - 37,47)	
<b>Recidiva peritoneal</b>	Sí	26,54 (18,93 - 34,15)	<b>0,003</b>
	No	<i>No alcanzada</i>	
<b>Recidiva hepática</b>	Sí	31,63 (20,29 - 42,98)	<b>0,044</b>
	No	44,61 ( <i>No determinados</i> )	
<b>Recidiva pleuro-pulmonar</b>	Sí	26,54 (3,99 - 49,10)	0,146
	No	41,39 (23,22 - 59,56)	

\* p valor según test de Log-Rank; \*\*Medianas estimadas según método de Kaplan-Meier.

#### SUPERVIVENCIA GLOBAL Y EDAD AL DIAGNÓSTICO

Como se muestra en la Tabla 26, para la comparación de las supervivencias estimadas en las curvas de Kaplan-Meier mediante test de Log-Rank se han creado dos sub-grupos de pacientes, tomando como punto de corte la edad media de esta población de pacientes: pacientes con edad superior a 64,42 años y pacientes con edad inferior a la misma.

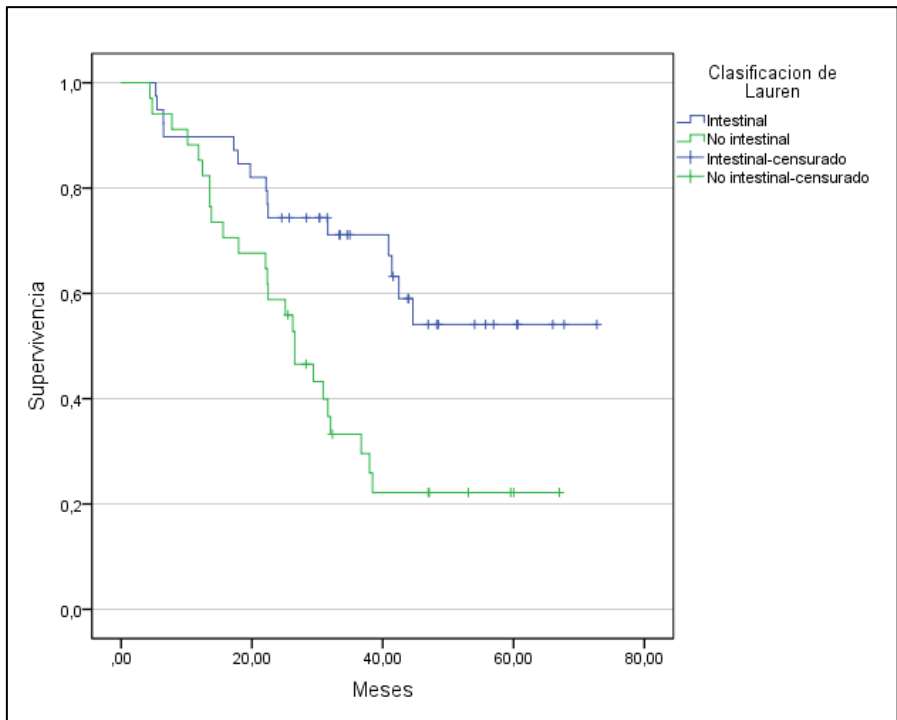
El análisis mediante regresión de Cox estima que los pacientes con edad  $\geq$  64,42 años presentan un riesgo de muerte 2,00 veces mayor que los pacientes con edad  $<$  64,42 años, siendo este incremento de riesgo estadísticamente significativo (HR 2,00, IC95% 1,11-3,60,  $p=0,020$ ).

#### SUPERVIVENCIA GLOBAL Y CLASIFICACIÓN DE LAUREN

El análisis univariante mediante regresión de Cox de la supervivencia global según la Clasificación de Lauren pone de manifiesto que existen diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con histología intestinal y no intestinal. Los pacientes con histología no intestinal tienen un riesgo de muerte

2,57 veces mayor que los pacientes con histología intestinal. Este incremento de riesgo es estadísticamente significativo (HR 2,57, IC95% 1,35-4,91,  $p=0,004$ ).

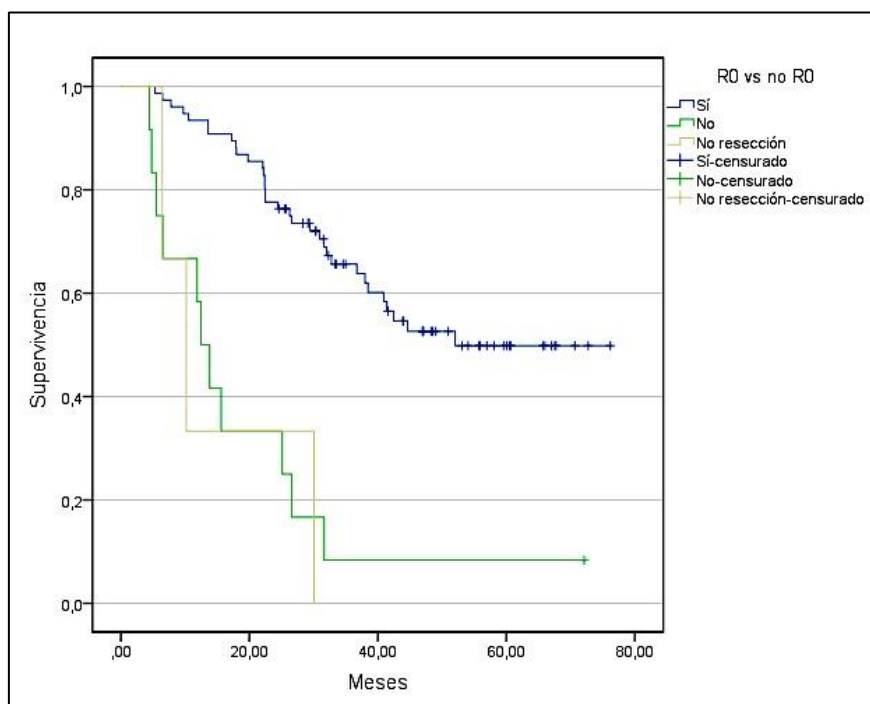
**Figura 15. Supervivencia global en meses de la cohorte Occidental según Clasificación de Lauren.**



#### SUPERVIVENCIA GLOBAL Y RESULTADO DE LA RESECCIÓN

La supervivencia de los pacientes en los cuales se logra una resección microscópicamente completa, es decir sin afectación tumoral de los bordes de resección (R0), es significativamente mayor que la de aquellos cuya pieza quirúrgica muestra afectación de los bordes microscópica (R1) o macroscópica (R2). Las medianas de supervivencia estimadas para estos grupos son de 52,04 meses (IC95% no alcanzados) para las resecciones R0 y 12,45 (9,16-15,74) para los casos R1/R2. La HR para los pacientes con resección R0 es 0,15 (IC95% 0,04-0,50,  $p=0,000$ ).

**Figura 16. Supervivencia global en meses de la cohorte Occidental según tipo de resección.**



#### SUPERVIVENCIA GLOBAL Y AFECTACIÓN GANGLIONAR EN LA PIEZA QUIRÚRGICA

El análisis mediante regresión de Cox estima que los pacientes pN0, es decir aquellos sin afectación tumoral ganglionar en la pieza de resección quirúrgica, presentan una mejor supervivencia y un menor riesgo de muerte que aquellos con ganglios afectados, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (HR 0,22, IC95% 0,10-0,49,  $p=0,000$ ).

#### SUPERVIVENCIA GLOBAL Y ADMINISTRACIÓN DE TRATAMIENTO ADYUVANTE

La mediana de supervivencia global de los pacientes que reciben tratamiento adyuvante post-cirugía no se alcanza en las curvas de Kaplan Meier frente a 26,54 meses (IC95% 16,68-33,40) de los que no lo reciben (Log-Rank  $p$ -valor=0,004). El análisis mediante regresión de Cox estima que los pacientes que reciben tratamiento post-operatorio complementario presentan un riesgo de muerte 0,43 veces menor que los pacientes que no reciben tratamiento

adyuvante. Esta disminución del riesgo de muerte resulta estadísticamente significativa (HR 0,43, IC95% 0,24-0,78, p=0,006).

#### SUPERVIVENCIA GLOBAL Y RECIDIVA

El análisis mediante regresión de Cox estima que los pacientes que presentan recidiva tienen un riesgo de muerte 5,87 veces mayor respecto a los pacientes que no recaen de la enfermedad. Este incremento de riesgo es estadísticamente significativo (HR 5,87, IC95% 2,72-12,65, p=0,000).

#### SUPERVIVENCIA GLOBAL Y LOCALIZACIÓN DE LA RECIDIVA

Como hemos señalado anteriormente, la localización locoregional de la recidiva tumoral tiene una relación estadísticamente significativa con la supervivencia global de los pacientes. Los pacientes con recidiva exclusivamente a nivel locoregional alcanzaron una mediana de supervivencia de 22,07 meses (IC95% 18,29-25,85) frente a los 30,88 meses (IC95% 22,76-39,00) de los que lo hicieron exclusivamente a distancia y los 26,54 meses (IC95% 15,61-37,47) de aquellos en los que la enfermedad recidivó tanto localmente como a distancia.

#### **Análisis de la supervivencia global y recidiva peritoneal**

El análisis mediante regresión de Cox estima que los pacientes que presentan una recidiva peritoneal tienen un riesgo de muerte 2,50 veces mayor que los pacientes que no presentan este tipo de recidiva, siendo este incremento de riesgo estadísticamente significativo (HR 2,50, IC95% 1,32-4,72, p=0,005).

#### **Análisis de la supervivencia global y recidiva hepática**

De manera similar a lo hallado con la recidiva peritoneal, los pacientes que presentan una recaída a nivel hepático tienen un riesgo de muerte 1,97 veces mayor que los pacientes que no la presentan, siendo este incremento de riesgo estadísticamente significativo (HR 1,97, IC95% 1,00-3,89, p=0,048).

## ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL SEGÚN EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE REPARACIÓN DEL ADN (PROTEÍNAS MMR)

La mediana de supervivencia global en los pacientes con expresión conservada de las proteínas reparadoras del ADN es de 40,90 meses (IC95%, 29,08-52,72 meses), mientras es de 6,40 meses para pacientes con pérdida de la expresión nuclear de alguna de ellas (IC95% no determinado). Esta diferencia no es estadísticamente significativa en la prueba de Log-Rank ( $p=0,787$ ).

## ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL SEGÚN LOS PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA

En la Tabla 28 se resumen los resultados del análisis de la supervivencia global estimada según el método de Kaplan-Meier comparando la misma entre los diversos grupos formados, de acuerdo a los parámetros de inflamación sistémica estudiados en esta tesis según el test de Log-Rank.

Se han utilizado como punto de corte para categorizar los casos, los valores de las medianas de las variables NLR, dNLR y SII, todas ellas determinadas en los momentos temporales pre-neoadyuvante y pre-quirúrgico. De esta manera, los casos se han agrupado según que el resultado estuviera por encima o por debajo de la mediana correspondiente. Respecto al punto de corte de la variable LDH, se han utilizado los valores de los laboratorios locales de cada hospital participante para determinar si el valor absoluto estaba por encima o no del Límite Superior de Normalidad (LSN). El análisis no ha evidenciado ninguna relación estadísticamente significativa entre los parámetros inflamatorios sistémicos y la supervivencia global en este grupo de pacientes (Tabla 28).



**Tabla 28. Supervivencia global según los parámetros de inflamación sistémica de los pacientes de la cohorte Occidental.**

		<b>SG meses, mediana (IC95%)**</b>	<b>p-valor*</b>
<b>LDH pre-neoadyuvante</b>	≥ LSN	<i>No alcanzado</i>	0,432
	< LSN	41,39 ( <i>No determinados</i> )	
<b>NLR pre-neoadyuvante ≥ mediana</b>	Sí	42,48 (16,57 – 68,38)	0,764
	No	41,39 ( <i>No determinados</i> )	
<b>dNLR pre-neoadyuvante ≥ mediana</b>	Sí	42,48 ( <i>No determinados</i> )	0,888
	No	41,39 (30,14 – 52,65)	
<b>SII pre-neoadyuvante ≥ mediana</b>	Sí	52,04 ( <i>No determinados</i> )	0,771
	No	40,90 (34,16 - 47,64)	
<b>LDH pre-quirúrgico</b>	≥ LSN	42,48 (25,14 - 59,81)	0,423
	< LSN	36,69 (22,42 - 50,97)	
<b>NLR pre-quirúrgico ≥ mediana</b>	Sí	41,39 (27,57 - 55,21)	0,772
	No	38,43 (14,10 – 62,77)	
<b>dNLR pre-quirúrgico ≥ mediana</b>	Sí	40,90 (26,95 - 54,85)	0,658
	No	38,43 (12,79 - 64,08)	
<b>SII pre-quirúrgico ≥ mediana</b>	Sí	41,39 (26,18 - 56,60)	0,869
	No	38,43 (16,29 - 60,58)	

\* p-valor según test de Log-Rank; \*\* Medianas estimadas según método de Kaplan-Meier. LSN: Límite Superior de la Normalidad; NLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos; dNLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos derivado; SII: Índice de Inflamación Sistémica; LDH: Lactato Deshidrogenasa.

## ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL

Dado que nuestro estudio es un estudio de investigación no experimental, la ausencia de aleatorización facilita que las variables de confusión produzcan un sesgo en la estimación cruda del efecto de una variable. Para determinar el impacto crudo de los parámetros de inflamación sistémica sobre la supervivencia global, de forma independiente a otras variables que pudieran estar influyendo como variables de confusión o variables modificadoras del efecto, hemos construido un modelo de regresión de Cox ajustado a dichas variables mediante el método de Domenech Massons y cols, tal y como se ha comentado en el apartado de Material y Métodos. Las variables incluidas en el modelo máximo inicial fueron aquellas variables clínico-patológicas que han resultado estadísticamente significativas en el modelo univariante: el subtipo histológico según la Clasificación de Lauren, el tipo de resección logrado y la ausencia de afectación tumoral en la linfadenectomía.

**Tabla 29. Análisis univariante de riesgos proporcionales de Cox para la supervivencia global de la cohorte Occidental.**

Variable	HR	IC95%	p-valor
<b>Edad <math>\geq</math> 64,42 años</b>	2,00	1,11 - 3,60	<b>0,020</b>
<b>Tipo histológico No intestinal de Lauren</b>	2,57	1,35 - 4,91	<b>0,004</b>
<b>Resultado resección R0</b>	0,15	0,04 - 0,50	<b>0,000</b>
<b>Resultado patológico ypN0</b>	0,22	0,10 - 0,49	<b>0,000</b>
<b>NLR pre-neoadyuvante <math>\geq</math> mediana</b>	0,77	0,46 - 1,27	0,300
<b>NLR pre-cirugía <math>\geq</math> mediana</b>	1,01	0,63 - 1,64	0,950
<b>dNLR pre-neoadyuvante <math>\geq</math> mediana</b>	0,78	0,47 - 1,30	0,350
<b>dNLR pre-cirugía <math>\geq</math> mediana</b>	1,67	0,99 - 2,81	0,052
<b>SII pre-neoadyuvante <math>\geq</math> mediana</b>	0,80	0,48 - 1,30	0,370
<b>SII pre-cirugía <math>\geq</math> mediana</b>	0,77	0,48 - 1,25	0,300

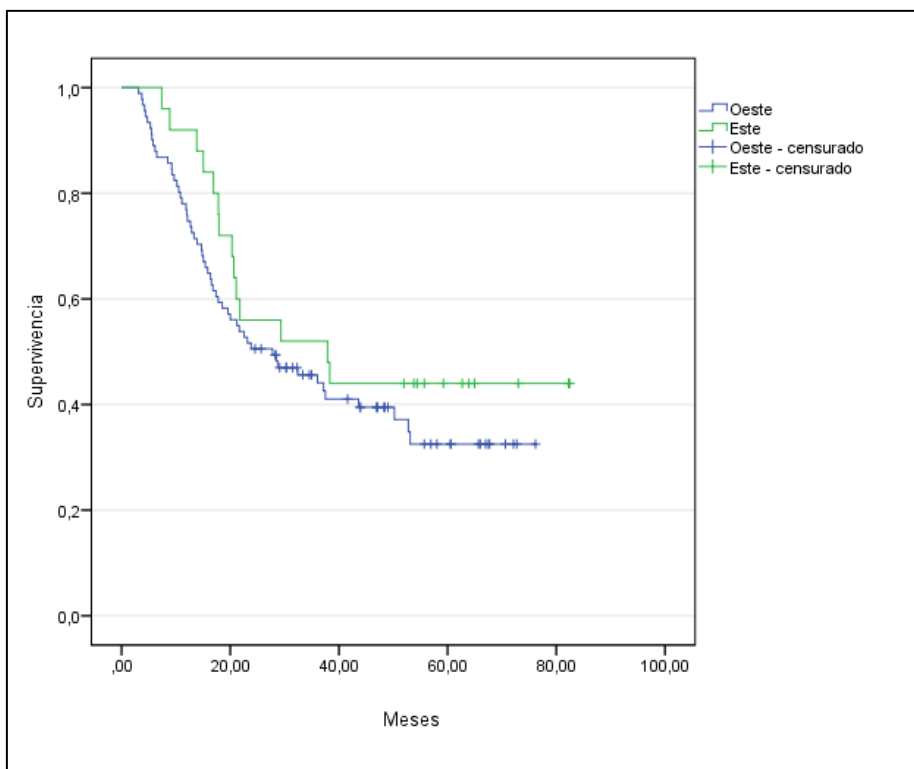
R0: Resección sin afectación microscópica del borde de resección; ypN0: Sin afectación ganglionar en la pieza quirúrgicapost-neoadyuvancia; NLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos; dNLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos derivado; SII: Índice de Inflamación Sistémica.

Sin embargo, ninguno de los parámetros de inflamación sistémica estudiados, y detallados en la Tabla 29, ha demostrado tener un valor pronóstico independiente del resto de las variables consideradas en el modelo multivariante sobre la supervivencia global en nuestra población occidental de pacientes.

## ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN

Se han determinado las medianas de supervivencia libre de progresión tumoral (SLP) estimadas mediante el método de Kaplan-Meier de las cohortes Occidental y Oriental, cuyas curvas se representan en la Figura 17.

**Figura 17. Supervivencia libre de progresión en meses de las cohortes Occidental y Oriental.**



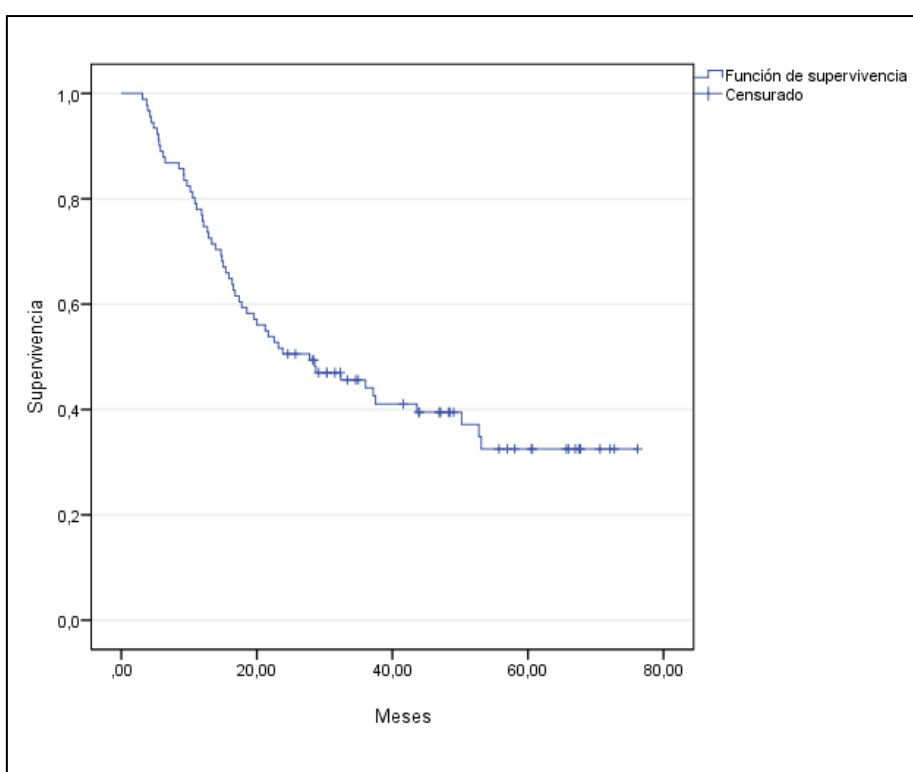
La mediana de la supervivencia libre de progresión en la cohorte Occidental es de 27,79 meses (IC95% 14,00-41,58 meses), mientras que la mediana de la supervivencia libre de progresión en la cohorte Oriental es de 37,91 meses (IC95% 10,94-64,88 meses). La diferencia entre las medianas de SLP en las dos cohortes no es estadísticamente significativa ( $p=0,273$ ). En el momento del último contacto de seguimiento, el 44% de los pacientes asiáticos no habían recaído frente a un 38,46% de los pacientes occidentales.

Debido a las diferencias clínico-patológicas descritas anteriormente en esta tesis y el pequeño tamaño muestral, los sucesivos análisis de SLP se han realizado solamente en la cohorte Occidental.

## ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN EN LA COHORTE OCCIDENTAL

Como hemos señalado anteriormente, la mediana de la supervivencia libre de progresión en la cohorte Occidental ha sido de 27,79 meses (IC95% 14,00-41,58 meses), habiendo recaído 56 pacientes (61,54%) (Figura 18). El percentil 25, es decir el tiempo en el que se han producido el 25% de las recidivas se sitúa en 12,12 meses (DE=1,74).

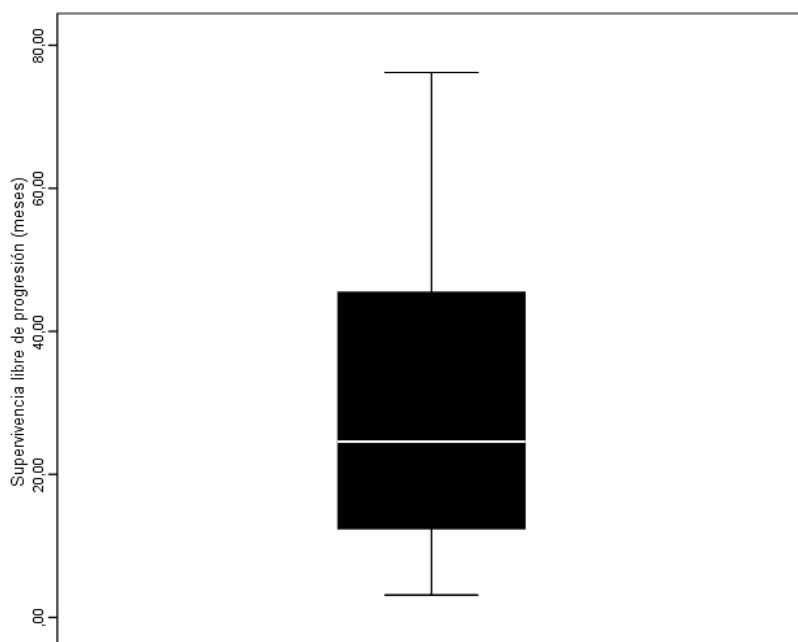
**Figura 18. Supervivencia Libre de Progresión tumoral de la cohorte Occidental.**



En el primer año la tasa de recidivas es del 24,17%, a los 2 años del 49,45%, a los 3 años del 53,84% y a los 5 años del 61,54%.

En la Figura 19 se representa la distribución de las medianas de la supervivencia libre de progresión en la cohorte Occidental, no habiéndose detectado casos de pacientes *outliers*.

**Figura 19. Diagrama de caja: Supervivencia Libre de Progresión de la cohorte Occidental.**



## SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SEGÚN LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Con el fin de analizar qué características clínico-patológicas podrían relacionarse con la supervivencia libre de progresión en los pacientes occidentales, se ha utilizado el test Log-Rank para comparar las medianas de SLP estimadas mediante el método de Kaplan-Meier. Se aplicó también un modelo de regresión de Cox, para identificar qué variables podrían tener valor pronóstico en la SLP y analizar el mismo, estimando para esto la Hazard Ratio (HR) y sus intervalos de confianza.

En el análisis se ha evidenciado como la edad del paciente en el momento del diagnóstico, la Clasificación de Lauren, el tipo de resección practicada, la ausencia de afectación ganglionar en la pieza quirúrgica y el empleo de tratamiento post-operatorio complementario, influyen de manera estadísticamente significativa en la supervivencia libre de progresión en estos pacientes (Tabla 30).

**Tabla 30. Supervivencia libre de progresión en la cohorte Occidental según las características clínico-patológicas estudiadas.**

		Mediana, meses (IC95%)**	p-valor*
<b>Edad al diagnóstico</b>	≥ 64,42 años	17,77 (12,62 - 22,92)	<b>0,042</b>
	< 64,42	43,63 (20,48 - 66,78)	
<b>Género</b>	Hombre	23,16 (7,68 - 38,64)	0,569
	Mujer	28,51 ( <i>No determinados</i> )	
<b>Localización del tumor primario</b>	UGE/cardias	17,77 (0,00 - 37,88)	0,744
	Cuerpo/fundus	28,51 (4,83 - 52,20)	
	Cuerpo/antro	13,89 ( <i>No determinados</i> )	
	Antro/píloro	27,79 (0,00 - 56,71)	
<b>Clasificación de Lauren</b>	Intestinal	<i>No alcanzada</i>	<b>0,000</b>
	No intestinal	14,71 (7,20 - 22,22)	
<b>Resecabilidad al diagnóstico</b>	Resecable	27,79 (13,32 - 42,26)	0,875
	Irresecable	15,86 (0,00 - 39,06)	
<b>Tratamiento neoadyuvante</b>	Doblete	27,79 (17,65 - 37,93)	0,653
	Triplete	23,81 (2,71 - 44,92)	
<b>Resultado de la resección</b>	R0	37,15 (18,25 - 56,06)	<b>0,000</b>
	R1-R2	5,78 (0,00 - 12,02)	
	No resección	3,74 (2,74 - 4,74)	
<b>ypN0</b>	Sí	<i>No alcanzada</i>	<b>0,000</b>
	No	16,36 (13,64 - 19,08)	
<b>Tratamiento adyuvante</b>	Sí	37,52 (17,52 - 57,51)	<b>0,000</b>
	No	12,68 (5,05 - 20,30)	

\* p valor según test de Log-Rank; \*\*Medianas estimadas según método de Kaplan-Meier. UGE: Unión gastroesofágica; R0: Resección sin afectación microscópica del borde de resección; R1: Afectación microscópica del borde de resección; R2: Afectación macroscópica del borde de resección; ypN0: Sin afectación ganglionar en la pieza quirúrgica post-neoadyuvancia.

## SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN Y EDAD AL DIAGNÓSTICO

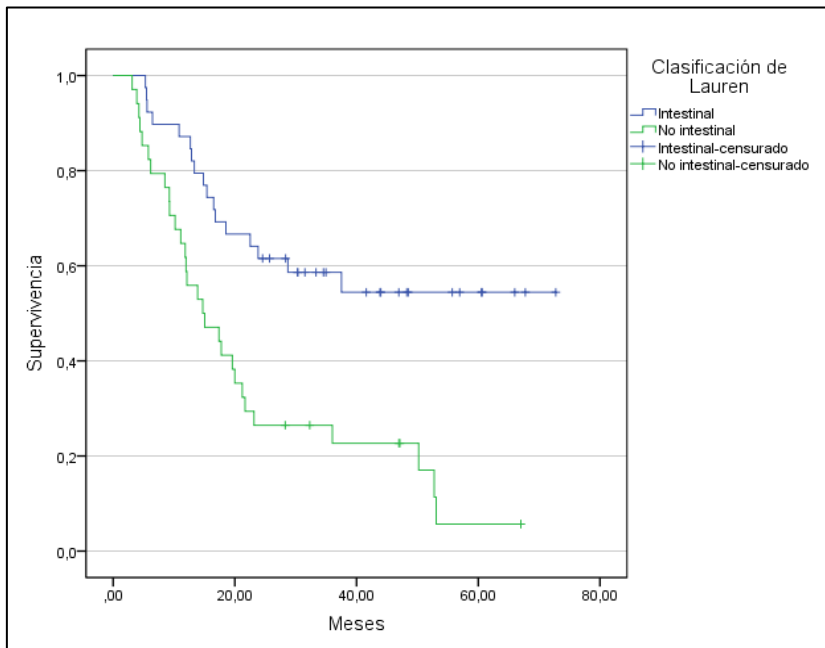
La comparación mediante el test de Log-Rank de la variable edad se ha realizado dividiendo a los pacientes en dos grupos según estuviesen por encima o por debajo del valor de la media de las edades de la población occidental del estudio: pacientes con edad superior o igual a 64,42 años y pacientes con edad inferior a 64,42 años. En el análisis mediante regresión de Cox se estima que los pacientes con edad  $\geq 64,42$  años presentan un riesgo de recidiva 1,72 veces mayor que los pacientes con edad  $< 64,42$  años, siendo este incremento de riesgo estadísticamente significativo (HR 1,72, IC95% 1,01-2,93,  $p=0,044$ ).

## SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAUREN

El análisis univariante mediante regresión de Cox de la supervivencia libre de progresión según la Clasificación de Lauren muestra una diferencia estadísticamente significativa entre pacientes con histología intestinal y no intestinal. Los pacientes con histología no intestinal lograron una mediana de supervivencia libre de progresión estimada de 14,71 meses (IC95% 7,20-22,22) frente a una mediana no alcanzada en los de tipo intestinal (Log-Rank  $p$ -valor 0,000). De acuerdo con el análisis de regresión de Cox los pacientes con histología no intestinal tienen un riesgo de recidiva 2,92 veces mayor que los pacientes con histología intestinal (HR 2,92, IC95% 1,60-5,35,  $p=0,000$ ).



**Figura 20. Supervivencia libre de progresión en meses de la cohorte Occidental según Clasificación de Lauren.**

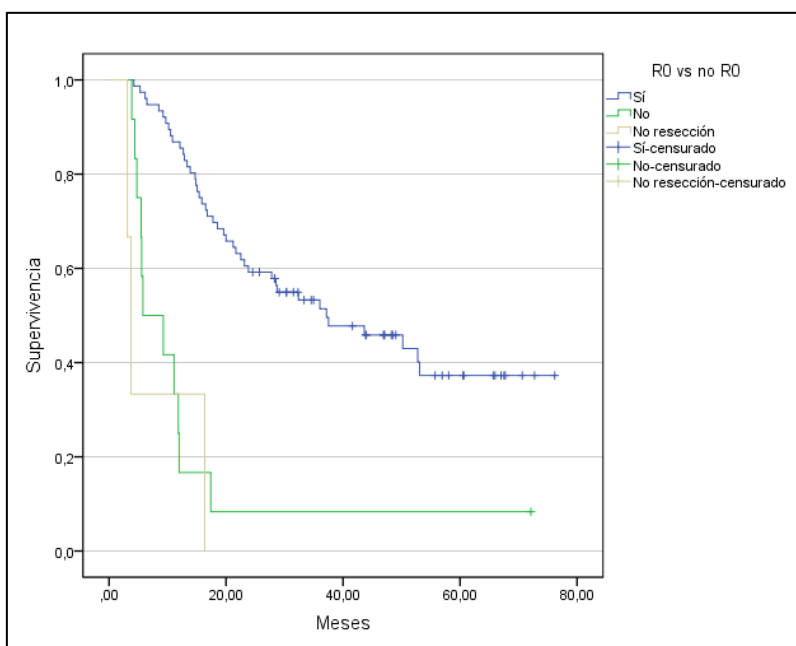


## SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN Y RESULTADO DE LA RESECCIÓN

Los pacientes en los que se logra una resección microscópica completa con bordes quirúrgicos libres (R0) en nuestra serie alcanzan una mediana de supervivencia estimada por Kaplan-Meier de 37,15 meses (IC95% 18,25-56,06), frente a los 5,78 (0,0-12,02) meses de los casos con afectación tumoral de los bordes de resección (Log-Rank p-valor=0,00).

El análisis de regresión univariante de Cox muestra una diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia a favor de las resecciones R0, con una HR de 0,11 (IC95% 0,03-0,38) y p-valor=0,000.

**Figura 21. Supervivencia libre de progresión en meses de la cohorte Occidental según tipo de resección.**



## SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN Y AFECTACIÓN GANGLIONAR EN LA PIEZA QUIRÚRGICA

El análisis mediante regresión de Cox estima que los pacientes sin afectación ganglionar en la pieza quirúrgica presentan un riesgo de recidiva inferior a aquellos con infiltración tumoral ganglionar post-neoadyuvancia, siendo esta disminución del riesgo estadísticamente significativa (HR 0,17, IC95% 0,08-0,37, p=0,000).

## SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE TRATAMIENTO ADYUVANTE

El análisis mediante regresión de Cox estima que los pacientes que reciben tratamiento post-operatorio complementario presentan un riesgo de recidiva 0,34 veces menor que los pacientes que no reciben tratamiento adyuvante. Esta disminución del riesgo de recidiva es estadísticamente significativa (HR 0,34, IC95% 0,20-0,59,  $p=0,000$ ).

## ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SEGÚN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE REPARACIÓN DEL ADN (PROTEÍNAS MMR)

La mediana de supervivencia libre de progresión según la expresión de las proteínas reparadoras del ADN es de 27,79 meses para pacientes que presentan la expresión de las proteínas del sistema MMR (IC95%, 14,14-41,44 meses), mientras es de 5,29 meses para pacientes que presentan defectos en el sistema MMR, no expresando algunas de esas proteínas (IC95% no alcanzado). Esta diferencia no es estadísticamente significativa en la prueba de Log-Rank ( $p=0,948$ ).

## ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SEGÚN LOS PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA

Para identificar cuales parámetros de inflamación sistémica influyen sobre la supervivencia libre de progresión en los pacientes de la cohorte Occidental, se ha utilizado el test Log-Rank, utilizando como punto de corte en los puntos temporales pre-neoadyuvante y pre-quirúrgico los valores de las medianas de las variables: NLR, dNLR, y SII. Respecto al punto de corte de la variable LDH en los dos puntos temporales, se han utilizado los valores de los Límites Superiores de Normalidad (LSN) de los laboratorios locales de cada hospital participante.

El análisis no ha evidenciado ninguna relación estadísticamente significativa entre los parámetros de inflamación sistémica y la SLP en este grupo de pacientes (Tabla 31).

**Tabla 31. Supervivencia libre de progresión en la cohorte Occidental según los parámetros de inflamación sistémica.**

		<b>Mediana, meses (IC95%)**</b>	<b>p-valor*</b>
<b>LDH pre-neoadyuvante</b>	≥ LSN	<i>No alcanzada</i>	0,311
	< LSN	28,71 (11,21 - 46,21)	
<b>NLR pre-neoadyuvante ≥ mediana</b>	Sí	27,79 (12,69 - 42,90)	0,864
	No	36,04 (17,23 - 54,84)	
<b>dNLR pre-neoadyuvante ≥ mediana</b>	Sí	27,79 (12,69 - 42,90)	0,833
	No	36,04 (17,23 - 54,84)	
<b>SII pre-neoadyuvante ≥ mediana</b>	Sí	28,71 (11,09 - 46,33)	0,758
	No	22,53 (0,00 - 48,93)	
<b>LDH pre-quirúrgico</b>	≥ LSN	32,39 (18,36 - 46,42)	0,632
	< LSN	18,53 (3,43 - 33,62)	
<b>NLR pre-quirúrgico ≥ mediana</b>	Sí	22,53 (2,42 - 42,64)	0,603
	No	28,51 (12,78 - 44,25)	
<b>dNLR pre-quirúrgico ≥ mediana</b>	Sí	22,53 (4,69 - 40,38)	0,548
	No	28,51 (12,15 - 44,88)	
<b>SII pre-quirúrgico ≥ mediana</b>	Sí	27,79 (4,72 - 50,86)	0,690
	No	28,71 (11,94 - 45,48)	

\* p-valor según test de Log-Rank; \*\*Medianas estimadas según método de Kaplan-Meier; LSN: Límite Superior de la Normalidad; NLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos; dNLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos derivado; SII: Índice de Inflamación Sistémica; LDH: Lactato Deshidrogenasa.

## ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESION TUMORAL

De manera similar a lo realizado para el estudio de la supervivencia global, con objeto de determinar el impacto de los parámetros de inflamación sistémica de forma independiente, hemos realizado un análisis multivariante según el método de Cox. Hemos incluido en el modelo máximo inicial aquellas variables que han resultado estadísticamente significativas en el análisis univariante: el subtipo histológico según la Clasificación de Lauren, el tipo de resección logrado, la ausencia de afectación tumoral en la linfadenectomía realizada en la cirugía.

**Tabla 32. Análisis univariante de riesgos proporcionales de Cox para la supervivencia libre de progresión.**

Variables	HR	IC95%	p-valor
<b>Edad <math>\geq</math> 64,42 años</b>	1,72	1,01 - 2,93	<b>0,044</b>
<b>Tipo histológico No intestinal de Lauren</b>	2,92	1,60 - 5,35	<b>0,000</b>
<b>Resultado resección R0</b>	0,11	0,03 – 0,38	<b>0,000</b>
<b>Resultado patológico ypN0</b>	0,17	0,08 - 0,37	<b>0,000</b>
<b>NLR pre-neoadyuvante <math>\geq</math> mediana</b>	0,61	0,31 - 1,19	0,150
<b>NLR pre-cirugía <math>\geq</math> mediana</b>	0,99	0,56 - 1,78	0,980
<b>dNLR pre-neoadyuvante <math>\geq</math> mediana</b>	0,75	0,38 - 1,48	0,400
<b>dNLR pre-cirugía <math>\geq</math> mediana</b>	2,20	1,13 - 4,28	<b>0,020</b>
<b>SII pre-neoadyuvante <math>\geq</math> mediana</b>	0,71	0,40 - 1,30	0,265
<b>SII pre-cirugía <math>\geq</math> mediana</b>	0,80	0,45 - 1,46	0,480

R0: Resección sin afectación microscópica del borde de resección; ypN0: Sin afectación ganglionar en la pieza quirúrgicapost-neoadyuvancia; NLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos; dNLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos derivado; SII: Índice de Inflamación Sistémica.

Tras el análisis por pasos, el modelo seleccionado que finalmente mejor determina el efecto de los niveles de los parámetros de inflamación sistémica sobre la supervivencia libre de progresión es aquel que incluye el subtipo histológico según la Clasificación de Lauren y el tipo de resección lograda en el caso del ratio dNLR.

**Tabla 33. Modelo multivariante explicativo de la supervivencia libre de progresión de la cohorte Occidental según los niveles del ratio dNLR.**

<b>Variable</b>	<b>HR</b>	<b>IC95%</b>	<b>p-valor</b>
<b>dNLR pre-cirugía <math>\geq</math> mediana</b>	2,23	1,14 - 4,36	<b>0,020</b>
<b>Subtipo histológico no intestinal de Lauren</b>	1,78	0,94 - 3,36	0,075
<b>Tipo resección, no R0</b>	12,40	4,86 - 31,61	<b>0,000</b>

R0: Resección sin afectación microscópica del borde de resección; dNLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos derivado.

Este modelo determina que los pacientes con un ratio dNLR por encima de la mediana presentan un riesgo de progresión tumoral 2,23 veces superior al de aquellos con valores de dNLR por debajo de la mediana, de forma estadísticamente significativa y ajustado por el subtipo histológico y el tipo de resección lograda.

## RESULTADOS EN EL SUBGRUPO DE PACIENTES DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE

En el subgrupo de pacientes procedentes del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid incluidos en este proyecto de tesis doctoral (36 casos, 40% de los casos procedentes de la población occidental), la disponibilidad de la muestra tumoral para poder llevar a cabo un estudio molecular más extenso ha permitido desarrollar el último objetivo de esta tesis: proponer una plataforma de diagnóstico patológico y molecular de utilidad en la clasificación pronóstica de los pacientes diagnosticados de adenocarcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica y sometidos a un tratamiento potencialmente curativo.

El 88,9% del total de pacientes de esta cohorte era resecable al diagnóstico. La mediana de número de ciclos de tratamiento pre-operatorio administrado fue 3 (rango: 2 - 9 ciclos), recibiendo la mayoría de los pacientes (30 casos, 83,3%) un esquema neoadyuvante con triplete con antraciclinas.

Solamente 2 de los 36 pacientes (5,6%) de esta cohorte no fueron sometidos a cirugía con intención curativa, presentando 1 paciente recidiva locorregional y a distancia y 1 paciente recidiva en forma de metástasis peritoneal en la reevaluación tras finalizar el tratamiento neoadyuvante. En el resto de los pacientes se alcanzaron resecciones quirúrgicas con márgenes libres de neoplasia en el 86,1% de los casos.

De 36 pacientes, el 58,3% recibió tratamiento adyuvante posterior a la cirugía, siguiendo el esquema empleado en la fase neoadyuvante.

La mediana de seguimiento de este grupo ha sido de 42,38 meses. Durante este periodo ha recidivado un total de 16 pacientes (44,4%), de los cuales 14 presentaron metástasis a distancia solas o acompañadas de recidiva locoregional como forma inicial de progresión de la enfermedad tras el tratamiento. Al finalizar el seguimiento, había fallecido el 61,1% de los pacientes (22 casos), 16 de ellos por el cáncer.

En las siguientes tablas se resumen las principales características clínico-patológicas de los pacientes procedentes del Hospital Universitario 12 de

Octubre, así como los resultados obtenidos del estudio de sus características inflamatorias y moleculares.

**Tabla 34. Características clínico-patológicas de los pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre.**

<b>Características clínico-patológicas, N=36</b>		
<b>Edad diagnóstico, mediana (rango)</b>		64 (48 - 85)
<b>Genero, n (%)</b>	Hombre	28 (77,8)
	Mujer	8 (22,2)
<b>Localización del tumor primario, n (%)</b>	UGE/cardias	12 (33,3)
	Cuerpo/fundus	9 (25)
	Cuerpo/antro	5 (13,9)
	Antro/píloro	10 (27,8)
<b>Clasificación de Lauren, n (%)</b>	Intestinal	13 (36,1)
	Difuso	8 (22,2)
	Mixto	4 (11,1)
	Indeterminado	3 (8,3)
	No realizado	8 (22,2)
<b>Resecabilidad al diagnóstico, n (%)</b>	Resecable	32 (88,9)
	Irresecable	4 (11,1)
<b>Nº ciclos neoadyuvancia, mediana (rango)</b>		3 (2 - 9)
<b>Esquema neoadyuvante, n (%)</b>	Tripletes antraciclinas	30 (83,3)
	Tripletes taxanos	2 (5,6)
	Dobletes	4 (11,1)
<b>Resultado resección, n (%)</b>	R0	31 (86,1)
	R1	3 (8,3)
	R2	0 (0)
	No resección	2 (5,6)
<b>Respuesta patológica en pieza quirúrgica, n (%)</b>	ypN0	11 (30,6)
	ypT0ypN0	2 (5,6)
	ypM0	33 (91,7)
<b>Recidiva y localización, n (%)</b>	No recidiva	20 (55,6)
	Locoregional	2 (5,6)
	Distancia	9 (25)
	Locoregional + Distancia	5 (13,9)
<b>Metástasis a distancia, n (%)</b>		14 (38,9)
<b>Localización de la metástasis, n (%)</b>	Recidiva peritoneal	7 (19,4)
	Recidiva hepática	4 (11,1)
	Recidiva pleuro-pulmonar	1 (2,8)

UGE: Unión gastroesofágica; R0: Resección sin afectación microscópica del borde de resección; R1: Afectación microscópica del borde de resección; R2: Afectación macroscópica del borde de resección; ypN0: Sin afectación ganglionar en la pieza quirúrgica post-neoadyuvancia; ypT0ypN0: Sin tumor residual en la pieza quirúrgica post-neoadyuvancia; ypM0: Sin afectación metastásica en la pieza quirúrgica post-neoadyuvancia.



CARACTERÍSTICAS DE LOS PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN  
SISTÉMICA EN LOS PACIENTES DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO  
12 DE OCTUBRE

En la siguiente tabla se detallan los valores obtenidos en los parámetros séricos inflamatorios de la cohorte del Hospital Universitario 12 de Octubre determinados en los puntos temporales pre-neoadyuvancia y pre-cirugía.

**Tabla 35. Parámetros séricos de inflamación sistémica en los pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre.**

		Pre-neoadyuvancia N=36	Pre-cirugía N=36
<b>Neutrófilos x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	Media, (DE)	5,81 (2,03)	3,88 (1,37)
	Mediana	5,45	3,70
	Rango, (Min-Max)	8,70 (2,70 – 11,40)	5,50 (1,80 – 7,30)
<b>Leucocitos X10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	Media, (DE)	8,72 (2,50)	6,55 (1,90)
	Mediana	7,95	6,40
	Rango, (Min-Max)	11,80 (4,50 – 16,30)	8,40 (3,10 – 11,50)
<b>Linfocitos X10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	Media, (DE)	1,97 (0,64)	1,82 (0,87)
	Mediana	1,80	1,60
	Rango, (Min-Max)	3,30 (1,20 - 4,50)	3,60 (0,60 – 4,20)
<b>Plaquetas x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	Media, (DE)	290,16 (97,55)	217,91 (82,06)
	Mediana	269,00	197,50
	Rango, (Min-Max)	330,00 (153,00 – 483,00)	352,00 (80,00 – 432,00)
<b>NLR</b>	Media, (DE)	3,17 (1,45)	2,59 (1,82)
	Mediana	2,65	2,20
	Rango, (Min-Max)	6,41 (1,29 – 7,69)	9,29 (0,71 – 10,00)
<b>dLNR</b>	Media, (DE)	2,07 (0,76)	1,65 (0,98)
	Mediana	1,73	1,47
	Rango, (Min-Max)	2,88 (1,00 – 3,88)	4,96 (0,58 – 5,54)
<b>SII</b>	Media, (DE)	976,01 (673,80)	516,23 (273,69)
	Mediana	806,55	437,29
	Rango, (Min-Max)	3222,51 (200,00 – 3423,08)	1037,50 (142,50 – 1180,00)

NLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos; dLNR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos derivado; SII: Índice de Inflamación Sistémica.

Como se reseñó anteriormente se tuvieron en cuenta para categorizar a los pacientes los valores de referencia de cada laboratorio respecto a los valores de LDH séricos. En la serie de pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre menos del 10% de los pacientes presentaban un valor de LDH superior al Límite Superior Normal (LSN) en el momento de iniciar el tratamiento neoadyuvante, porcentaje que ascendía al 57,6% en el momento previo a la cirugía con intención curativa.

**Tabla 36. Resultados de los niveles séricos de LDH en en los pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre.**

		Pre-neoadyuvancia N=31	Pre-cirugía N=33
<b>LDH ≥ LSN, n (%)</b>	Sí	3 (9,7)	19 (57,6)
	No	28 (90,3)	14 (42,4)

LDH: Lactato Deshidrogenasa; LSN: Límite Superior de la Normalidad.

## RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES Y DE OTROS BIOMARCADORES EN LOS PACIENTES DEL HOSPITAL UNIVERITARIO 12 DE OCTUBRE

En los 36 pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre se ha realizado, como se describe en el correspondiente apartado de Material y Métodos, un estudio patológico y molecular más extenso, incluyendo a la determinación por inmunohistoquímica no solo la pérdida de expresión de las proteínas reparadoras de ADN sino también de la expresión de PD-L1, E-cadherina y EBER, la posible amplificación génica de *HER2*, *MET* y *FGFR2*, así como el estudio mediante *Next-Generation Sequencing* (NGS) de las mutaciones significativas, de la carga mutacional, de la inestabilidad de microsatélites y de las amplificaciones o deleciones genómicas.

En la Tabla 37 se resumen los resultados de los estudios por inmunohistoquímica (IHQ).

**Tabla 37. Resultados de la determinación por IHQ de PD-L1, E-cadherina, EBER y MMR en la cohorte del Hospital Universitario 12 de Octubre.**

Biomarcador N=36			Biomarcador N=36		
<b>PD-L1, n (%)</b>	Positivo (CPS ≥1%)	15 (41,7)	<b>MLH1, n (%)</b>	presente	33 (91,7)
	Negativo (CPS <1%)	21 (58,3)		ausente	3 (8,3)
<b>E-cadherina, n (%)</b>	Expresión Normal	22 (61,1)	<b>MSH2, n (%)</b>	presente	36 (100)
	Expresión alterada	13 (36,1)		ausente	0 (0)
<b>EBER, n (%)</b>	Positivo	5 (13,9)	<b>MSH6, n (%)</b>	presente	36 (100)
	Negativo	31 (86,1)		ausente	0 (0)
			<b>PMS2, n (%)</b>	presente	33 (91,7)
				ausente	3 (8,3)

PD-L1: *Programmed Death Ligand 1*; EBER: *Epstein-Barr encoded RNA*; MLH1: *MutL Homolog 1*; MSH2: *MutS Homolog 2*; MSH6: *MutS Homolog 6*; PMS2: *PMS1 Homolog 2*.

A continuación se detallan los resultados obtenidos mediante hibridación *in situ* respecto a la amplificación de *HER2*, *MET* y *FGFR2*.

**Tabla 38. Resultados del estudio de hibridación de *HER2*, *MET* y *FGFR2* en la cohorte del Hospital Universitario 12 de Octubre.**

Biomarcador N=36		
<b><i>HER2</i>, N=36</b>	Amplificado, n (%)	5 (13,9)
	No amplificado, n (%)	31 (86,1)
<b><i>MET</i>, N=35</b>	Amplificado, n (%)	2 (5,6)
	No amplificado, n (%)	33 (91,7)
<b><i>FGFR2</i>, N=36</b>	Amplificado, n (%)	4 (11,1)
	No amplificado, n (%)	32 (88,9)

*HER2*: Human Epidermal growth factor Receptor 2 gene; *MET*: Mesenchymal to Epithelial Transition gene; *FGFR2*: Fibroblast Growth Factor Receptor 2.

La mayoría de las amplificaciones génicas encontradas fueron mutuamente excluyentes, detectándose 2 únicos casos de co-amplificación de *MET* y *FGFR2*. Por el contrario, la presencia de alteraciones simultáneas en la expresión de las diversas proteínas estudiadas por IHQ fue más frecuente, destacando:

- 4 de los 5 pacientes EBER positivos fueron también PD-L1 positivos (CPS >15)
- 1 paciente EBER positivo presentó amplificación de *HER2*
- Los 3 pacientes MMR deficientes fueron PD-L1 positivos
- 2 pacientes MMR deficientes presentaron expresión anormal de E-cadherina
- 6 pacientes presentaron expresión anormal de E-cadherina y resultado positivo de PD-L1
- 1 paciente presentó expresión anormal de E-cadherina y amplificación de *HER2* simultáneamente
- 2 pacientes fueron PD-L1 positivos y *HER2* amplificados.

Tabla 39. Resumen de resultados de Hibridación *in situ* e Inmunohistoquímica en la cohorte del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Nº caso	MET	HER-2	FGFR2	PD-L1	EBER	E-cadherina	MMR
01			amplificación			expresión normal	
02				expresión positiva			pérdida de expresión
03		amplificación					
04				expresión positiva	expresión positiva	expresión normal	
05		amplificación		expresión positiva			
07						expresión normal	
08							
09			amplificación				
10				expresión positiva	expresión positiva	expresión normal	
11							
12				expresión positiva			
13		amplificación		expresión positiva		expresión normal	
14							
15				expresión positiva	expresión positiva		
16						expresión normal	
17		amplificación					
18							
19				expresión positiva			
20							
21						expresión normal	
22				expresión positiva			
23				expresión positiva		expresión normal	pérdida de expresión
24				expresión positiva		expresión normal	
25							
26				expresión positiva		expresión normal	
27						expresión normal	
28						expresión normal	
30	amplificación		amplificación	expresión positiva	expresión positiva		
31		amplificación			expresión positiva		
32	amplificación		amplificación				
33							
34							
36						expresión normal	
39				expresión positiva		expresión normal	pérdida de expresión
41				expresión positiva			
42							

 pérdida de expresión  
 expresión normal  
 expresión positiva  
 amplificación

ESTUDIO MEDIANTE *NEXT-GENERATION SEQUENCING* DE OTRAS ALTERACIONES MOLECULARES EN LOS PACIENTES DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE

El análisis realizado por NGS ha confirmado los resultados respecto a la inestabilidad de microsatélites (IMS) determinada por inmunohistoquímica mediante la pérdida de expresión de las proteínas reparadoras de ADN (sistema MMR-deficiente). Los 3 casos evidenciados por IHQ se confirmaron mediante el estudio genómico de los 77 marcadores incluidos en la plataforma empleada, no encontrándose ningún otro caso de IMS mediante este análisis.

El estudio molecular exhaustivo ha permitido además clasificar los 36 pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre en 3 categorías de acuerdo al valor de la carga mutacional tumoral de cada caso (*Tumor Mutational Burden*, TMB). De esta manera se han dividido en TMB-bajo (TMB < 5 Mut/mb), TMB-medio (TMB 5-10 Mut/mb) y TMB-alto (TMB > 10 Mut/mb) siendo los porcentajes de los pacientes en cada subgrupo del 25%, 44,4% y 27,8% respectivamente.

En esta cohorte, todos los pacientes presentaron al menos una alteración genómica en el análisis mediante NGS (mutaciones o cambios en el número de copias de alguno de los genes incluidos en el panel). El número medio de alteraciones genómicas por paciente fue de 11,61 (rango 1-45).

**Tabla 40. Incidencia de las alteraciones moleculares por sujeto en la cohorte de pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre.**

	Nº IDENTIFICATIVO DE PACIENTE																																									
	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	30	31	32	33	34	36	39	41	42						
nº alteraciones totales por sujeto	45	22	25	5	11	32	11	12	9	17	1	19	2	1	12	10	7	17	10	1	1	11	16	6	20	14	10	9	16	6	9	3	5	17	3	3						
nº mutación por sujeto	2	8	1	2	1	1	0	2	4	4	1	3	1	1	1	1	2	4	3	1	1	10	1	2	1	3	0	0	4	2	1	2	0	15	1	3						
nº deleción/amplificación por sujeto	43	14	24	3	10	31	11	10	5	13	0	16	1	0	11	9	5	13	7	0	0	1	15	4	19	11	10	9	12	4	8	1	5	2	2	0						

- **Mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas**

El 86,1% de los pacientes ha presentado alguna mutación en al menos uno de los genes analizados. El número medio de mutaciones por muestra encontrado fue de 2,47 (rango 0-15). El gen mutado con más frecuencia es el gen supresor tumoral *TP53* (38,8%, n=14) y *APOE* (19,4%, n=7). Además de las mutaciones

en *TP53* y en *APOE*, se encontraron mutaciones en *ARID1A* (11,1%, n=4), *PIK3CA* (11,1%, n=4) y *SMAD4* (8,3%, n=3).

- **Amplificaciones y deleciones**

El 86,1% de las muestras tumorales analizadas presentaban al menos un cambio en el número de copias (CNV). La media de alteraciones encontradas en el número de copias fue de 9,13 (rango 0-43). El gen con la más alta incidencia de deleciones ha sido *ATRX* (50%, n=18) seguido de *DDX3C* (47,2%, n=17), *RBM10* (41,6%, n=15), *USP9X* (38,8%, n=14), *STAG2* (36,1%, n=13), *KDM5C* (36,1%, n=13), *KDM6A* (36,1%, n=13), *BCOR* (36,1%, n=13), *AMER1* (27,7%, n=10), *XMYM3* (27,7%, n=10), *ERAP2* (25%, n=9), *HLA-B* (22,2%, n=8), *TSC* (22,2%, n=8), *ZFH3* (16,6%, n=6), *HLA-A* (16,6%, n=6), *CUL4B* (16,6%, n=6), *RASA1* (13,8%, n=5), *JAK2* (11,1%, n=4), *PIK3R1* (11,1%, n=4). Los genes amplificados con más frecuencia han sido *CCNE1* y *EIF1AX* en un 8,3% (n=3), seguidos de *AR* (5,5%, n=2), *CDK6* (5,5%, n=2), *MYC* (5,5%, n=2), *KLF5* (5,5%, n=2), y *ZNF217* (5,5%, n=2).

En la Tabla 41 en la siguiente página se representa de manera gráfica el resumen de estas alteraciones.





## ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA EN LOS PACIENTES DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE

De cara al análisis de esta cohorte, se ha extendido el periodo de seguimiento de los pacientes hasta el 31 Diciembre de 2020.

Las alteraciones moleculares detectadas han evidenciado influir sobre la supervivencia de estos pacientes. No obstante, debido al pequeño tamaño muestral, en algunos casos solo es posible observar tendencias positivas. En las Tablas 42 y 43 se reportan los valores estimados de las medianas y los p-valor asociados para supervivencia global y supervivencia libre de progresión para estas variables, calculadas mediante método de Kaplan-Meier.

**Tabla 42. Supervivencia global en la cohorte del Hospital Universitario 12 de octubre respecto a las alteraciones moleculares.**

		Mediana, meses (IC95%)*	p-valor*
<b>EBER</b>	Positivo	<i>No alcanzada</i>	0,104
	Negativo	42,53 (34,97 - 50,10)	
<b>Proteínas MMR</b>	Expresión conservada	43,91 (35,64 - 52,18)	0,410
	Expresión ausente	<i>No alcanzada</i>	
<b>E-cadherina</b>	Expresión normal	60,16 (47,42 - 72,90)	<b>0,002</b>
	Expresión alterada	22,40 (7,37 - 37,42)	
<b>TMB</b>	Alto	<i>No alcanzada</i>	0,067
	No alto	42,53 (33,88 - 51,18)	
<b>PD-L1</b>	Positivo	60,16 (25,01 - 95,31)	0,354
	Negativo	42,53 (34,16 - 50,90)	
<b>HER2</b>	Amplificado	30,09 (0,00 - 72,12)	0,247
	No amplificado	44,67 (28,25 - 61,08)	
<b>MET</b>	Amplificado	<i>No alcanzada</i>	0,625
	No amplificado	48,42 (31,37 - 65,46)	
<b>FGFR2</b>	Amplificado	22,40 ( <i>No determinados</i> )	0,924
	No amplificado	43,91 (31,14 - 56,68)	

\* Estimados según método de Kaplan-Meier. EBER: *Epstein-Barr encoded RNA*; MMR: *Mismatch Repair*; TMB: *Tumor Mutational Burden*; PD-L1: *Programmed death Ligand 1*; HER2: *Human Epidermal growth factor Receptor 2 gene*; MET: *Mesenchymal to Epithelial Transition gene*; FGFR2: *Fibroblast Growth Factor Receptor 2*.

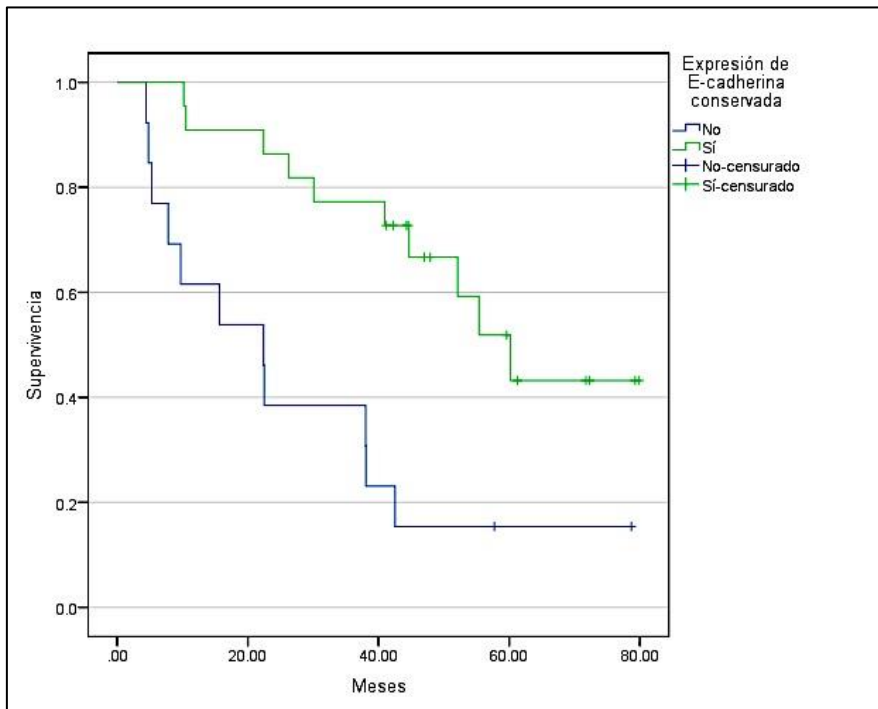
Tabla 43. Supervivencia libre de progresión en la cohorte del Hospital Universitario 12 de Octubre respecto a las alteraciones moleculares.

		Mediana, meses (IC95%)*	p-valor*
<b>EBER</b>	Positivo	<i>No alcanzada</i>	0,127
	Negativo	39,73 (30,97 - 48,50)	
<b>Proteínas MMR</b>	Expresión conservada	42,53 (29,61 - 55,45)	0,446
	Expresión ausente	<i>No alcanzada</i>	
<b>E-cadherina</b>	Expresión normal	57,20 (43,28 - 71,12)	<b>0,002</b>
	Expresión alterada	14,96 (1,17 - 28,75)	
<b>TMB</b>	Alto	<i>No alcanzada</i>	0,090
	No alto	39,73 (31,93 - 47,54)	
<b>PD-L1</b>	Positivo	57,20 ( <i>No determinados</i> )	0,244
	Negativo	39,73 (30,94 - 48,52)	
<b>HER2</b>	Amplificado	15,82 (0,7 - 31,57)	0,156
	No amplificado	53,55 (34,89 - 72,20)	
<b>MET</b>	Amplificado	19,14 ( <i>No determinados</i> )	0,625
	No amplificado	48,42 (31,37 - 65,46)	
<b>FGFR2</b>	Amplificado	19,14 ( <i>No determinados</i> )	0,948
	No amplificado	42,53 (27,71 - 57,35)	

\* Estimados según método de Kaplan-Meier. EBER: *Epstein-Barr encoded RNA*; MMR: *Mismatch Repair*; TMB: *Tumor Mutational Burden*; PD-L1: *Programmed death Ligand 1*; HER2: *Human Epidermal growth factor Receptor 2 gene*; MET: *Mesenchymal to Epithelial Transition gene*; FGFR2: *Fibroblast Growth Factor Receptor 2*.

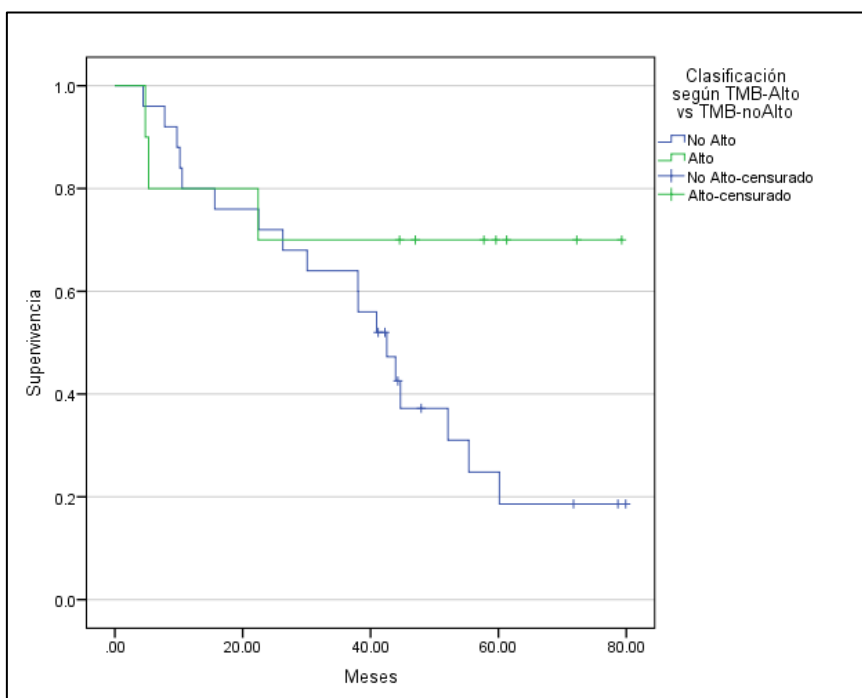
Como se muestra en la Figura 22, los pacientes con expresión anormal de E-cadherina tienen peor supervivencia global respecto a los otros sub-grupos de pacientes. El análisis mediante Log-Rank evidencia diferencias estadísticamente significativas en las medianas de la supervivencia global de los pacientes con expresión alterada o no de esta proteína (22,40 vs. 60,16 meses,  $p=0,002$ ).

**Figura 22. Supervivencia global según la expresión de E-cadherina en los pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre.**



De manera similar, pero sin alcanzar la significación estadística como se detalla en la tabla anterior, los tumores con elevada carga mutacional también presentan una diferencia notable en supervivencia global.

**Figura 23. Supervivencia global según Carga Mutacional Tumoral en los pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre.**

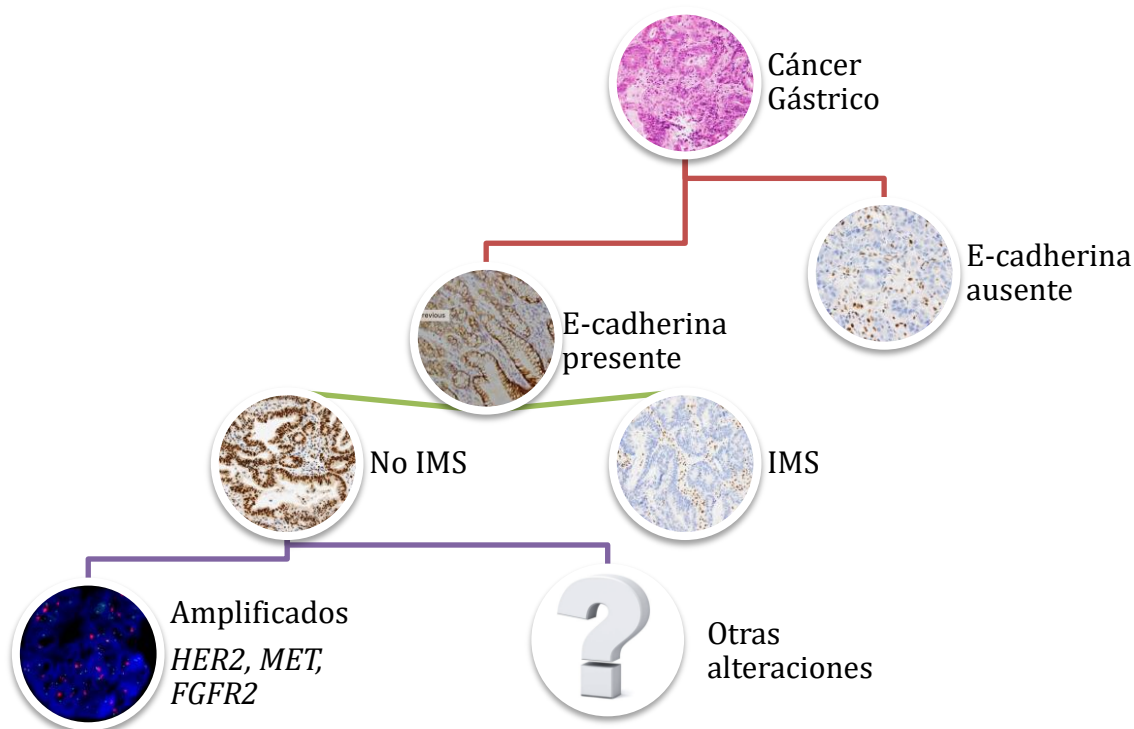


Dada la significativa diferencia en la supervivencia global entre los pacientes con expresión conservada o no de E-cadherina, y debido al valor límite estadístico, pero muy relevante clínicamente, de acuerdo a la presencia de elevada carga mutacional, hemos procedido a agrupar a los pacientes pertenecientes a la cohorte del Hospital Universitario 12 de Octubre en 4 subpoblaciones con características moleculares distintas, siguiendo un algoritmo clasificatorio jerarquizado. De esta manera la clasificación propuesta consta de los grupos:

- Pacientes con pérdida de expresión de E-cadherina
- Pacientes con Inestabilidad de Microsatélites (IMS y/o TMB-alto)
- Pacientes con amplificaciones génicas susceptibles de tratamiento dirigido
- Pacientes con alteraciones moleculares no incluíbles en las anteriores

El algoritmo de clasificación propuesto se detalla en la siguiente figura (Figura 24).

Figura 24. Algoritmo de clasificación molecular propuesto.



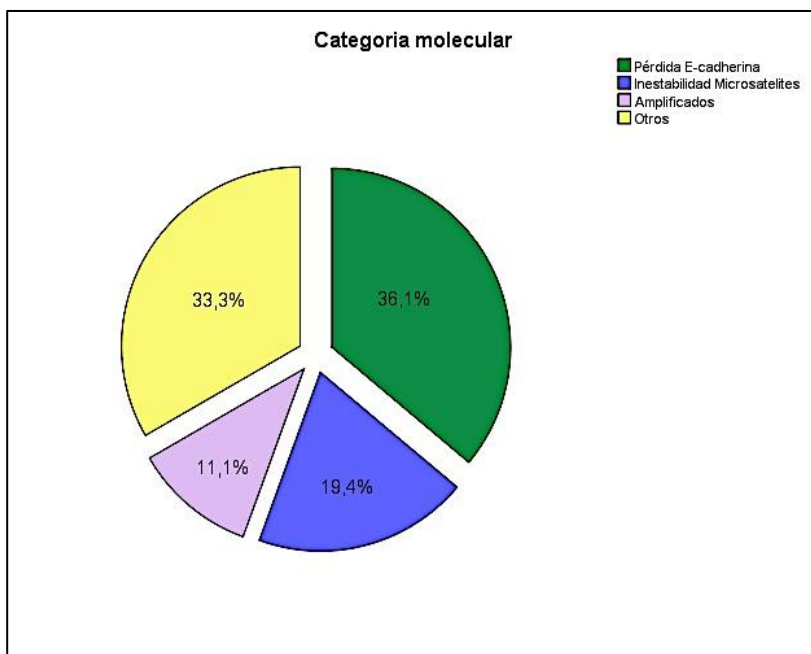
IMS: Inestabilidad de Microsatélites; *HER2*: *Human Epidermal growth factor Receptor 2 gene*; *MET*: *Mesenchymal to Epithelial Transition gene*; *FGFR2*: *Fibroblast Growth Factor Receptor 2*.

De acuerdo a esta clasificación jerarquizada, el 36,1% de los pacientes presentaban pérdida de expresión de E-cadherina, el 19,4% de los pacientes representaban el sub-grupo IMS / TMB-alto y el 11,1% se caracterizaban por tener amplificaciones en *HER2*, *MET* y *FGFR2*. El 33,3% de los pacientes restantes pertenecían al cuarto subgrupo, presentando otras alteraciones moleculares no incluíbles en las categorías anteriores.

Dada la existencia de múltiples alteraciones concurrentes en un mismo paciente, el uso de un algoritmo jerarquizado ha permitido clasificar los 2 pacientes IMS que presentaban también expresión alterada de E-cadherina y 1 paciente adicional con TMB-alto y expresión anormal de E-cadherina dentro del primer grupo de la clasificación propuesta, vale a decir en aquellos con pérdida de expresión normal de E-cadherina. La distribución de los pacientes de la

cohorte del Hospital Universitario 12 de Octubre, de acuerdo a la clasificación propuesta, se representa en la Figura 25.

**Figura 25. Porcentaje de pacientes de la cohorte del Hospital Universitario 12 de Octubre según categorial molecular.**



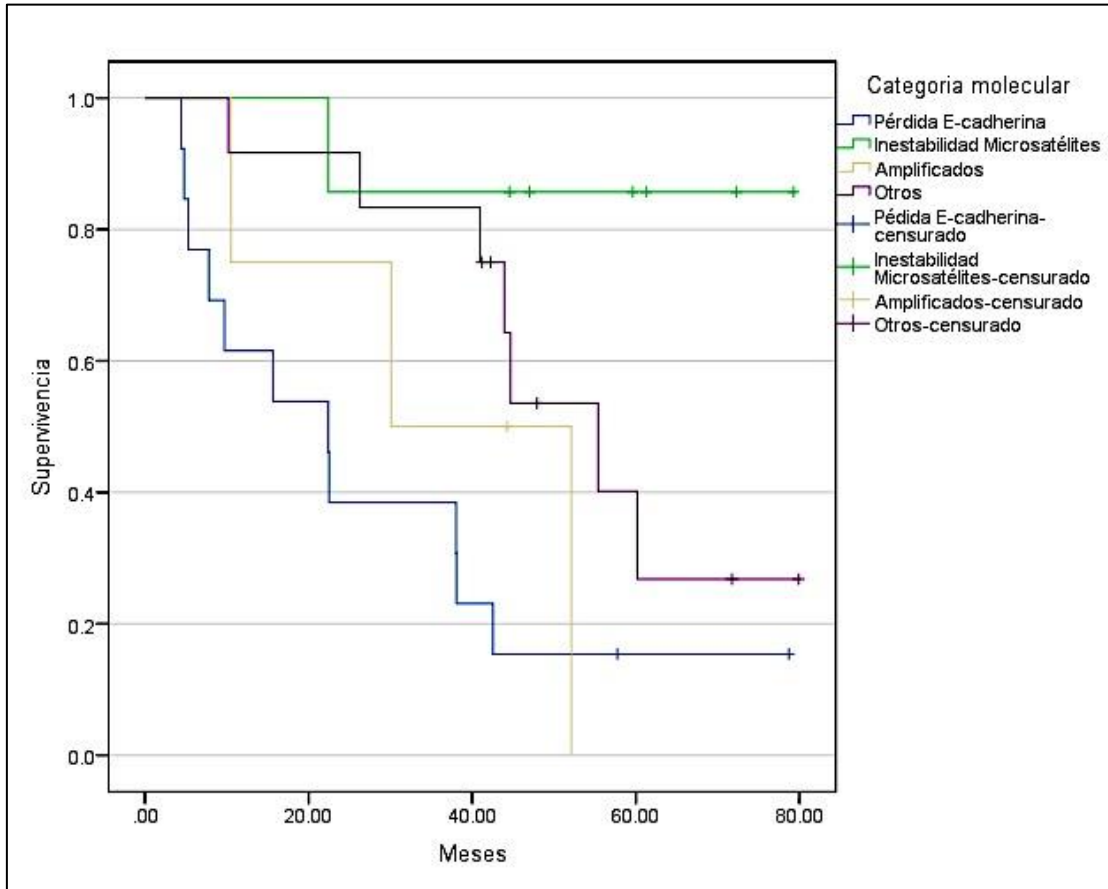
En términos de supervivencia global, los 4 sub-grupos de pacientes han presentado diferencias importantes desde el punto de vista clínico, aunque estas diferencias no han resultado ser estadísticamente significativas ( $p=0,126$ ) (Tabla 45, Figura 26).

**Tabla 44. Supervivencia global en la cohorte del Hospital Universitario 12 de Octubre respecto a la clasificación molecular propuesta.**

	Mediana, meses (IC95%)**	p-valor*
<b>E-cadherina ausente</b>	22,40 (7,37 - 37,42)	0,126
<b>IMS/TMB-alto</b>	<i>No alcanzada</i>	
<b>Amplificados</b>	30,09 (2,93 - 57,26)	
<b>Otras alteraciones</b>	55,36 (40,02 - 70,70)	

\* p-valor según test de Log Rank; \*\* Medianas estimadas según método de Kaplan-Meier. IMS/TMB: Inestabilidad de Microsatélites/*Tumour Mutational Burden*.

Figura 26. Supervivencia global en la cohorte del Hospital Universitario 12 de Octubre de acuerdo a la clasificación molecular propuesta.







# DISCUSIÓN



## CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA DEL CÁNCER GÁSTRICO Y DE LA UNIÓN GASTROESOFÁGICA RESECABLE

Para la realización de esta tesis se ha llevado a cabo un estudio observacional, multicéntrico e internacional, en el cual se estudiaron de manera retrospectiva tanto las características clínico-patológicas como moleculares de 116 pacientes que, entre los años 2013-2017, fueron diagnosticados de adenocarcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica (UGE) y fueron tratados en un régimen perioperatorio con intención curativa en 3 centros españoles, un centro italiano y otro japonés. Respecto al total de casos incluidos, el 78,4% de los pacientes eran occidentales y el 21,6% era de origen asiático.

En nuestra serie, el tratamiento quimioterápico administrado no ha sido idéntico en todos los casos, debido a los diferentes esquemas terapéuticos empleados en las distintas áreas geográficas de procedencia de los pacientes. No obstante, todos y cada uno de los pacientes incluidos recibió tratamiento preoperatorio, con el objeto de disminuir el volumen tumoral, mejorar las tasas de resección y actuar de manera precoz sobre las posibles micro-metástasis. Los pacientes estudiados habían recibido tratamiento sistémico neoadyuvante según esquemas basados en tripletes con antraciclinas (44,8%), tripletes con taxanos (30,2%) o dobletes basados en platinos (25%), siendo la mediana de ciclos recibidos con intención neoadyuvante de 3 ciclos. En el grupo de los pacientes occidentales, los tratamientos administrados han sido tripletes con antraciclinas, dobletes y tripletes con taxanos en el 57,1%, 29,7% y 13,2% de los casos respectivamente. Por el contrario, en el 92% de los pacientes orientales el esquema administrado fue un triplete con taxanos, mientras solo un 8% de ellos ha recibido un esquema con sólo 2 drogas.

En la literatura disponemos de tres grandes estudios randomizados de fase III que han estudiado diferentes esquemas de tratamiento quimioterápico en el contexto del cáncer gástrico resecable.

En 2006, Cunningham y cols (353) publicaron los resultados del estudio MAGIC, un fase III internacional que randomizaba pacientes con adenocarcinoma resecable en estadios II o superiores de tercio distal del

esófago, unión gastroesofágica y estómago a recibir tratamiento perioperatorio con ECF o cirugía aislada. Este ensayo clínico fue el primer estudio randomizado que evidenció la superioridad del tratamiento perioperatorio respecto a la sola cirugía en esta población de pacientes en términos de supervivencia global (SG). Posteriormente, los grupos franceses del FNCLCC-FFCD aportaron los resultados del estudio de fase III (354) en el que pacientes reclutados en centros franceses con adenocarcinoma resecable de tercio distal del esófago, unión gastroesofágica y estómago se randomizaban a recibir quimioterapia perioperatoria con 5-fluorouracilo y cisplatino *versus* cirugía aislada. En este estudio también se reportó la superioridad en términos de supervivencia global del tratamiento perioperatorio, pero siendo inferior al beneficio reportado en el MAGIC. En 2019, Al-Batran y cols publicaron los resultados del estudio de fase III en población alemana que aleatorizaba pacientes con adenocarcinoma de la UGE o de estómago, cT2 o superiores y cN+, a recibir tratamiento según esquema ECF/ECX o esquema FLOT (5-Fluorouracilo / Leucovorin / Oxaliplatino / Docetaxel). Este estudio demostró un aumento en la supervivencia global de los pacientes tratados con el esquema FLOT respecto a los que recibieron ECF/ECX (355).

Analizando la población de pacientes reclutada en estos tres grandes estudios, solamente el estudio MAGIC incluyó pacientes de diferentes áreas geográficas. No obstante, en este estudio no se aportaron datos analizando las posibles diferencias en las variables clínico-patológicas de los pacientes en función de su origen geográfico o étnico.

En nuestro estudio, encontramos diferencias estadísticamente significativas en los resultados entre el grupo occidental y el oriental en aspectos clínicos y patológicos esenciales, como son los referente a la distribución de casos según la clasificación de Lauren ( $p=0,01$ ), las distintas combinaciones de quimioterapia empleadas en el tratamiento neoadyuvante ( $p=0,03$ ), el número de ciclos de quimioterapia preoperatoria administrados ( $p=0,00$ ) y la localización de la recidiva ( $p=0,03$ ). En otros aspectos, no obstante, ambas poblaciones presentan resultados casi idénticos, como ocurre con el porcentaje

de pacientes que desarrolló metástasis a distancia tras la cirugía que fue comparable entre las dos cohortes de pacientes (44% Oeste vs 40% Este).

El subtipo histológico de Lauren más frecuente ha sido el difuso (76%) en los pacientes asiáticos, mientras que en los occidentales ha sido el intestinal (42,9%). En este aspecto, la proporción de pacientes con histología intestinal de la cohorte Occidental de esta tesis, es comparable con el porcentaje de pacientes con ese subtipo histológico reportado en el estudio alemán FLOT. Por otro lado, la mediana de la edad al diagnóstico fue similar en ambas cohortes y comparables con las medianas de edad reportadas en los 3 estudios de fase III anteriormente comentados.

En nuestra serie de pacientes occidentales, los varones han representado una amplia mayoría de los casos (79,1%), siendo las mujeres el 20,9% restante. En la serie oriental las mujeres, por el contrario, han sido más numerosas constituyendo el 40% de los pacientes reclutados. Esta diferente proporción de los casos según el género del paciente puede tener relevancia a la hora de valorar los resultados pues el género masculino se considera como factor de riesgo en pacientes con cáncer gástrico (339).

El 40% de los pacientes orientales incluidos presentaban un adenocarcinoma de la UGE, mientras que esta localización topográfica se encontraba solamente en un 25,3% de los pacientes occidentales. Significativamente, ninguno de los pacientes asiáticos incluidos en este trabajo presentaba un cáncer distal, es decir localizado en el cuerpo/antro gástricos.

Todos los pacientes incluidos en el grupo asiático de esta tesis presentaban tumores resecables al diagnóstico, mientras que ese porcentaje se reducía al 86,8% de los casos occidentales, correspondiendo el resto a pacientes con enfermedad localmente avanzada y potencialmente resecable.

En el estudio MAGIC, de los 250 pacientes incluidos en el grupo de tratamiento perioperatorio, el 86% terminó el tratamiento quimioterápico neoadyuvante, el 83,6% se sometió a cirugía y sólo el 41,6% finalizó el tratamiento quimioterápico perioperatorio (353). En el estudio de FNCLCC-FFCD, de los 113 pacientes asignados al brazo de tratamiento perioperatorio, 109 pacientes

(97%) recibieron tratamiento neoadyuvante y pasaron a cirugía. Entre los 109 pacientes que recibieron al menos 1 ciclo de quimioterapia preoperatoria, apenas un 23% recibieron quimioterapia postoperatoria completa (354). En el estudio FLOT, el 91% de los pacientes del grupo control y el 90% del grupo experimental completaron el tratamiento pre-operatorio. De todos los pacientes randomizados, el 37% de los pacientes del grupo ECF/ECX y el 46% de los pacientes del grupo FLOT completaron todos los ciclos de quimioterapia postoperatoria (355).

Los datos de nuestra serie son comparables a los publicados en estos grandes estudios. Como hemos reflejado en el capítulo de resultados de esta tesis, el 100% de los pacientes de nuestra serie total recibió por lo menos 1 ciclo de neoadyuvancia, el 97,4% se sometió a cirugía, y el 68,1% recibió tratamiento postoperatorio.

Respecto a los resultados quirúrgicos, en nuestra serie la tasa de resección R0 ha sido similar en ambas cohortes aunque ligeramente superior en la cohorte oriental (83,5% Oeste vs 92,0% Este). Esto posiblemente se debe a las diferencias entre los tipos de abordajes quirúrgicos empleados y/o a la distinta proporción de tumores distales entre ambas series. En la literatura también se reflejan estas diferencias entre estudios, posiblemente por la falta de grandes ensayos clínicos randomizados y multicéntricos que comparen los más recientes esquemas neoadyuvantes combinados con resección controlada D2 y cirugía sola (393). En cualquier caso, en nuestro estudio se confirma el beneficio, en los mismos términos, de lograr una resección sin afectación tumoral de los bordes quirúrgicos (R0) (HR 0,15 IC95% 0,04-0,50,  $p=0,00$ ).

La afectación tumoral ganglionar en la pieza de resección quirúrgica posterior al tratamiento neoadyuvante es probablemente, junto con la presencia de infiltración tumoral del borde quirúrgico de resección, el mayor factor pronóstico de cara a la supervivencia en los pacientes con cáncer gástrico resecable y tratados con quimioterapia perioperatoria y cirugía radical (394). En nuestra serie, la tasa de respuestas completas patológicas a nivel ganglionar en la pieza quirúrgica ( $ypN0$ ) fue de un 35,2% en los pacientes occidentales y del 16% en los pacientes asiáticos. Estos valores están en línea con los

comunicados en los 2 mayores estudios de fase III europeos y el estudio MAGIC. Al igual que lo reportado en estos estudios, la supervivencia tanto global como libre de recidiva de los pacientes incluidos en esta tesis, y que mostraron una respuesta completa patológica ganglionar, fue significativamente mayor tanto clínica como estadísticamente en comparación con aquellos en los que la pieza de resección mostraba persistencia tumoral en la linfadenectomía (HR 0,22, IC95% 0,10-0,49,  $p=0,00$  para supervivencia global).

## CARACTERIZACIÓN Y VALOR PRONÓSTICO DE LOS PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA EN CÁNCER GÁSTRICO RESECABLE

La respuesta inflamatoria sistémica (RIS) es un biosistema complejo que incluye componentes humorales y celulares que se encargan de proteger al huésped de patógenos dañinos. Varios de estos componentes han sido identificados como posibles biomarcadores, habiéndose asociado algunos de ellos con pobres resultados en el tratamiento del cáncer gástrico (395, 396).

Uno de los biomarcadores de la RIS más estudiados, no sólo en cáncer gástrico sino también en otros tipos de cánceres, es el denominado ***Neutrophil to Lymphocyte Ratio (NLR)***, es decir, el cociente entre los valores absolutos de neutrófilos y linfocitos determinados en una muestra de sangre del paciente.

Jin H y cols (302) estudiaron retrospectivamente el papel del NLR pre-neoadyuvante y pre-quirúrgico en pacientes chinos con cánceres gástricos avanzados (estadios III-IV) que habían recibido tratamiento neoadyuvante. Los autores encontraron como este biomarcador, determinado en ambos puntos temporales en el tratamiento del paciente, no solo era un factor pronóstico independiente de supervivencia libre de progresión sino que el tratamiento neoadyuvante parecía comportarse como un elemento normalizador de los valores de NLR si estos estaban inicialmente elevados. En su estudio, los pacientes con valores de NLR menos elevados presentaban medianas de supervivencia global y supervivencia libre de progresión más prolongadas.

El análisis multivariante realizado por El Aziz LM y cols en otro estudio que analizaba el parámetro NLR en una población similar de pacientes, identificó el valor de NLR pre-neoadyuvante como un factor pronóstico independiente de supervivencia global (397).

Aunque ambos estudios y sus resultados son interesantes, ambos incluían un porcentaje no desdeñable de pacientes en estadio IV, los cuales no se incluyen de manera habitual entre la población de pacientes con cáncer gástrico susceptibles de tratamiento con intención curativa que conforman la población objeto de estudio en este proyecto de tesis.

En un metaanálisis recientemente publicado sobre el valor pronóstico del NLR



en pacientes con cáncer gástrico tras una resección R0 (398), se incluyeron 10 estudios retrospectivos en 7 de los cuales se habían incluido pacientes en estadios I-III. La mayoría de los pacientes incluidos en este metaanálisis, tenían una edad superior a 60 años y eran prevalentemente varones (ratio medio H/M 2,1:1). Alrededor del 40% de los pacientes presentaron valores de NLR preoperatorio elevado, resultado coincidente con lo publicado en otros metaanálisis precedentemente publicados (rangos 36,5%-59,8%) (396, 399-400). Entre los pacientes con valores elevados de NLR, en más del 50% se reportaron valores de estadio patológico (pT) más elevados, los cuales se asociaban a un riesgo de recidiva dos veces mayor y a una peor supervivencia a largo plazo.

A pesar de la concordancia global de los resultados en estos metaanálisis, la heterogeneidad de los valores elegidos como punto de corte en los diferentes artículos incluidos se ha mostrado como un factor limitante a la hora de su interpretación, dada la falta de consenso sobre valor estadístico y el umbral a considerar para su determinación. De manera global, esta falta de consenso sobre el valor determinante para considerar un caso como elevado respecto a un parámetro de inflamación sistémica es común a todos los trabajos publicados hasta la fecha, y se repite también con otros biomarcadores de RIS descritos en la literatura. La falta de estudios prospectivos y/o randomizados que describan el rol de los biomarcadores de la RIS en pacientes con cáncer gástrico resecable, hace además que las comparaciones con los hallazgos encontrados en poblaciones con enfermedad más avanzada resulten complicadas o improcedentes.

Dada la falta de consenso en la literatura sobre el valor a elegir, en nuestra serie hemos empleado como punto de corte el valor de la mediana de cada variable de inflamación sistémica estudiada para considerar como elevado o no dicho valor, considerando que esta mediana puede ser un estadístico representativo para investigar el valor pronóstico de estas variables en nuestra población de pacientes.

En nuestra serie, el punto de corte de la variable NLR pre-neoadyuvante ha sido 2,60, mientras que el valor de la variable NLR pre-quirúrgica ha sido 1,85.

Estos valores no han mostrado poseer una relación estadísticamente significativa con ninguna característica clínico-patológica concreta en la cohorte occidental de pacientes, así como tampoco se ha mostrado su valor pronóstico respecto a la supervivencia global y libre de progresión de los pacientes occidentales. No hemos detectado tampoco diferencias en los valores de esta variable entre las poblaciones oriental y occidental estudiadas en esta tesis.

Recientemente en un estudio retrospectivo italiano (401), uno de los escasos trabajos realizados en población occidental y que incluía pacientes que habían recibido tanto tratamiento perioperatorio como cirugía aislada seguida o no de tratamiento adyuvante, se ha identificado el NLR pre-operatorio como factor pronóstico independiente para la supervivencia global en esa población de pacientes. En este estudio el punto de corte elegido para considerar un caso como NLR elevado fue la mediana, cuyo valor era de 2,34.

Otros estudios retrospectivos han estudiado el valor pronóstico de la evolución del NLR determinándolo en distintos momentos post-adyuvancia en pacientes con cánceres gástricos resecables sometidos a cirugía como tratamiento inicial. Estos estudios describen como el aumento del NLR durante el tratamiento adyuvante, o que no se normalice durante el mismo, pueden ser útiles para predecir la supervivencia de los pacientes tras dicho tratamiento (307, 402).

**El dNLR, o *derived Neutrophil to Lymphocyte Ratio***, es otro de los biomarcadores estudiados en este trabajo. Este parámetro se determina mediante el cociente entre el valor absoluto de neutrófilos partido por el resultado de la resta del total de leucocitos menos los neutrófilos, todos ellos determinados en una muestra de sangre periférica del paciente.

En nuestra serie de pacientes el punto de corte elegido para este biomarcador, es decir la mediana, ha sido 1,73 y 1,25 para el momento pre-neoadyuvancia y pre-cirugía respectivamente, valores en línea con otros estudios publicados (312, 313).

En la comparación entre las cohortes Oeste y Este los valores de dNLR no mostraron diferencias significativas en ninguno de los dos puntos temporales. En nuestra serie, este biomarcador no se ha correlacionado con ninguna

característica clínico-patológica específica de las incluidas en el análisis de la cohorte Occidental de pacientes, a diferencia de lo publicado en otros estudios realizados en poblaciones de distinta etnia y estadio tumoral y en los cuales el valor de este biomarcador sí se ha asociado con algún rasgo clínico (313)

Los valores de dNLR pre-neoadyuvancia y pre-cirugía no han mostrado poseer un valor pronóstico independiente para la supervivencia global de los pacientes occidentales incluidos en nuestra serie, siendo la significación estadística del dNLR pre-quirúrgico límite para la supervivencia global en la misma población. Sin embargo, el valor del dNLR pre-quirúrgico sí ha demostrado ser de manera estadísticamente significativa un factor pronóstico independiente para la supervivencia libre de progresión en esta población. El análisis multivariante ha reportado como, en nuestra serie occidental, los pacientes con un valor de dNLR pre-quirúrgico por encima de la mediana presentan un riesgo de progresión tumoral 2,23 veces superior al de aquellos con valores de dNLR pre-cirugía inferiores, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,020$ ).

Otros biomarcadores de la RIS, que han sido investigados como factores pronósticos en cáncer gástrico en distintos estudios, han sido el **SII o Systemic Immune-inflammation Index** y los valores séricos de LDH.

Respecto al primer biomarcador mencionado, dos grandes metaanálisis han estudiado su valor pronóstico en pacientes con tumores sólidos, indicando que valores elevados de SII podrían predecir peor supervivencia en pacientes con cáncer gástrico (288, 404).

El SII, determinado mediante el cociente resultante de dividir el producto de plaquetas por neutrófilos entre el recuento absoluto de linfocitos, se ha postulado por algunos autores como el índice que podría reflejar de manera más integral la situación del estado inmunológico e inflamatorio del huésped.

En un estudio, Wang y cols mostraron como el SII pre-operatorio fue superior a NLR y PLR en predecir la supervivencia global en pacientes con cáncer gástrico en estadios I-III sometidos a gastrectomía (323). Es importante destacar que en este estudio retrospectivo los puntos de corte de los

biomarcadores estudiados fueron los valores publicados en trabajos anteriores (NLR=2,10, PLR=120, SII=660), no estudiándose si se ajustaban a la distribución de dichos valores en la población del trabajo (288, 405-407). En este estudio retrospectivo, el análisis multivariante mostraba como los valores elevados de SII se asociaban de manera estadísticamente significativa a la edad al diagnóstico, tamaño tumoral, clasificación de Bormann, estadio TNM y los niveles de CEA.

Por otro lado, Chen L y cols (322) realizaron un estudio en el que se analizaron de manera retrospectiva dos grupos de pacientes diagnosticados de cáncer gástrico avanzado (estadios II-III). En el primer grupo de pacientes se incluyeron aquellos que se habían tratado con quimioterapia neoadyuvante según esquemas SOX o XELOX (107 pacientes), y en el segundo grupo aquellos que se habían sometido exclusivamente a cirugía con intención curativa (185 pacientes). El punto de corte óptimo se calculó mediante la determinación del área bajo la curva ROC, estratificando los pacientes según el valor de SII pre-neoadyuvante en SII-bajo ( $<600 \times 10^9/L$ ) o SII-alto ( $\geq 600 \times 10^9/L$ ).

Los pacientes con SII bajo presentaron mayor supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG) que aquellos con SII elevado, siendo las medias de SLE y SG de 57,22 vs. 41,56 meses y 62,25 vs. 45,60 meses respectivamente. Asimismo las tasas de SLE y SG a 1, 3 y 5 años eran más elevadas en los pacientes con SII-bajo. En este mismo trabajo los autores reflejan que en aquellos pacientes con valores de SII-bajo el beneficio de la quimioterapia neoadyuvante y adyuvante podría ser mayor en términos de SLE y SG.

En la población occidental analizada en esta tesis, el punto de corte elegido para la categorización de los casos según la mediana, fue de 656,13 en el caso del SII pre-neoadyuvante y de 385,96 en el caso del SII pre-quirúrgico. Los casos por debajo de estos valores se consideraron como SII bajo, es decir pacientes sin inflamación sistémica significativa. En nuestro análisis no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en el valor del SII pre-neoadyuvante entre las cohortes Oeste y Este, presentando valores de SII muy similares (656,13 Oeste vs. 726,60 Este). En la serie occidental además, los

pacientes con SII pre-neoadyuvancia más elevados han sido más frecuentemente pacientes con edades por debajo de la media de la población del estudio (64,42 años,  $p=0,036$ ). No disponemos de otros estudios en la literatura en los que se comparen estos parámetros en grupos de pacientes de etnias u orígenes geográficos distintos por lo cual debemos considerar este hallazgo como original y pendiente de su posible validación en series multicéntricas con mayor número de casos. Al contrario de cuanto reportado en las series de pacientes asiáticos anteriormente mencionadas en la literatura, en nuestra población de pacientes occidentales el SII no se ha demostrado relacionado de manera significativa con la supervivencia global o libre de progresión de los pacientes con cáncer gástrico resecable.

En diversos estudios, y como enzima que participa en el metabolismo anaeróbico, se ha descrito como **la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)** podría influir en la malignidad de los tumores a través de diferentes mecanismos, facilitando la proliferación, viabilidad y capacidad invasiva de las células cancerosas, y evitando la apoptosis mediada por mitocondrias (408-410).

Asimismo se ha publicado como la inactivación de este enzima puede bloquear oncogenes involucrados en la sobre-regulación de genes responsables del metabolismo glicolítico, de la angiogénesis y de la supervivencia celular en la célula tumoral (411).

A fecha de hoy, y según nuestro conocimiento, solo dos estudios han analizado la importancia de la LDH en los casos de cáncer de la UGE y de estómago resecables (estadios IB-IIIC) (297, 298). En estos estudios, ambos retrospectivos y realizados exclusivamente China, los pacientes se habían sometido a cirugía con intención radical de inicio sin haber recibido tratamiento neoadyuvante previo. En ambos trabajos se concluye que elevados valores pre-operatorios de LDH ( $> 245$  U/L) se asocian de manera estadísticamente significativa a peores supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad (SLE) en estos pacientes. Curiosamente, los valores de LDH no se correlacionan de la misma manera con las diferentes variables clínico-patológicas en ambos estudios.

En esta tesis, al tratarse de un estudio multicéntrico, se han considerados como LDH alto aquellos pacientes con valores por encima del Limite Superior de la Normalidad (LSN) de acuerdo a los rangos de referencia de cada hospital participante. En la población total de pacientes incluidos, los pacientes occidentales y orientales no han presentado diferencias estadísticamente significativas en los valores de LDH pre-neoadyuvante, pero sí en el valor de la LDH pre-quirúrgica ( $p=0,00$ ). De esta manera el porcentaje de pacientes considerados como metabólicamente inflamados de acuerdo a los valores de LDH pre quirúrgica ha sido de un 44,4% en la población occidental frente a un 8,0% de los pacientes asiáticos. En la cohorte Occidental, a pesar de observarse un aumento de los valores de LDH pre-cirugía en comparación con los valores pre-neoadyuvancia, la relación los valores de LDH con las características clínico-patológicas no ha resultado ser estadísticamente significativa en ninguno de los puntos temporales en los que se determinó. Tampoco hemos identificado la LDH como un factor pronóstico independiente de supervivencia global y/o libre de progresión en la población de pacientes occidentales de esta tesis.

Recientemente se han presentado algunos trabajos preliminares que estudian la posible combinación de distintos biomarcadores relacionados con la inflamación sistémica en el cáncer gástrico (310, 317). No obstante son aún escasos los que se han centrado en la posible importancia pronostica de estos biomarcadores en el cáncer gástrico resecable, así como cada estudio propone el uso de variables y calificaciones distintas (284, 308, 310, 412)

Probablemente el trabajo más concreto y orientado a una población similar a la incluida en esta tesis en lo relativo a la intención curativa del tratamiento ha sido el publicado por Kim y cols (316). Estos autores realizaron un estudio observacional prospectivo incluyendo 1986 pacientes en estadios I-III que habían sido sometidos a una gastrectomía radical. Empleando el análisis mediante curva ROC de los ratios NLR y PLR preoperatorios para determinar el punto de corte óptimo de los mismos en relación con la posibilidad de recidiva y la supervivencia global, dividieron a los pacientes en los grupos de NLR-alto/NLR-bajo y PLR-alto/PLR-bajo. En este trabajo se reportó como la

presencia de NLR-alto y PLR-alto se correlacionaban con peor pronóstico, identificando solamente el NLR pre-operatorio un factor pronóstico independiente para supervivencia global. En este sentido, y aunque la población de esta tesis es más limitada, es de origen occidental y todos recibieron tratamiento quimioterápico neoadyuvante, nuestros resultados se orientan en el mismo sentido al determinar que los pacientes con dNLR alto tienen peor supervivencia libre de recidiva.

A modo de resumen podemos decir que en este proyecto de tesis hemos observado una tendencia común en los valores de los parámetros de la RIS estudiados. En general, se ha evidenciado valores más elevados antes de comenzar el tratamiento neoadyuvante que a la finalización del mismo (o momento pre-cirugía), hallazgo que sugiere un posible efecto del tratamiento quimioterápico pre-operatorio sobre la respuesta inmune en estos pacientes. Asimismo, hemos comprobado como valores más elevados de los parámetros de la RIS pre-quirúrgicos se asocian a supervivencias libres de progresión más cortas, por lo que la determinación de estos parámetros inflamatorios de manera habitual podría ayudar a identificar aquellos pacientes en los cuales el tratamiento adyuvante podría tener un mayor impacto positivo.

## CARACTERIZACIÓN Y VALOR PRONÓSTICO DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN EL CÁNCER GÁSTRICO RESECABLE

En 2014, el *Cancer Genome Atlas* (TCGA) (32) propuso una nueva clasificación molecular de acuerdo a la cual se han definido cuatro subtipos genómicos principales en Cáncer Gástrico (CG): tumores positivos para Epstein-Barr virus (EBV), tumores con inestabilidad de microsatélites (MSI), tumores genómicamente estables (GS) y tumores con inestabilidad cromosómica (CIN). Las 295 muestras de tumor primario analizadas pertenecían a pacientes provenientes de diferentes continentes, sin tratamiento previo con quimioterapia o radioterapia y en diferentes estadios de la enfermedad (IA-IV). El estudio de la inestabilidad de microsatélites se realizó mediante PCR, determinando un porcentaje de pacientes MSI del 22%.

En nuestro estudio se incluyeron 116 pacientes vírgenes de tratamiento en estadios IB-IIIC provenientes de centros Europeos y de un centro Japonés. El porcentaje de pacientes con fenotipo IMS (o MSI) ha sido bastante inferior a lo reportado por el TCGA. Los resultados obtenidos por IHQ en nuestra serie se confirmaron mediante NGS. El porcentaje de pacientes con fenotipo IMS fue del 5,2% en la serie global y del 4,4% en la serie occidental. Una posible explicación de esta diferencia en los porcentajes entre las dos series podía ser la diferente metodología empleada para su determinación inmunohistoquímica. En el caso de la serie japonesa, esta se limitó al estudio de la pérdida de expresión de MLH1, realizándose también la técnica mediante el empleo de anticuerpos monoclonales frente a dicha proteína desarrollados por la propia Universidad de Osaka y no disponibles comercialmente ni validados en series independientes, impidiendo su comparación directa con los resultados de la serie occidental incluida en esta tesis.

En el subgrupo de pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre, se pudo estudiar la presencia o ausencia de inestabilidad de microsatélites mediante no solo IHQ sino también mediante NGS. Los 3 casos evidenciados por IHQ se confirmaron mediante el estudio genómico, no encontrándose ningún otro caso



de IMS mediante este análisis, lo que resulta en una concordancia del 100% entre ambas técnicas.

En línea con nuestros resultados, el análisis exploratorio del estudio randomizado de fase III MAGIC (98), estudio que comparaba el empleo de quimioterapia perioperatoria con Epirrubicina/Cisplatino/5-Fluorouracilo (ECF) *versus* cirugía aislada en pacientes con cáncer gastroesofágico, evidenció resultados similares a los encontrados en nuestra serie occidental. El 6,6% de las muestras quirúrgicas de los pacientes incluidos en ese análisis exploratorio, presentaba fenotipo MSI-High (MSI-H), detectando una concordancia del 97,6% en los resultados proporcionados por PCR y IHQ.

Tanto en el estudio proporcionado por el TCGA (32) como en el análisis exploratorio del estudio MAGIC(98), los tumores IMS se diagnosticaron a edades más avanzadas y más frecuentemente en mujeres, así como en el subtipo histológico intestinal de Lauren y menos frecuentemente presentaban afectación metastásica ganglionar.

En nuestra serie Occidental, a pesar del reducido número de casos, el 100% de los pacientes IMS tenía una edad superior a la mediana calculada de 64,42 años ( $p=0,042$ ). También, se ha observado una mayor tendencia en la incidencia del fenotipo IMS respecto al fenotipo EMS (o MSS) en las mujeres y en el subtipo intestinal de Lauren. Dentro del fenotipo IMS, la localización del tumor más frecuente ha sido la distal, hallazgo que confirma los resultados de estudios previos que reportaban una menor incidencia de tumores IMS y MMR-D en tumores esofágicos y de la UGE (32, 413, 414)

En el análisis exploratorio del estudio randomizado de fase III MAGIC anteriormente citado, los pacientes MSI-H o con deficiencias en el sistema MMR tratados solo con cirugía, tuvieron mejor supervivencia global que los pacientes no MSI-H y/o que fueran MMR competentes. Estos datos son concordantes con los resultados previos de estudios retrospectivos tanto asiáticos como europeos (330, 331, 413, 415). Además, existen algunos datos preclínicos que apoyan la idea de que las líneas celulares MSI-H son más resistentes a fluoropirimidinas y cisplatino (416, 417).

Debido al pequeño número de casos detectados en nuestra serie, no ha sido posible determinar el valor predictivo de la respuesta al tratamiento perioperatorio del fenotipo IMS. No obstante, sí se ha observado una tendencia mayor de este fenotipo respecto al fenotipo EMS a la existencia de resecciones incompletas (R1/R2/No resección) y de la afectación metastásica ganglionar en la pieza quirúrgica (ypN+). En este sentido cabe destacar que en nuestra serie ningún paciente IMS ha tenido una respuesta patológica completa (ypT0ypN0) en el análisis anatomopatológico de la pieza quirúrgica tras completar el tratamiento neoadyuvante. La posible relevancia de la afectación de los márgenes quirúrgicos en la supervivencia de estos pacientes es un tema aún no definido en la literatura (418).

Por el contrario, en esta tesis hemos observado una incidencia inferior de recidivas y de metástasis a distancia como presentación inicial de las mismas, hecho que se ha relacionado en algunos trabajos con la presencia de un infiltrado inflamatorio intratumoral en los pacientes con IMS. Este infiltrado podría ser el responsable de la supresión de las micrometástasis residuales tras el tratamiento complementario. Algunos estudios sugieren esta relación, a pesar de que el mencionado infiltrado es heterogéneo y no aparece de modo constante en todos los casos (419, 420).

Es importante recordar que en nuestro estudio se observó en 1 paciente la ausencia aislada de expresión de la proteína PMS2. En este mismo sujeto la expresión de la proteína MSH6 no estaba estudiada, con lo cual este caso no pudo considerarse como correctamente analizado y no se consideró un caso con inestabilidad de microsatélites, como se definen en las guías internacionales (421). En nuestra serie, ninguno de los pacientes con fenotipo IMS presentaba una mutación previamente conocida en línea germinal de los genes que codifican las proteínas reparadoras del ADN, ni antecedentes familiares compatibles con la existencia de un Síndrome de Lynch.

## RELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA Y LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN CÁNCER GÁSTRICO RESECABLE

En este trabajo hemos estudiado la posible relación entre la inestabilidad de microsatélites y la presencia de un fenotipo tumoral “inflamado” que pudiera definirse por la elevación de los diversos parámetros séricos de inflamación sistémica. Este aspecto no está recogido en la literatura científica publicada en cáncer gástrico y podría apoyar la hipótesis que defiende que los tumores con inestabilidad de microsatélites presentan una elevada carga mutacional que conduce a la producción de neoantígenos y con ello a una activación del sistema inmunológico. En este sentido en el trabajo realizado en esta tesis hemos encontrado que todos los pacientes con fenotipo IMS presentaban una alta carga mutacional tumoral (>10 mutaciones/megabase). Además, en los casos con inestabilidad de microsatélites se ha observado una tendencia al descenso en los valores de los parámetros de inflamación sistémica estudiados tras el tratamiento neoadyuvante, no alcanzando la significación estadística en la comparación con el grupo de pacientes sin estabilidad probablemente por el insuficiente tamaño muestral.

## CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER GÁSTRICO RESECABLE EN EL SUBGRUPO DE PACIENTES DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE

De manera exploratoria y generadora de nuevas hipótesis, para el manejo de los pacientes con cáncer gástrico tratado de manera multidisciplinar y con intención curativa, se ha realizado un sub-estudio en el que se han incluido los 36 pacientes procedentes del Hospital Universitario 12 de Octubre. Este análisis se llevó a cabo mediante técnicas de inmunohistoquímica para el estudio de la expresión de las proteínas del sistema MMR, PD-L1, E-cadherina y EBER, hibridación fluorescente *in situ* para el análisis de la posible amplificación génica de *HER2*, *MET* y *FGFR2*, y mediante NGS para el estudio de las mutaciones significativas, amplificaciones o deleciones genómicas, de la carga mutacional y de la inestabilidad de microsatélites.

El cáncer gástrico ha demostrado ser una neoplasia ampliamente heterogénea tanto a nivel clínico como molecular. Como se ha resumido en la introducción de esta tesis, en los últimos años varios estudios han propuesto nuevas clasificaciones dedicadas a la identificación de subtipos moleculares de pacientes con pronósticos y susceptibilidades diferentes a los distintos tratamientos. El objetivo común de estas nuevas clasificaciones es ser empleadas para la elección de una terapia más específica en cada caso y poder lograr un efecto positivo sobre la supervivencia de estos pacientes.

Entre estas clasificaciones, el mayor trabajo publicado hasta la fecha en población occidental es el presentado por el *The Cancer Genome Atlas* (32). De manera resumida podemos decir que en este trabajo los tumores se seleccionaron en primer lugar de acuerdo a la positividad de la expresión de genoma de EBV (9%). Los casos negativos fueron testados para la presencia de inestabilidad de microsatélites (MSI-H), encontrándose una incidencia de esta alteración del 22% entre los casos incluidos en dicho estudio. Finalmente, los tumores sin inestabilidad de microsatélites ni presencia de EBV se subdividieron de acuerdo con su grado de aneuploidía en genómicamente estables (GS, 20% de los casos) y en tumores con inestabilidad cromosómica (CIN). Estos últimos comprendían el 50% de todos los casos.

En el sub-estudio de la presente tesis se han empleado diversas técnicas moleculares accesibles en nuestros hospitales para valorar la aplicabilidad práctica de un abordaje similar al realizado por el TCGA.

En nuestra serie de pacientes, hemos encontrado una incidencia de casos con detección positiva de genoma de Virus de Epstein-Barr (EBER) del 13,9%, valor ligeramente superior al reportado por el TCGA pero en línea con otros estudios publicados (422) y que reflejan una gran disparidad de cifras (2-20%), probablemente debida a las distintas técnicas empleadas así como a la inclusión de poblaciones no homogéneas. En este sentido es importante recordar que nuestra modesta serie solo incluía casos en estadios Ib a IIIC mientras que el estudio del TCGA incluyó casos de estadio I a IVa.

En la publicación del TCGA los tumores EBER positivos mostraron una mayor frecuencia de amplificaciones de los genes *CD274* y *PDCD1LG2* que codifican los receptores de membrana PD-L1 y PD-L2. Esta amplificación se acompañaba de una expresión aumentada de dichos receptores. Esta asociación se ha comprobado asimismo en el subgrupo de pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre estudiados, en los cuales se ha evidenciado una expresión positiva de PD-L1 en 4 de los 5 pacientes EBER positivos. La importancia pronóstica de este hallazgo no ha sido aun establecida de manera indubitada, pero podría orientar hacia la necesidad de emplear este biomarcador a la hora de seleccionar pacientes susceptibles de posibles terapias de combinación de quimioterapia e inmunoterapia con anticuerpos monoclonales reguladores de los puntos de control inmunológico como son los anti-PD-1 / anti-PD-L1, con el fin de aumentar la respuesta inmune antitumoral.

En lo referente al subgrupo de casos con inestabilidad de microsatélites, la incidencia detectada de pérdida de expresión de las proteínas reparadoras del ADN en nuestra serie del hospital Universitario 12 de Octubre ha sido del 8,3% (3 de 36 casos). Como hemos detallado anteriormente, en estos 3 casos se ha confirmado la inestabilidad mediante secuenciación y todos presentaban una alta carga mutacional (>10 Mutaciones/megabases). A estos 3 casos se unen otros 7 en los cuales se detectó una elevada carga mutacional y juntos

conforman el grupo de tumores que se corresponderían con el subgrupo IMS descrito por el TCGA. Aunque nuestra incidencia es algo mayor a la descrita en el mencionado estudio (27,7% vs 22%), resulta coincidente con otros estudios presentes en la literatura que reportan incidencias de entre el 8% y el 35,9% (423-425). Al igual que lo ocurrido con la detección de EBER, las diferencias en la incidencia de la inestabilidad de microsatélites detectada en nuestra serie y la publicada en otros trabajos puede residir en el diferente estadio patológico de la enfermedad de los pacientes incluidos, en las distintas técnicas empleadas para su determinación (secuenciación completa del exoma en el TCGA frente a secuenciación dirigida en nuestro estudio), y en otros factores como puede ser el uso de muestras del tumor primario en vez de las metástasis. Ninguno de los pacientes con fenotipo IMS ha presentado amplificación en *MET*, *HER2* o *FGFR2*, al igual que tampoco hemos detectado entre ellos ninguna mutación en *BRAF*. Sin embargo 2 de los 3 casos con fenotipo IMS también presentaron una expresión anómala de E-caherina, hallazgo ya descrito en otro estudio previo que empleaba similar abordaje para el diagnóstico molecular (34).

El grupo denominado Genómicamente estable (GS) en el estudio del TCGA se caracteriza por alteraciones moleculares características entre las que destacan las mutaciones en los genes *RHOA* y  *$\beta$ -catenina*. Este subgrupo se ha equiparado en la práctica clínica con el subgrupo de pacientes con tumores que muestran alteraciones en la vía de  *$\beta$ -catenina* y especialmente a aquellos con alteraciones en la expresión de la proteína de membrana E-cadherina, característica esencial de los tumores pobremente cohesivos en la clasificación de la OMS detallada anteriormente en esta tesis. La incidencia de tumores con expresión alterada de E-cadherina en nuestra serie ha sido del 36,1% (13 casos), cifra superior a la correspondiente a los casos del grupo GS pero muy similar al porcentaje habitual de casos del subtipo histológico pobremente cohesivo. Este subgrupo se ha caracterizado en esta tesis por su mal pronóstico, coincidiendo con lo descrito clásicamente en la literatura para este fenotipo tumoral (27, 32-34). Como se detalla más adelante, el subgrupo de tumores con expresión alterada de E-cadherina tuvieron una supervivencia

global de 22,40 meses frente a los 60,16 meses de aquellos con expresión normal de esta proteína. Esta diferencia ha resultado no solo clínica sino estadísticamente muy significativa en la comparación univariante mediante el test de log-rank ( $p=0,002$ ).

Además, en la serie de pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre, se ha detectado al menos un cambio en el número de copias (CNV) de alguno de los genes estudiados hasta en el 86,1% de las muestras tumorales analizadas, siendo la media de estas alteraciones de 9,13 (rango 0-43), predominando las deleciones sobre las amplificaciones. Dado que el estudio mediante NGS no permite diferenciar por motivos estrictamente técnicos los casos verdaderamente amplificados de los casos poliploides, este proyecto incluyó la identificación mediante hibridación *in situ* fluorescente de los casos con verdadera amplificación de genes no sólo frecuentemente alterados en la categoría de inestabilidad cromosómica descrita en el estudio del TCGA sino también frente a los cuales existan terapias específicas dirigidas en forma de tratamiento estándar y dentro de ensayos clínicos en fases más avanzadas. Por ello se analizaron mediante este método las posibles amplificaciones de *HER2*, *MET* y *FGFR2* detectándose las mismas en un 30% de los pacientes. De los 36 pacientes, el 13,9% presentaba amplificación de *HER2*, el 5,6% de *MET* y el 11,1% de *FGFR2*. Estos resultados son muy similares a los reportados previamente en la literatura que cifraban estas alteraciones en un 17%, 6% y 9% respectivamente (32). La mayoría de las amplificaciones génicas encontradas fueron mutuamente excluyentes, detectándose 2 únicos casos de co-amplificación de *MET* y *FGFR2*, al contrario de lo detectado mediante IHQ en la expresión o pérdida de expresión de proteínas en la cual la presencia de alteraciones simultáneas ha sido frecuente. Curiosamente sólo un paciente ha presentado amplificación de *HER2* siendo EBER+, contrariamente a lo observado por el TCGA que reporta la amplificación en *HER2* como la amplificación más frecuente en este grupo de pacientes.

Debido al pequeño tamaño muestral de esta cohorte, el estudio de las alteraciones moleculares se ha limitado a un análisis descriptivo de las mismas. No obstante se ha realizado de manera exploratoria una propuesta de

algoritmo de clasificación, basado en la importancia pronóstica de cada biomarcador por separado y en la jerarquización de las pruebas a realizar para el estudio molecular de estos pacientes dada la frecuente coexistencia de alteraciones moleculares a distintos niveles y la difícil interpretación de algunas de las pruebas descritas en esta tesis. Así, y como se detalla en la parte de resultados, hemos definido 4 grupos de pacientes de manera secuencial: tumores con pérdida de E-cadherina, tumores con inestabilidad de microsatélites, tumores con amplificaciones en genes susceptibles de tratamiento específico y un último grupo de tumores no incluíbles en las categorías anteriores. Esta clasificación ha mostrado notables diferencias en la supervivencia global entre los grupos, no alcanzándose la significación estadística probablemente por el insuficiente tamaño muestral, el cual se intentará completar en un futuro.

Como se ha señalado, de especial importancia es la caracterización de los casos de acuerdo a la pérdida de expresión de E-cadherina y a la inestabilidad de microsatélites, esta última definida no sólo por la pérdida de expresión nuclear de las proteínas reparadoras del ADN sino también por aquellos casos con elevada carga mutacional. Ambos biomarcadores nos permiten definir 2 grupos de pronóstico radicalmente distinto, confirmando lo publicado en otras series.



## IMPLICACIONES PRÁCTICAS

De acuerdo con lo anteriormente expuesto en esta tesis, la inclusión de la determinación de parámetros de inflamación sistémica entre las variables pronósticas a considerar en los pacientes sometidos a tratamiento con intención curativa de un cáncer gástrico o de la unión gastroesofágica podrían ayudar a determinar aquellos con mayor riesgo de recidiva y en los cuales la administración de tratamiento sistémico post-quirúrgico es de vital importancia para mejorar sus posibilidades de supervivencia sin recaída de la enfermedad.

Asimismo se ha demostrado, en un subgrupo de pacientes cuyos tumores se han podido analizar con mayor profundidad, que la coexistencia habitual de múltiples alteraciones simultáneas en un mismo tumor confirma la heterogeneidad molecular de esta neoplasia. El estudio mediante diversas tecnologías ha permitido clasificar mejor a estos pacientes de acuerdo no solo a sus diferencias genómicas, sino también al diferente pronóstico ligado a las mismas.

## LIMITACIONES DEL ESTUDIO

A pesar de los resultados alcanzados en este proyecto de tesis, el estudio realizado presenta algunas limitaciones.

En primer lugar se trata de un estudio retrospectivo, multicéntrico y con un tamaño muestral limitado. Esto ha hecho que el análisis de algunas variables no alcanzaran, a nuestro juicio, el valor de significación esperado y que además las poblaciones de las cohortes Occidental y Oriental no fuesen totalmente comparables. En este sentido, el escaso tamaño de la muestra puede haber motivado el no encontrar diferencias estadísticamente significativas cuando existen diferencias clínicamente relevantes. Además, dada la baja incidencia de la mayoría de las alteraciones moleculares, un tamaño muestral pequeño dificulta su detección así como el encontrar posibles relaciones entre ellas y con los efectos del tratamiento. Todo ello puede explicar porque la incidencia de una cierta alteración molecular en nuestra serie de pacientes fuese inferior a la reportada en la literatura.

En segundo lugar, los distintos esquemas de quimioterapia utilizados en el tratamiento de los pacientes estudiados en esta tesis pueden haber determinado diferencias tanto en la respuesta tumoral al tratamiento perioperatorio empleado como en la supervivencia de los pacientes. El tratamiento perioperatorio o neoadyuvante del carcinoma gástrico y de la unión gastroesofágica es un área dinámica y en la cual se han producido notables cambios en los últimos años, como ha sido la incorporación de manera habitual de los tripletes con taxanos en la población occidental a partir del estudio alemán del esquema FLOT, el descenso notable del uso de antraciclinas en este contexto o el aumento de las laparoscopias como método de estadificación estandarizado. Ante este panorama cambiante, solo una serie con mayor número de pacientes y tratados de manera homogénea a partir de su diagnóstico inicial podría evitar esta limitación.

Otro aspecto que puede haber limitado nuestro estudio puede haber sido la ausencia de ventanas temporales concretas entre el fin del tratamiento preoperatorio y la intervención quirúrgica y entre esta última y el comienzo del

tratamiento postoperatorio. En la literatura científica no está reconocido de manera universal el margen de tiempo en el cual se debe intervenir quirúrgicamente al paciente ni cuantas semanas deben esperarse tras la cirugía para iniciar el tratamiento quimioterápico adyuvante. De manera universal se realiza la cirugía a las 4-6 semanas tras la administración del último ciclo de tratamiento pre-operatorio y se inicia la quimioterapia adyuvante a las 8 semanas de la cirugía si el paciente se ha recuperado convenientemente de la intervención quirúrgica.

Las muestras para el estudio de los marcadores de inflamación sistémica se obtuvieron en marcos temporales razonables antes de iniciar el tratamiento neoadyuvante y antes de la cirugía, pero no en momentos temporales fijos e idénticos para todos los pacientes, lo que debemos interpretar como un posible limitación del estudio derivada del carácter retrospectivo de la recogida de datos.

Cabe destacar que los biomarcadores inflamatorios sistémicos estudiados en esta tesis no son cáncer específicos y que la ausencia de grandes estudios prospectivos y/o randomizados en una más amplia población de pacientes no permiten a día de hoy establecer su punto de corte óptimo y su valor pronóstico cierto en pacientes con adenocarcinoma de estómago o de la unión gastroesofágica potencialmente resecable.

Finalmente es importante resaltar que aunque en nuestro estudio no todos los pacientes fueron sometidos a laparoscopia diagnóstica como método de estadificación inicial para la detección de metástasis peritoneales ocultas, la inmensa mayoría fueron intervenidos mediante cirugía con intención curativa, descartándose en el acto quirúrgico la diseminación peritoneal. En cualquier caso las diferencias en las pruebas de estadificación entre los distintos centros participantes podrían limitar de alguna manera la exactitud de los resultados y la validez de los biomarcadores estudiados en esta tesis, al no poder asegurar la homogeneidad de la estadificación entre todos los pacientes.



# CONCLUSIONES



1. Se ha realizado una descripción de las características clínico-patológicas de la población de pacientes con adenocarcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica candidatos a tratamiento con intención curativa, encontrándose diferencias significativas en las mismas según el origen étnico del paciente.
2. Se han determinado los parámetros de inflamación sistémica en la misma población, así como se ha establecido una incidencia de la inestabilidad de microsatélites del 4,4% de los casos en la población Occidental de nuestra serie.
3. No se ha encontrado ninguna relación significativa entre las variables clínico-patológicas, los parámetros de inflamación sistémica y la presencia de inestabilidad de microsatélites en la población de pacientes occidentales con adenocarcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica candidatos a tratamiento con intención curativa, excepto una relación no clínicamente relevante entre la edad al diagnóstico y el Índice de Inflamación Sistémica pre-neoadyuvante.
4. La edad en el momento del diagnóstico, la infiltración tumoral de los bordes de resección quirúrgica, el subtipo histológico según la clasificación de Lauren y la afectación ganglionar en la linfadenectomía son las variables clínico-patológicas con mayor valor pronóstico en términos de supervivencia global y supervivencia libre de progresión en los pacientes con adenocarcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica tratados con intención curativa en la población occidental de nuestra serie. La inestabilidad de microsatélites no ha demostrado su valor pronóstico en esta población.
5. El ratio Neutrófilos/Linfocitos derivado (dNLR), determinado tras finalizar el tratamiento neoadyuvante, ha mostrado tener un valor pronóstico independiente en términos de supervivencia libre de progresión, siendo su significación estadística límite para la supervivencia global en esta misma población.

6. El estudio molecular que combina inmunohistoquímica, hibridación *in situ* y secuenciación de última generación, permite identificar subgrupos de pacientes con diferente pronóstico como son los tumores con pérdida de expresión de E-cadherina o aquellos con elevada carga mutacional (TMB-alto), mereciendo valorarse su aplicación práctica en la clínica diaria



# BIBLIOGRAFÍA



1. Cancer IAFRo. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/7-Stomach-fact-sheet.pdf>: World Health Organization; 2020 [Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/7-Stomach-fact-sheet.pdf>].
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
3. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1941-53.
4. Correa P. Gastric cancer: two epidemics? *Dig Dis Sci*. 2011;56(5):1585-6; author reply 6.
5. Sonnenberg A. Time trends of mortality from gastric cancer in Europe. *Dig Dis Sci*. 2011;56(4):1112-8.
6. Schlansky B, Sonnenberg A. Epidemiology of noncardia gastric adenocarcinoma in the United States. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(11):1978-85.
7. Bertuccio P, Chatenoud L, Levi F, Praud D, Ferlay J, Negri E, et al. Recent patterns in gastric cancer: a global overview. *Int J Cancer*. 2009;125(3):666-73.
8. Ang TL, Fock KM. Clinical epidemiology of gastric cancer. *Singapore Med J*. 2014;55(12):621-8.
9. Kim J, Sun CL, Mailey B, Prendergast C, Artinyan A, Bhatia S, et al. Race and ethnicity correlate with survival in patients with gastric adenocarcinoma. *Ann Oncol*. 2010;21(1):152-60.
10. Haenszel W, Kurihara M. Studies of Japanese migrants. I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst*. 1968;40(1):43-68.
11. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2016;25:16-27.
12. 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(7):765-70.
13. Kaneko S, Yoshimura T. Time trend analysis of gastric cancer incidence in Japan by histological types, 1975-1989. *Br J Cancer*. 2001;84(3):400-5.
14. Forman D, Burley VJ. Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2006;20(4):633-49.

15. Corral JE, Delgado Hurtado JJ, Domínguez RL, Valdez de Cuéllar M, Balmore Cruz C, Morgan DR. The descriptive epidemiology of gastric cancer in Central America and comparison with United States Hispanic populations. *J Gastrointest Cancer*. 2015;46(1):21-8.
16. Siewert JR, Stein HJ. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Br J Surg*. 1998;85(11):1457-9.
17. Feith M, Stein HJ, Siewert JR. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction: surgical therapy based on 1602 consecutive resected patients. *Surg Oncol Clin N Am*. 2006;15(4):751-64.
18. Mariette C, Piessen G, Briez N, Gronnier C, Triboulet JP. Oesophagogastric junction adenocarcinoma: which therapeutic approach? *Lancet Oncol*. 2011;12(3):296-305.
19. Japanese Gastric Cancer A. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer*. 2011;14(2):101-12.
20. R B. Geschwulste des magens and duodenums. In: Henke F LO, editor. *Handbuch der speziellen pathologischen anatomie and histology*. Berlin. Germany 1926. p. 865.
21. Japanese Gastric Cancer A. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2014 (ver. 4). *Gastric Cancer*. 2017;20(1):1-19.
22. Nakamura K, Sugano H, Takagi K. Carcinoma of the stomach in incipient phase: its histogenesis and histological appearances. *Gan*. 1968;59(3):251-8.
23. Goseki N, Takizawa T, Koike M. Differences in the mode of the extension of gastric cancer classified by histological type: new histological classification of gastric carcinoma. *Gut*. 1992;33(5):606-12.
24. Carneiro F, Seixas M, Sobrinho-Simões M. New elements for an updated classification of the carcinomas of the stomach. *Pathol Res Pract*. 1995;191(6):571-84.
25. Ming SC. Gastric carcinoma. A pathobiological classification. *Cancer*. 1977;39(6):2475-85.
26. 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.
27. Chapter 3 Tumours of the stomach. In: Bosman F CF, Hruban R, Theise N, editor. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. Lyon. France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2019. p. 23-56.
28. Tan IB, Ivanova T, Lim KH, Ong CW, Deng N, Lee J, et al. Intrinsic subtypes of gastric cancer, based on gene expression pattern, predict survival and respond differently to chemotherapy. *Gastroenterology*. 2011;141(2):476-85, 85 e1-11.

29. Lei Z, Tan IB, Das K, Deng N, Zouridis H, Pattison S, et al. Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to PI3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil. *Gastroenterology*. 2013;145(3):554-65.
30. Wang K, Kan J, Yuen ST, Shi ST, Chu KM, Law S, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer. *Nat Genet*. 2011;43(12):1219-23.
31. Boussioutas A, Li H, Liu J, Waring P, Lade S, Holloway AJ, et al. Distinctive patterns of gene expression in premalignant gastric mucosa and gastric cancer. *Cancer Res*. 2003;63(10):2569-77.
32. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517):202-9.
33. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, Kim K-M, Ting JC, Wong SS, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nature Medicine*. 2015;21(5):449-56.
34. Setia N, Agoston AT, Han HS, Mullen JT, Duda DG, Clark JW, et al. A protein and mRNA expression-based classification of gastric cancer. *Mod Pathol*. 2016;29(7):772-84.
35. Ahn S, Lee SJ, Kim Y, Kim A, Shin N, Choi KU, et al. High-throughput Protein and mRNA Expression-based Classification of Gastric Cancers Can Identify Clinically Distinct Subtypes, Concordant With Recent Molecular Classifications. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(1):106-15.
36. Jia F, Teer JK, Knepper TC, Lee JK, Zhou HH, He YJ, et al. Discordance of Somatic Mutations Between Asian and Caucasian Patient Populations with Gastric Cancer. *Mol Diagn Ther*. 2017;21(2):179-85.
37. Lin SJ, Gagnon-Bartsch JA, Tan IB, Earle S, Ruff L, Pettinger K, et al. Signatures of tumour immunity distinguish Asian and non-Asian gastric adenocarcinomas. *Gut*. 2015;64(11):1721-31.
38. Liu Z, Jiang Z, Wu N, Zhou G, Wang X. Classification of gastric cancers based on immunogenomic profiling. *Transl Oncol*. 2020;14(1):100888.
39. Bang Y-J, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung H, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010;376(9742):687-97.
40. Gomez-Martin C, Plaza JC, Pazo-Cid R, Salud A, Pons F, Fonseca P, et al. Level of HER2 gene amplification predicts response and overall survival in HER2-positive advanced gastric cancer treated with trastuzumab. *J Clin Oncol*. 2013;31(35):4445-52.

41. Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ, Dumitru F, Passalacqua R, Goswami C, et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 2014;383(9911):31-9.
42. Wilke H, Muro K, Van Cutsem E, Oh S-C, Bodoky G, Shimada Y, et al. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2014;15(11):1224-35.
43. TNM classification of malignant tumor 8th Ed. 8th ed. James D. Brierley MKG, Christian Wittekind, editor: Wiley-Blackwell; 2016.
44. TNM Classification of Malignant Tumours 7<sup>a</sup> Ed. 7th ed. Leslie H. Sobin MKG, Christian Wittekind, editor: Wiley-Blackwell; 2009.
45. Japanese Gastric Cancer A. Japanese Classification of Gastric Carcinoma - 2nd English Edition. *Gastric Cancer*. 1998;1(1):10-24.
46. Maehara Y, Watanabe A, Kakeji Y, Emi Y, Moriguchi S, Anai H, et al. Prognosis for surgically treated gastric cancer patients is poorer for women than men in all patients under age 50. *Br J Cancer*. 1992;65(3):417-20.
47. Maguire A, Porta M, Sanz-Anquela JM, Ruano I, Malats N, Piñol JL. Sex as a prognostic factor in gastric cancer. *Eur J Cancer*. 1996;32a(8):1303-9.
48. Lo SS, Kuo HS, Wu CW, Hsieh MC, Shyr YM, Wang HC, et al. Poorer prognosis in young patients with gastric cancer? *Hepatogastroenterology*. 1999;46(28):2690-3.
49. Weimann A, Braga M, Carli F, Higashiguchi T, Hübner M, Klek S, et al. ESPEN guideline: Clinical nutrition in surgery. *Clin Nutr*. 2017;36(3):623-50.
50. Bunt AM, Hogendoorn PC, van de Velde CJ, Bruijn JA, Hermans J. Lymph node staging standards in gastric cancer. *J Clin Oncol*. 1995;13(9):2309-16.
51. Li C, Oh SJ, Kim S, Hyung WJ, Yan M, Zhu ZG, et al. Macroscopic Borrmann type as a simple prognostic indicator in patients with advanced gastric cancer. *Oncology*. 2009;77(3-4):197-204.
52. Chiaravalli AM, Klersy C, Tava F, Manca R, Fiocca R, Capella C, et al. Lower- and higher-grade subtypes of diffuse gastric cancer. *Hum Pathol*. 2009;40(11):1591-9.
53. Chiaravalli AM, Klersy C, Vanoli A, Ferretti A, Capella C, Solcia E. Histotype-based prognostic classification of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2012;18(9):896-904.
54. Radi MJ, Fenoglio-Preiser CM, Bartow SA, Key CR, Pathak DR. Gastric carcinoma in the young: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Am J Gastroenterol*. 1986;81(9):747-56.

55. Martin IG, Dixon MF, Sue-Ling H, Axon AT, Johnston D. Goseki histological grading of gastric cancer is an important predictor of outcome. *Gut*. 1994;35(6):758-63.
56. Carriaga MT, Henson DE. The histologic grading of cancer. *Cancer*. 1995;75(1 Suppl):406-21.
57. Scartozzi M, Galizia E, Verdecchia L, Berardi R, Graziano F, Catalano V, et al. Lymphatic, blood vessel and perineural invasion identifies early-stage high-risk radically resected gastric cancer patients. *Br J Cancer*. 2006;95(4):445-9.
58. Kim JJ, Song KY, Hur H, Hur JI, Park SM, Park CH. Lymph node micrometastasis in node negative early gastric cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2009;35(4):409-14.
59. Lee HE, Chae SW, Lee YJ, Kim MA, Lee HS, Lee BL, et al. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *Br J Cancer*. 2008;99(10):1704-11.
60. Kim HI, Kim H, Cho HW, Kim SY, Song KJ, Hyung WJ, et al. The ratio of intra-tumoral regulatory T cells (Foxp3+)/helper T cells (CD4+) is a prognostic factor and associated with recurrence pattern in gastric cardia cancer. *J Surg Oncol*. 2011;104(7):728-33.
61. Liu K, Yang K, Wu B, Chen H, Chen X, Chen X, et al. Tumor-Infiltrating Immune Cells Are Associated With Prognosis of Gastric Cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(39):e1631.
62. Lee JS, Won HS, Sun S, Hong JH, Ko YH. Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(32):e11769.
63. Lee JY, Son T, Cheong JH, Hyung WJ, Noh SH, Kim CB, et al. Association between Chemotherapy-Response Assays and Subsets of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Gastric Cancer: A Pilot Study. *J Gastric Cancer*. 2015;15(4):223-30.
64. Thompson ED, Zahurak M, Murphy A, Cornish T, Cuka N, Abdelfatah E, et al. Patterns of PD-L1 expression and CD8 T cell infiltration in gastric adenocarcinomas and associated immune stroma. *Gut*. 2017;66(5):794-801.
65. Avital I PP, Kelsen DP, Willett C. Chapter 80. Cancer of the stomach. In: De Vita VT LT, Rosenberg SA, editor. *Cancer Principles & Practice of Oncology* 9th edition 9th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 925.
66. Kattan MW, Karpeh MS, Mazumdar M, Brennan MF. Postoperative nomogram for disease-specific survival after an R0 resection for gastric carcinoma. *J Clin Oncol*. 2003;21(19):3647-50.

67. Takagane A, Terashima M, Abe K, Araya M, Irinoda T, Yonezawa H, et al. Evaluation of the ratio of lymph node metastasis as a prognostic factor in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer*. 1999;2(2):122-8.
68. Lagarde SM, ten Kate FJ, Reitsma JB, Busch OR, van Lanschot JJ. Prognostic factors in adenocarcinoma of the esophagus or gastroesophageal junction. *J Clin Oncol*. 2006;24(26):4347-55.
69. Oliveira C, Pinheiro H, Figueiredo J, Seruca R, Carneiro F. Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *Lancet Oncol*. 2015;16(2):e60-70.
70. Gholami S, Janson L, Worhunsky DJ, Tran TB, Squires MH, 3rd, Jin LX, et al. Number of Lymph Nodes Removed and Survival after Gastric Cancer Resection: An Analysis from the US Gastric Cancer Collaborative. *J Am Coll Surg*. 2015;221(2):291-9.
71. Eloubeidi MA, Desmond R, Arguedas MR, Reed CE, Wilcox CM. Prognostic factors for the survival of patients with esophageal carcinoma in the U.S.: the importance of tumor length and lymph node status. *Cancer*. 2002;95(7):1434-43.
72. Hölscher AH, Bollschweiler E, Bumm R, Bartels H, Höfler H, Siewert JR. Prognostic factors of resected adenocarcinoma of the esophagus. *Surgery*. 1995;118(5):845-55.
73. van Sandick JW, van Lanschot JJ, ten Kate FJ, Tijssen JG, Obertop H. Indicators of prognosis after transhiatal esophageal resection without thoracotomy for cancer. *J Am Coll Surg*. 2002;194(1):28-36.
74. Chau I, Norman AR, Cunningham D, Waters JS, Oates J, Ross PJ. Multivariate prognostic factor analysis in locally advanced and metastatic esophago-gastric cancer--pooled analysis from three multicenter, randomized, controlled trials using individual patient data. *J Clin Oncol*. 2004;22(12):2395-403.
75. Chau I, Ashley S, Cunningham D. Validation of the Royal Marsden hospital prognostic index in advanced esophagogastric cancer using individual patient data from the REAL 2 study. *J Clin Oncol*. 2009;27(19):e3-4.
76. Maehara Y, Kusumoto T, Takahashi I, Kakeji Y, Baba H, Akazawa K, et al. Predictive value of preoperative carcinoembryonic antigen levels for the prognosis of patients with well-differentiated gastric cancer. A multivariate analysis. *Oncology*. 1994;51(3):234-7.
77. Sakamoto J, Nakazato H, Teramukai S, Ohashi Y, Takahashi Y, Mai M, et al. Association between preoperative plasma CEA levels and the prognosis of gastric cancer following curative resection. Tumor Marker Committee, Japanese Foundation for Multidisciplinary Treatment of Cancer, Tokyo, Japan. *Surg Oncol*. 1996;5(3):133-9.
78. Hermanek P. pTNM and residual tumor classifications: problems of assessment and prognostic significance. *World J Surg*. 1995;19(2):184-90.



79. Bachmann MO, Alderson D, Edwards D, Wotton S, Bedford C, Peters TJ, et al. Cohort study in South and West England of the influence of specialization on the management and outcome of patients with oesophageal and gastric cancers. *Br J Surg.* 2002;89(7):914-22.
80. Birkmeyer JD, Stukel TA, Siewers AE, Goodney PP, Wennberg DE, Lucas FL. Surgeon volume and operative mortality in the United States. *N Engl J Med.* 2003;349(22):2117-27.
81. Scartozzi M, Galizia E, Freddari F, Berardi R, Cellerino R, Cascinu S. Molecular biology of sporadic gastric cancer: prognostic indicators and novel therapeutic approaches. *Cancer Treat Rev.* 2004;30(5):451-9.
82. Sunakawa Y, Lenz HJ. Molecular classification of gastric adenocarcinoma: translating new insights from the cancer genome atlas research network. *Curr Treat Options Oncol.* 2015;16(4):17.
83. Cho JY, Lim JY, Cheong JH, Park YY, Yoon SL, Kim SM, et al. Gene expression signature-based prognostic risk score in gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(7):1850-7.
84. Feng CW, Wang LD, Jiao LH, Liu B, Zheng S, Xie XJ. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. *BMC Cancer.* 2002;2:8.
85. Sakai H, Okamoto E. [Clinical importance of serum anti-p53 antibodies as tumor markers]. *Rinsho Byori.* 2002;50(10):970-5.
86. Okuyama T, Maehara Y, Kabashima A, Takahashi I, Kakeji Y, Sugimachi K. Combined evaluation of expressions of p53 and p21 proteins as prognostic factors for patients with gastric carcinoma. *Oncology.* 2002;63(4):353-61.
87. Ichiyoshi Y, Oiwa H, Tomisaki S, Sakaguchi Y, Ohno S, Maehara Y, et al. Overexpression of p53 is associated with growth pattern and prognosis in advanced gastric cancer. *Hepatogastroenterology.* 1997;44(14):546-53.
88. Gonçalves AR, Carneiro AJ, Martins I, de Faria PA, Ferreira MA, de Mello EL, et al. Prognostic significance of p53 protein expression in early gastric cancer. *Pathol Oncol Res.* 2011;17(2):349-55.
89. Durães C, Almeida GM, Seruca R, Oliveira C, Carneiro F. Biomarkers for gastric cancer: prognostic, predictive or targets of therapy? *Virchows Arch.* 2014;464(3):367-78.
90. Corso G, Carvalho J, Marrelli D, Vindigni C, Carvalho B, Seruca R, et al. Somatic mutations and deletions of the E-cadherin gene predict poor survival of patients with gastric cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31(7):868-75.

91. Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, Soares P, Berx G, Caldas C, et al. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene*. 2001;20(12):1525-8.
92. Tanaka M, Kitajima Y, Sato S, Miyazaki K. Combined evaluation of mucin antigen and E-cadherin expression may help select patients with gastric cancer suitable for minimally invasive therapy. *Br J Surg*. 2003;90(1):95-101.
93. Zhang HK, Zhang QM, Zhao TH, Li YY, Yi YF. Expression of mucins and E-cadherin in gastric carcinoma and their clinical significance. *World J Gastroenterol*. 2004;10(20):3044-7.
94. Jin Z, Jiang W, Wang L. Biomarkers for gastric cancer: Progression in early diagnosis and prognosis (Review). *Oncol Lett*. 2015;9(4):1502-8.
95. Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, et al. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol*. 2002;8(6):987-93.
96. Digestive System Tumours. 5th ed. Editors I, editor. Lyon (France): International for Research on Cancer (IARC) 2019 2019.
97. Wang Q, Liu G, Hu C. Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma. *Gastroenterology Res*. 2019;12(6):275-82.
98. Smyth EC, Wotherspoon A, Peckitt C, Gonzalez D, Hulkki-Wilson S, Eltahir Z, et al. Mismatch Repair Deficiency, Microsatellite Instability, and Survival : An Exploratory Analysis of the Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy (MAGIC) Trial. *JAMA Oncol*. 2017.
99. Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, Castellano P, Mura AL, Pinto M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is an independent prognostic indicator of worse outcome in gastric cancer patients. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(1):69-79.
100. Kim MA, Lee HS, Lee HE, Jeon YK, Yang HK, Kim WH. EGFR in gastric carcinomas: prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number. *Histopathology*. 2008;52(6):738-46.
101. Tokunaga A, Onda M, Okuda T, Teramoto T, Fujita I, Mizutani T, et al. Clinical significance of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor, and c-erbB-2 in human gastric cancer. *Cancer*. 1995;75(6 Suppl):1418-25.
102. García I, del Casar JM, Corte MD, Allende MT, García-Muñiz JL, Vizoso F. Epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 contents in unresectable (UICC R1 or R2) gastric cancer. *Int J Biol Markers*. 2003;18(3):200-6.
103. Sanz-Ortega J, Steinberg SM, Moro E, Saez M, Lopez JA, Sierra E, et al. Comparative study of tumor angiogenesis and immunohistochemistry for p53, c-

ErbB2, c-myc and EGFr as prognostic factors in gastric cancer. *Histol Histopathol.* 2000;15(2):455-62.

104. Matsubara J, Nishina T, Yamada Y, Moriwaki T, Shimoda T, Kajiwara T, et al. Impacts of excision repair cross-complementing gene 1 (ERCC1), dihydropyrimidine dehydrogenase, and epidermal growth factor receptor on the outcomes of patients with advanced gastric cancer. *Br J Cancer.* 2008;98(4):832-9.

105. Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol.* 2008;19(9):1523-9.

106. Hofmann M, Stoss O, Shi D, Buttner R, van de Vijver M, Kim W, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology.* 2008;52(7):797-805.

107. Tanner M, Hollmen M, Junttila TT, Kapanen AI, Tammola S, Soini Y, et al. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol.* 2005;16(2):273-8.

108. Bang Y-J, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet.* 2010;376(9742):687-97.

109. Barros-Silva JD, Leitão D, Afonso L, Vieira J, Dinis-Ribeiro M, Fragoso M, et al. Association of ERBB2 gene status with histopathological parameters and disease-specific survival in gastric carcinoma patients. *Br J Cancer.* 2009;100(3):487-93.

110. Park D, Yun J, Park J, Oh S, Kim H, Cho Y, et al. HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Digestive diseases and sciences.* 2006;51(8):1371-9.

111. Grabsch H, Sivakumar S, Gray S, Gabbert HE, Muller W. HER2 expression in gastric cancer: Rare, heterogeneous and of no prognostic value - conclusions from 924 cases of two independent series. *Cell Oncol.* 2010;32(1-2):57-65.

112. Aizawa M, Nagatsuma AK, Kitada K, Kuwata T, Fujii S, Kinoshita T, et al. Evaluation of HER2-based biology in 1,006 cases of gastric cancer in a Japanese population. *Gastric Cancer.* 2014;17(1):34-42.

113. Rüschoff J, Hanna W, Bilous M, Hofmann M, Osamura RY, Penault-Llorca F, et al. HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Modern Pathology.* 2012;25(5):637-50.

114. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407(6801):249-57.

115. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011;146(6):873-87.
116. Vidal O, Metges JP, Elizalde I, Valentini M, Volant A, Molina R, et al. High preoperative serum vascular endothelial growth factor levels predict poor clinical outcome after curative resection of gastric cancer. *Br J Surg*. 2009;96(12):1443-51.
117. Fondevila C, Metges JP, Fuster J, Grau JJ, Palacín A, Castells A, et al. p53 and VEGF expression are independent predictors of tumour recurrence and survival following curative resection of gastric cancer. *Br J Cancer*. 2004;90(1):206-15.
118. Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, Zbar A, Kouraklis G, Simopoulos C, et al. Circulating VEGF levels in the serum of gastric cancer patients: correlation with pathological variables, patient survival, and tumor surgery. *Ann Surg*. 2002;236(1):37-42.
119. Van Cutsem E, de Haas S, Kang YK, Ohtsu A, Tebbutt NC, Ming Xu J, et al. Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a biomarker evaluation from the AVAGAST randomized phase III trial. *J Clin Oncol*. 2012;30(17):2119-27.
120. Deng N, Goh LK, Wang H, Das K, Tao J, Tan IB, et al. A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. *Gut*. 2012;61(5):673-84.
121. Kilgour RD, Vigano A, Trutschnigg B, Lucar E, Borod M, Morais JA. Handgrip strength predicts survival and is associated with markers of clinical and functional outcomes in advanced cancer patients. *Support Care Cancer*. 2013;21(12):3261-70.
122. Jung EJ, Jung EJ, Min SY, Kim MA, Kim WH. Fibroblast growth factor receptor 2 gene amplification status and its clinicopathologic significance in gastric carcinoma. *Hum Pathol*. 2012;43(10):1559-66.
123. Kim H, Karpeh M. Surgical approaches and outcomes in the treatment of gastric cancer. *Semin Radiat Oncol*. 2002;12:162 - 9.
124. Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, Watanabe A, Tatsumi M, Yamashita J, et al. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer*. 1999;85(9):1894-902.
125. Lennerz JK, Kwak EL, Ackerman A, Michael M, Fox SB, Bergethon K, et al. MET amplification identifies a small and aggressive subgroup of esophagogastric adenocarcinoma with evidence of responsiveness to crizotinib. *J Clin Oncol*. 2011;29(36):4803-10.
126. Amemiya H, Kono K, Itakura J, Tang RF, Takahashi A, An FQ, et al. c-Met expression in gastric cancer with liver metastasis. *Oncology*. 2002;63(3):286-96.

127. Peng Z, Zhu Y, Wang Q, Gao J, Li Y, Li Y, et al. Prognostic significance of MET amplification and expression in gastric cancer: a systematic review with meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(1):e84502.
128. Shi J, Yao D, Liu W, Wang N, Lv H, Zhang G, et al. Highly frequent PIK3CA amplification is associated with poor prognosis in gastric cancer. *BMC Cancer*. 2012;12:50.
129. Okines AF, Gonzalez de Castro D, Cunningham D, Chau I, Langley RE, Thompson LC, et al. Biomarker analysis in oesophagogastric cancer: Results from the REAL3 and TransMAGIC trials. *Eur J Cancer*. 2013;49(9):2116-25.
130. Murakami D, Tsujitani S, Osaki T, Saito H, Katano K, Tatebe S, et al. Expression of phosphorylated Akt (pAkt) in gastric carcinoma predicts prognosis and efficacy of chemotherapy. *Gastric Cancer*. 2007;10(1):45-51.
131. Martín ME, Pérez MI, Redondo C, Alvarez MI, Salinas M, Fando JL. 4E binding protein 1 expression is inversely correlated to the progression of gastrointestinal cancers. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000;32(6):633-42.
132. Yu G, Wang J, Chen Y, Wang X, Pan J, Li G, et al. Overexpression of phosphorylated mammalian target of rapamycin predicts lymph node metastasis and prognosis of chinese patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(5):1821-9.
133. Hino R, Uozaki H, Murakami N, Ushiku T, Shinozaki A, Ishikawa S, et al. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of PTEN gene in gastric carcinoma. *Cancer Res*. 2009;69(7):2766-74.
134. Li M, Sun H, Song L, Gao X, Chang W, Qin X. Immunohistochemical expression of mTOR negatively correlates with PTEN expression in gastric carcinoma. *Oncol Lett*. 2012;4(6):1213-8.
135. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-64.
136. Eto S, Yoshikawa K, Nishi M, Higashijima J, Tokunaga T, Nakao T, et al. Programmed cell death protein 1 expression is an independent prognostic factor in gastric cancer after curative resection. *Gastric Cancer*. 2016;19(2):466-71.
137. Ouban A, Ahmed AA. Claudins in human cancer: a review. *Histol Histopathol*. 2010;25(1):83-90.
138. Liu JX, Wei ZY, Chen JS, Lu HC, Hao L, Li WJ. Prognostic and clinical significance of claudin-4 in gastric cancer: a meta-analysis. *World J Surg Oncol*. 2015;13:207.
139. Sanada Y, Oue N, Mitani Y, Yoshida K, Nakayama H, Yasui W. Down-regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression

data analysis, in gastric cancer with an intestinal phenotype. *J Pathol.* 2006;208(5):633-42.

140. Chon HJ, Kim HR, Shin E, Kim C, Heo SJ, Lee CK, et al. The Clinicopathologic Features and Prognostic Impact of ALK Positivity in Patients with Resected Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2015;22(12):3938-45.

141. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol.* 2009;27(26):4247-53.

142. Aizawa K, Ueki K, Suzuki S, Yabusaki H, Kanda T, Nishimaki T, et al. Apoptosis and Bcl-2 expression in gastric carcinomas: correlation with clinicopathological variables, p53 expression, cell proliferation and prognosis. *Int J Oncol.* 1999;14(1):85-91.

143. Inada T, Kikuyama S, Ichikawa A, Igarashi S, Ogata Y. Bcl-2 expression as a prognostic factor of survival of gastric carcinoma. *Anticancer Res.* 1998;18(3b):2003-10.

144. Song KY, Jung CK, Park WS, Park CH. Expression of the antiapoptosis gene Survivin predicts poor prognosis of stage III gastric adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2009;39(5):290-6.

145. Osaki M, Kase S, Kodani I, Watanabe M, Adachi H, Ito H. Expression of Fas and Fas ligand in human gastric adenomas and intestinal-type carcinomas: correlation with proliferation and apoptosis. *Gastric Cancer.* 2001;4(4):198-205.

146. Ernst M, Putoczki TL. Molecular pathways: IL11 as a tumor-promoting cytokine-translational implications for cancers. *Clin Cancer Res.* 2014;20(22):5579-88.

147. Necula LG, Chivu-Economescu M, Stanciulescu EL, Bleotu C, Dima SO, Alexiu I, et al. IL-6 and IL-11 as markers for tumor aggressiveness and prognosis in gastric adenocarcinoma patients without mutations in Gp130 subunits. *J Gastrointest Liver Dis.* 2012;21(1):23-9.

148. Putoczki TL, Thiem S, Loving A, Busuttill RA, Wilson NJ, Ziegler PK, et al. Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically. *Cancer Cell.* 2013;24(2):257-71.

149. Tenderenda M. A study on the prognostic value of cyclins D1 and E expression levels in resectable gastric cancer and on some correlations between cyclins expression, histoclinical parameters and selected protein products of cell-cycle regulatory genes. *J Exp Clin Cancer Res.* 2005;24(3):405-14.

150. Corso G, Velho S, Paredes J, Pedrazzani C, Martins D, Milanezi F, et al. Oncogenic mutations in gastric cancer with microsatellite instability. *European Journal of Cancer.* 2011;47(3):443-51.

151. Warneke VS, Behrens HM, Haag J, Balschun K, Böger C, Becker T, et al. Prognostic and putative predictive biomarkers of gastric cancer for personalized medicine. *Diagn Mol Pathol*. 2013;22(3):127-37.
152. Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *The Lancet Oncology*. 2010;11(2):136-46.
153. Kim BH, Hong SW, Kim A, Choi SH, Yoon SO. Prognostic implications for high expression of oncogenic microRNAs in advanced gastric carcinoma. *J Surg Oncol*. 2013;107(5):505-10.
154. Boku N, Chin K, Hosokawa K, Ohtsu A, Tajiri H, Yoshida S, et al. Biological markers as a predictor for response and prognosis of unresectable gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil and cis-platinum. *Clin Cancer Res*. 1998;4(6):1469-74.
155. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):330-8.
156. Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Groshen S, Cohen H, et al. Thymidylate synthase mRNA level in adenocarcinoma of the stomach: a predictor for primary tumor response and overall survival. *J Clin Oncol*. 1996;14(1):176-82.
157. Liu XF, Zhang H, Sun JQ, Yin C, Liu TF, Yang H, et al. Correlation between expression of thymidylate synthase and clinical outcome of advanced gastric cancer treated with capecitabine alone chemotherapy. *Tumour Biol*. 2014;35(12):12409-14.
158. Alexander HR, Grem JL, Hamilton JM, Pass HI, Hong M, Fraker DL, et al. Thymidylate synthase protein expression: Association with response to neoadjuvant chemotherapy and resection for locally advanced gastric and gastroesophageal adenocarcinoma. *Cancer J Sci Am*. 1995;1(1):49-54.
159. Yeh KH, Shun CT, Chen CL, Lin JT, Lee WJ, Lee PH, et al. High expression of thymidylate synthase is associated with the drug resistance of gastric carcinoma to high dose 5-fluorouracil-based systemic chemotherapy. *Cancer*. 1998;82(9):1626-31.
160. Hua D, Huang ZH, Mao Y, Deng JZ. Thymidylate synthase and thymidine phosphorylase gene expression as predictive parameters for the efficacy of 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2007;13(37):5030-4.
161. Suda Y, Kuwashima Y, Tanaka Y, Uchida K, Akazawa S. Immunohistochemical detection of thymidylate synthase in advanced gastric cancer: a prognostic indicator in patients undergoing gastrectomy followed by adjuvant chemotherapy with 5-fluoropyrimidines. *Anticancer Res*. 1999;19(1b):805-10.

162. Milano G, Etienne MC, Pierrefite V, Barberi-Heyob M, Deporte-Fety R, Renée N. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity. *Br J Cancer*. 1999;79(3-4):627-30.
163. Ezzeldin H, Diasio R. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency, a pharmacogenetic syndrome associated with potentially life-threatening toxicity following 5-fluorouracil administration. *Clin Colorectal Cancer*. 2004;4(3):181-9.
164. Scartozzi M, Bittoni A, Pistelli M, Galizia E, Berardi R, Giampieri R, et al. Toward molecularly selected chemotherapy for advanced gastric cancer: state of the art and future perspectives. *Cancer Treat Rev*. 2009;35(5):451-62.
165. Ajani JA, Rodriguez W, Bodoky G, Moiseyenko V, Lichinitser M, Gorbunova V, et al. Multicenter phase III comparison of cisplatin/S-1 with cisplatin/infusional fluorouracil in advanced gastric or gastroesophageal adenocarcinoma study: the FLAGS trial. *J Clin Oncol*. 2010;28(9):1547-53.
166. Shen XM, Zhou C, Lian L, Li LQ, Li W, Tao M. Relationship Between the DPD and TS mRNA Expression and the Response to S-1-Based Chemotherapy and Prognosis in Patients with Advanced Gastric Cancer. *Cell Biochem Biophys*. 2015;71(3):1653-61.
167. Sasako M, Terashima M, Ichikawa W, Ochiai A, Kitada K, Kurahashi I, et al. Impact of the expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase genes on survival in stage II/III gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2015;18(3):538-48.
168. Xin HW, Yang JH, Nguyen DM. Sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor requires E-cadherin in esophageal cancer and malignant pleural mesothelioma. *Anticancer Res*. 2013;33(6):2401-8.
169. Ferreira P, Oliveira MJ, Beraldi E, Mateus AR, Nakajima T, Gleave M, et al. Loss of functional E-cadherin renders cells more resistant to the apoptotic agent taxol in vitro. *Exp Cell Res*. 2005;310(1):99-104.
170. Xing RC, Zheng J, Zheng WH, Qin ZP, Liu W, Yao RC. Relevance of E-cadherin expression to EGFR-TKI molecular targeted therapy sensitivity/resistance and its clinical significance. *Genet Mol Res*. 2015;14(2):5785-92.
171. Witta SE, Dziadziuszko R, Yoshida K, Hedman K, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., et al. ErbB-3 expression is associated with E-cadherin and their coexpression restores response to gefitinib in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol*. 2009;20(4):689-95.
172. Witta SE, Gemmill RM, Hirsch FR, Coldren CD, Hedman K, Ravdel L, et al. Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines. *Cancer Res*. 2006;66(2):944-50.



173. Heindl S, Eggenstein E, Keller S, Kneissl J, Keller G, Mutze K, et al. Relevance of MET activation and genetic alterations of KRAS and E-cadherin for cetuximab sensitivity of gastric cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(5):843-58.
174. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2003;349(3):247-57.
175. Gulley ML. Genomic assays for Epstein-Barr virus-positive gastric adenocarcinoma. *Exp Mol Med*. 2015;47:e134.
176. Yamamoto H, Imai K. Microsatellite instability: an update. *Arch Toxicol*. 2015;89(6):899-921.
177. Choi YY, Kim H, Shin SJ, Kim HY, Lee J, Yang HK, et al. Microsatellite Instability and Programmed Cell Death-Ligand 1 Expression in Stage II/III Gastric Cancer: Post Hoc Analysis of the CLASSIC Randomized Controlled study. *Ann Surg*. 2018.
178. Rojo F, Tabernero J, Albanell J, Van Cutsem E, Ohtsu A, Doi T, et al. Pharmacodynamic studies of gefitinib in tumor biopsy specimens from patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(26):4309-16.
179. Luber B, Deplazes J, Keller G, Walch A, Rauser S, Eichmann M, et al. Biomarker analysis of cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric and oesophago-gastric junction cancer: results from a phase II trial of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *BMC Cancer*. 2011;11:509.
180. Han SW, Oh DY, Im SA, Park SR, Lee KW, Song HS, et al. Phase II study and biomarker analysis of cetuximab combined with modified FOLFOX6 in advanced gastric cancer. *Br J Cancer*. 2009;100(2):298-304.
181. Pirker R, Pereira JR, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, Park K, et al. EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol*. 2012;13(1):33-42.
182. Morishita A, Gong J, Masaki T. Targeting receptor tyrosine kinases in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(16):4536-45.
183. Waddell T, Chau I, Cunningham D, Gonzalez D, Okines AFC, Wotherspoon A, et al. Epirubicin, oxaliplatin, and capecitabine with or without panitumumab for patients with previously untreated advanced oesophagogastric cancer (REAL3): a randomised, open-label phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2013;14(6):481-9.
184. Lordick F, Kang Y-K, Chung H-C, Salman P, Oh SC, Bodoky G, et al. Capecitabine and cisplatin with or without cetuximab for patients with previously untreated advanced gastric cancer (EXPAND): a randomised, open-label phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2013;14(6):490-9.

185. Klapper LN, Waterman H, Sela M, Yarden Y. Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2. *Cancer Res.* 2000;60(13):3384-8.
186. Zhang S, Huang WC, Li P, Guo H, Poh SB, Brady SW, et al. Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nat Med.* 2011;17(4):461-9.
187. Junttila TT, Akita RW, Parsons K, Fields C, Lewis Phillips GD, Friedman LS, et al. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell.* 2009;15(5):429-40.
188. Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001;61(12):4744-9.
189. Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature.* 2002;416(6878):279-80.
190. Scartozzi M, Giampieri R, Del Prete M, Faloppi L, Bianconi M, Vincenzi B, et al. Selected gastrointestinal cancer presentations from the American Society of Clinical Oncology annual meeting 2013 in review: it is not about the destination, it is about the journey. *Expert Opin Pharmacother.* 2014;15(1):143-50.
191. Satoh T, Xu R-H, Chung HC, Sun G-P, Doi T, Xu J-M, et al. Lapatinib Plus Paclitaxel Versus Paclitaxel Alone in the Second-Line Treatment of HER2-Amplified Advanced Gastric Cancer in Asian Populations: TyTAN—A Randomized, Phase III Study. *Journal of Clinical Oncology.* 2014;32(19):2039-49.
192. Barok M, Tanner M, Köninki K, Isola J. Trastuzumab-DM1 is highly effective in preclinical models of HER2-positive gastric cancer. *Cancer Lett.* 2011;306(2):171-9.
193. Kang Y-K, editor A randomized, open-label, multicenter, adaptive phase 2/3 study of trastuzumab emtansine (T-DM1) versus a taxane (TAX) in patients (pts) with previously treated HER2-positive locally advanced or metastatic gastric/gastroesophageal junction adenocarcinoma (LA/MGC/GEJC)2016; *Gastrointestinal Cancers Symposium: American Society of Clinical Oncology.*
194. Baselga J, Cortés J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(2):109-19.
195. Swain SM, Kim SB, Cortés J, Ro J, Semiglazov V, Campone M, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2013;14(6):461-71.

196. de Melo Gagliato D, Jardim DL, Marchesi MS, Hortobagyi GN. Mechanisms of resistance and sensitivity to anti-HER2 therapies in HER2+ breast cancer. *Oncotarget*. 2016;7(39):64431-46.
197. Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J, Guzman M, Cortes J, et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(8):628-38.
198. Nagy P, Friedländer E, Tanner M, Kapanen AI, Carraway KL, Isola J, et al. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res*. 2005;65(2):473-82.
199. Alimandi M, Romano A, Curia MC, Muraro R, Fedi P, Aaronson SA, et al. Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene*. 1995;10(9):1813-21.
200. Gori S, Sidoni A, Colozza M, Ferri I, Mameli MG, Fenocchio D, et al. EGFR, pMAPK, pAkt and PTEN status by immunohistochemistry: correlation with clinical outcome in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab. *Ann Oncol*. 2009;20(4):648-54.
201. Gallardo A, Lerma E, Escuin D, Tibau A, Muñoz J, Ojeda B, et al. Increased signalling of EGFR and IGF1R, and deregulation of PTEN/PI3K/Akt pathway are related with trastuzumab resistance in HER2 breast carcinomas. *Br J Cancer*. 2012;106(8):1367-73.
202. Nahta R, Yuan LX, Zhang B, Kobayashi R, Esteva FJ. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res*. 2005;65(23):11118-28.
203. Browne BC, Crown J, Venkatesan N, Duffy MJ, Clynes M, Slamon D, et al. Inhibition of IGF1R activity enhances response to trastuzumab in HER-2-positive breast cancer cells. *Ann Oncol*. 2011;22(1):68-73.
204. Minuti G, Cappuzzo F, Duchnowska R, Jassem J, Fabi A, O'Brien T, et al. Increased MET and HGF gene copy numbers are associated with trastuzumab failure in HER2-positive metastatic breast cancer. *Br J Cancer*. 2012;107(5):793-9.
205. Agarwal S, Zerillo C, Kolmakova J, Christensen JG, Harris LN, Rimm DL, et al. Association of constitutively activated hepatocyte growth factor receptor (Met) with resistance to a dual EGFR/Her2 inhibitor in non-small-cell lung cancer cells. *Br J Cancer*. 2009;100(6):941-9.
206. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*. 2004;6(2):117-27.
207. Wang Y, Liu Y, Du Y, Yin W, Lu J. The predictive role of phosphatase and tensin homolog (PTEN) loss, phosphoinositol-3 (PI3) kinase (PIK3CA) mutation, and

PI3K pathway activation in sensitivity to trastuzumab in HER2-positive breast cancer: a meta-analysis. *Curr Med Res Opin.* 2013;29(6):633-42.

208. Baselga J, Cortés J, Im SA, Clark E, Ross G, Kiermaier A, et al. Biomarker analyses in CLEOPATRA: a phase III, placebo-controlled study of pertuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive, first-line metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2014;32(33):3753-61.

209. Diaz-Serrano A, Angulo B, Dominguez C, Pazo-Cid R, Salud A, Jimenez-Fonseca P, et al. Genomic Profiling of HER2-Positive Gastric Cancer: PI3K/Akt/mTOR Pathway as Predictor of Outcomes in HER2-Positive Advanced Gastric Cancer Treated with Trastuzumab. *Oncologist.* 2018;23(9):1092-102.

210. Sukawa Y, Yamamoto H, Nosho K, Ito M, Igarashi H, Naito T, et al. HER2 expression and PI3K-Akt pathway alterations in gastric cancer. *Digestion.* 2014;89(1):12-7.

211. Zuo Q, Liu J, Zhang J, Wu M, Guo L, Liao W. Development of trastuzumab-resistant human gastric carcinoma cell lines and mechanisms of drug resistance. *Sci Rep.* 2015;5:11634.

212. Lee JY, Hong M, Kim ST, Park SH, Kang WK, Kim KM, et al. The impact of concomitant genomic alterations on treatment outcome for trastuzumab therapy in HER2-positive gastric cancer. *Sci Rep.* 2015;5:9289.

213. Singh SS, Yap WN, Arfuso F, Kar S, Wang C, Cai W, et al. Targeting the PI3K/Akt signaling pathway in gastric carcinoma: A reality for personalized medicine? *World J Gastroenterol.* 2015;21(43):12261-73.

214. Zhang X, Park JS, Park KH, Kim KH, Jung M, Chung HC, et al. PTEN deficiency as a predictive biomarker of resistance to HER2-targeted therapy in advanced gastric cancer. *Oncology.* 2015;88(2):76-85.

215. Brennetot C, Duval A, Hamelin R, Pinto M, Oliveira C, Seruca R, et al. Frequent Ki-ras mutations in gastric tumors of the MSI phenotype. *Gastroenterology.* 2003;125(4):1282.

216. Oliveira C, Pinto M, Duval A, Brennetot C, Domingo E, Espín E, et al. BRAF mutations characterize colon but not gastric cancer with mismatch repair deficiency. *Oncogene.* 2003;22(57):9192-6.

217. Queirós P, Pinheiro H, Carvalho J, Oliveira P, Gullo I, Carneiro F, et al. KRAS mutations in microsatellite instable gastric tumours: impact of targeted treatment and intratumoural heterogeneity. *Virchows Arch.* 2015;467(4):383-92.

218. Erber R, Thurnher A, Katsen AD, Groth G, Kerger H, Hammes HP, et al. Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *Faseb j.* 2004;18(2):338-40.

219. Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, et al. Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell*. 2007;131(3):463-75.
220. Bang YJ, Kang YK, Kang WK, Boku N, Chung HC, Chen JS, et al. Phase II study of sunitinib as second-line treatment for advanced gastric cancer. *Invest New Drugs*. 2011;29(6):1449-58.
221. Sun W, Powell M, O'Dwyer PJ, Catalano P, Ansari RH, Benson AB, 3rd. Phase II study of sorafenib in combination with docetaxel and cisplatin in the treatment of metastatic or advanced gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma: ECOG 5203. *J Clin Oncol*. 2010;28(18):2947-51.
222. Xie L, Su X, Zhang L, Yin X, Tang L, Zhang X, et al. FGFR2 gene amplification in gastric cancer predicts sensitivity to the selective FGFR inhibitor AZD4547. *Clin Cancer Res*. 2013;19(9):2572-83.
223. Van Cutsem E, Bang YJ, Mansoor W, Petty RD, Chao Y, Cunningham D, et al. A randomized, open-label study of the efficacy and safety of AZD4547 monotherapy versus paclitaxel for the treatment of advanced gastric adenocarcinoma with FGFR2 polysomy or gene amplification. *Ann Oncol*. 2017;28(6):1316-24.
224. Iveson T, Donehower RC, Davidenko I, Tjulandin S, Deptala A, Harrison M, et al. Rilotumumab in combination with epirubicin, cisplatin, and capecitabine as first-line treatment for gastric or oesophagogastric junction adenocarcinoma: an open-label, dose de-escalation phase 1b study and a double-blind, randomised phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2014;15(9):1007-18.
225. Doshi S, Gislekog PO, Zhang Y, Zhu M, Oliner KS, Loh E, et al. Rilotumumab exposure-response relationship in patients with advanced or metastatic gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(11):2453-61.
226. Zhu M, Tang R, Doshi S, Oliner KS, Dubey S, Jiang Y, et al. Exposure-response analysis of rilotumumab in gastric cancer: the role of tumour MET expression. *Br J Cancer*. 2015;112(3):429-37.
227. Catenacci DVT, Tebbutt NC, Davidenko I, Murad AM, Al-Batran SE, Ilson DH, et al. Rilotumumab plus epirubicin, cisplatin, and capecitabine as first-line therapy in advanced MET-positive gastric or gastro-oesophageal junction cancer (RILOMET-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(11):1467-82.
228. Shah MA, Cho JY, Tan IB, Tebbutt NC, Yen CJ, Kang A, et al. A Randomized Phase II Study of FOLFOX With or Without the MET Inhibitor Onartuzumab in Advanced Adenocarcinoma of the Stomach and Gastroesophageal Junction. *Oncologist*. 2016;21(9):1085-90.
229. Shah MA, Wainberg ZA, Catenacci DV, Hochster HS, Ford J, Kunz P, et al. Phase II study evaluating 2 dosing schedules of oral foretinib (GSK1363089),

cMET/VEGFR2 inhibitor, in patients with metastatic gastric cancer. *PLoS One*. 2013;8(3):e54014.

230. Ohtsu A, Ajani Ja Fau - Bai Y-X, Bai Yx Fau - Bang Y-J, Bang Yj Fau - Chung H-C, Chung Hc Fau - Pan H-M, Pan Hm Fau - Sahmoud T, et al. Everolimus for previously treated advanced gastric cancer: results of the randomized, double-blind, phase III GRANITE-1 study. (1527-7755 (Electronic)).

231. Markman B, Dienstmann R, Tabernero J. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway--beyond rapalogs. *Oncotarget*. 2010;1(7):530-43.

232. Markman B, Tao JJ, Scaltriti M. PI3K pathway inhibitors: better not left alone. *Curr Pharm Des*. 2013;19(5):895-906.

233. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515(7528):563-7.

234. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2443-54.

235. Homet Moreno B, Parisi G, Robert L, Ribas A. Anti-PD-1 therapy in melanoma. *Semin Oncol*. 2015;42(3):466-73.

236. Weber JS, Kudchadkar RR, Yu B, Gallenstein D, Horak CE, Inzunza HD, et al. Safety, efficacy, and biomarkers of nivolumab with vaccine in ipilimumab-refractory or -naive melanoma. *J Clin Oncol*. 2013;31(34):4311-8.

237. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(2):123-35.

238. Freidin MB, Bhudia N, Lim E, Nicholson AG, Cookson WO, Moffatt MF. Impact of collection and storage of lung tumor tissue on whole genome expression profiling. *J Mol Diagn*. 2012;14(2):140-8.

239. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010;29(8):1093-102.

240. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.

241. Roxburgh CS, McMillan DC. Role of systemic inflammatory response in predicting survival in patients with primary operable cancer. *Future Oncol*. 2010;6(1):149-63.

242. Allin KH, Nordestgaard BG, Flyger H, Bojesen SE. Elevated pre-treatment levels of plasma C-reactive protein are associated with poor prognosis after breast cancer: a cohort study. *Breast Cancer Res.* 2011;13(3):R55.
243. Guthrie GJ, Charles KA, Roxburgh CS, Horgan PG, McMillan DC, Clarke SJ. The systemic inflammation-based neutrophil-lymphocyte ratio: experience in patients with cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013;88(1):218-30.
244. McMillan DC. The systemic inflammation-based Glasgow Prognostic Score: a decade of experience in patients with cancer. *Cancer Treat Rev.* 2013;39(5):534-40.
245. Szkandera J, Absenger G, Liegl-Atzwanger B, Pichler M, Stotz M, Samonigg H, et al. Elevated preoperative neutrophil/lymphocyte ratio is associated with poor prognosis in soft-tissue sarcoma patients. *Br J Cancer.* 2013;108(8):1677-83.
246. Paramanathan A, Saxena A, Morris DL. A systematic review and meta-analysis on the impact of pre-operative neutrophil lymphocyte ratio on long term outcomes after curative intent resection of solid tumours. *Surg Oncol.* 2014;23(1):31-9.
247. Templeton AJ, Ace O, McNamara MG, Al-Mubarak M, Vera-Badillo FE, Hermanns T, et al. Prognostic role of platelet to lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(7):1204-12.
248. Petrelli F, Cabiddu M, Coinu A, Borgonovo K, Ghilardi M, Lonati V, et al. Prognostic role of lactate dehydrogenase in solid tumors: a systematic review and meta-analysis of 76 studies. *Acta Oncol.* 2015;54(7):961-70.
249. Tas F, Aykan F, Alici S, Kaytan E, Aydiner A, Topuz E. Prognostic factors in pancreatic carcinoma: serum LDH levels predict survival in metastatic disease. *Am J Clin Oncol.* 2001;24(6):547-50.
250. Danner BC, Didilis VN, Wiemeyer S, Stojanovic T, Kitz J, Emmert A, et al. Long-term survival is linked to serum LDH and partly to tumour LDH-5 in NSCLC. *Anticancer Res.* 2010;30(4):1347-51.
251. Yi JH, Kim JH, Baek KK, Lim T, Lee DJ, Ahn YC, et al. Elevated LDH and paranasal sinus involvement are risk factors for central nervous system involvement in patients with peripheral T-cell lymphoma. *Ann Oncol.* 2011;22(7):1636-43.
252. Fahmueller YN, Nagel D, Hoffmann RT, Tatsch K, Jakobs T, Stieber P, et al. Predictive and prognostic value of circulating nucleosomes and serum biomarkers in patients with metastasized colorectal cancer undergoing Selective Internal Radiation Therapy. *BMC Cancer.* 2012;12:5.
253. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Bougioukas G, Didilis V, Gatter KC, et al. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer.* 2003;89(5):877-85.

254. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Simopoulos C, Polychronidis A, Sivridis E. Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2005;22(1):25-30.
255. Kolev Y, Uetake H, Takagi Y, Sugihara K. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) expression in human gastric cancer: association with hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha) pathway, angiogenic factors production and poor prognosis. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(8):2336-44.
256. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline--Update 2012. *Eur J Cancer*. 2012;48(15):2375-90.
257. Forrest LM, McMillan DC, McArdle CS, Angerson WJ, Dunlop DJ. Evaluation of cumulative prognostic scores based on the systemic inflammatory response in patients with inoperable non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2003;89(6):1028-30.
258. Laird BJ, McMillan DC, Fayers P, Fearon K, Kaasa S, Fallon MT, et al. The systemic inflammatory response and its relationship to pain and other symptoms in advanced cancer. *Oncologist*. 2013;18(9):1050-5.
259. Tazzyman S, Lewis CE, Murdoch C. Neutrophils: key mediators of tumour angiogenesis. *Int J Exp Pathol*. 2009;90(3):222-31.
260. An X, Ding PR, Li YH, Wang FH, Shi YX, Wang ZQ, et al. Elevated neutrophil to lymphocyte ratio predicts survival in advanced pancreatic cancer. *Biomarkers*. 2010;15(6):516-22.
261. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):401-10.
262. Qiu MZ, Xu RH, Ruan DY, Li ZH, Luo HY, Teng KY, et al. Incidence of anemia, leukocytosis, and thrombocytosis in patients with solid tumors in China. *Tumour Biol*. 2010;31(6):633-41.
263. Takahashi R, Mabuchi S, Kawano M, Sasano T, Matsumoto Y, Kuroda H, et al. Prognostic significance of systemic neutrophil and leukocyte alterations in surgically treated endometrial cancer patients: a monoinstitutional study. *Gynecol Oncol*. 2015;137(1):112-8.
264. Martínez-Lostao L, Anel A, Pardo J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin Cancer Res*. 2015;21(22):5047-56.
265. Amato RJ, Flaherty A, Zhang Y, Ouyang F, Mohlere V. Clinical prognostic factors associated with outcome in patients with renal cell cancer with prior tyrosine kinase inhibitors or immunotherapy treated with everolimus. *Urol Oncol*. 2014;32(3):345-54.



266. Ferrucci PF, Ascierto PA, Pigozzo J, Del Vecchio M, Maio M, Antonini Cappellini GC, et al. Baseline neutrophils and derived neutrophil-to-lymphocyte ratio: prognostic relevance in metastatic melanoma patients receiving ipilimumab. *Ann Oncol.* 2016;27(4):732-8.
267. Suzuki R, Takagi T, Hikichi T, Konno N, Sugimoto M, Watanabe KO, et al. Derived neutrophil/lymphocyte ratio predicts gemcitabine therapy outcome in unresectable pancreatic cancer. *Oncol Lett.* 2016;11(5):3441-5.
268. van Kessel KE, de Haan LM, Fransen van de Putte EE, van Rhijn BW, de Wit R, van der Heijden MS, et al. Elevated Derived Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Corresponds With Poor Outcome in Patients Undergoing Pre-Operative Chemotherapy in Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Bladder Cancer.* 2016;2(3):351-60.
269. Proctor MJ, Morrison DS, Talwar D, Balmer SM, Fletcher CD, O'Reilly DS, et al. A comparison of inflammation-based prognostic scores in patients with cancer. A Glasgow Inflammation Outcome Study. *Eur J Cancer.* 2011;47(17):2633-41.
270. Roxburgh CS, McMillan DC. Cancer and systemic inflammation: treat the tumour and treat the host. *Br J Cancer.* 2014;110(6):1409-12.
271. Dolan RD, McSorley ST, Horgan PG, Laird B, McMillan DC. The role of the systemic inflammatory response in predicting outcomes in patients with advanced inoperable cancer: Systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017;116:134-46.
272. Jiang K, Lei J, Li C, Shu K, Li W, Zhang Y, et al. Comparison of the prognostic values of selected inflammation based scores in patients with medullary thyroid carcinoma: A pilot study. *J Surg Oncol.* 2017;116(3):281-7.
273. Kwon HC, Kim SH, Oh SY, Lee S, Lee JH, Choi HJ, et al. Clinical significance of preoperative neutrophil-lymphocyte versus platelet-lymphocyte ratio in patients with operable colorectal cancer. *Biomarkers.* 2012;17(3):216-22.
274. Smith RA, Bosonnet L, Raraty M, Sutton R, Neoptolemos JP, Campbell F, et al. Preoperative platelet-lymphocyte ratio is an independent significant prognostic marker in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Surg.* 2009;197(4):466-72.
275. Zhang GM, Zhu Y, Luo L, Wan FN, Zhu YP, Sun LJ, et al. Preoperative lymphocyte-monocyte and platelet-lymphocyte ratios as predictors of overall survival in patients with bladder cancer undergoing radical cystectomy. *Tumour Biol.* 2015;36(11):8537-43.
276. Bhindi B, Hermanns T, Wei Y, Yu J, Richard PO, Wettstein MS, et al. Identification of the best complete blood count-based predictors for bladder cancer outcomes in patients undergoing radical cystectomy. *Br J Cancer.* 2016;114(2):207-12.
277. Song X, Zhang GM, Ma XC, Luo L, Li B, Chai DY, et al. Comparison of preoperative neutrophil-lymphocyte, lymphocyte-monocyte, and platelet-lymphocyte

ratios in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma undergoing radical nephroureterectomy. *Onco Targets Ther.* 2016;9:1399-407.

278. Ying HQ, Deng QW, He BS, Pan YQ, Wang F, Sun HL, et al. The prognostic value of preoperative NLR, d-NLR, PLR and LMR for predicting clinical outcome in surgical colorectal cancer patients. *Med Oncol.* 2014;31(12):305.

279. Zou ZY, Liu HL, Ning N, Li SY, Du XH, Li R. Clinical significance of preoperative neutrophil lymphocyte ratio and platelet lymphocyte ratio as prognostic factors for patients with colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2016;11(3):2241-8.

280. Cho U, Park HS, Im SY, Yoo CY, Jung JH, Suh YJ, et al. Prognostic value of systemic inflammatory markers and development of a nomogram in breast cancer. *PLoS One.* 2018;13(7):e0200936.

281. Chen JH, Zhai ET, Yuan YJ, Wu KM, Xu JB, Peng JJ, et al. Systemic immune-inflammation index for predicting prognosis of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2017;23(34):6261-72.

282. Geng Y, Shao Y, Zhu D, Zheng X, Zhou Q, Zhou W, et al. Systemic Immune-Inflammation Index Predicts Prognosis of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma: A Propensity Score-matched Analysis. *Sci Rep.* 2016;6:39482.

283. Hong X, Cui B, Wang M, Yang Z, Wang L, Xu Q. Systemic Immune-inflammation Index, Based on Platelet Counts and Neutrophil-Lymphocyte Ratio, Is Useful for Predicting Prognosis in Small Cell Lung Cancer. *Tohoku J Exp Med.* 2015;236(4):297-304.

284. Huang L, Liu S, Lei Y, Wang K, Xu M, Chen Y, et al. Systemic immune-inflammation index, thymidine phosphorylase and survival of localized gastric cancer patients after curative resection. *Oncotarget.* 2016;7(28):44185-93.

285. Fu H, Zheng J, Cai J, Zeng K, Yao J, Chen L, et al. Systemic Immune-Inflammation Index (SII) is Useful to Predict Survival Outcomes in Patients After Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma within Hangzhou Criteria. *Cell Physiol Biochem.* 2018;47(1):293-301.

286. Hu B, Yang XR, Xu Y, Sun YF, Sun C, Guo W, et al. Systemic immune-inflammation index predicts prognosis of patients after curative resection for hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2014;20(23):6212-22.

287. Wang L, Wang C, Wang J, Huang X, Cheng Y. A novel systemic immune-inflammation index predicts survival and quality of life of patients after curative resection for esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2017;143(10):2077-86.

288. Yang R, Chang Q, Meng X, Gao N, Wang W. Prognostic value of Systemic immune-inflammation index in cancer: A meta-analysis. *J Cancer.* 2018;9(18):3295-302.

289. Chan JC, Chan DL, Diakos CI, Engel A, Pavlakis N, Gill A, et al. The Lymphocyte-to-Monocyte Ratio is a Superior Predictor of Overall Survival in Comparison to Established Biomarkers of Resectable Colorectal Cancer. *Ann Surg.* 2017;265(3):539-46.
290. Toyokawa T, Kubo N, Tamura T, Sakurai K, Amano R, Tanaka H, et al. The pretreatment Controlling Nutritional Status (CONUT) score is an independent prognostic factor in patients with resectable thoracic esophageal squamous cell carcinoma: results from a retrospective study. *BMC Cancer.* 2016;16(1):722.
291. Ni XJ, Zhang XL, Ou-Yang QW, Qian GW, Wang L, Chen S, et al. An elevated peripheral blood lymphocyte-to-monocyte ratio predicts favorable response and prognosis in locally advanced breast cancer following neoadjuvant chemotherapy. *PLoS One.* 2014;9(11):e111886.
292. Hirahara N, Matsubara T, Kawahara D, Nakada S, Ishibashi S, Tajima Y. Prognostic significance of preoperative inflammatory response biomarkers in patients undergoing curative thoracoscopic esophagectomy for esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2017;43(2):493-501.
293. Ishii Y, Hamashima T, Yamamoto S, Sasahara M. Pathogenetic significance and possibility as a therapeutic target of platelet derived growth factor. *Pathol Int.* 2017;67(5):235-46.
294. Radziwon-Balicka A, Medina C, O'Driscoll L, Treumann A, Bazou D, Inkielewicz-Stepniak I, et al. Platelets increase survival of adenocarcinoma cells challenged with anticancer drugs: mechanisms and implications for chemoresistance. *Br J Pharmacol.* 2012;167(4):787-804.
295. Mezquita L, Auclin E, Ferrara R, Charrier M, Remon J, Planchard D, et al. Association of the Lung Immune Prognostic Index With Immune Checkpoint Inhibitor Outcomes in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* 2018;4(3):351-7.
296. Weide B, Martens A, Hassel JC, Berking C, Postow MA, Bisschop K, et al. Baseline Biomarkers for Outcome of Melanoma Patients Treated with Pembrolizumab. *Clin Cancer Res.* 2016;22(22):5487-96.
297. Zhao Z, Han F, Yang S, Hua L, Wu J, Zhan W. The clinicopathologic importance of serum lactic dehydrogenase in patients with gastric cancer. *Dis Markers.* 2014;2014:140913.
298. Wang ZX, Yang LP, Qiu MZ, Wang ZQ, Zhou YX, Wang F, et al. Prognostic value of preoperative serum lactate dehydrogenase levels for resectable gastric cancer and prognostic nomograms. *Oncotarget.* 2016;7(26):39945-56.
299. Yu X, Hu F, Yao Q, Li C, Zhang H, Xue Y. Serum fibrinogen levels are positively correlated with advanced tumor stage and poor survival in patients with

gastric cancer undergoing gastrectomy: a large cohort retrospective study. *BMC Cancer*. 2016;16:480.

300. Aliustaoglu M, Bilici A, Ustaalioglu BB, Konya V, Gucun M, Seker M, et al. The effect of peripheral blood values on prognosis of patients with locally advanced gastric cancer before treatment. *Med Oncol*. 2010;27(4):1060-5.

301. Hirashima M, Higuchi S, Sakamoto K, Nishiyama T, Okada H. The ratio of neutrophils to lymphocytes and the phenotypes of neutrophils in patients with early gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1998;124(6):329-34.

302. Jin H, Zhang G, Liu X, Liu X, Chen C, Yu H, et al. Blood neutrophil-lymphocyte ratio predicts survival for stages III-IV gastric cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *World J Surg Oncol*. 2013;11:112.

303. Jung MR, Park YK, Jeong O, Seon JW, Ryu SY, Kim DY, et al. Elevated preoperative neutrophil to lymphocyte ratio predicts poor survival following resection in late stage gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2011;104(5):504-10.

304. Kim H, Ro SM, Yang JH, Jeong JW, Lee JE, Roh SY, et al. The neutrophil-to-lymphocyte ratio prechemotherapy and postchemotherapy as a prognostic marker in metastatic gastric cancer. *Korean J Intern Med*. 2018;33(5):990-9.

305. Shimada H, Takiguchi N, Kainuma O, Soda H, Ikeda A, Cho A, et al. High preoperative neutrophil-lymphocyte ratio predicts poor survival in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2010;13(3):170-6.

306. Yamanaka T, Matsumoto S, Teramukai S, Ishiwata R, Nagai Y, Fukushima M. The baseline ratio of neutrophils to lymphocytes is associated with patient prognosis in advanced gastric cancer. *Oncology*. 2007;73(3-4):215-20.

307. Min KW, Kwon MJ, Kim DH, Son BK, Kim EK, Oh YH, et al. Persistent elevation of postoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio: A better predictor of survival in gastric cancer than elevated preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio. *Sci Rep*. 2017;7(1):13967.

308. Guo J, Chen S, Chen Y, Li S, Xu D. Combination of CRP and NLR: a better predictor of postoperative survival in patients with gastric cancer. *Cancer Manag Res*. 2018;10:315-21.

309. Lin JX, Lin JP, Xie JW, Wang JB, Lu J, Chen QY, et al. Prognostic Value and Association of Sarcopenia and Systemic Inflammation for Patients with Gastric Cancer Following Radical Gastrectomy. *Oncologist*. 2019;24(11):e1091-e101.

310. Liu X, Liu Z, Lin E, Chen Y, Sun X, Zhou Z. A cumulative score based on preoperative fibrinogen and the neutrophil-lymphocyte ratio to predict outcomes in resectable gastric cancer. *Cancer Manag Res*. 2018;10:3007-14.

311. Mao M, Wei X, Sheng H, Chi P, Liu Y, Huang X, et al. C-reactive protein/albumin and neutrophil/lymphocyte ratios and their combination predict overall survival in patients with gastric cancer. *Oncol Lett.* 2017;14(6):7417-24.
312. Song S, Li C, Li S, Gao H, Lan X, Xue Y. Derived neutrophil to lymphocyte ratio and monocyte to lymphocyte ratio may be better biomarkers for predicting overall survival of patients with advanced gastric cancer. *Onco Targets Ther.* 2017;10:3145-54.
313. Deng Q, He B, Liu X, Yue J, Ying H, Pan Y, et al. Prognostic value of pre-operative inflammatory response biomarkers in gastric cancer patients and the construction of a predictive model. *J Transl Med.* 2015;13:66.
314. Cao W, Yao X, Cen D, Zhi Y, Zhu N, Xu L. The prognostic role of platelet-to-lymphocyte ratio on overall survival in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol.* 2020;20(1):16.
315. Zhang Y, Lu JJ, Du YP, Feng CX, Wang LQ, Chen MB. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in gastric cancer. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(12):e0144.
316. Kim EY, Lee JW, Yoo HM, Park CH, Song KY. The Platelet-to-Lymphocyte Ratio Versus Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio: Which is Better as a Prognostic Factor in Gastric Cancer? *Ann Surg Oncol.* 2015;22(13):4363-70.
317. Toyokawa T, Muguruma K, Yoshii M, Tamura T, Sakurai K, Kubo N, et al. Clinical significance of prognostic inflammation-based and/or nutritional markers in patients with stage III gastric cancer. *BMC Cancer.* 2020;20(1):517.
318. Fang T, Wang Y, Yin X, Zhai Z, Zhang Y, Yang Y, et al. Diagnostic Sensitivity of NLR and PLR in Early Diagnosis of Gastric Cancer. *J Immunol Res.* 2020;2020:9146042.
319. Lieto E, Galizia G, Auricchio A, Cardella F, Mabilia A, Basile N, et al. Preoperative Neutrophil to Lymphocyte Ratio and Lymphocyte to Monocyte Ratio are Prognostic Factors in Gastric Cancers Undergoing Surgery. *J Gastrointest Surg.* 2017;21(11):1764-74.
320. Hsu JT, Wang CC, Le PH, Chen TH, Kuo CJ, Lin CJ, et al. Lymphocyte-to-monocyte ratios predict gastric cancer surgical outcomes. *J Surg Res.* 2016;202(2):284-90.
321. Pan YC, Jia ZF, Cao DH, Wu YH, Jiang J, Wen SM, et al. Preoperative lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR) could independently predict overall survival of resectable gastric cancer patients. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(52):e13896.
322. Chen L, Yan Y, Zhu L, Cong X, Li S, Song S, et al. Systemic immune-inflammation index as a useful prognostic indicator predicts survival in patients with advanced gastric cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Manag Res.* 2017;9:849-67.

323. Wang K, Diao F, Ye Z, Zhang X, Zhai E, Ren H, et al. Prognostic value of systemic immune-inflammation index in patients with gastric cancer. *Chin J Cancer*. 2017;36(1):75.
324. Sohn BH, Hwang JE, Jang HJ, Lee HS, Oh SC, Shim JJ, et al. Clinical Significance of Four Molecular Subtypes of Gastric Cancer Identified by The Cancer Genome Atlas Project. *Clin Cancer Res*. 2017.
325. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*. 2017;357(6349):409-13.
326. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, Taube JM, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov*. 2015;5(1):43-51.
327. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2509-20.
328. An JY, Kim H, Cheong JH, Hyung WJ, Kim H, Noh SH. Microsatellite instability in sporadic gastric cancer: its prognostic role and guidance for 5-FU based chemotherapy after R0 resection. *Int J Cancer*. 2012;131(2):505-11.
329. Choi YY, Bae JM, An JY, Kwon IG, Cho I, Shin HB, et al. Is microsatellite instability a prognostic marker in gastric cancer? A systematic review with meta-analysis. *J Surg Oncol*. 2014;110(2):129-35.
330. Corso G, Pedrazzani C, Marrelli D, Pascale V, Pinto E, Roviello F. Correlation of microsatellite instability at multiple loci with long-term survival in advanced gastric carcinoma. *Arch Surg*. 2009;144(8):722-7.
331. Fang WL, Chang SC, Lan YT, Huang KH, Chen JH, Lo SS, et al. Microsatellite instability is associated with a better prognosis for gastric cancer patients after curative surgery. *World J Surg*. 2012;36(9):2131-8.
332. Polom K, Marano L, Marrelli D, De Luca R, Roviello G, Savelli V, et al. Meta-analysis of microsatellite instability in relation to clinicopathological characteristics and overall survival in gastric cancer. *Br J Surg*. 2018;105(3):159-67.
333. Shin SJ, Kim SY, Choi YY, Son T, Cheong JH, Hyung WJ, et al. Mismatch Repair Status of Gastric Cancer and Its Association with the Local and Systemic Immune Response. *Oncologist*. 2019.
334. Hölscher AH, Drebber U, Mönig SP, Schulte C, Vallböhmer D, Bollschweiler E. Early gastric cancer: lymph node metastasis starts with deep mucosal infiltration. *Ann Surg*. 2009;250(5):791-7.

335. Bollschweiler E, Boettcher K, Hoelscher AH, Sasako M, Kinoshita T, Maruyama K, et al. Is the prognosis for Japanese and German patients with gastric cancer really different? *Cancer*. 1993;71(10):2918-25.
336. Noguchi Y, Yoshikawa T, Tsuburaya A, Motohashi H, Karpeh MS, Brennan MF. Is gastric carcinoma different between Japan and the United States? *Cancer*. 2000;89(11):2237-46.
337. Bennett C, Wang Y, Pan T. Endoscopic mucosal resection for early gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;2009(4):Cd004276.
338. Kim JJ, Lee JH, Jung HY, Lee GH, Cho JY, Ryu CB, et al. EMR for early gastric cancer in Korea: a multicenter retrospective study. *Gastrointest Endosc*. 2007;66(4):693-700.
339. Smyth EC, Verheij M, Allum W, Cunningham D, Cervantes A, Arnold D, et al. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2016;27(suppl 5):v38-v49.
340. Kim YW, Baik YH, Yun YH, Nam BH, Kim DH, Choi IJ, et al. Improved quality of life outcomes after laparoscopy-assisted distal gastrectomy for early gastric cancer: results of a prospective randomized clinical trial. *Ann Surg*. 2008;248(5):721-7.
341. Kitano S, Shiraishi N, Fujii K, Yasuda K, Inomata M, Adachi Y. A randomized controlled trial comparing open vs laparoscopy-assisted distal gastrectomy for the treatment of early gastric cancer: an interim report. *Surgery*. 2002;131(1 Suppl):S306-11.
342. Lee JH, Han HS, Lee JH. A prospective randomized study comparing open vs laparoscopy-assisted distal gastrectomy in early gastric cancer: early results. *Surg Endosc*. 2005;19(2):168-73.
343. Chen K, Pan Y, Cai JQ, Xu XW, Wu D, Mou YP. Totally laparoscopic gastrectomy for gastric cancer: a systematic review and meta-analysis of outcomes compared with open surgery. *World J Gastroenterol*. 2014;20(42):15867-78.
344. Wu CW, Hsiung CA, Lo SS, Hsieh MC, Chen JH, Li AF, et al. Nodal dissection for patients with gastric cancer: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2006;7(4):309-15.
345. Dent DM, Madden MV, Price SK. Randomized comparison of R1 and R2 gastrectomy for gastric carcinoma. *Br J Surg*. 1988;75(2):110-2.
346. Robertson CS, Chung SC, Woods SD, Griffin SM, Raimes SA, Lau JT, et al. A prospective randomized trial comparing R1 subtotal gastrectomy with R3 total gastrectomy for antral cancer. *Ann Surg*. 1994;220(2):176-82.
347. Cuschieri A, Fayers P, Fielding J, Craven J, Bancewicz J, Joypaul V, et al. Postoperative morbidity and mortality after D1 and D2 resections for gastric cancer:

preliminary results of the MRC randomised controlled surgical trial. The Surgical Cooperative Group. *Lancet*. 1996;347(9007):995-9.

348. Bonenkamp JJ, Songun I, Hermans J, Sasako M, Welvaart K, Plukker JT, et al. Randomised comparison of morbidity after D1 and D2 dissection for gastric cancer in 996 Dutch patients. *Lancet*. 1995;345(8952):745-8.

349. Hartgrink HH, van de Velde CJ, Putter H, Bonenkamp JJ, Klein Kranenbarg E, Songun I, et al. Extended lymph node dissection for gastric cancer: who may benefit? Final results of the randomized Dutch gastric cancer group trial. *J Clin Oncol*. 2004;22(11):2069-77.

350. Brennan MF. Lymph-node dissection for gastric cancer. *N Engl J Med*. 1999;340(12):956-8.

351. Mocellin S, McCulloch P, Kazi H, Gama-Rodrigues JJ, Yuan Y, Nitti D. Extent of lymph node dissection for adenocarcinoma of the stomach. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;2015(8):Cd001964.

352. Rougier P, Lasser P, Ducreux M, Mahjoubi M, Bognel C, Elias D. Preoperative chemotherapy of locally advanced gastric cancer. *Ann Oncol*. 1994;5 Suppl 3:59-68.

353. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJ, Nicolson M, et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med*. 2006;355(1):11-20.

354. Ychou M, Boige V, Pignon JP, Conroy T, Bouché O, Lebreton G, et al. Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial. *J Clin Oncol*. 2011;29(13):1715-21.

355. Al-Batran S-E, Homann N, Pauligk C, Goetze TO, Meiler J, Kasper S, et al. Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial. *The Lancet*. 2019;393(10184):1948-57.

356. Ji J SZ, Li Z, y cols. Perioperative chemotherapy of oxaliplatin combined with S1 (SOX) versus postoperative chemotherapy of SOX or oxaliplatin with capecitabine (XELOX) in locally advanced gastric adenocarcinoma with D2 gastrectomy: a randomized phase III trial (RESOLVE trial). *Annals of Oncology*. 2019;30:v851-v934.

357. Kang Y YJ, Park Y, y cols. Phase III randomized study of neoadjuvant chemotherapy (CT) with docetaxel (D), oxaliplatin (O) and S-1 (S) (DOS) followed by surgery and adjuvant S-1, vs surgery and adjuvant S1, for resectable advanced gastric cancer (GC) (PRODIGY). *Annals of Oncology*. 2019;30 v851-v934.

358. Shapiro J, van Lanschot JJB, Hulshof M, van Hagen P, van Berge Henegouwen MI, Wijnhoven BPL, et al. Neoadjuvant chemoradiotherapy plus surgery versus



surgery alone for oesophageal or junctional cancer (CROSS): long-term results of a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(9):1090-8.

359. van Hagen P, Hulshof MCCM, van Lanschot JJB, Steyerberg EW, Henegouwen MIVB, Wijnhoven BPL, et al. Preoperative Chemoradiotherapy for Esophageal or Junctional Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2012;366(22):2074-84.

360. Tepper J, Krasna MJ, Niedzwiecki D, Hollis D, Reed CE, Goldberg R, et al. Phase III trial of trimodality therapy with cisplatin, fluorouracil, radiotherapy, and surgery compared with surgery alone for esophageal cancer: CALGB 9781. *J Clin Oncol.* 2008;26(7):1086-92.

361. Walsh TN, Noonan N, Hollywood D, Kelly A, Keeling N, Hennessy TP. A comparison of multimodal therapy and surgery for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 1996;335(7):462-7.

362. Ronellenfitsch U, Schwarzbach M, Hofheinz R, Kienle P, Kieser M, Slinger TE, et al. Perioperative chemo(radio)therapy versus primary surgery for resectable adenocarcinoma of the stomach, gastroesophageal junction, and lower esophagus. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013(5):Cd008107.

363. Sjoquist KM, Burmeister BH, Smithers BM, Zalcberg JR, Simes RJ, Barbour A, et al. Survival after neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy for resectable oesophageal carcinoma: an updated meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2011;12(7):681-92.

364. Huang TC, Hsu CH, Lin CC, Tu YK. Systematic review and network meta-analysis: neoadjuvant chemoradiotherapy for locoregional esophageal cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2015;45(11):1023-8.

365. Stahl M, Walz MK, Riera-Knorrenschild J, Stuschke M, Sandermann A, Bitzer M, et al. Preoperative chemotherapy versus chemoradiotherapy in locally advanced adenocarcinomas of the oesophagogastric junction (POET): Long-term results of a controlled randomised trial. *Eur J Cancer.* 2017;81:183-90.

366. Stahl M, Walz MK, Stuschke M, Lehmann N, Meyer HJ, Riera-Knorrenschild J, et al. Phase III comparison of preoperative chemotherapy compared with chemoradiotherapy in patients with locally advanced adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *J Clin Oncol.* 2009;27(6):851-6.

367. Klevebro F, Alexandersson von Döbeln G, Wang N, Johnsen G, Jacobsen AB, Friesland S, et al. A randomized clinical trial of neoadjuvant chemotherapy versus neoadjuvant chemoradiotherapy for cancer of the oesophagus or gastro-oesophageal junction. *Ann Oncol.* 2016;27(4):660-7.

368. Burmeister BH, Thomas JM, Burmeister EA, Walpole ET, Harvey JA, Thomson DB, et al. Is concurrent radiation therapy required in patients receiving preoperative chemotherapy for adenocarcinoma of the oesophagus? A randomised phase II trial. *Eur J Cancer.* 2011;47(3):354-60.

369. Deng HY, Wang WP, Wang YC, Hu WP, Ni PZ, Lin YD, et al. Neoadjuvant chemoradiotherapy or chemotherapy? A comprehensive systematic review and meta-analysis of the options for neoadjuvant therapy for treating oesophageal cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2017;51(3):421-31.
370. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(1):7-30.
371. Cascinu S, Labianca R, Barone C, Santoro A, Carnaghi C, Cassano A, et al. Adjuvant treatment of high-risk, radically resected gastric cancer patients with 5-fluorouracil, leucovorin, cisplatin, and epidoxorubicin in a randomized controlled trial. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(8):601-7.
372. De Vita F, Giuliani F, Orditura M, Maiello E, Galizia G, Di Martino N, et al. Adjuvant chemotherapy with epirubicin, leucovorin, 5-fluorouracil and etoposide regimen in resected gastric cancer patients: a randomized phase III trial by the Gruppo Oncologico Italia Meridionale (GOIM 9602 Study). *Ann Oncol.* 2007;18(8):1354-8.
373. Bouché O, Ychou M, Burtin P, Bedenne L, Ducreux M, Lebreton G, et al. Adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil and cisplatin compared with surgery alone for gastric cancer: 7-year results of the FFC0 randomised phase III trial (8801). *Ann Oncol.* 2005;16(9):1488-97.
374. Sakuramoto S, Sasako M, Yamaguchi T, Kinoshita T, Fujii M, Nashimoto A, et al. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. *N Engl J Med.* 2007;357(18):1810-20.
375. Bang YJ, Kim YW, Yang HK, Chung HC, Park YK, Lee KH, et al. Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): a phase 3 open-label, randomised controlled trial. *Lancet.* 2012;379(9813):315-21.
376. Noh SH, Park SR, Yang HK, Chung HC, Chung IJ, Kim SW, et al. Adjuvant capecitabine plus oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): 5-year follow-up of an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(12):1389-96.
377. Diaz-Nieto R, Orti-Rodríguez R, Winslet M. Post-surgical chemotherapy versus surgery alone for resectable gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013(9):Cd008415.
378. Sun P, Xiang JB, Chen ZY. Meta-analysis of adjuvant chemotherapy after radical surgery for advanced gastric cancer. *Br J Surg.* 2009;96(1):26-33.
379. Paoletti X, Oba K, Burzykowski T, Michiels S, Ohashi Y, Pignon JP, et al. Benefit of adjuvant chemotherapy for resectable gastric cancer: a meta-analysis. *Jama.* 2010;303(17):1729-37.
380. Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann GN, et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for

adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med.* 2001;345(10):725-30.

381. Smalley SR, Benedetti JK, Haller DG, Hundahl SA, Estes NC, Ajani JA, et al. Updated analysis of SWOG-directed intergroup study 0116: a phase III trial of adjuvant radiochemotherapy versus observation after curative gastric cancer resection. *J Clin Oncol.* 2012;30(19):2327-33.

382. Park SH, Sohn TS, Lee J, Lim DH, Hong ME, Kim KM, et al. Phase III Trial to Compare Adjuvant Chemotherapy With Capecitabine and Cisplatin Versus Concurrent Chemoradiotherapy in Gastric Cancer: Final Report of the Adjuvant Chemoradiotherapy in Stomach Tumors Trial, Including Survival and Subset Analyses. *J Clin Oncol.* 2015;33(28):3130-6.

383. Cats A, Jansen EPM, van Grieken NCT, Sikorska K, Lind P, Nordsmark M, et al. Chemotherapy versus chemoradiotherapy after surgery and preoperative chemotherapy for resectable gastric cancer (CRITICS): an international, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology.* 2018.

384. Dai Q, Jiang L, Lin RJ, Wei KK, Gan LL, Deng CH, et al. Adjuvant chemoradiotherapy versus chemotherapy for gastric cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Surg Oncol.* 2015;111(3):277-84.

385. Ahmed S, Iqbal N, Yadav S, Zaidi A, Ahmed O, Alvi R, et al. Time to adjuvant therapy and other variables in localized gastric and gastroesophageal junction (GEJ) cancer (IJGC-D-13-00162). *J Gastrointest Cancer.* 2014;45(3):284-90.

386. Greenleaf EK, Kulaylat AN, Hollenbeak CS, Almhanna K, Wong J. Timing of Adjuvant Chemotherapy and Impact on Survival for Resected Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2016;23(13):4203-13.

387. Yao J, Arcila ME, Ladanyi M, Hechtman JF. Pan-Cancer Biomarkers: Changing the Landscape of Molecular Testing. *Arch Pathol Lab Med.* 2020.

388. Roach C, Zhang N, Corigliano E, Jansson M, Toland G, Ponto G, et al. Development of a Companion Diagnostic PD-L1 Immunohistochemistry Assay for Pembrolizumab Therapy in Non-Small-cell Lung Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2016;24(6):392-7.

389. Almeida PR, Ferreira VA, Santos CC, Rocha-Filho FD, Feitosa RR, Falcão EA, et al. E-cadherin immunoexpression patterns in the characterisation of gastric carcinoma histotypes. *J Clin Pathol.* 2010;63(7):635-9.

390. Jawhari AU, Noda M, Farthing MJ, Pignatelli M. Abnormal expression and function of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma cell lines. *Br J Cancer.* 1999;80(3-4):322-30.

391. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American

Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*. 2018;36(20):2105-22.

392. J.M. Doménech Massons JNP. Análisis de la supervivencia y modelo de riesgos proporcionales de Cox. 13th edition ed: Signo Impressió Gràfica, SLU; 2020 10 March 2020.

393. Reddavid R, Sofia S, Chiaro P, Colli F, Trapani R, Esposito L, et al. Neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer. Is it a must or a fake? *World J Gastroenterol*. 2018;24(2):274-89.

394. Smyth EC, Fassan M, Cunningham D, Allum WH, Okines AF, Lampis A, et al. Effect of Pathologic Tumor Response and Nodal Status on Survival in the Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy Trial. *J Clin Oncol*. 2016;34(23):2721-7.

395. Powell A, Parkinson D, Patel N, Chan D, Christian A, Lewis WG. Prognostic Significance of Serum Inflammatory Markers in Gastric Cancer. *J Gastrointest Surg*. 2018;22(4):595-605.

396. Zhang X, Zhang W, Feng LJ. Prognostic significance of neutrophil lymphocyte ratio in patients with gastric cancer: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(11):e111906.

397. el Aziz LM. Blood neutrophil-lymphocyte ratio predicts survival in locally advanced cancer stomach treated with neoadjuvant chemotherapy FOLFOX 4. *Med Oncol*. 2014;31(12):311.

398. Mellor KL, Powell A, Lewis WG. Systematic Review and Meta-Analysis of the Prognostic Significance of Neutrophil-Lymphocyte Ratio (NLR) After R0 Gastrectomy for Cancer. *J Gastrointest Cancer*. 2018;49(3):237-44.

399. Xin-Ji Z, Yong-Gang L, Xiao-Jun S, Xiao-Wu C, Dong Z, Da-Jian Z. The prognostic role of neutrophils to lymphocytes ratio and platelet count in gastric cancer: A meta-analysis. *Int J Surg*. 2015;21:84-91.

400. Chen J, Hong D, Zhai Y, Shen P. Meta-analysis of associations between neutrophil-to-lymphocyte ratio and prognosis of gastric cancer. *World J Surg Oncol*. 2015;13:122.

401. Graziosi L, Marino E, De Angelis V, Rebonato A, Cavazzoni E, Donini A. Prognostic value of preoperative neutrophils to lymphocytes ratio in patients resected for gastric cancer. *Am J Surg*. 2015;209(2):333-7.

402. Mori M, Shuto K, Kosugi C, Narushima K, Hayashi H, Matsubara H, et al. An increase in the neutrophil-to-lymphocyte ratio during adjuvant chemotherapy indicates a poor prognosis in patients with stage II or III gastric cancer. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1261.

403. Tang C, Cheng X, Yu S, Wang Y, Hou J, Li Q, et al. Platelet-to-lymphocyte ratio and lymphocyte-to-white blood cell ratio predict the efficacy of neoadjuvant chemotherapy and the prognosis of locally advanced gastric cancer patients treated with the oxaliplatin and capecitabine regimen. *Onco Targets Ther.* 2018;11:7061-75.
404. Zhong JH, Huang DH, Chen ZY. Prognostic role of systemic immune-inflammation index in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(43):75381-8.
405. Yang Z, Zhang J, Lu Y, Xu Q, Tang B, Wang Q, et al. Aspartate aminotransferase-lymphocyte ratio index and systemic immune-inflammation index predict overall survival in HBV-related hepatocellular carcinoma patients after transcatheter arterial chemoembolization. *Oncotarget.* 2015;6(40):43090-8.
406. Aldemir MN, Turkeli M, Simsek M, Yildirim N, Bilen Y, Yetimoglu H, et al. Prognostic Value of Baseline Neutrophil-Lymphocyte and Platelet-Lymphocyte Ratios in Local and Advanced Gastric Cancer Patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(14):5933-7.
407. Sun X, Liu X, Liu J, Chen S, Xu D, Li W, et al. Preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio plus platelet-to-lymphocyte ratio in predicting survival for patients with stage I-II gastric cancer. *Chin J Cancer.* 2016;35(1):57.
408. Sun X, Sun Z, Zhu Z, Guan H, Zhang J, Zhang Y, et al. Clinicopathological significance and prognostic value of lactate dehydrogenase A expression in gastric cancer patients. *PLoS One.* 2014;9(3):e91068.
409. Yao F, Zhao T, Zhong C, Zhu J, Zhao H. LDHA is necessary for the tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol.* 2013;34(1):25-31.
410. Augoff K, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R. Lactate dehydrogenase 5: an old friend and a new hope in the war on cancer. *Cancer Lett.* 2015;358(1):1-7.
411. Xie H, Hanai J, Ren JG, Kats L, Burgess K, Bhargava P, et al. Targeting lactate dehydrogenase--a inhibits tumorigenesis and tumor progression in mouse models of lung cancer and impacts tumor-initiating cells. *Cell Metab.* 2014;19(5):795-809.
412. Luigina G, Elisabetta M, Cristina VM, Annibale D. New prognostic western score predicting survival after curative resection of gastric cancer. *Updates Surg.* 2020;72(4):1023-30.
413. Marrelli D, Polom K, Pascale V, Vindigni C, Piagnerelli R, De Franco L, et al. Strong Prognostic Value of Microsatellite Instability in Intestinal Type Non-cardia Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2016;23(3):943-50.
414. Evans SC, Gillis A, Geldenhuys L, Vaninetti NM, Malatjalian DA, Porter GA, et al. Microsatellite instability in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Lett.* 2004;212(2):241-51.

415. Kim SY, Choi YY, An JY, Shin HB, Jo A, Choi H, et al. The benefit of microsatellite instability is attenuated by chemotherapy in stage II and stage III gastric cancer: Results from a large cohort with subgroup analyses. *Int J Cancer*. 2015;137(4):819-25.
416. Meyers M, Wagner MW, Hwang HS, Kinsella TJ, Boothman DA. Role of the hMLH1 DNA mismatch repair protein in fluoropyrimidine-mediated cell death and cell cycle responses. *Cancer Res*. 2001;61(13):5193-201.
417. Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehmé A, et al. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res*. 1996;56(21):4881-6.
418. Polom K, Marrelli D, Smyth EC, Voglino C, Roviello G, Pascale V, et al. The Role of Microsatellite Instability in Positive Margin Gastric Cancer Patients. *Surg Innov*. 2018;25(2):99-104.
419. Grogg KL, Lohse CM, Pankratz VS, Halling KC, Smyrk TC. Lymphocyte-rich gastric cancer: associations with Epstein-Barr virus, microsatellite instability, histology, and survival. *Mod Pathol*. 2003;16(7):641-51.
420. Chiaravalli AM, Feltri M, Bertolini V, Bagnoli E, Furlan D, Cerutti R, et al. Intratumour T cells, their activation status and survival in gastric carcinomas characterised for microsatellite instability and Epstein-Barr virus infection. *Virchows Arch*. 2006;448(3):344-53.
421. Stjepanovic N, Moreira L, Carneiro F, Balaguer F, Cervantes A, Balmana J, et al. Hereditary gastrointestinal cancers: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019;30(10):1558-71.
422. Shinozaki-Ushiku A, Kunita A, Fukayama M. Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer (review). *Int J Oncol*. 2015;46(4):1421-34.
423. Lee HS, Choi SI, Lee HK, Kim HS, Yang HK, Kang GH, et al. Distinct clinical features and outcomes of gastric cancers with microsatellite instability. *Mod Pathol*. 2002;15(6):632-40.
424. Seo HM, Chang YS, Joo SH, Kim YW, Park YK, Hong SW, et al. Clinicopathologic characteristics and outcomes of gastric cancers with the MSI-H phenotype. *J Surg Oncol*. 2009;99(3):143-7.
425. Gu M, Kim D, Bae Y, Choi J, Kim S, Song S. Analysis of microsatellite instability, protein expression and methylation status of hMLH1 and hMSH2 genes in gastric carcinomas. *Hepatogastroenterology*. 2009;56(91-92):899-904.
426. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009;45(2):228-47.

**ANEXOS**





## ANEXO I. APROBACIÓN CEIC HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE



Hospital Universitario  
12 de Octubre  
Comunidad de Madrid



**Nº CEIm: 18/415**

### DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

---

Dña. **MARÍA UGALDE DÍEZ**, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del **HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE**.

#### CERTIFICA

Que este Comité en la reunión celebrada el día **16/10/2018** ha evaluado la propuesta del investigador para que se realice el proyecto de investigación, titulado: **“ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN ENTRE PARÁMETROS SÉRICOS INFLAMATORIOS E INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN PACIENTES CON CÁNCER DE ESTÓMAGO Y DE UNIÓN GASTROESOFÁGICA TRATADOS CON INTENCIÓN CURATIVA Y SU POSIBLE IMPORTANCIA PRONOSTICA”**.

Entendiendo que dicho estudio se ajusta a las normas éticas esenciales y criterios deontológicos que rigen en este Centro, cumpliendo los requisitos metodológicos necesarios y las normas de funcionamiento interno del Comité. Se han ponderado los aspectos metodológicos éticos y legales y se recogerá la decisión adoptada en el acta correspondiente.

Este Comité **INFORMA FAVORABLEMENTE** a la realización de dicho proyecto.

El estudio será realizado en el **Hospital Universitario 12 de Octubre** por el Dr. **GOMEZ MARTIN, Carlos** como Investigador Principal.

Lo que firmo en Madrid, a 16 de octubre de 2018.

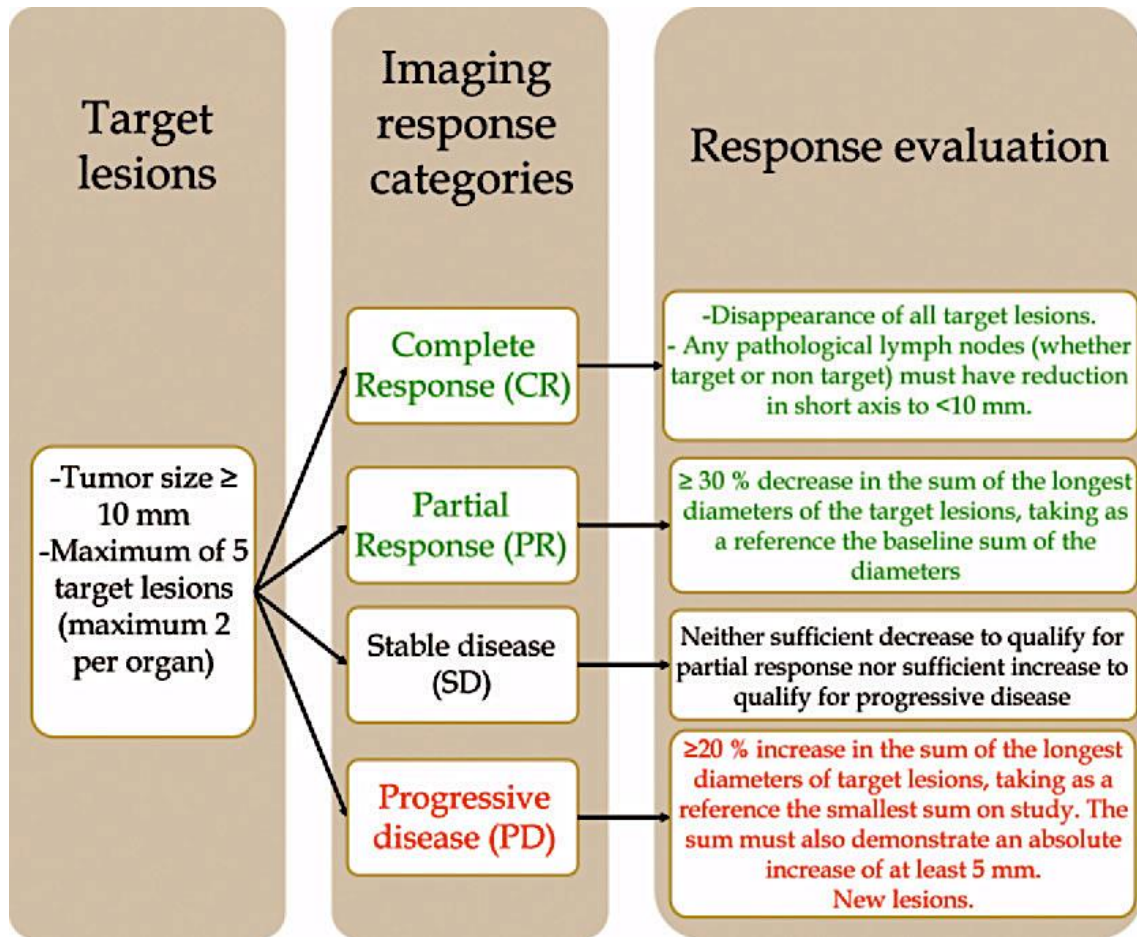
Firmado digitalmente por UGALDE DIEZ  
DULCE MARIA - 05242157C  
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES,  
serialNumber=IDCES-05242157C,  
givenName=DULCE MARIA, sn=UGALDE DIEZ,  
cn=UGALDE DIEZ DULCE MARIA - 05242157C  
Fecha: 2018.10.16 10:59:47 +02'00'

Firmado: **Dra. Maria Ugalde Diez**  
**Secretaria del CEIm Hospital Universitario 12 de Octubre.**

ANEXO II. VALORES DE REFERENCIA Y RANGOS DE LABORATORIO DE LOS CENTROS PARTICIPANTES

Unidades y Rangos de los Laboratorios Locales			
<b>Hospital Universitario 12 de Octubre</b>	Neutrófilos	X10E3/ $\mu$ l	[1,8 – 7,6]
	Leucocitos	X10E3/ $\mu$ l	[4 – 11,6]
	Linfocitos	X10E3/ $\mu$ l	[1,2 – 4,2]
	Plaquetas	X10E3/ $\mu$ l	[140 – 450]
	LDH	IU/L	[135 – 214]
<b>Hospital Universitario de Fuenlabrada</b>	Neutrófilos	X10E3/ $\mu$ l	[1,7 – 7,5]
	Leucocitos	X10E3/ $\mu$ l	[4,0 – 11,6]
	Linfocitos	X10E3/ $\mu$ l	[1,0 – 3,2]
	Plaquetas	X10E3/ $\mu$ l	[140 – 450]
	LDH	IU/L	[80 – 248]
<b>Hospital Universitario Marqués de Valdecilla</b>	Neutrófilos	X10E3/ $\mu$ l	[1,4 – 7,5]
	Leucocitos	X10E3/ $\mu$ l	[3,0 – 10,0]
	Linfocitos	X10E3/ $\mu$ l	[1,2 – 5,0]
	Plaquetas	X10E3/ $\mu$ l	[150 – 450]
	LDH	IU/L	[105 – 215]
<b>Istituto di Candiolo IRCCS</b>	Neutrófilos	X10E3/ $\mu$ l	[1,9 – 8,00]
	Leucocitos	X13E3 c./ $\mu$ l	[4,4 – 11,0]
	Linfocitos	X10E3/ $\mu$ l	[0,9 – 3,8]
	Plaquetas	X10E3 c./ $\mu$ l	[150 – 400]
	LDH	IU/L	[240 – 480]
<b>Hospital Universitario de Osaka</b>	Neutrófilos	/ $\mu$ l	[1500 – 7500]
	Leucocitos	/ $\mu$ l	[4000 – 8000]
	Linfocitos	/ $\mu$ l	[1000 – 4000]
	Plaquetas	X10E3/ $\mu$ l	[14,5 – 38,0]
	LDH	IU/L	[120 - 225]

ANEXO III. CRITERIOS RECIST 1.1 DE VALORACIÓN DE LA RESPUESTA TUMORAL



MODIFICADO A PARTIR DE EISENHAUER EA Y COLS (426).



# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS



## FIGURAS

Figura 1. Clasificación de Siewert-Lend (1998), tomado de (18).

Figura 2. Clasificación del Cáncer Gástrico Precoz de la Sociedad Japonesa de Gastroenterología Endoscópica.

Figura 3. Clasificación de Borrmann para el Cáncer Gástrico avanzado.

Figura 4. Principales características de los cuatro subtipos moleculares de cáncer gástrico, tomado de (32).

Figura 5. Descripción molecular del CG según la clasificación de TCGA, tomando de (32).

Figura 6. Estaciones ganglionares definidas por el JCGC.

Figura 7. Mapa de centros hospitalarios participantes.

Figura 8. Diagrama de flujo de los pacientes del estudio.

Figura 9. Estudio de la expresión de las proteínas MMR del paciente 002.

Figura 10. Estudio de la expresión de las proteínas MMR del paciente 013.

Figura 11. Estudio de la expresión de las proteínas MMR del paciente 023.

Figura 12. Estudio de la expresión de las proteínas MMR del paciente 039.

Figura 13. Supervivencia global en meses de las cohortes Occidental y Oriental.

Figura 14. Diagrama de caja: supervivencia global de la cohorte Occidental.

Figura 15. Supervivencia global en meses de la cohorte Occidental según Clasificación de Lauren.

Figura 16. Supervivencia global en meses de la cohorte Occidental según tipo de resección.

Figura 17. Supervivencia libre de progresión en meses de las cohortes Occidental y Oriental.

Figura 18. Supervivencia libre de progresión tumoral de la cohorte Occidental.

Figura 19. Diagrama de caja: supervivencia libre de progresión de la cohorte Occidental.

Figura 20. Supervivencia libre de progresión en meses de la cohorte Occidental según Clasificación de Lauren.

Figura 21. Supervivencia libre de progresión en meses de la cohorte Occidental según tipo de resección.

Figura 22. Supervivencia global según la expresión de E-Cadherina en los pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Figura 23. Supervivencia global según Carga Mutacional Tumoral en los pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Figura 24. Algoritmo de clasificación molecular propuesto.

Figura 25. Porcentaje de pacientes de la cohorte del Hospital Universitario 12 de Octubre según categorial molecular.

Figura 26. Supervivencia global en la cohorte del Hospital Universitario 12 de Octubre de acuerdo a la clasificación molecular propuesta.



## TABLAS

Tabla 1. Comparación entre Clasificación de la OMS y Clasificación de Lauren del cáncer gástrico.

Tabla 2. Estadio TNM del cáncer gástrico: TNM 7<sup>a</sup> edición (UICC/AJCC).

Tabla 3. Grupos por estadio patológico del cáncer gástrico: TNM 7<sup>a</sup> edición (UICC/AJCC).

Tabla 4. Grupos por estadio clínico del cáncer gástrico: TNM 8<sup>a</sup> edición (UICC/AJCC).

Tabla 5. Grupos por estadio patológico del cáncer gástrico: TNM 8<sup>a</sup> edición (UICC/AJCC).

Tabla 6. Grupos por estadio patológico del cáncer gástrico tras neoadyuvancia: TNM 8<sup>a</sup> edición (UICC/AJCC).

Tabla 7. Anticuerpos y plataformas empleados en los centros occidentales.

Tabla 8. Genes incluidos en el panel *Oncomine Comprehensive Assay Plus* para los cuales se determinan ganancias en el número de copias y mutaciones puntuales.

Tabla 9. Genes incluidos en el panel *Oncomine Comprehensive Assay Plus* para los cuales se realiza la secuenciación completa y se determinan pérdidas en el número de copias.

Tabla 10. Características clínico-patológicas de los pacientes del estudio.

Tabla 11. Tratamientos empleados y respuestas obtenidas en la población del estudio.

Tabla 12. Parámetros séricos de inflamación sistémica en la serie total.

Tabla 13. Parámetros séricos de inflamación sistémica en la cohorte de pacientes occidentales.

Tabla 14. Parámetros séricos de inflamación sistémica en la cohorte de pacientes orientales.

Tabla 15. Resultados de los niveles de LDH en la población del estudio.

Tabla 16. Expresión de proteínas reparadoras del ADN en la cohorte Occidental.

Tabla 17. Comparación de las características clínico-patológicas entre cohorte Occidental y Oriental.

Tabla 18. Comparación de la variable MMR entre cohorte Occidental y Oriental.

Tabla 19. Comparación de los parámetros de inflamación sistémica entre cohorte Occidental y Oriental.

Tabla 20. Relación entre parámetros de inflamación sistémica pre-neoadyuvancia y características clínico-patológicas.

Tabla 21. Relación entre parámetros de inflamación sistémica pre-cirugía y características clínico-patológicas.

Tabla 22. Relación entre parámetros de inflamación sistémica pre-neoadyuvancia y respuesta al tratamiento neoadyuvante.

Tabla 23. Relación entre parámetros de inflamación sistémica pre-cirugía y respuesta al tratamiento neoadyuvante.

Tabla 24. Relación entre los parámetros de inflamación sistémica pre-neoadyuvancia e inestabilidad de microsatélites en la cohorte Occidental.

Tabla 25. Relación entre los parámetros de inflamación sistémica pre-cirugía e inestabilidad de microsatélites en la cohorte Occidental.

Tabla 26. Supervivencia global en la cohorte Occidental según las características clínico-patológicas estudiadas.

Tabla 27. Supervivencia global en la cohorte Occidental según tipo de recidiva.

Tabla 28. Supervivencia global según los parámetros de inflamación sistémica de los pacientes de la cohorte Occidental.

Tabla 29. Análisis univariante de riesgos proporcionales de Cox para la supervivencia global de la cohorte Occidental.

Tabla 30. Supervivencia libre de progresión en la cohorte Occidental según las características clínico-patológicas estudiadas.

Tabla 31. Supervivencia libre de progresión en la cohorte Occidental según los parámetros de inflamación sistémica.

Tabla 32. Análisis univariante de riesgos proporcionales de Cox para la supervivencia libre de progresión.

Tabla 33. Modelo multivariante explicativo de la supervivencia libre de progresión de la cohorte Occidental según los niveles del ratio dNLR.

Tabla 34. Características clínico-patológicas de los pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Tabla 35. Parámetros séricos de inflamación sistémica en los pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Tabla 36. Resultados de los niveles séricos de LDH en los pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Tabla 37. Resultados de la determinación por IHQ de PD-L1, E-cadherina, EBER y MMR en la cohorte del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Tabla 38. Resultados del estudio de hibridación de *HER2*, *MET* y *FGFR2* en la cohorte del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Tabla 39. Resumen de resultados de Hibridación *in situ* e Inmunohistoquímica en la cohorte del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Tabla 40. Incidencia de las alteraciones moleculares por sujeto en la cohorte de pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Tabla 41. Mutaciones, amplificaciones y deleciones génicas encontradas en los pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Tabla 42. Supervivencia global en la cohorte del Hospital Universitario 12 de octubre respecto a las alteraciones moleculares.

Tabla 43. Supervivencia libre de progresión en la cohorte del Hospital Universitario 12 de Octubre respecto a las alteraciones moleculares.

Tabla 44. Supervivencia global en la cohorte del Hospital Universitario 12 de Octubre respecto a la clasificación molecular propuesta.

