



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Antía
Cousillas Castiñeiras

Tesis doctoral

Biomarcadores en cáncer
gástrico avanzado y metastásico,
el papel predictivo y pronóstico
de la vitamina D

Santiago de Compostela, 2022



TESIS DE DOCTORADO

**BIOMARCADORES EN CÁNCER
GÁSTRICO AVANZADO Y
METASTÁSICO, EL PAPEL PREDICTIVO
Y PRONÓSTICO DE LA VITAMINA D**

Antía Cousillas Castiñeiras

**ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE
LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN
INVESTIGACIÓN CLÍNICA EN MEDICINA**

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2022





DECLARACIÓN DE LA AUTORA DE LA TESIS

Dña. **Antía Cousillas Castiñeiras**

Título de la tesis: **Biomarcadores en cáncer gástrico avanzado y metastásico, el papel predictivo y pronóstico de la vitamina D**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
- 4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En Santiago de Compostela, 11 de Octubre de 2022.

Firma electrónica



AUTORIZACIÓN DE LA DIRECTORA DE LA TESIS

Dra. María Elena Gallardo Martín

En condición de: Directora

Título de la tesis: **Biomarcadores en cáncer gástrico avanzado y metastásico, el papel predictivo y pronóstico de la vitamina D**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña Antía Cousillas Castiñeiras, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directora de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 11 de Octubre de 2022

Firma electrónica



AUTORIZACIÓN DEL TUTOR DE LA TESIS

Dr. Arturo González Quintela

En condición de: Tutor

Título de la tesis: **Biomarcadores en cáncer gástrico avanzado y metastásico, el papel predictivo y pronóstico de la vitamina D**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña Antía Cousillas Castiñeiras, bajo mi tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 11 de Octubre de 2022

Firma electrónica



DECLARACIONES CONFLICTO DE INTERESES

DECLARACIONES CONFLICTO DE INTERESES, USO DE IMÁGENES Y CONTENIDO PUBLICADO.

El doctorando declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.

Fdo. Antía Cousillas Castiñeiras

Resumen

En esta tesis se analizó la relación entre el pronóstico del cáncer gástrico y biomarcadores moleculares, bioquímicos y clínicos. El diseño del estudio fue observacional, ambispectivo y multicéntrico compuesto por dos cohortes: una cohorte de pacientes con cáncer gástrico localizado y otra con cáncer gástrico metastásico. En la cohorte de cáncer gástrico localizado se observó un peor pronóstico en los pacientes con un déficit grave de vitamina D. Así como a nivel molecular, los pacientes con infraexpresión de miR-125b, miR-181b-5p, miR181c-5p, miR-181d-5p en tejido tumoral y adyacente al tumor presentaron un menor tiempo hasta la recaída y peor supervivencia global. Además, fue desarrollada una escala denominada PALV basada en los niveles basales de proteína C reactiva, albúmina, vitamina D y estado funcional. Esta escala distinguió de forma estadísticamente significativa un grupo de pacientes de alto riesgo (grupo C) con peor supervivencia global y menor tiempo hasta la recaída en comparación con los pacientes de riesgo bajo e intermedio. En la cohorte de cáncer gástrico metastásico, biomarcadores inflamatorios como el ratio neutrófilo-linfocito basal y el ratio neutrófilo-linfocito diferencial fueron factores pronósticos independientes para la supervivencia global en pacientes con quimioterapia paliativa; además la combinación de ambas medidas tuvo un valor predictivo de respuesta a primera línea de quimioterapia.

Palabras clave: Carcinoma gástrico, estado proinflamatorio, ratio neutrófilo-linfocito, miRNA, vitamina D.

Resumo

Nesta tese analizouse a relación entre o prognóstico do cancro gástrico e biomarcadores bioquímicos, moleculares e clínicos. O deseño do estudo foi observacional, ambispectivo e multicéntrico composto por dúas cohortes: unha en estadio localizado e outra en estadio metastásico. Na cohorte de cancro gástrico localizado observouse un peor prognóstico nos pacientes con un déficit grave de vitamina D. Así como a nivel molecular, os pacientes con infraexpresión de miR-125b, miR-181b-5p, miR181c-5p, miR-181d-5p no tecido tumoral e adxacente ao tumor presentaron un menor tempo ata a recaída e peor supervivencia global. Ademais, desenvolveuse unha escala denominada PALV conformada polos niveis basais da proteína C reactiva, albúmina, vitamina D e o estado funcional. Esta escala diferenciou de forma estatisticamente significativa un grupo de paciente de alto risco (grupo C) con peor supervivencia global e menor tempo ata a recaída en comparación cos pacientes de risco intermedio e baixo. Na cohorte de cancro gástrico metastásico o ratio neutrófilo-linfocito basal e o ratio neutrófilo-linfocito diferencial foron factores prognósticos independentes para a supervivencia global nos pacientes en tratamento de quimioterapia paliativa; ademais a combinación de ambas medidas tivo un valor predictivo de resposta á primeira liña de quimioterapia.

Palabras clave: Carcinoma gástrico, estado proinflamatorio, ratio neutrófilo-linfocito, miRNA, vitamina D.

Abstract

In this thesis, the relationship between prognosis in gastric cancer and biochemical, molecular and clinical markers was related. Observational, ambispective and multicentric trial was designed with two cohorts: localized and metastatic gastric cancer. In localized gastric cancer cohort, patients with severe deficiency of vitamin D presented poor prognosis. Patients with downregulated miR-125b, miR-181b-5p, miR181c-5p and miR-181d-5p in tumoral and normal tissue adjacent to tumor presented shorter time to relapse and worse survival. PALV score was established based on C-reactive protein, albumin, vitamin D and functional status. Patients with high score presented worse survival and shorter time to relapse compared to low and intermediate risk. In metastatic gastric cancer setting, basal neutrophil-to-lymphocyte ratio and change neutrophil-to-lymphocyte ratio were independent prognostic factors in overall survival. Furthermore, these measures combined were predictive factors of response in first line chemotherapy.

Keywords: Gastric cancer, inflammatory status, neutrophil-to-lymphocyte ratio, miRNA, vitamin D.

Agradecimientos

Mi principal agradecimiento se dirige a mi mentora y directora, la Dra. Elena Gallardo Martín, por dirigir esta tesis con grandes dosis de paciencia y sobre todo, empeño. Por haberme enseñado con entusiasmo, por inculcarme su dedicación a los pacientes y por ser un referente como profesional y como persona. Elena, gracias por recorrer esta etapa tan importante junto a mí, por haber luchado juntas.

También quiero expresar mi agradecimiento al tutor de esta tesis, el Dr. Arturo González Quintela, por sus sugerencias finales.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Alfons Navarro por su valiosísima ayuda, sin la cual esta tesis no habría salido adelante. Te agradezco profundamente tu apoyo, tu orientación y todo el tiempo dedicado a este proyecto.

Además, quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Prof. Tomás García-Caballero Parada por haberme ayudado con una amabilidad y disponibilidad excepcional. Porque desde aquí le agradezco el haberme transmitido su pasión por la profesión en sus clases, por enseñar medicina desde la humildad, la dedicación y el conocimiento profundo.

Mi agradecimiento a la Dra. Nieves Martínez Lago por su energía positiva, por sus valiosos consejos, por contar siempre conmigo y por su último empujón.

Han sido parte fundamental de esta tesis Diana Alves Pereira, la Dra. Karla Moncayo León y la Dra. Lucía Rivas Arribas por su apoyo siempre incondicional, por acompañarme en los momentos más duros y por su amistad.

El siguiente agradecimiento es para el Dr. Ramón Falcón Galiñanes por guiarme, asesorarme y animarme a lo largo de este intenso camino. Agradecer también a toda A Pandela, por seguir creyendo en este proyecto aún en los momentos más complicados, por acogerme con tantísimo cariño. Ao Dr. Óscar Pardo Planas pola súa axuda coas linguas.

Por supuesto, a mis padres, mi más emotivo agradecimiento porque sin ellos nunca habría llegado a cumplir mi sueño, nada de esto habría sido posible sin su sacrificio, su esfuerzo y su amor. Todo lo que soy es gracias a vosotros. A mi hermano Alberto, por nuestro apoyo incondicional y la relación tan especial que tenemos.

A Fogo, por acompañarme cada tarde.

Mi mayor y más profundo agradecimiento a mi compañera de vida, a Marina. Gracias por creer en mí, incluso cuando ni siquiera yo lo hago, por empujarme y recogerme, por escucharme. Gracias por estar a mi lado cada vez que dudo, por ser mi hogar. Gracias por tanto, por todo.

Finalmente, a todos los pacientes y sus familias, principio y fin de esta tesis doctoral.

Índice

Lista de Abreviaturas	23
Índice de Figuras	31
Índice de Tablas	33
1. Introducción	37
1.1. Epidemiología del cáncer gástrico	37
1.2. Clasificación: anatómica, histológica y molecular	43
1.3. Tratamiento del cáncer gástrico	48
1.4. MicroRNAs y cáncer gástrico	51
1.4.1. RNA no codificante: generalidades y microRNAs.	52
1.4.2 Biogénesis de los miRNA y mecanismo de acción.....	53
1.4.3 miRNAs y cáncer: genes supresores de tumores y oncogenes.	56
1.4.4 miRNAs y cáncer gástrico.....	57
1.5. Vitamina D: metabolismo y mecanismo de acción	66
1.5.1 Síntesis y metabolismo de vitamina D.	66
1.5.2 Mecanismo de acción de la vitamina D.	69
1.5.2.1. Papel del receptor de vitamina D (VDR).	69
1.5.2.2. Efectos antiproliferativos, antiangiogénicos y proapoptóticos de 1,25(OH) ₂ D ₃ en cáncer.....	71

1.5.2.3 Evidencia de la actividad de 1,25(OH) ₂ D ₃ in vitro en cáncer gástrico.....	74
1.5.2.4 Evidencia de la actividad de 1,25(OH) ₂ D ₃ in vivo en cáncer gástrico(113).	75
1.5.2.4 Mecanismo de acción a nivel epigenético: 1,25(OH) ₂ D ₃ , VDR, miRNA.	76
1.6. Proteínas reparadoras del ADN (MMR): inestabilidad de microsatélites.....	78
1.7. El papel de la inflamación en la carcinogénesis.....	80
1.7.1 Neutrófilos y ratio neutrófilo-linfocito, estado proinflamatorio/estado inmune.	84
2. Hipótesis y Objetivos	89
2.1. Cohorte de cáncer gástrico localizado.....	89
2.1.1. Hipótesis.	89
2.1.2 Objetivos.....	90
2.2. Cohorte de cáncer gástrico metastásico	91
2.2.1 Hipótesis.	91
2.2.2 Objetivos.....	91
3. Material y métodos.....	95
3.1. Diseño de la investigación	95
3.2. Población del estudio	96
3.2.1 Criterios de inclusión globales:.....	98
3.2.2 Criterios de inclusión específicos en la cohorte localizada:	98
3.2.3 Criterios de exclusión específicos en la cohorte localizada:	98

3.2.3 Criterios de inclusión específicos en la cohorte metastásica:	99
3.2.4 Criterios de exclusión específicos en la cohorte metastásica:	99
3.3. Recogida y fuentes de datos	100
3.4. Tratamiento de muestras analíticas DE SANGRE y anatomopatológico.....	106
3.5. Tamaño muestral	109
3.6. Método estadístico	110
3.7. Aspectos ético-legales	111
4. Resultados	115
4.1. Resultados en la cohorte de cáncer gástrico localizado.....	115
4.1.1 Resultados en tiempo hasta la recaída en la cohorte de cáncer gástrico localizado.....	123
4.1.2 Resultados en supervivencia global en la cohorte de cáncer gástrico localizado.	126
4.1.3 Perfil de miRNA en cáncer gástrico localizado.	133
4.2. Resultados en la cohorte de cáncer gástrico metastásico.....	139
5. Discusión.....	151
5.1. Limitaciones y fortalezas del estudio	163
6. Conclusiones.....	169
6.1 Conclusiones en la cohorte de cáncer gástrico localizado....	169
6.2 Conclusiones en la cohorte de cáncer gástrico metastásico..	170
7. Bibliografía.....	173

Anexo 1. Consentimiento informado.....	191
Anexo 2. Lista de verificación de recomendaciones para tesis EDI saúde. General	197
Anexo 3. Lista de verificación para Tesis con estudios observacionales. Epidemiología STROBE	199
Anexo 4. Dictamen del comité de ética.....	205
Anexo 5. Dynamic perspective of the neutrophil-to- lymphocyte ratio in metastatic gastric cancer	213

LISTA DE ABREVIATURAS

25(OH)D3	25-hidroxivitamina D3 o 25-hidroxicolecalciferol
1,25(OH)2D3	25-dihidroxivitamina D3 o 1-alfa,25-dihidroxicolecalciferol
15-PGDH	15-hidroxiprostaglandina deshidrogenasa
3'UTR	Región no traducida tres prima
5FU	5-fluorouracilo
AECC	Asociación española contra el cáncer
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT	Serina/treonina quinasa
ASCO	Sociedad americana de oncología médica
BAX	proteína asociada a BCL2
BAK	BCL2 antagonista
BCL-2	Linfoma célula B -2
CAFs	Fibroblastos del estroma asociados a tumor
CCL2	Ligando de quimioquinas 2
CDH1	Cadherina 1
CDK	Quinasas dependientes de ciclinas
CEA	Antígeno carcinoembrionario

CI	Intervalo de confianza
CIN	Inestabilidad cromosómica
cNLR:	Ratio neutrófilo-linfocito diferencial
CPS	Score positivo combinado
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CXCL12	Factor derivado de células estromales 1
CXCR4	Receptor de quemocina C-X-C tipo 4
CYP24A1	Citocromo p450 24A 1 o 24-hidroxilasa
CYP27B1	Citocromo p450 27B1 o 27- hidroxilasa
DBP	Proteína de unión de la vitamina D
dL	Decilitro
dMMR	Déficit de proteínas reparadoras
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT3A	ADN-metiltransferasa 3
EBV	Virus Epstein-Barr
ECOG	The Eastern Cooperative Oncology Group
EE	Enfermedad estable
EGFR	Receptores de crecimiento epidérmico
ELK1	Proteína ETS like 1
EMT	Transición epitelio-mesénquima
ERK5	Quinasa 5 del receptor extracelular
FEVI	Fracción de eyección de ventrículo izquierdo
FGF23	Factor de crecimiento de fibroblastos

FSCN1	Fascina 1
G-CSF	Factor estimulante de crecimiento de neutrófilos
GC	Cáncer gástrico
GM-CSF	Factor estimulante de crecimiento de granulocitos
GPS	Escala pronóstica de Glasgow
GS	Genéticamente estables
Gy	Gray
HER2	Receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HIF1A	Subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia
HPV	Virus de papiloma humano
HR	Hazard ratio
IGF-1R	Factor de crecimiento de insulina.
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
ILV	Invasión linfovascular
IPN	Invasión perineural
iRNA/siRNA	Ácido ribonucleico de interferencia
LDH	Lactato deshidrogenasa
lncRNAs	RNA largo no-codificantes
M-CSF	Factor estimulante de crecimiento de monocitos
M	Presencia de metástasis
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosa

MAPK5	Proteína quinasa activadora de mitógeno fosfatasa 5
mg	Miligramo
mGC	Cáncer gástrico metastásico
miR-supresor	Ácido ribonucleico pequeño supresor
miRNA	Micro ácido ribonucleico
mL	Mililitro
MLH1	MutL homologo 1
MMP2	Metaloproteinasa 2
MMP9	Metaloproteinasa 9
MMP-11	Metaloproteinasa 11
MMP-13	Metaloproteinasa 13
MMR	Proteínas reparadoras de apareamiento
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MSH2	MutS homologo 2
MSH6	MutS homolog 6
MSI	Inestabilidad de microsátélites
MYO6	Miosina 6
N	Afectación ganglionar del tumor
NA	No alcanzada mediana
NAT	Tejido normal adyacente al tumor
ncRNA	Ácido ribonucleico no codificante
NF-Kb	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NGS	Next generation sequence
NLR	Ratio neutrófilo-linfocito
nM	Nanomolar
NRP1	Neuropilina 1
OMS-WHO	Organización Mundial de la Salud
oncomiRs	Ácido ribonucleico pequeño oncogénico
P-AKT	Fosfo-proteína quinasa T
PAI-1	Inhibidor del activador tisular del plasminógeno
PALV	Escala conformada por: albúmina, proteína C reactiva, vitamina D y Performance Status.
PCA	Pre-Cancer Genome Atlas
PCR	Proteína C reactiva
PCR	Reacción en cadena
PD-L1	Ligando 1 de muerte programada
PD	Progresión de la enfermedad
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
piRNA	RNA asociado a Piwi
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PMS2	Endonucleasa reparadora de emparejamiento
PNI	Índice pronóstico nutricional
PS	Performance Status
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

PTH	Hormona paratiroidea
QT	Quimioterapia
R0	Resección completa
R1	Resección incompleta
RB	Retinoblastoma
RC	Respuesta completa
RHOA	Hexámero proteico de la familia de las helicasas.
RISC	Induced silencing complex
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Especies de nitrógeno reactivo
ROS	Especies de oxígeno reactivo
RP	Respuesta parcial
RT	Radioterapia
RXR	Receptores X retinoide
SD	Estabilización de la enfermedad
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results Program
SG	Supervivencia global
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple
snRNA	Ácido ribonucleico nuclear pequeño
SP1	Proteína 1 específica
SPSS	Programa estadístico para ciencias sociales
STAT3	Señal activadora de transcripción 3

T	Tamaño del tumor
TAS-102	Trifluridina/tipiracilo
TNF-alfa	Factor de necrosis tumoral alfa
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TERT	Transcriptasa inversa telomerasa
Th1/2	Células T helper 1/2
TIMP-1	Metalopeptidasa inhibidora 1
TNM	Clasificación de Tumores Malignos: tamaño, afectación ganglionar y metástasis
TTR	Tiempo hasta la recaída
UGE	Unión gastroesofágica
VDR	Receptor de vitamina D
VDREs	Elementos de respuesta de la vitamina D del DNA
VEB:	Virus Ebstein Bar
VEGF	Factor de crecimiento endotelial
ypTNM	Estadio tumoral anatomopatológico tras tratamiento neoadyuvante
ZEB2	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2 proteína

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tasa de incidencia estimada de cáncer gástrico en 2020.....	37
Figura 2. Número estimado de muertes en 2020.....	38
Figura 3. Número de casos nuevos en 2020, ambos sexos, todas las edades.	39
Figura 4. Tasa de incidencia de cáncer gástrico por sexo.	41
Figura 5. Incidencia estimada desde 2018 hasta 2040 en cáncer gástrico, ambos sexos.....	42
Figura 6. Incidencia estimada desde 2018 hasta 2040 en cáncer gástrico, hombres y mujeres.....	43
Figura 7. Características moleculares de los subtipos de carcinoma gástrico.	47
Figura 8. Biogénesis y supresión post-transcripcional de miRNAs.....	54
Figura 9. Estructura bioquímica y formación de la vitamina D.	66
Figura 10. Metabolismo de vitamina D.	68
Figura 11: La vitamina D, interiorización celular y su función en el núcleo celular.....	70
Figura 12: Mecanismo de acción del calcitriol a través del VDR y efecto antineoplásico.	73
Figura 13. Efecto antitumoral de la vitamina D en cáncer gastrointestinal.....	74
Figura 14. Diagrama de flujo.....	97

Figura 15. Microfotografía de adenocarcinoma gástrico localizado con una inmunotinción nuclear y citoplasmática correspondiente a receptor de vitamina D (VDR) VDR 3+ (Aumento original, 20x).....	117
Figura 16. Adenocarcinoma gástrico localizado con positividad moderada para receptor de vitamina D (VDR) 2+. Aumento original, 20x.	117
Figura 17. Tejido normal de mucosa gástrica (derecha) y metaplasia intestinal (izquierda). Se observa que la expresión del receptor de vitamina D es mucho más intensa en la metaplasia que en el tejido normal. Aumento original, 20x... ..	118
Figura 18. Supervivencia global en base a los niveles de Vitamina D basal.....	126
Figura 19. Supervivencia global en base a PALV score.....	128
Figura 20: Comparativa entre la expresión de miRNAs entre tejido tumoral y tejido normal adyacente al tumor (NAT).....	133
Figura 21: Infraexpresión de miR-106 en pacientes sin respuesta a tratamiento neoadyuvante y presencia de recaída	135
Figura 22. Infraexpresión disminuida de miR-145 en pacientes con niveles bajos de vitamina D. Infraexpresión de miR-498 en pacientes con expresión VDR 2+.....	136
Figura 23. Curva de Kaplan-Meier.....	137
Figura 24. Curva de Kaplan-Meier.	138
Figura 25. Supervivencia global en pacientes con cáncer gástrico metastásico en función de: NLR basal. cNLR; supervivencia global de cNLR aumento vs descenso	142
Figura 26. Supervivencia global en pacientes con cáncer gástrico metastásico en función de DScore	146

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Modificado de la clasificación de cáncer gástrico, clasificación TNM 8º edición.....	45
Tabla 2. Descripción de la escala ECOG.....	101
Tabla 3. Definición de la puntuación del Glasgow Prognostic Score.....	105
Tabla 4. Definición del ratio neutrófilo-linfocito diferencial	105
Tabla 5. Definición de la escala de combinación de ratios.....	105
Tabla 6. Características clínico-patológicas de la cohorte de cáncer gástrico localizado.	119
Tabla 7. Tiempo hasta la recaída y supervivencia global en cáncer gástrico localizado.....	129
Tabla 8: Supervivencia global de las características clínico-patológicas de 116 pacientes con cáncer gástrico metastásico en función de la variación del ratio neutrófilo-linfocito.	139
Tabla 9. Análisis univariante de la asociación entre las características clínico-patológicas y la supervivencia.	143
Tabla 10. Comparación de SG entre los diferentes grupos de riesgo.	147
Tabla 11. Relación entre DScore y respuesta radiológica a quimioterapia.	147

1

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER GÁSTRICO

La evolución del cáncer gástrico a lo largo de los años ha venido condicionada en gran parte por la modificación del tipo de dieta y la conservación de los alimentos en las distintas culturas. La primera documentación data del año 3000 a.C. mediante inscripciones jeroglíficas en el antiguo Egipto. La conservación de los alimentos basada en sal y ahumados ha sido relacionada con un mayor riesgo, observándose así una mayor incidencia en las regiones geográficas en las que la alimentación se centra en estos métodos (este de Asia, este de Europa y Sudamérica)(1).

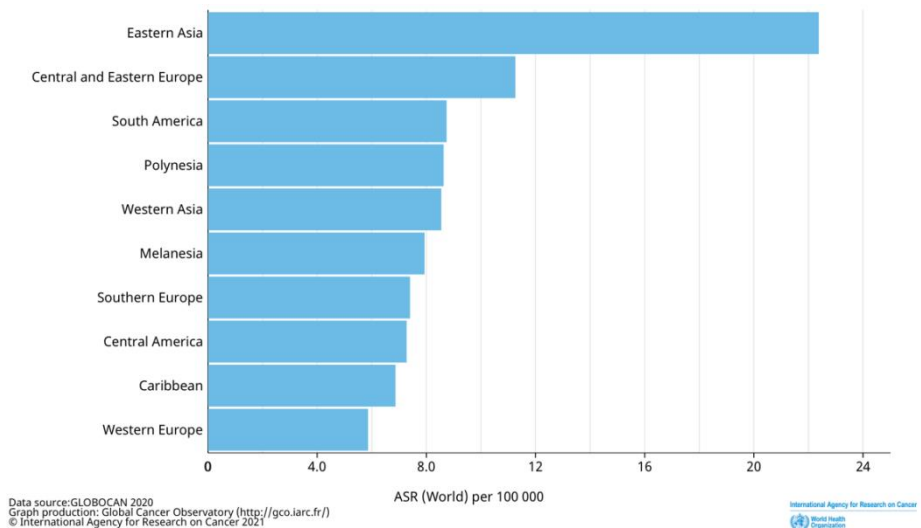


Figura 1. Tasa de incidencia estimada de cáncer gástrico en 2020. Reproducida con el permiso de © International Agency for Research on Cancer. Hyuna Sung, Jacques Ferlay y cols. 2021;71(3):209-249 (2) Fuente: Global Cancer Observatory 2020. International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr>

Hasta 1990 el cáncer gástrico era la principal causa de muerte por cáncer(3). Posteriormente, el cáncer de pulmón, vinculado principalmente al tabaco, ocupó el primer lugar en países occidentales(4). En la actualidad, el cáncer gástrico es la cuarta causa de muerte por cáncer tras otras localizaciones como pulmón y cáncer colorrectal, y ocupa el quinto lugar en tasa de incidencia global (5) (Figura 2 y 3).

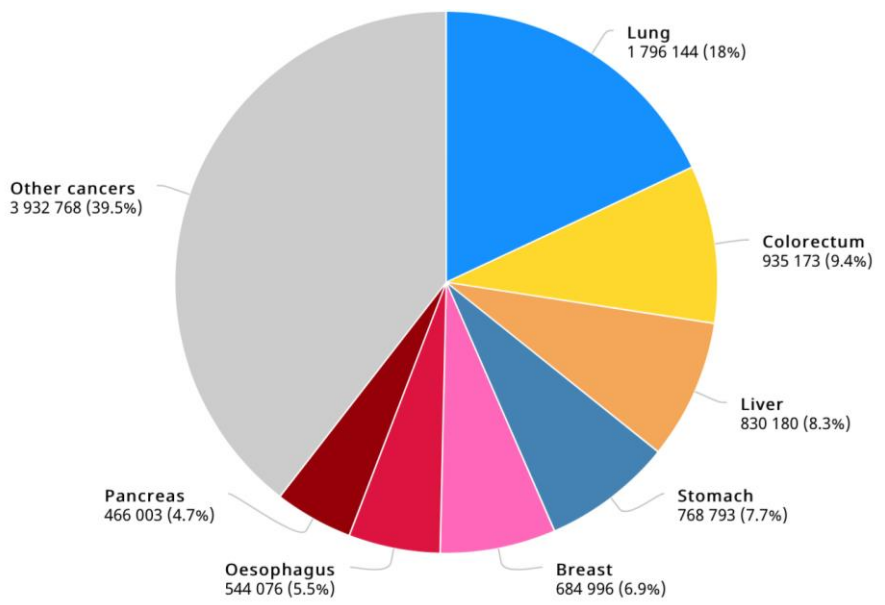


Figura 2. Número estimado de muertes en 2020. Reproducida con el permiso de © International Agency for Research on Cancer. Hyuna Sung, Jacques Ferlay y cols. 2021;71(3):209-249. (2) Fuente: Global Cancer Observatory 2020. International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr>

A pesar de la disminución en la tasa de incidencia global en los últimos años, los datos varían en función de la región anatómica debido a las diferencias en la etiología y patogénesis. El cáncer gástrico es clasificado anatómicamente en dos regiones, proximal o cardial y distal o no cardial.

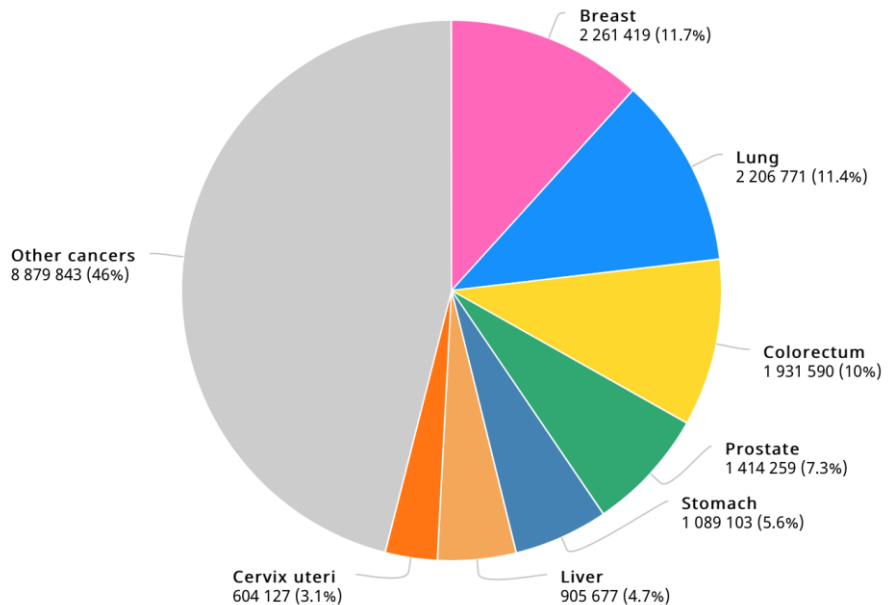


Figura 3. Número de casos nuevos en 2020, ambos sexos, todas las edades. Reproducida con el permiso de © International Agency for Research on Cancer. Hyuna Sung, Jacques Ferlay y cols. 2021;71(3):209-249. (2) Fuente: Global Cancer Observatory 2020. International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr>

Los tumores originados en la región no cardial, cuya causa más importante es la infección por *H.pylori*, muestran un descenso en incidencia debido a la mejoría del tratamiento antibiótico y sanitario, cambios en la conservación de alimentos y aumento en el consumo de vegetales y disminución del hábito tabáquico (6). Por otra parte los tumores de origen cardial presentan un aumento en la incidencia durante el mismo periodo y están relacionados etiológicamente con la obesidad y reflujo gastroesofágico; esta tendencia se observa fundamentalmente en países desarrollados(7).

En cuanto a la distribución por sexo y edad, se observa una afectación dos o tres veces mayor en hombres y ancianos(5) (Figura

4). El 70% de los casos se diagnostican en países desarrollados, aunque debemos tener en cuenta los limitados registros en países en vías de desarrollo. La tasa de incidencia varía también en relación con la raza observándose un mayor riesgo en personas procedentes del este de Asia y Europa del este, así como la población de América del Sur.

Los factores ambientales influyen en mayor medida que el componente genético en el desarrollo del cáncer gástrico. En Norteamérica se ha descrito una disminución del riesgo de incidencia en las segundas y terceras generaciones de ascendientes procedentes del este de Asia (Japón); en esta población se han observado unos hábitos de vida y alimentación muy similares al país de residencia.

El principal factor de riesgo relacionado con el cáncer gástrico es la infección por *H.pylori*(8), dicha bacteria desempeña un papel fundamental en la asociación entre la úlcera gástrica y desarrollo del carcinoma. La sintomatología relacionada con la infección es infrecuente y la detección puede realizarse en heces o saliva. La prevalencia aumenta con la edad y presenta una variación geográfica con las tasas más elevadas en Asia (9).

La infección persistente por *H.pylori* produce atrofia gástrica seguida de metaplasia intestinal, la cual puede desencadenar displasia y hasta en un 90% de los casos, adenocarcinoma gástrico distal o subtipo no-cardial (10). En cambio, no se ha demostrado una relación causal con el subtipo cardinal o proximal, describiéndose además la posibilidad de una relación inversa debido la reducción en la producción de ácido gástrico en la porción proximal del estómago(10).

Otro patógeno relacionado es el virus de Epstein-Barr (EBV), el cual se encuentra en el 80% de las células malignas a nivel gástrico, en este caso el mecanismo de carcinogénesis no es claro(11).

La obesidad es otro factor de riesgo relevante y complejo debido al estado proinflamatorio inducido a través la activación de la interleuquina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) entre otros mecanismos (12).

Otros factores de riesgo como la alta ingesta de sal, nitratos y adobos, el hábito tabáquico, además un bajo nivel socioeconómico con escasa ingesta de vegetales y productos frescos están relacionados con un mayor riesgo(13).

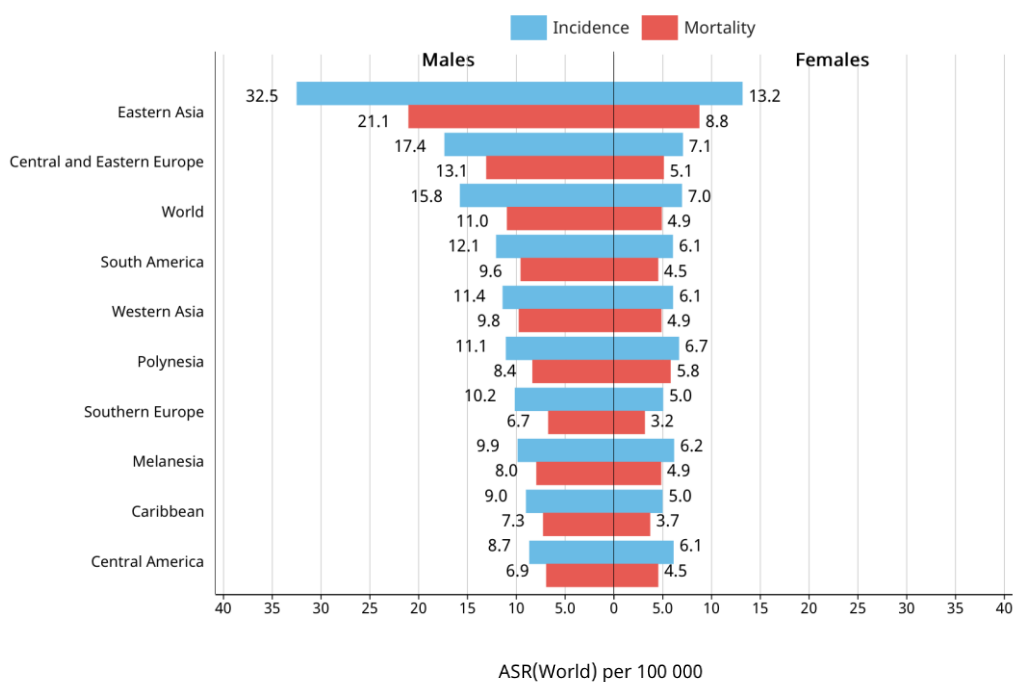


Figura 4. Tasa de incidencia de cáncer gástrico por sexo. Reproducida con el permiso de © International Agency for Research on Cancer. Hyuna Sung, Jacques Ferlay y cols. 2021;71(3):209-249. (2) Fuente: Global Cancer Observatory 2020. International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr>

Desde 1970 la tasa de mortalidad del cáncer gástrico ha disminuido en los países desarrollados, en parte debido a los avances terapéuticos,

modificaciones en la conservación de alimentos y programas de detección temprana. Sin embargo, el retraso diagnóstico en más del 50% de los casos debido a la escasa sintomatología, además de la alta tasa de recidiva, le confieren mal pronóstico a corto plazo.

La tasa de supervivencia a los 2 años en estadios localmente avanzados es inferior al 40% y en torno al 10% en cáncer gástrico metastásico. Globalmente, la tasa de supervivencia a los 5 años varía entre el 10 y 30%(14). La recidiva se presenta fundamentalmente a nivel locorregional (órganos adyacentes, peritoneo y afectación ganglionar) y a distancia a través de la diseminación linfática y hematogena. En base a los datos de registro del Observatorio Global del Cáncer, GLOBOCAN, se estima que en los próximos años la incidencia de cáncer gástrico aumentará en ambos sexos; en parte debido al incremento de los tumores de origen cardinal (15)(Figura 5 y 6).

Estimated number of incident cases from 2018 to 2040, stomach, both sexes, all ages

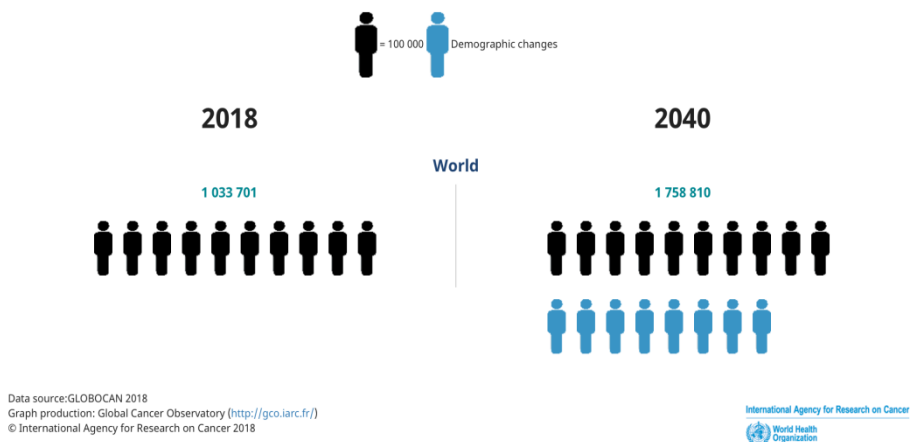


Figura 5. Incidencia estimada desde 2018 hasta 2040 en cáncer gástrico, ambos sexos. Reproducida con el permiso de © International Agency for Research on Cancer. Hyuna Sung, Jacques Ferlay y cols. 2021;71(3):209-249.(2) Fuente: Global Cancer Observatory 2020. International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr>

Estimated number of incident cases from 2018 to 2040, stomach, males and females, all ages

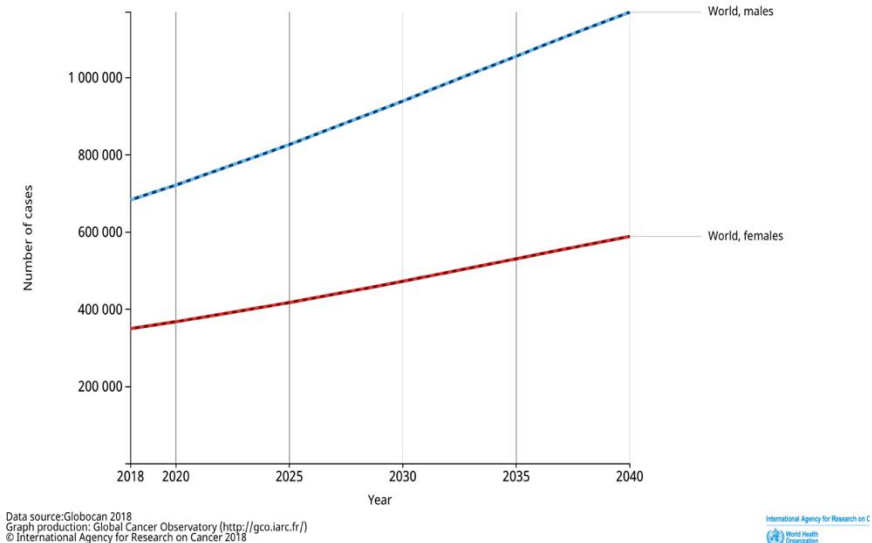


Figura 6. Incidencia estimada desde 2018 hasta 2040 en cáncer gástrico, hombres y mujeres. Reproducida con el permiso de © International Agency for Research on Cancer. Hyuna Sung, Jacques Ferlay y cols. 2021;71(3):209-249. (2) Fuente: Global Cancer Observatory 2020. International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr>

1.2. CLASIFICACIÓN: ANATÓMICA, HISTOLÓGICA Y MOLECULAR

A nivel anatómico, la clasificación en distintas regiones es importante debido a las diferencias desde el punto de vista etiológico, epidemiológico, pronóstico y terapéutico (16). Podemos distinguir los tumores de la unión gastroesofágica (UGE) o cardias de los tumores gástricos o no-cardias, los cuales están localizados en el fundus, cuerpo, antro y píloro.

La diferenciación a nivel de la UGE fue establecida mediante la clasificación de Siewert (Siewert I: tumor localizado en esófago distal, Siewert II: epicentro localizado al menos 1cm por encima o 2 cm por

debajo de la UGE, Siewert III o subcardiales: epicentro está localizado entre 2 y hasta 5cm por debajo de la UGE) (17). La clasificación TNM 8ª edición estableció recientemente dos categorías para la clasificación de los tumores de la unión gastroesofágica: se incluye en cáncer esofágico cuando el epicentro del tumor se encuentra en los 2 cm de la UGE y se extiende al esófago (Siewert I/II); se incluye en cáncer gástrico cuando el epicentro del tumor está a más de 2 cm de la UGE. Esta diferenciación se ha mantenido a lo largo de los diferentes estudios clínicos en la investigación en cáncer gástrico debido al distinto comportamiento y evolución de la enfermedad, así como en el nivel de respuesta a los distintos tratamientos oncológicos: radioterapia, inmunoterapia y quimioterapia entre otros.

La clasificación TNM 8ª edición, actualizada en el 2017 por la American Joint Committee on Cancer, AJCC, nos permite realizar la estadificación tumoral basándose en el tamaño del tumor primario (T), afectación ganglionar (N) y presencia o no de metástasis (M)(18) (Tabla 1).

Esta clasificación tiene una clara relación con el pronóstico de la enfermedad, siendo por lo tanto, una herramienta básica en la planificación del tratamiento. Así la tasa de supervivencia a 5 los años en el estadio IA es del 95%, estadio IB 87%, IIA 50%, IIB 61%, IIIA 38%, IIIB 20%, IIIC 9%, IV 0%.

Además, esta clasificación presenta algunas limitaciones relevantes ya que aporta únicamente información acerca de la situación estática del tumor. No refleja la situación inmune ni clínica del paciente, siendo ésta relevante en cuanto a supervivencia. Además, la clasificación vigente TNM se basa de los hallazgos anatomopatológicos tras la intervención.

Tabla1. Modificada de la clasificación de cáncer gástrico, clasificación TNM 8º edición.

Tumor primario (pT)
<ul style="list-style-type: none"> • Tis: carcinoma in situ. • T1: invade la lámina propia o muscularis mucosa (pT1a), invade la submucosa (pT1b). • T2: invade las muscularis propia. • T3 penetra en la subserosa, tejido conectivo sin invasión del peritoneo visceral o estructuras adyacentes. • T4: invade la serosa- peritoneo visceral (pT4a), invade estructuras u órganos adyacentes (pT4b).
Afectación ganglionar regional (pN)
<ul style="list-style-type: none"> • N0: no afectación ganglionar regional. • N1: en 1 o 2 ganglios regionales. • N2: en 3 a 6 ganglios regionales- • N3: en 7 a 15 ganglios regionales (N3a), en 16 o más ganglios (N3b) <p>Los ganglios regionales incluyen: curvatura mayor gástrica, omento mayor, curvatura menor gástrica, omento menor, paracardial (cardioesofágico) derechos y izquierdos, gastroduodenal suprapilórico e infrapilórico, gastroepiploico, arteria gástrica izquierda, arteria celiaca, arteria hepática común, hepatoduodenal, portal, arteria esplénica, ganglios del hilio esplénico.</p>
Metástasis a distancia (pM)
<ul style="list-style-type: none"> • M0: no metástasis a distancia. • M1: metástasis a distancia.

Desde el punto de vista histológico, el subtipo más frecuente es el adenocarcinoma y en lo sucesivo cuando se haga referencia a “cáncer gástrico” se hará referencia únicamente este subtipo. El resto representan un porcentaje bajo y entre los cuales podemos destacar el linfoma MALT y los tumores neuroendocrinos. El adenocarcinoma gástrico presenta una patogenia, morfología y diferenciación celular heterogénea, por lo cual se desarrollaron varios sistemas de clasificación histopatológica pudiendo destacar dos de ellos por ser los más ampliamente utilizados: clasificación de Lauren y el sistema de la OMS - WHO (Organización Mundial de la Salud).

La clasificación de Lauren diferencia dos subtipos histológicos principales: intestinal (bien y moderadamente diferenciado, estructura glandular, relacionado etiológicamente con *H.pylori*) y difuso (pobrementemente diferenciado, células solitarias o no cohesivas, más frecuentemente relacionado con alteraciones genéticas en su etiopatogenia como la pérdida de expresión de la e-cadherina por una mutación germinal, somática o un silenciamiento epigenético mediante la hipermetilación del promotor de CDH1; además del subtipo mixto e indeterminados(19). Cada uno de los cuales presenta una etiopatogenia y pronóstico diferente.

La clasificación de la OMS (WHO) incluye cinco subtipos: tubular, papilar, mucinoso, pobrementemente cohesionado y variantes raras. Las dos primeras se corresponden con el subtipo intestinal y el pobrementemente cohesivo (célula en anillo de sello) se corresponde a su vez con el subtipo difuso de Lauren.

A pesar de los sistemas de clasificación mencionados, seguimos observando importantes diferencias en el pronóstico, evolución de la enfermedad y respuesta al tratamiento en el cáncer gástrico debido a la heterogeneidad intratumoral e intertumoral que presenta. Por lo tanto, son necesarios nuevos sistemas de clasificación complementarios para dirigir un tratamiento individualizado a los pacientes.

El grupo de investigación TCGA (The Cancer Genome Atlas) (20) publicó los resultados de 295 pacientes con adenocarcinoma gástrico no tratados previamente con quimioterapia ni radioterapia en los que se realizó un estudio del perfil molecular mediante NGS (Next generation sequencing). El objetivo principal es la identificación de alteraciones genéticas comunes que permita una clasificación molecular en base a la cual se puedan desarrollar tratamientos dirigidos e individualizados. La clasificación molecular propuesta diferencia cuatro subtipos (figura 7): VEB positivo o virus Epstein-Barr (9%) el cual se ha observado más frecuente en varones y

localizados en fundus y cuerpo; MSI o tumores con inestabilidad de microsatélites (22%) más frecuentemente en mujeres y ancianos; GS o genéticamente estables (20%) descrito en pacientes más jóvenes y relacionado con el subtipo difuso de Lauren, mutaciones en RHOA, CDH1, CLDN18/ARHGAP y vías de angiogénesis; CIN o tumores con inestabilidad cromosómica (50%) asociado con el subtipo intestinal y localizado más frecuentemente en cardias y unión gastroesofágica (21–23).

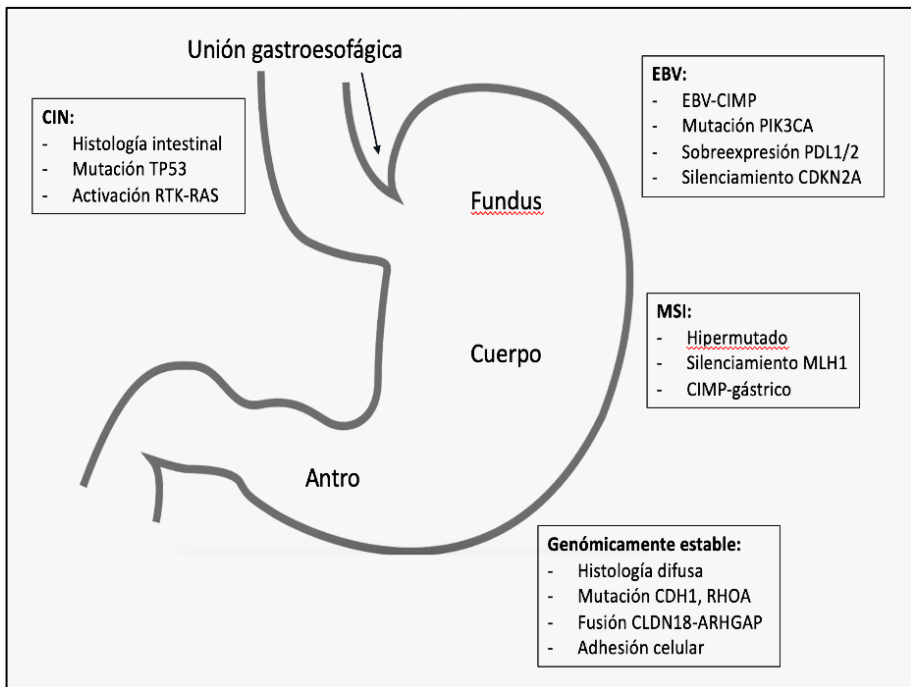


Figura 7. Características moleculares de los subtipos de carcinoma gástrico.

1.3. TRATAMIENTO DEL CÁNCER GÁSTRICO

Los avances en el tratamiento del cáncer gástrico han conseguido un aumento en la supervivencia global tanto en estadios precoces como avanzados. Sin embargo, este tipo de tumor presenta aún una alta tasa de recaída y mortalidad; debido a esto, los nuevos sistemas de estratificación de riesgo, las terapias personalizadas con tratamientos dirigidos y la intensificación de esquemas de quimio-radioterapia, son los objetivos de los actuales estudios en marcha.

El tratamiento del cáncer gástrico se puede dividir en dos categorías según la intencionalidad del mismo, tratamiento radical en aquellos tumores locales o localmente avanzados y paliativo en aquellos con enfermedad metastásica.

En el cáncer gástrico localizado la cirugía continúa siendo el eje fundamental de la terapéutica en este escenario; por lo tanto, conseguir una resección completa con unos márgenes negativos(24) y una adecuada linfadenectomía influye en el pronóstico de la enfermedad(25). Éste es el objetivo del esquema perioperatorio en el que se administra quimioterapia antes y después de cirugía, para conseguir la máxima citorreducción y disminuir el riesgo de recaída. El esquema estándar desde el año 2006 en Europa ha consistido en la administración de tres ciclos previos y tres ciclos tras la cirugía conocido como esquema MAGIC (26). Este es un estudio multicéntrico de 503 paciente aleatorizados a recibir tres ciclos pre y post cirugía de 5Fluorouracilo en infusión continua 200mg/m² diario, cisplatino 60mg/m² y epirrubicina 50mg/m² cada 21 días comparado con cirugía sola. Los 503 pacientes incluidos tenían un estadio >Ib, performance status 0-1 y una edad media de 62 años. La mediana de supervivencia global en el brazo experimental fue de 24 versus 20 meses, la tasa de supervivencia global a 5 años fue del 36% versus 23% (p=0.009) y se objetivó un menor riesgo de progresión de la enfermedad (HR 0.66; 95% IC 0.53-0.81; P<0.001).

Este estudio demostró un beneficio a favor del esquema de quimioterapia perioperatoria en comparación con la cirugía. La toxicidad fundamentalmente hematológica y gastrointestinal fue manejable.

En Junio de 2017 el estudio con el esquema FLOT fue presentado en el Congreso Americano de Oncología y fue publicado en 2019 (27). Este estudio realizado en 716 pacientes con cáncer gástrico localizado, cT2 y/o afectación ganglionar, compara la administración de 4 ciclos previos y posteriores a la cirugía de docetaxel 50 mg/m², oxaliplatino 85 mg/m², leucovorin 200 mg/m² y 5 fluorouracilo en infusión de un día 2600 mg/m² cada dos semanas con el esquema MAGIC anteriormente descrito. Los resultados demuestran un aumento de la supervivencia global de 50 versus 35 meses con un de HR 0.77 (95% CI, 0.63–0.94) p=0.012, supervivencia libre de progresión 30 versus 18 meses con HR 0.75 (95% CI, 0.62–0.91) p=0.0036. La tasa de respuestas patológicas completa fue del 15% vs 6%; p=0.02. Tras los resultados publicados, el esquema FLOT se ha convertido en el estándar en quimioterapia perioperatoria.

El tratamiento de quimioterapia complementario o adyuvante tras la cirugía también ha demostrado beneficio en supervivencia global. El estudio CLASSIC fue realizado pacientes asiáticos (28), en este estudio fueron aleatorizados 1035 pacientes a recibir tratamiento adyuvante con oxaliplatino 130 mg/m² y capecitabina a 1000 mg/m² cada 12 horas durante 14 días cada 21 días durante 6 meses comparado con observación tras la cirugía. El beneficio en la tasa de supervivencia global a 5 años fue del 78% comparado con 69% con cirugía, HR 0.66. El beneficio de la quimioterapia complementaria en pacientes occidentales se observó además en varios estudios y metaanálisis (29).

Por otra parte, la radioterapia también ha demostrado beneficio en el tratamiento del cáncer gástrico tras la cirugía. En el estudio

estadounidense INT 0116, un total de 556 pacientes recibieron tratamiento postoperatorio con quimioterapia, 5fluorouracilo y leucovorin, concomitante con radioterapia 45 Gy comparado con observación tras la cirugía (30). Se observó un aumento en la tasa de supervivencia global a 3 años de un 3%, sin embargo, este estudio ha sido muy controvertido debido a las limitaciones relacionadas con la calidad de la cirugía.

Sin embargo, no todos los pacientes se van a beneficiar de estos tratamientos. Recientemente, se han publicado dos estudios retrospectivos (31,32), en los que se describe el efecto perjudicial de la quimioterapia en pacientes diagnosticados de cáncer gástrico localizado con pérdida de expresión de las proteínas reparadoras o inestabilidad de microsátélites, MMR o MSI. Por lo tanto, la detección previa al tratamiento neoadyuvante o adyuvante puede aportar información como biomarcador predictivo de respuesta.

En la enfermedad metastásica, la primera línea de quimioterapia se basa en la combinación de dos fármacos, derivados de platinos y 5 fluorouracilo en diferentes esquemas por vía intravenosa y oral. En las siguientes líneas de tratamiento debemos tener en cuenta los tratamientos recibidos previamente, la toxicidad residual a los mismos y las preferencias del paciente; algunos de los fármacos utilizados son el irinotecán, los taxanos y el TAS 102.

La asociación de quimioterapia estándar con tratamientos dirigidos ha sido investigada en múltiples estudios en los últimos años.

El primero de ellos fue publicado en 2010, el estudio ToGA demostró un aumento de la supervivencia global en 2.7 meses en aquellos pacientes con amplificación de la proteína HER2 tratados con trastuzumab más quimioterapia en comparación con quimioterapia (33).

En el tratamiento dirigido a la vía de la angiogénesis, anti-VEGF, la administración de ramucirumab en combinación con

quimioterapia en segunda línea(34) o en monoterapia en líneas posteriores (35) ha demostrado eficacia en este contexto.

En la actualidad, los últimos estudios están dirigidos hacia el papel de la inmunoterapia en cáncer gástrico. En 2017, el anticuerpo anti-PD-L1 pembrolizumab fue el primer tratamiento de inmunoterapia aprobado en cáncer gástrico en pacientes que hubieran recibido al menos dos líneas de tratamiento previas en enfermedad metastásica (36,37). En 2017, fue aprobado otro anticuerpo monoclonal anti-PD1, nivolumab, tras demostrar un aumento en supervivencia global en pacientes asiáticos tratados con dos o más líneas previas de quimioterapia(38), se observó mayor beneficio en tasa de respuesta en pacientes con alteración de proteínas reparadoras o inestabilidad de microsatélites. En el año 2021 se publica el primer estudio que explora la combinación de quimioterapia e inmunoterapia, nivolumab con el esquema Folfox, en primera línea de cáncer gástrico metastásico con expresión de PDL1-CPS mayor a cinco. En este subgrupo de pacientes se objetivo una supervivencia global de catorce meses, con una diferencia estadísticamente significativa frente al brazo control de quimioterapia estándar(39).

1.4. MICRORNAs Y CÁNCER GÁSTRICO

La carcinogénesis se desarrolla a través de diferentes etapas originadas por factores ambientales, alteraciones genéticas y epigenéticas (40). A nivel genético se producen mutaciones, inserciones-delecciones y reordenamientos; por otra parte, a nivel post-transcripcional destacan la metilación del DNA (inestabilidad de microsatélites) y la regulación de genes por RNA no codificante (microRNA) (41).

1.4.1. RNA no codificante: generalidades y microRNAs.

El dogma de la teoría evolucionista clásica afirma que el código genético está formado principalmente por DNA codificante a través del cual se transmite la información unidireccionalmente desde el DNA a las proteínas mediante el RNA (42). Sin embargo, el DNA codificante forma únicamente el 2% del genoma humano(43). En los últimos años, los estudios sobre las zonas de DNA no codificante llamadas intrones han demostrado un papel fundamental en funciones biológicas clave (44). Estas áreas de DNA contienen información de RNA no codificante de proteínas (ncRNA), el cual tiene un papel relevante en la regulación de la expresión de genes relacionados con la carcinogénesis(45). Han sido descritos varios tipos de ncRNA:

- RNA de interferencia (iRNA o siRNA): formado por 20-25 pares de bases, se encuentra en las regiones de doble cadena de las moléculas de RNA. El mecanismo de acción se basa en la interferencia en la traducción del RNA mensajero a través de la degradación de este último mediante un emparejamiento completo, permitiendo el silenciamiento de genes con una gran especificidad(46).
- RNA nuclear pequeño (snRNA): formado por 150 pares de bases, se localiza en el núcleo de la célula y actúa a nivel de pre-RNA mensajero mediante la regulación de la RNA polimerasa II. Tiene un papel relevante en la síntesis de ribosomas y se relacionan con enfermedades hereditarias y la carcinogénesis(47).
- RNA asociado a Piwi (piRNA): formado por una secuencia de 26 a 31 pares de bases. Son las moléculas de ncRNA más frecuentes en animales. Su acción afecta a distintos procesos biológicos como la regeneración celular, la función de las células madre y la carcinogénesis(48).

- RNA largo no-codificantes (lncRNAs): moléculas de RNA no codificante de más de 200 pares de bases. Presentan capacidad de autorregulación y su función se ejerce a través de la activación de la transcripción en la expresión génica. Algunos de los lncRNA están implicados en la regulación de la diferenciación tisular(49).
- MicroRNAs (miRNAs) son oligómeros (18-24 nucleótidos) de RNA monocatenario no codificante. El mecanismo de acción se basa en la regulación de la expresión de genes a través de la degradación o inhibición del RNA mensajero (mRNA), es decir, a nivel post-transcripcional.

Se estima que afecta a la expresión del 30-60% de genes codificantes de proteínas del genoma (50). Cada miRNA puede regular múltiples genes y diferentes vías de señalización por lo que desempeñan un papel importante en enfermedades cardiovasculares, infecciosas, inflamatorias y tumorales (51). Desde el punto de vista de la carcinogénesis, los miRNA contribuyen a la regulación de los procesos de diferenciación, proliferación, migración y angiogénesis tumoral a través de la modulación de la expresión de oncogenes o genes supresores de tumores(52). En base a lo anterior, el perfil molecular de expresión de los miRNAs ha sido investigado como posible biomarcador tumoral(53).

1.4.2 Biogénesis de los miRNA y mecanismo de acción.

En 1993 fue identificado el primer miRNA, una molécula de RNA de 22 nucleótidos llamada *lin-4* necesaria para el control del desarrollo de la *Caenorhabditis elegans* (54,55). Posteriormente, hasta 2654 formas maduras de miRNA en humanos han sido identificadas según la versión 22.0 (mirbase.org). Además están presentes en un amplio rango de especies tanto en plantas como en animales.

El 40% de los genes de miRNA están localizados en intrones. Los miRNA se transcriben a partir de genes de ADN pero no se traducen a proteínas, lo que se denomina genes no-codificantes.

Los loci de miRNA se encuentran próximos en el genoma por lo que se transcriben en *clusters* a través de la RNA polimerasa II o III para generar transcritos primarios policistrónicos, los pri-miRNAs. Los pri-miRNAs son secuencias de nucleótidos cubiertos en el extremo 5' y poliadenilados en las regiones 3' terminal, posteriormente forman estructuras secundarias en horquilla y son procesados mediante la proteína Drosha y su cofactor DGCR8. El pre-miRNA resultante es exportado al citoplasma mediante la exportina 5 (Figura 8).

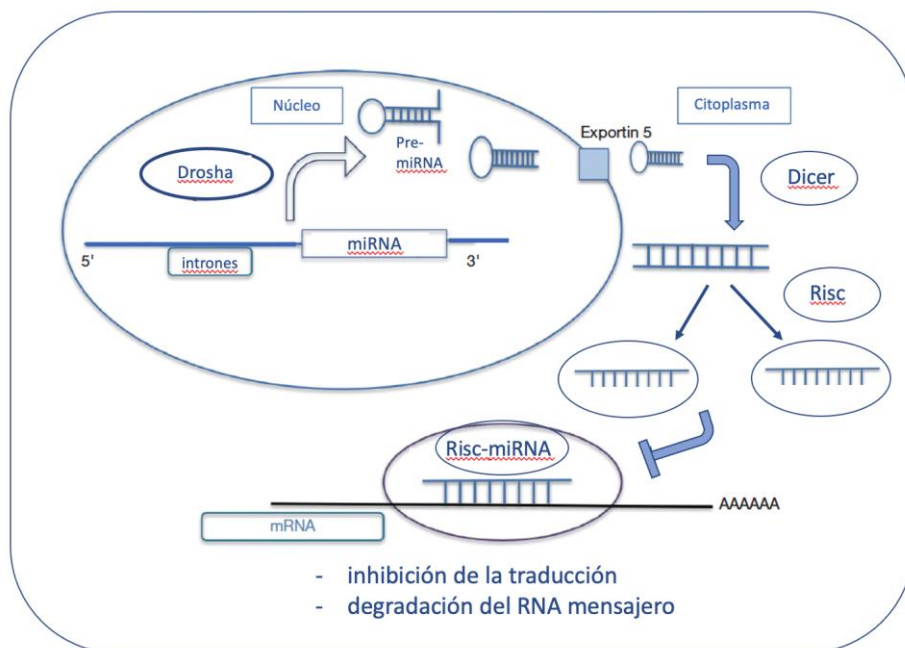


Figura 8. Biogénesis y supresión post-transcripcional de miRNAs. Reproducido con el permiso de Gallardo E. y Cousillas A. “Vitamin D modulation and microRNAs in gastric cancer : prognostic and therapeutic role” *Translational Cancer Research*. Vol 10, nº6, Junio 2021.

En el citoplasma el pre-miRNA se procesa a miRNA de doble hebra maduro por la ribonucleasa III endonucleasa Dicer. El miRNA maduro se asocia con el complejo efector RISC (RNA-induced silencing complex). Durante el ensamblado de RISC, el miRNA maduro se separa en dos hebras, cada hebra puede ser degradada o incorporada a complejo efector RISC produciendo la inhibición de la traducción o la degradación del RNA mensajero(56).

Los miRNAs actúan mayoritariamente en la región 3'UTR del RNA mensajero produciendo una inhibición en la expresión de genes; aunque se han identificado algunos miRNAs cuya diana es la región 5'UTR del mRNA.

Esta inhibición se lleva a cabo mediante la degradación de mRNA cuando el acoplamiento entre las hebras es completo; sin embargo, cuando la complementariedad no es perfecta, la unión provoca el bloqueo de la traducción de mRNA del gen diana.

La alteración en la expresión de los miRNAs desencadena una inactivación de los genes supresores de tumores o bien una activación de los oncogenes dependiendo del mRNA diana(57). Los mecanismos que producen esta pérdida de regulación no han sido claramente identificados, las principales hipótesis incluyen mutaciones en el procesamiento de los miRNAs, la alteración epigenética mediante hipermetilación y la amplificación o pérdida de regiones genómicas que codifican miRNAs. En cáncer gástrico, la modificación en la expresión de Dicer y Drosha está asociado con una alteración en la expresión del perfil de miRNAs en tejidos tumorales comparado con tejidos sanos(58).

La transcripción de genes que codifican miRNAs pueden ser modificados por la alteración en los factores de transcripción, al igual que los genes que codifican proteínas. Por otra parte, la metilación de DNA y la desacetilación de histonas pueden producir el silenciamiento de genes que codifican miRNAs.

1.4.3 miRNAs y cáncer: genes supresores de tumores y oncogenes.

Por lo tanto, el miRNA efector actúa como supresor o promotor de la oncogénesis en base al mRNA diana. En general los miRNAs supresores de tumores (miRs supresores) bloquean oncogenes y por lo tanto, su hiporregulación por los mecanismos previamente descritos, promueven la tumorigénesis. Por otra parte, los miRNAs oncogénicos (oncomiRs) hiperregulados silencian genes supresores de tumores, lo cual conduce a la pérdida de supresión y promoción de la progresión tumoral(59). Las alteraciones en la vía antiapoptótica desencadenan una proliferación celular clave en la progresión del tumor. Los oncomiRs promueven la proliferación celular e inhiben la apoptosis mediante el silenciamiento de genes supresores de crecimiento(60). La pérdida de expresión de miRNAs supresores conduce a la pérdida de inhibición de oncogenes, progresión en el ciclo celular por ausencia de inhibición en por genes de arresto celular(61).

El papel central de los miRNAs en la regulación génica nos indica su importancia en el desarrollo tumoral. A nivel del ciclo celular, la alteración en la expresión de miRNAs promueve la progresión del ciclo celular, a través de la regulación de quinasas dependientes de ciclinas y sus moduladores. Una parte clave en la progresión tumoral es la inhibición de la apoptosis por las células tumorales, miembros de la familia de bcl-2 regulan este proceso. La pérdida de regulación de miRNAs reduce las señales relacionadas con la apoptosis a través de la alteración de bcl-2, PTEN, y PI3K-AKT, promoviendo por lo tanto la proliferación celular ilimitada.

Otra fase importante en la carcinogénesis y progresión tumoral es la invasión y metástasis. Diferentes genes relacionados con este proceso han sido descritos como dianas de miRNAs. El gen CDH1, diana de miR-92, codifica la e-cadherina una molécula clave en la adhesión celular.

La relación entre perfiles específicos de miRNAs y los diferentes subtipos tumorales, así como la diferencia de expresión en tejidos tumorales y sanos, ha dirigido el reciente desarrollo de su investigación como biomarcadores en el diagnóstico y progresión de la enfermedad (53).

1.4.4 miRNAs y cáncer gástrico.

Los miRNAs regulan el 30% de los genes y cada uno de ellos puede llegar a controlar cientos de genes diana. Más del 50% de estos miRNAs se localizan en regiones cromosómicas frágiles y regiones de delección o amplificación que pueden estar alteradas en diferentes tumores (62,63).

A continuación se describe la relación de miR-145, miR-143, miR-125b, miR-338, miR-223, miR-99b-3p, miR-498, miR-22, miR-181, miR-106b y miR-532-3p con el cáncer gástrico:

- miR-145:

El miR-145 se localiza en el cromosoma 5 (5q32-33) y fue descubierto en el año 2002, desde entonces diversos estudios han analizado su papel en la supresión de genes que actúan promoviendo la progresión tumoral; es por tanto un miR-supresor.

La regulación de la expresión de miR-145 se produce a través de varios mecanismos como alteraciones a nivel de la cromatina en el gen de miRNA, delecciones, mutaciones e hipermetilación del promotor, regulación post-transcripcional mediante modificaciones en el procesamiento y estabilidad del miRNA y regulación en la transcripción a través de factores de unión a DNA como p53, c-myc, FOXO1, FoxO3 y RRBE1.

En el estudio publicado por Gao y cols. (64) analizaron el papel del miR-145 en la inhibición de la invasión y migración celular en cáncer gástrico. Los investigadores presentaron los resultados obtenidos in vitro de cuatro líneas celulares e in vivo en ratones. En primer lugar se comparó la expresión de miR-145 en células sanas y tumorales en cuatro líneas celulares así como en ratones. Se observó una expresión 32 veces inferior en las líneas celulares y tejido tumoral gástrico. In vitro, los investigadores realizaron una transferencia de pre-miR-145 observando un aumento de los niveles de expresión del mismo y, secundariamente, una reducción en la migración e invasión estromal estadísticamente significativo, $p < 0.001$.

Posteriormente transfirieron anti-miR-145 con la consiguiente pérdida de función de este miRNA y un aumento de la capacidad de invasión y migración celular.

In vivo, se implantaron células con producción ectópica de miR-145 en ratones, objetivándose la aparición de enfermedad metastásica pulmonar en los controles, con niveles normales de miR-145, en comparación con la ausencia de metástasis en los ratones con sobreexpresión de miR-145. Por otra parte, no se observó una relación significativa entre el crecimiento tumoral y el índice de proliferación tumoral, Ki 67.

El mecanismo de acción de miR-145 en la inhibición de la migración e invasión tumoral se lleva a cabo a través de la expresión proteica de la N-cadherina según lo descrito en el presente estudio.

Por lo tanto, los investigadores demuestran el papel supresor de miR-145 en la invasión, migración y metástasis a través de N-cadherina en cáncer gástrico.

El papel oncosupresor de miR-145 también fue descrito en el estudio de Wang y cols. (65) En este trabajo se demuestra que la sobreexpresión de miR-145 inhibe el crecimiento en líneas celulares

de origen gástrico mediante la inducción de apoptosis y detención del ciclo celular en fase G1.

Los investigadores realizaron una comparación entre células transferidas con un análogo de miR-145, con un inhibidor de miR-145 y con vector de control negativo. Se observó que, en las células transferidas con un análogo de miR-145 se produjo una sobreexpresión, el cual se relacionó de forma estadísticamente significativa, con una inhibición de la proliferación celular y un aumento en la apoptosis a través de la supresión del pro-oncogén c-myc.

Además de observarse una supresión de la invasión y metástasis en células tumorales gástricas a través de la regulación de la metaloproteinasas MMP2 y MMP9, en el estudio se demostró una infraexpresión de miR-145 en células de cáncer gástrico en comparación con células sanas, $p < 0.001$.

La vía PI3K/AKT regula el crecimiento celular, la supervivencia, proliferación, apoptosis, angiogénesis y migración celular.

En las líneas celulares con aumento de miR-145 se observó una infraexpresión proteica en esta vía con la secundaria inhibición de la cascada de señalización. Estos resultados sugieren posibles oncogenes diana regulados por miR-145, así como el papel fundamental en la oncogénesis del cáncer gástrico (65).

En las células tumorales gástricas, la expresión de miR-145 se encuentra significativamente disminuida comparación con células sanas produciendo por tanto una sobreexpresión de los oncogenes descritos(66).

La relación de miR-145 y la vitamina D se describe en el estudio de Chang et. al (67); en este estudio la adición de vitamina D produjo una inhibición significativa del crecimiento celular a través de la sobreexpresión de miR-145 in vitro.

Se han descrito alteraciones en la expresión de otros genes implicados en la invasión, migración y metástasis, así la disminución en la expresión de MYO6 (66), la Fascina 1 (FSCN1) (68), ZEB2 (69) y la metaloproteínasa 11 (MMP-11) (70), Sp1 (71) por miR-145 produce una inhibición en la migración celular y metástasis.

- mirR-143:

Los resultados en cáncer de pulmón (72) y cáncer colorrectal (73) demostraron que la pérdida de expresión de miR-143 aumentaba la incidencia de estos tumores. Los resultados en cáncer gástrico demostraron una infraexpresión de miR-143 en células tumorales(74), así como en estadios metastásicos en comparación con estadios precoces(75).

El miR-143 es un anti-oncomir que regula la expresión de genes a través de múltiples mRNA diana codificantes de proteínas implicadas en la proliferación celular, diferenciación, supervivencia y apoptosis; entre ellas se incluyen COX-2, KRAS, Bcl-2, PAI-1, MYO6, MMP-13, citosina-5, DNMT3A y ELK1 (76).

MiR-143 presenta una infraexpresión en tejidos tumorales entre los que se encuentra el cáncer gástrico y, de forma más significativa, en cáncer gástrico metastásico. Entre los genes diana de miR-143 destaca COX-2 por su asociación con el crecimiento tumoral y metástasis, inhibición de la apoptosis y modificación en la adhesión celular.

En un estudio previo se observó una sobreexpresión de COX-2 en cáncer gástrico, así como una reducción en la proliferación y metástasis tras reducir su expresión. Los autores concluyen que COX-2 presenta un papel relevante en cáncer gástrico. (30).

El mecanismo a través del cual miR-143 actúa sobre COX-2 y la proliferación tumoral en este tipo de tumor se analizó en el estudio de

Wu y cols. (76). En este trabajo desarrollado en seis líneas celulares de cáncer gástrico se objetivó una infraexpresión de miR-143 y un aumento de COX-2 en células tumorales.

En el estudio se realizó la transferencia de miR-143-5p y miR-143-3p con la consiguientes reducción en la viabilidad celular ($p < 0.05$), aumento de apoptosis ($p < 0.05$) y disminución del número de células viables ($p < 0.05$). En todos los casos miR-143-5p presentó mayor efecto inhibitorio que miR-143-3p. Los resultados demostraron que sólo miR-143-5p presenta una secuencia de unión en 3'-UTR del mRNA de COX-2, siendo por tanto miR-143-5p el único que produce un efecto inhibitorio sobre COX-2.

En este trabajo se demuestra la existencia de diferentes dianas entre miR-143-5p y 3p, los cuales son el resultado de una escisión del mismo pre-miRNA dado lugar a dos miRNA maduros con diferentes secuencias y, por lo tanto dianas.

En el estudio de Takagi y cols. (62) describen una cohorte de 43 pacientes diagnosticados de cáncer gástrico, las muestras procedían del tumor primario y se incluyeron pacientes con cáncer gástrico localizado y metastásico. Se observó una infraexpresión de ambos miRNAs, miR-143 y miR-145, en 27 de las 43 muestras en comparación con las muestras pareadas sanas, ratio de 0.67. No se observó relación entre la expresión de estos miRNAs y características clínico-patológicas de los pacientes. Realizaron además la transferencia de miR-143 y miR-145 a dos líneas celulares cultivadas observándose una inhibición en el crecimiento celular de forma dosis-dependiente, de la misma forma la inhibición de estos dos miRNAs condujo a un aumento en la proliferación celular. En ambos cultivos celulares el efecto inhibitorio tras la transferencia fue mayor en el caso de miR-145. Los investigadores demostraron además el efecto aditivo en la inhibición celular tras la transferencia conjunta de ambos miRNAs de forma no dosis-dependiente, ya que no se observaron

diferencias entre la adición de ambos a dosis de 20 nM o a 40 nM. Las diferencias en el crecimiento celular se observaron en comparación con la transferencia de miR-143 solo, aunque no hubo variación en la comparación con miR-145. Se analizó además un aumento en la sensibilidad al tratamiento de quimioterapia 5-FU con la sobreexpresión de miR-143 o miR-145.

- miR-125b:

Se encuentra regulado en diferentes tipos de tumores. Se ha analizado la hipótesis que sugiere que su función depende de los niveles de expresión de su gen diana.

En el estudio de Mohri y cols. (77) demuestran que miR-125b inhibe los efectos antiproliferativos de la vitamina D a través de la regulación post-transcripcional del receptor de vitamina D (VDR). Además, en estudios posteriores observaron una hiporregulación progresiva desde la mucosa gástrica normal, a lesiones premalignas y finalmente adenocarcinoma de tipo intestinal (78). Los niveles de expresión de miR-125b fueron inversamente correlacionados con la expresión de HER2, siendo más bajos en pacientes con positividad HER2. En células tumorales gástricas HER2 actúa como diana de miR-125b. La sobreexpresión de miR-125b inhibe la proliferación, migración e invasión *in vitro* e *in vivo* así como aumenta la sensibilidad a fármacos quimioterápicos como el cisplatino (79).

Los pacientes con sobreexpresión de miR-125b presentan mejor supervivencia libre de progresión y global.

En el estudio de Wu y cols. observaron que los niveles de miR-125b se correlacionaron inversamente con la profundidad en la invasión tumoral, estadio clínico y afectación ganglionar metastásica. Los tumores iniciales con infraexpresión de miR-125b presentaron un supervivencia libre de enfermedad y global más corta (80).

- miR-338:

El miR-338 actúa como supresor tumoral en cáncer gástrico (81). La infraexpresión produce la pérdida de inhibición sobre oncogenes relevantes en la proliferación tumoral.

La normalización en la expresión de miR-338 inhibe la vías de oncogénesis, por lo que tiene un papel importante a nivel pronóstico y terapéutico.

En el trabajo de Peng y cols. (81) se analizaron 41 muestras de tejido tumoral gástrico, 24 muestras de tejido sano como control y fueron cultivadas 5 líneas celulares tumorales del mismo origen.

Se observó una infraexpresión significativa de miR-338 en las líneas celulares y tejido tumoral gástrico.

Por otro lado, el análisis del efecto de la sobreexpresión de miR-338, realizado mediante la transferencia de LV-hsa-mir-338, indicó una reducción significativa en la migración, invasión, proliferación y un aumento de apoptosis en las líneas celulares tumorales.

El mecanismo de acción de produce a través de la inhibición de la expresión de NRP1 y, secundariamente, inhibe EMT o transición epitelio-mesénquima.

Además en el trabajo de Guo y cols. (82) demuestran que miR-338 se encuentra frecuentemente silenciado en cáncer gástrico a través de la hipermetilación de su promotor. Además concluye que miR-338 inhibe la migración e invasión de las células tumorales actuando en la vía de señalización de N-cadherina y Hhat-MMP in vitro.

- miR-223:

El papel de miR-223 ha sido descrito en diferentes estudios en cáncer gástrico, en los que se demuestra una sobreexpresión en

comparación con tejido sano, se corresponde por lo tanto de un oncomiR (83).

- miR-99b-5p:

En cáncer gástrico, se han estudiado otros miRNAs cuya alteración en la expresión se relaciona con el proceso de diferenciación y proliferación celular a través de sus genes diana.

La relación entre el nivel de expresión del miR-99b-5p (y miR-203a-3p) y su función en la proliferación celular fue analizada en el estudio de Wang y cols (84). En este trabajo realizaron una comparación entre la expresión en tejido tumoral gástrico, procedente de la pieza quirúrgica de pacientes, y el tejido sano obtenido al menos a cinco 5cm del margen tumoral. Se observó una infraexpresión de miR-99b-5p en el tejido tumoral en comparación con el tejido sano. Posteriormente, las células tumorales fueron transfectadas con plásmidos, pre-miR-99b o pre-miR-203a, o controles.

Los resultados demostraron que la sobreexpresión de miR-99b-5p produce el arresto del ciclo celular en G1-S en células con cáncer gástrico *in vitro* a través de un gen diana, IGF-1R.

Por lo tanto, en el estudio se concluye el posible papel de miR-99b y miR-203a como miRsupresores en cáncer gástrico.

- miR-498:

En este estudio en cáncer de ovario observaron que la vitamina D induce la expresión de miR-498 a través de su unión a VDRE localizado en la región reguladora 5' del gen de miR-498 (85).

En cáncer gástrico, la sobreexpresión de miR-498 inhibe la invasión, proliferación y revierte la resistencia a cisplatino *in vitro* e *in vivo* (86).

- miR-22:

La vitamina D induce la expresión de mi miR-22 en cáncer de colon de una forma dependiente del receptor de vitamina D (87). En cáncer gástrico miR-22 se encuentra hiporregulado comparado con controles sanos y está asociado a un fenotipo más agresivo y peor supervivencia (88).

- miR-181b:

La sobreexpresión descrita en cáncer gástrico se relaciona con peor supervivencia y características clínico-patológicas más agresivas (89). En otros estudios publicados describen un posible papel como supresor de tumores y se ha descrito significativamente disminuido en células tumorales gástricas (90).

- miR-106b:

En cáncer gástrico miR-106b se encuentra sobreexpresado en comparación con células tumorales sanas, lo cual produce el acortamiento de la fase G0/G1 y peor supervivencia (91).

- miR-532-3p:

En el estudio de Guo y cols. describieron la hiporregulación en cáncer gástrico (92). En contraste, Dai y cols. demostraron que miR-532-3p se encuentra sobreexpresado en células tumorales gástricas en comparación con células sanas (93).

1.5. VITAMINA D: METABOLISMO Y MECANISMO DE ACCIÓN

1.5.1 Síntesis y metabolismo de vitamina D.

Históricamente se consideró que la vitamina D formaba parte del grupo de vitaminas al igual que la vitamina A, E y B entre otras. Sin embargo, fue en la segunda mitad del siglo XX cuando se demostró que la vitamina D es una hormona esteroidea liposoluble con un amplio espectro de efectos fisiológicos.

Esta hormona interviene en mecanismos de diferenciación celular, homeostasis del calcio, regulación el crecimiento y modulación del esqueleto (94).

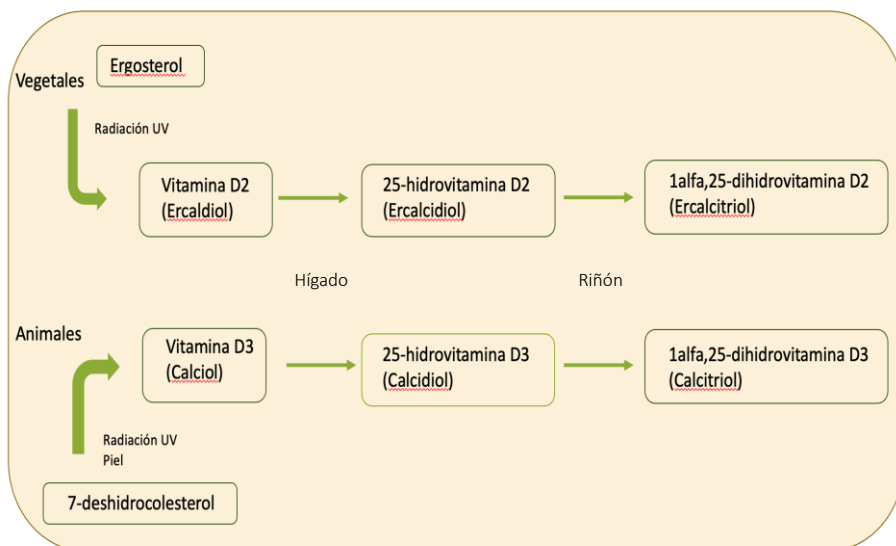


Figura 9. Estructura bioquímica y formación de la vitamina D.

El concepto vitamina D está representada por dos compuestos, la vitamina D₃ (calcio) o colecalciferol) en el caso de los animales y la vitamina D₂ (ercaldiol o ergocalciferol) en los vegetales. Estas moléculas derivan del 7-deshidrocolesterol en el caso de los animales o del ergosterol en el caso de los vegetales (figura 9). Tras exposición

a radiación ultravioleta se transforman a vitamina D₃ o calcidiol y vitamina D₂ o ercalciol respectivamente. La vitamina D₃ puede por lo tanto originarse en la piel tras recibir radiación ultravioleta o ingerirse en la dieta mediante su absorción en el intestino delgado.

La activación ocurre a través de dos pasos de hidroxilación, el primero de ellos es una 25-hidroxilación producida en el hígado a través de una enzima 25-hidroxilasa cuyo resultado es el calcidiol o 25-hidroxivitamina D₃ [25(OH)D₃] (ver figura 10).

El segundo paso se produce a nivel renal mediante una hidroxilación catalizada por la enzima 1alfa-hidroxilasa (CYP27B1) dando lugar a la forma biológicamente activa, el calcitriol o 1-alfa,25 dihidroxicolecalciferol, 1,25-(OH)₂D₃.

Finalmente, la enzima catalítica 24-hidroxilasa (CYP24A1) convierte el 25(OH)D₃ y 1,25-(OH)₂D₃ en moléculas sin actividad biológica regulando así los niveles de vitamina D y evitando un estado de hipervitaminosis (95).

La síntesis de vitamina D está regulada además por la hormona paratiroidea (PTH) que aumenta la síntesis a través de la 1alfa hidroxilasa, y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF23) que suprime la actividad de la vitamina D activando la enzima catalítica 24-hidroxilasa (CYP24A1) y suprimiendo al 1-alfahidroxilasa (96).

La regulación de las enzimas encargadas del metabolismo del calcitriol varía en función del tipo de tejido (97).

La CYP27B1 se expresa también en tejidos fuera del riñón, por ejemplo en colon, cerebro, páncreas y piel; y su actividad permite el paso a la forma biológicamente activa de la vitamina D. Se observó una sobreexpresión de esta enzima (CYP27B1) en carcinomas bien diferenciados de mama, próstata y etapas precoces de cáncer colorrectal. Sin embargo, su expresión está reducida en tumores de colon pobremente diferenciados, limitando así los niveles de vitamina D circulante (98).

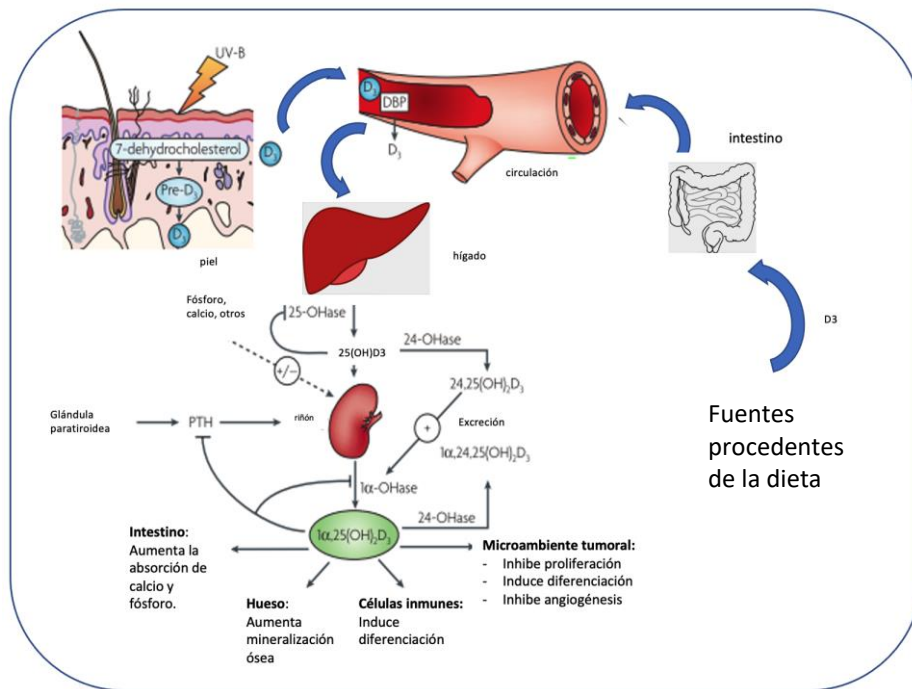


Figura 10. Metabolismo de vitamina D. Fuente: Modificado de “Vitamin D and GI cancers: shedding some light on dark diseases”. Hargrove y cols. *Annals Translational Medicine* 2014;2(1):9.

Por otra parte, la expresión de mRNA de CYP24A1 (codifica 24-hidroxilasa encargada de la inactivación del calcitriol) se encuentra hiperregulado en tejido tumoral, disminuyendo por tanto los niveles de vitamina D (98).

En el estudio de Cross y cols. (99) se demuestra la hiperregulación de CYP24A1 y CYP27B1 en cáncer de colon de alto grado.

Por lo tanto, el metabolismo/catabolismo de la vitamina D encargado de regular los niveles de la misma sugiere una actividad tumoral. En lo sucesivo, el concepto de vitamina D se referirá al metabolito activo resultante del proceso de síntesis y activación.

La cuantificación de la vitamina D se realiza a través de la medición del calcidiol [25(OH)D₃] o el calcitriol [1,25-(OH)₂D₃],

aunque este último, a pesar de ser la forma más activa, presenta concentraciones picomolares y una vida media más corta por lo que no constituye el índice más fiable. En base a las guías de práctica clínica de la Sociedad de Endocrinología podemos establecer el déficit de vitamina D en 10 ng/mL.

1.5.2 Mecanismo de acción de la vitamina D.

La vitamina D interviene en diferentes procesos celulares relacionados con la carcinogénesis y la progresión tumoral a través de la regulación en la expresión de genes. Esta acción es llevada a cabo mediante mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA, modificación de histonas y la regulación de nc-RNA (96,97).

1.5.2.1. Papel del receptor de vitamina D (VDR).

La acción de la vitamina D se ejerce a través del receptor de vitamina D (VDR), el cual forma parte de una familia de receptores nucleares reguladores de transcripción que incluyen a los receptores de hormonas tiroideas, receptores de hormonas esteroideas, receptores de ácido retinoico y receptores X retinoide (RXR).

El receptor de vitamina D se divide en varios dominios, aminoterminal de funciones poco conocidas, C o de unión al DNA de unos 70 aminoácidos, D o de región puente de unos 40 aminoácidos, E o carboxiloterminal de unión al ligando de 293 aminoácidos.

El VDR es codificado por un gen localizado en el cromosoma 12 formado por 14 exones con dos regiones promotoras. Este receptor regula la expresión de genes de forma ligando-dependiente.

El calcitriol es transportado en el torrente sanguíneo mediante la proteína de unión de la vitamina D (DBP) (figura 11). En la unión de este ligando con el extremo carboxilo-terminal del receptor VDR, se produce un cambio conformacional y la formación de un heterodímero con el receptor de ácido retinoico RXR, posteriormente este complejo VDR-RXR es traslocado núcleo. Es en el núcleo celular en donde se

une a los elementos de respuesta de la vitamina D del DNA (VDREs) localizados en los promotores de los genes diana o en las zonas distales, esto conduce al reclutamiento de coactivadores y correpresores que regulan la transcripción de genes implicados en vías que regulan la homeostasis del calcio, vías celulares tumorales, procesos relacionados con el ciclo celular, crecimiento, invasión, apoptosis, diferenciación y metástasis (100). El VDR presenta un papel fundamental en la vía de señalización de la vitamina D y es un paso crucial en la respuesta celular. El efecto antitumoral se reduce en los casos con ausencia o disminución de expresión del VDR, incluso en pacientes con valores elevados o en rango de normalidad como veremos más adelante.

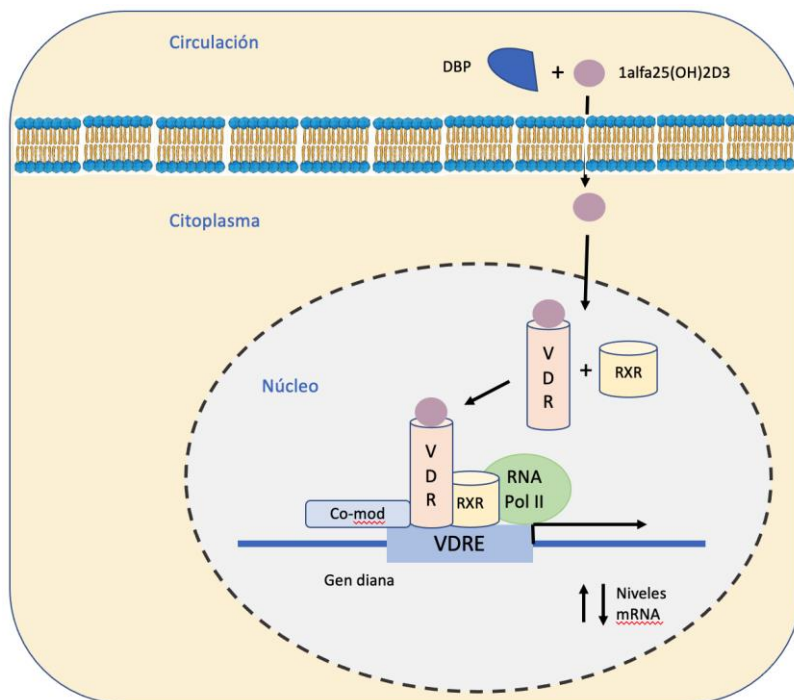


Figura 11: La vitamina D, interiorización celular y su función en el núcleo celular. La vitamina D circula en sangre unida a la proteína de unión de la vitamina D (DBP) y se interioriza en la célula a través del receptor VDR. A través de la unión con el receptor se une al complejo RXR y forma un heterodímero que ejerce su función en el núcleo celular mediante los elementos de respuesta de vitamina D (VDRE). Como resultado, se induce o suprime la expresión del gen diana.

Recientemente se han publicado datos sobre el papel de la vitamina D como factor pronóstico en varios tipos de tumores, entre ellos destaca su actividad en cáncer de colon, mama, próstata y gástrico(101–103).

1.5.2.2. Efectos antiproliferativos, antiangiogénicos y proapoptóticos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en cáncer

A continuación se describen los efectos de la vitamina D en cáncer (figura 12) y más concretamente en cáncer gastrointestinal (figura 13).

Efecto antiproliferativo(96,97,104):

- Detención del ciclo celular en fase G0/G1 mediante la expresión de ciclinas dependientes de quinasas. (97)
- Inhibición de señales de crecimiento como las producidas por IGF-1 y EGFR (105)
- Modulación de la vía quinasa intracelular y represión del onocógeno MYC.

Inducción de la apoptosis:

- Supresión de genes como BCL2 y estimulación de genes proapoptóticos como BAX Y BAK (este efecto no ocurre en todos los tejidos tumorales) (106).
- Estimulación de la diferenciación.
- Mecanismos específicos de cada población celular, a través de la regulación de betacateninas.
- Inhibición de la actividad de la telomerasa reduciendo la expresión de la transcriptasa inversa telomerasa (TERT), la cual induce apoptosis (107) .

Inhibición de la invasión y metástasis:

- Disminuye la expresión de integrinas.
- Aumenta la expresión de E-cadherina (108)
- Regula la expresión de componentes del sistema activador del plasminógeno e inhibe metaloproteinasas de la matriz MMP2 y MMP9 (109).
- Incrementa los inhibidores de TIMP-1 y catepsina (109)

Inhibición de la angiogénesis:

- Supresión de la expresión de VEGF (a través de la inhibición en la transcripción de HIF1A)
- Acción antiproliferativa directa sobre las células endoteliales.

Efectos inflamatorios:

- Inhibición de la expresión de COX2, receptores de prostaglandinas.
- Inhibe acciones protumorales de los fibroblastos del estroma asociados a tumor (CAFs) a través de la inhibición de NF-Kb (110)

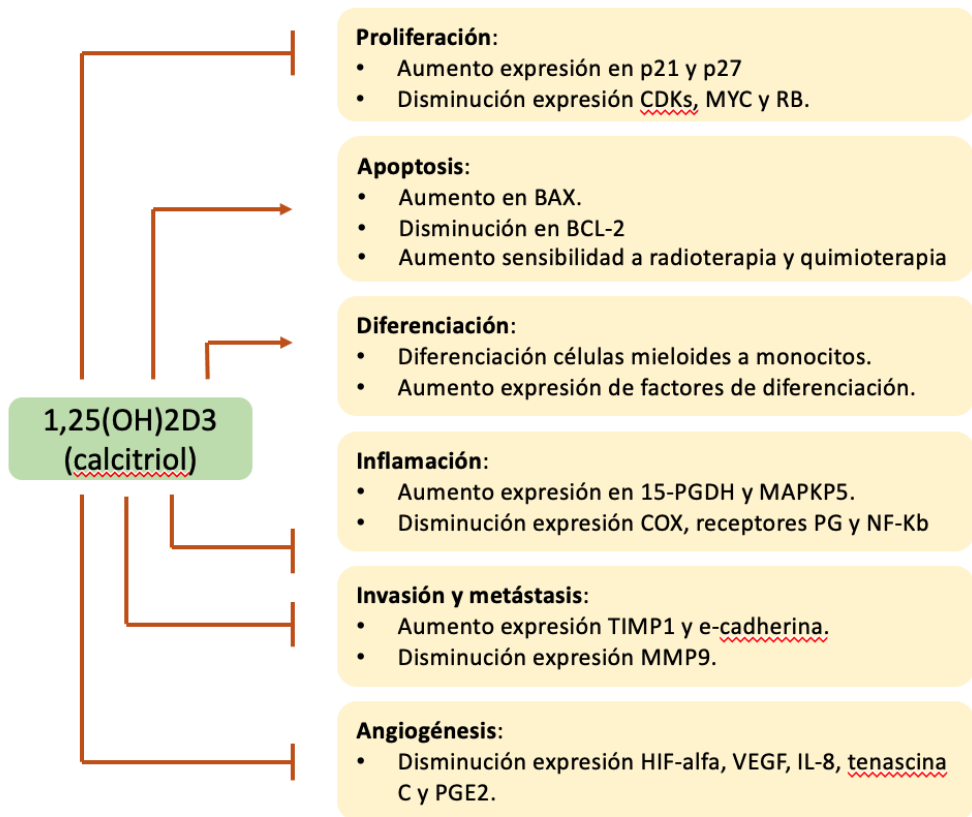


Figura 12: Mecanismo de acción del calcitriol a través del VDR y efecto antineoplásico.

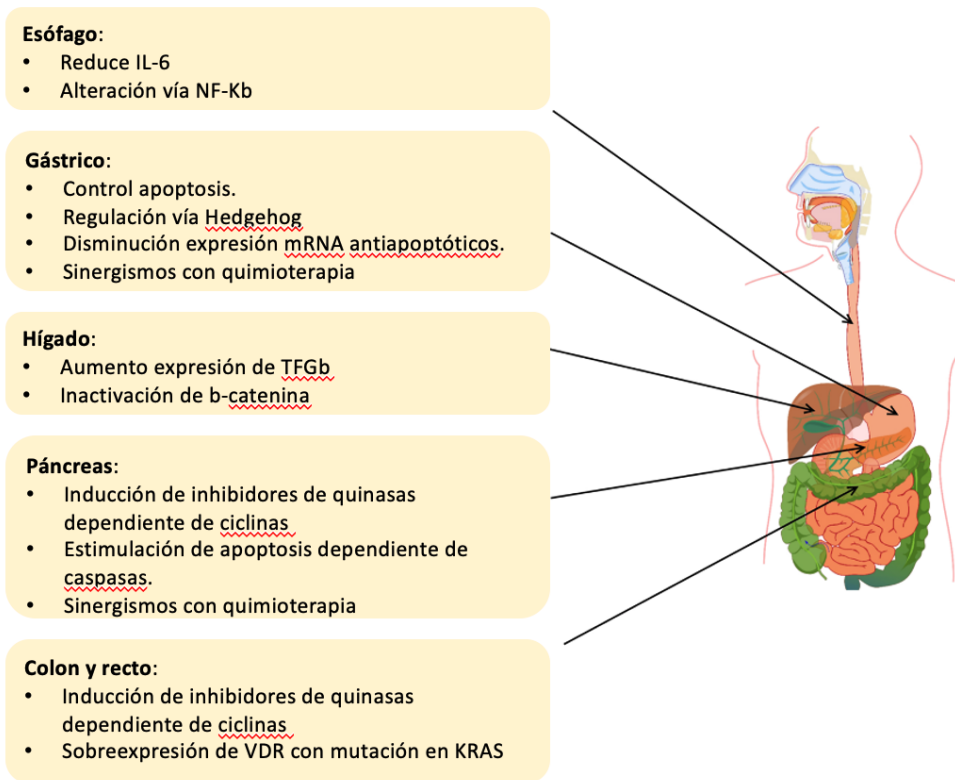


Figura 13. Efecto antitumoral de la vitamina D en cáncer gastrointestinal.

1.5.2.3 Evidencia de la actividad de 1,25(OH)₂D₃ in vitro en cáncer gástrico.

Los niveles bajos de vitamina D séricos se han relacionado con un incremento en la incidencia de cáncer gastrointestinal, así como en cáncer de mama y próstata. El efecto en la regulación de genes implicados en proliferación celular, apoptosis y angiogénesis en ratones sugieren una asociación entre la vitamina D y carcinogénesis(111,112).

En el trabajo publicado por Baek y cols. (112) se demuestra el efecto en la viabilidad celular tras la adición de calcitriol en líneas celulares. En 96 placas se cultivaron células gástricas tumorales y se añadió vitamina D en diferentes concentraciones; tras cuatro días, se determinó el porcentaje de células viables. El resultado fue una inhibición dosis dependiente, específicamente a una concentración de 10 micromolar de vitamina D, la viabilidad celular se había reducido un 80%.

En un segundo tiempo se añadió vitamina D con agentes quimioterápicos, paclitaxel, adriamicina y vinblastina, de forma conjunta. En el análisis de viabilidad celular tras dos días, se observó una reducción del 57% y 41% en ambas muestras tras adición de vitamina D; además, la tasa de supervivencia de las células tumorales se redujo más de un 70% al añadir Vitamina D y quimioterápicos de forma conjunta.

En el estudio de Bao y cols. (111) se publicaron resultados similares; en dicho estudio se objetivó un efecto pro-apoptótico del calcitriol en líneas celulares de cáncer gástrico a través de la vía de activación de caspasa 3, de la regulación de la expresión proteica de BAX, de la inhibición de p-AKT y la activación de ERK 1/ 2. El efecto antiproliferativo fue fundamentalmente a través del arresto de la célula en fase G1.

1.5.2.4 Evidencia de la actividad de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in vivo en cáncer gástrico(113).

En el estudio de Ren y cols. (113)se incluyeron 197 pacientes diagnosticados de cáncer gástrico que recibieron tratamiento con quimioterapia entre el año 2002 y 2006. Previamente al inicio del tratamiento se realizó una determinación de los niveles séricos de vitamina D. El 57% de los pacientes presentaban un déficit de vitamina D (<50nmol/L) y un 37% se encontraban en rango de insuficiencia (50-

75 nmol/L). El estadio clínico y la afectación ganglionar fueron inversamente asociados con los niveles de vitamina D. En el análisis univariante los pacientes con niveles elevados de vitamina D (>50nmol/L) presentaron un aumento de supervivencia global a 5 años comparado con aquellos que presentaban unos niveles inferiores a 50nmol/L ($p=0.0018$). La tasa de supervivencia a 5 años fue de 57.8% versus 43% (la mediana de supervivencia fue de 63.7 meses versus 54 meses). El análisis multivariante determinó la validez de la vitamina D como factor pronóstico independiente en cáncer gástrico ($p=0.0019$).

Además en el estudio de Durak y cols (114) los pacientes con un déficit grave de vitamina D (<10ng/mL) presentaban cuatro veces más riesgo de cáncer gástrico.

1.5.2.4 Mecanismo de acción a nivel epigenético: 1,25(OH)₂D₃, VDR, miRNA.

Un 3-5% de genes son regulados por 1,25(OH)₂D₃ directa o indirectamente, estos genes incluyen miRNAs (RNA no codificante dirigido a la inhibición o desestabilización del mRNA) con función como oncogenes o genes supresores de tumores en la carcinogénesis.

La vitamina D regula la transcripción de miRNAs a través de la unión del VDR a las secuencias del promotor de los genes de miRNA diana, además regula los genes implicados en su maduración como Drosha o Dicer, y altera la estabilidad del miRNAs mediante su degradación.

Algunos estudios exploraron el papel de los miRNAs en el mecanismo de acción antitumoral de la vitamina D.

El trabajo de Chang y cols. (67) analizó la relación entre la vitamina D y miR-145. El análisis de la expresión de miRNA tras la adición in vitro de vitamina D demostró el incremento significativo del nivel de expresión de miRNA-145. Además, tras la inactivación

del receptor de vitamina D, los niveles de miR-145 descendieron. Se observó también una infraexpresión de miR-145 en tejidos tumorales que en tejidos sanos.

Cuando miR-145 fue inhibido, el efecto antiproliferativo de la vitamina D disminuyó bruscamente con el consiguiente aumento del tamaño tumoral. Por lo tanto, en el estudio se concluye que miR-145 es activado a través del receptor de vitamina D y el cual es crítico para la acción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Para investigar la función de miR-145 se transfirió activado a una línea celular y bloqueado en la siguiente. Los resultados demuestran una inhibición significativa del crecimiento celular en la muestra con miR-145 activado causando la detención del ciclo celular en fase S.

Los autores del estudio concluyen que la vitamina D ejerce su función antiproliferativa a través de un receptor de membrana que se traslada al núcleo y regula genes diana a través de miR-145 y secundariamente la inhibición (hiporregulación) de E2F3 y CDK6.

Por lo tanto, el déficit de vitamina D se relaciona in vitro con peor pronóstico en el cáncer gástrico, a través de su papel en la inflamación, angiogénesis, proliferación tumoral, metástasis e inhibición de la apoptosis.

En Abril de 2019 el mismo grupo de investigación liderado por Chang y cols. (115) publicó los resultados de otro miRNA relacionado con la vitamina D y la proliferación celular en cáncer gástrico, miR-99b-3p.

En este estudio demostraron una disminución en los niveles de expresión del receptor de vitamina D en células tumorales gástricas en comparación con tejido normal.

Tras la administración de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a dosis de 100 y 200 nM el análisis PCR en tiempo real mostró un incremento de miR-99b-3p de

40 veces. Posteriormente, realizaron de nuevo la adición de 1,25(OH)₂D₃ en células transferidas con plásmidos sh-VDR, en este caso los niveles de miR-99b-3p se redujeron a la mitad. En cuanto al mecanismo de acción antitumoral de la vitamina D a través de miR-99b-3p, se observó un aumento en la viabilidad tumoral cuando se inhibe este miRNA, indicando por lo tanto su papel como miRNAsupresor. Además se demuestra un menor efecto antiproliferativo de la vitamina D con esta inhibición.

En este estudio en línea celular de cáncer gástrico se demuestra el mecanismo antitumoral de la vitamina D mediado por el receptor de vitamina D y miR-99b-3p.

1.6. PROTEÍNAS REPARADORAS DEL ADN (MMR): INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

Las proteínas reparadoras son un mecanismo de reparación de errores en la duplicación del ADN. La falta de expresión de estas proteínas (fundamentalmente por alteraciones epigenéticas que producen una inactivación de la transcripción a través de la hipermetilación del promotor islas CpG), produce la pérdida en la capacidad de reparación durante la duplicación del DNA y, por lo tanto, el acúmulo de un alto número de mutaciones en zonas del cromosoma con alta tasa de replicación (microsatélites). Esto es lo que se conoce como inestabilidad de microsatélites (MSI) o déficit de proteínas reparadoras (dMMR) (116).

Debido a la pérdida de los mecanismos de reparación, este tipo de tumores presentan una mayor carga mutacional (10-100 veces mayor) y un aumento en el número de antígenos presentados, lo que le confiere una mayor activación de la respuesta inmune y una mejor respuesta a la inmunoterapia (117).

Los hallazgos de infiltrados inflamatorios y citoquinas asociadas a linfocitos T en el tejido tumoral de pacientes con MSI, así como los estudios en cáncer de pulmón y melanoma en los que se estableció una relación directa entre la alta carga tumoral y la respuesta inmune, apoyan la idea de que un mayor número de antígenos presentados induce una mayor respuesta inmune y un mejor pronóstico. En pacientes con estabilidad de microsatélites (MSS) el infiltrado linfocitario en el microambiente tumoral es drásticamente inferior que en pacientes MSI (118).

En 2014 el grupo investigador The Cancer Genome Atlas (20) presentó una división del cáncer gástrico en cuatro grupos atendiendo a su perfil molecular: VEB+, MSI, GS o genéticamente estable y CIN o tumores con inestabilidad cromosómica. El grupo MSI o tumores con inestabilidad de microsatélites conforma un 22% y se observa más frecuentemente en mujeres y ancianos (media de 72 años). Este grupo se caracteriza por una pérdida o déficit de expresión de las proteínas reparadoras MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, lo cual, se asocia con un mejor pronóstico en algunos tumores como cáncer colorrectal E.II, cáncer de ovario y cáncer gástrico (119); así como una falta de respuesta a tratamiento adyuvante de quimioterapia con esquema 5FU en cáncer colorrectal en estadio II.

En cáncer gástrico se han publicado dos estudios retrospectivos en los que se analiza el impacto en supervivencia en pacientes con MSI o MSS tratados con cirugía (sola o con quimioterapia) (31,32)

El primero de los trabajos es un análisis retrospectivo del estudio MAGIC (31): estudio multicéntrico fase III en el que se comparaba el esquema de quimioterapia perioperatoria (cisplatino, epirrubicina y 5Fluorouracilo- administrados tres ciclos antes y después de la cirugía) con cirugía de entrada y posterior seguimiento. El objetivo inicial de dicho estudio fue la supervivencia global, demostrando un menor riesgo de muerte a los 5 años del 36% vs 23% con una HR de

0.75; IC 95% (0.60-0.93) $P = .009$. En el estudio retrospectivo se analizaron un total de 303 pacientes; el grupo con inestabilidad de microsátélites (20 pacientes) presentó un mejor pronóstico cuando recibían cirugía como único tratamiento (supervivencia global, SG: no alcanzada versus 20.5 meses, $p=0.09$), sin embargo presentó un peor pronóstico cuando recibían tratamiento con cirugía y quimioterapia complementaria (SG 9.6 meses versus 19.5 meses, HR, 2.18; 95% CI, 1.08-4.42; $P = .03$). Por lo tanto, en el estudio se observa el efecto perjudicial de la quimioterapia en pacientes con inestabilidad de microsátélites en cáncer gástrico reseado de manera retrospectiva.

El otro trabajo que analiza el pronóstico y efecto de la quimioterapia es este grupo de pacientes, es el análisis retrospectivo del estudio CLASSIC (32) presentado en el Congreso Americano Anual de Oncología en 2017 (ASCO). Los pacientes con MSI presentaron mayor tasa libre de enfermedad a 5 años que los pacientes MSS: HR 0.244 (95% IC, 0.069–0.867); $p = 0.0292$; sin embargo entre los pacientes MSI la quimioterapia adyuvante no se relacionó con mayor supervivencia libre de enfermedad (SLE): HR 0.561 (95% IC, 0.190–1.654); $p = 0.2946$. Los estudios descritos son análisis retrospectivos con todas las limitaciones que implica por lo que son necesario estudios prospectivos de validación de hipótesis.

1.7. EL PAPEL DE LA INFLAMACIÓN EN LA CARCINOGENÉISIS

La relación entre inflamación y cáncer ha sido motivo de controversia y estudio en las últimas décadas. La primera hipótesis fue descrita por el alemán R. Virchow a mediados del siglo XIX tras observar infiltrados inflamatorios y zonas de inflamación crónica en biopsias de tejido tumoral.

Casi cincuenta años más tarde, en 1909, Paul Ehrlich introdujo la idea de que el sistema inmune tenía la capacidad para contrarrestar el

crecimiento tumoral. Posteriormente, F. Burnet en 1957 consideraba que los neoantígenos específicos de las células tumorales podrían producir una reacción inmunológica que detendría el desarrollo de los tumores.

Estudios epidemiológicos demuestran la relación entre inflamación crónica y cáncer. La presencia de determinadas infecciones aumenta el riesgo de cáncer, como es el caso de bacterias (*H. pylori*: riesgo de desarrollar cáncer gástrico)(9), virus (virus Epstein Barr, virus de la hepatitis C y hepatocarcinoma, virus del papiloma humano en cáncer de cérvix)(11), enfermedades autoinmunes e inflamaciones crónicas como la enfermedad inflamatoria intestinal(120).

La presencia de células inflamatorias, mediadores inflamatorios, remodelación tisular y angiogénesis en el microambiente tumoral son similares a las observadas en la reparación tisular e inflamación crónica; además se encuentran presentes en la mayoría de tumores independientemente de la causa de la carcinogénesis(121). La inflamación innata en tejido normal es un proceso limitado. Sin embargo, la inflamación que se observa en tejidos tumorales se autoperpetúa a través de mediadores autocrinos y paracrinos, produciendo un aumento en el riesgo de cáncer(122).

Se han descrito dos vías sobre el papel de la inflamación y el cáncer. La vía extrínseca, se caracteriza por un aumento del riesgo de desarrollar cáncer debido a un estado inflamatorio previo (enfermedad inflamatoria intestinal, pancreatitis...) o a una infección (*H.pylori*, VEB, HPV...). Por otra parte, el paso principal en el origen del tumor en la vía intrínseca es una alteración genética (activación de oncogenes, reordenamiento cromosómico o inactivación de genes supresores de tumores) que provoca que las células mutadas induzcan un microambiente tumoral similar al observado durante la

inflamación. Por lo tanto, no sólo la inflamación causa cáncer, sino también el cáncer causa inflamación (121).

Tanto la vía extrínseca con un origen infeccioso o inflamatorio, como la vía intrínseca cuyo origen es una alteración genética, van a generar un microambiente inflamatorio en el tejido tumoral debido a la activación de factores de transcripción como NF-Kb (factor nuclear -Kb) y STAT3 (señal activadora de transcripción 3) que activan la expresión de genes que codifican la producción de citoquinas inflamatorias (por ejemplo: TNF alfa, IL-6, CCL2, IL-8), moléculas relacionadas con la adhesión celular (CXCR4, CXCL12, L-selectina) enzimas relacionados con la vía de las prostaglandinas como COX-2, factores angiogénicos, factores de crecimiento (G-CSF, GM-CSF, M-CSF) y mediadores inflamatorios que inducen el reclutamiento de células inflamatorias (macrófagos, eosinófilos, mastocitos, neutrófilos y células superiores derivadas de los mielocitos) (121). Estas células van a producir más citoquinas proinflamatorias que aumentan el reclutamiento y amplifican el estado inflamatorio en el tejido tumoral. Esta situación inflamatoria tiene un efecto protumoral promoviendo la proliferación, la supervivencia tumoral (NF-Kb induce la expresión de genes de supervivencia y antiapoptosis como BCL2) y la estimulación de la transición epitelio-mesénquima, angiogénesis, migración celular, invasión y metástasis (a través de citoquinas como CXCR4). Así como una inhibición de la respuesta inmune (inducida a través de STAT3) (122,123).

Por lo tanto, el infiltrado inflamatorio tiene un papel doble, por un lado induce una respuesta antitumoral y por otro, promueve la carcinogénesis e inactivación de la respuesta inmune.

Desde principios del siglo XX se han descrito diferentes hipótesis que establecen un vínculo entre el tumor y la respuesta desencadenada a nivel inmune. Los estudios llevados a cabo en ratones con inmunodeficiencias, en los que se comparaba la inmunogenicidad de

los tumores derivados de ratones inmunocompetentes versus tumores inmunodeficientes (124), demuestran el papel de la inmunidad innata y adaptativa en la vigilancia y eliminación en los estadios tempranos del tumor. Los resultados apoyaban por lo tanto la hipótesis de inmunovigilancia del cáncer postulada previamente. En el año 2002 y 2004 Dunn y cols. (125), complementaron esta hipótesis con el papel de la inmunidad innata y específica en lo que se conoce como “inmunoedición del cáncer”. Este nuevo concepto se refiere a un proceso dinámico que refleja la relación entre el tumor y el sistema inmune en tres pasos: eliminación (o el concepto clásico de inmunovigilancia) equilibrio y escape. Es un proceso en el cual la respuesta del sistema inmune está influida por el origen de las células tumorales, la localización anatómica, el modo de transformación tumoral, la respuesta del estromal, el perfil de citoquinas liberadas y la inmunogenicidad inherente(125). Es difícil determinar si la inmunovigilancia de todos los tejidos del cuerpo es similar o varía localmente.

La respuesta innata, la cual se manifiesta como inflamación, es crucial en el inicio de la respuesta inmune adaptativa, por lo que los efectos divergentes de la inflamación y la inmunoedición son una paradoja(121).

La inmunoedición del cáncer representa diferentes fases entre el tumor y el sistema inmune. En una primera fase o eliminación, las células de la inmunidad innata y adaptativa producen una supresión y eliminación del tumor, este proceso representa el clásico concepto de inmunovigilancia. Sin embargo, si esta fase no se completa y el tumor no es erradicado con éxito, las células tumorales entran en una fase de equilibrio o inmunotolerancia variable en el tiempo. Posteriormente se encuentra la fase de escape en la que las células tumorales desarrollan mecanismos de evasión del sistema inmune y conduce la proliferación tumoral (125).

En los últimos años, la investigación en cáncer se ha centrado en el estado inflamatorio inducido por el tumor y la respuesta inmune del paciente. Además, diferentes fármacos dirigidos a “desbloquear” el sistema inmune han sido estudiados en este contexto, la mayoría de ellos aportan un aumento de la supervivencia con un mejor control de la enfermedad, beneficios clínicos y con un buen perfil de tolerancia (126,127).

Este estado proinflamatorio podría tener marcadores que nos permitieran identificar y clasificar a los pacientes en función del riesgo. Las clasificaciones moleculares o firmas genéticas (TCGA) no han sido trasladadas a la práctica diaria. Entre las limitaciones para su implementación destaca el elevado coste de la tecnología necesaria para realizarlas y su interpretación. Por tanto, su utilización se limita al campo de la investigación y ensayos clínicos. Por otro lado, se han descrito diferentes marcadores clínicos de práctica diaria que reflejan el estado inflamatorio o inmune del paciente mediante variaciones de sus niveles en sangre y en función de la respuesta inflamatoria generada en el microambiente tumoral.

1.7.1 Neutrófilos y ratio neutrófilo-linfocito, estado proinflamatorio/estado inmune.

Recientemente, la investigación en cáncer se ha centrado en la respuesta inmune y en el efecto de un estado proinflamatorio. Varios estudios han determinado la relación entre marcadores inflamatorios y pronósticos en cáncer gástrico, así como en otros tumores sólidos (128–130). Diferentes células del sistema inmune participan en esta respuesta, la cual es un proceso dinámico que podría ser modificado mediante tratamientos dirigidos(127).

Existen además de los linfocitos T, diferentes células del sistema inmune participan en este escenario dinámico (células tumorales - sistema inmune del huésped). Los neutrófilos tienen un papel

importante en la carcinogénesis y estudios recientes demuestran su función durante la progresión tumoral. Cómo participan en estos procesos no está completamente identificado. Los neutrófilos son atraídos al microambiente tumoral a través de la vía CXCR2, mediante los ligandos CXCL1, CXCL2 y CXCL5. El paso inicial puede ser promovido por especies de nitrógeno y oxígeno reactivos (ROS, RNS) y factores antiangiogénicos como MMP9, los cuales son liberados por los neutrófilos (131).

Además, los neutrófilos pueden inducir proliferación tumoral a través de la inhibición de la respuesta de los linfocitos T CD8+. Los neutrófilos tienen un papel importante en la cascada metastásica para la extravasación y formación del nicho premetastásico (acumulación de neutrófilos en órganos viscerales antes de la llegada de las células metastásicas)(132,133). Los tumores pueden inducir la producción de citoquinas que promueven la liberación de neutrófilos inmaduros desde la médula ósea. Estos neutrófilos inmaduros podrían tener un fenotipo (N1/N2 polarización) y comportamiento diferente a la de los neutrófilos maduros en la carcinogénesis. Publicaciones recientes han descrito funciones antagónicas de los neutrófilos, pudiendo inhibir el proceso de formación de metástasis. Esta diferencia de función puede ser explicada por las diferentes de subpoblaciones de neutrófilos existentes (134,135).

Por lo tanto el ratio compuesto por los neutrófilos y linfocitos (NLR) hallado mediante la división de la población total de neutrófilos entre la población de linfocitos en sangre periférica, podría representar el balance entre el estado proinflamatorio tumoral y el estado inmune antitumoral. Este marcador ha sido estudiado como un marcador personalizado para la estratificación de pacientes en función del riesgo (132)(129,136–139). Además, el NLR ratio es un análisis de bajo coste, fácilmente extrapolable a la práctica diaria mediante el análisis en sangre periférica. Debido a esto, ha sido varios los estudios

publicados en tumores sólidos y hematológicos que describen su relación con el pronóstico. La mayoría están centrados en una determinación basal; sin embargo, la evolución del tumor es un proceso dinámico que puede variar en función de los tratamientos recibidos, por lo tanto el aumento o descenso del ratio podría aumentar la información a nivel pronóstico e incluso predictivo.

2

Hipótesis y Objetivos

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El cáncer gástrico es la quinta neoplasia más frecuente en la actualidad con una supervivencia a 5 años inferior al 26% en Europa(8). El diagnóstico en estadios avanzados y la alta tasa de recidivas precoces tras un tratamiento radical le confieren al cáncer gástrico una historia natural corta. A pesar de los grandes avances en el conocimiento molecular del cáncer, así como en las estrategias de diagnóstico precoz y la aprobación de nuevos fármacos, en la práctica clínica no disponemos de más herramientas que el TNM, la expresión de HER2 y PDL-1 para seleccionar el tratamiento más adecuado en cáncer gástrico.

Esta alta tasa de recaída incluso en estadios precoces justifica el interés en estudiar marcadores pronósticos de supervivencia y recidiva, así como marcadores de respuesta y resistencia a tratamientos que nos permita un mejor enfoque terapéutico en cáncer gástrico localizado y metastásico.

2.1. COHORTE DE CÁNCER GÁSTRICO LOCALIZADO

2.1.1. Hipótesis.

- El déficit en los niveles séricos de vitamina D medidos al diagnóstico distingue un grupo de pacientes con mayor riesgo de recaída y peor supervivencia global.

- El déficit de vitamina D está relacionado con alteraciones de miRNAs que marcan un pronóstico diferente y resistencia a la quimioterapia.
- Un estado proinflamatorio medido a través de parámetros clínicos y bioquímicos en cáncer gástrico en estadios localizados distingue grupos con una diferente supervivencia y respuesta a tratamiento.

2.1.2 Objetivos.

- Determinar los niveles de vitamina D al diagnóstico y analizar la relación con el evento recaída, el tiempo hasta la recaída, supervivencia global y respuesta a la quimioterapia neoadyuvante.
- Encontrar diferencias en los niveles de expresión de miRNAs entre las muestras pareadas de tejido gástrico tumoral y el tejido normal adyacente al tumor obtenido en el acto quirúrgico.
- Analizar si existe relación entre los niveles de expresión de los miRNAs y los niveles de vitamina D al diagnóstico, así como su relación con la respuesta al tratamiento, el evento recaída y el tiempo hasta la recaída.
- Estratificar en grupos de riesgo a los pacientes a través de parámetros clínicos y bioquímicos.
- Analizar la relación del tiempo hasta la recaída y supervivencia global con otros parámetros inflamatorios y nutricionales: ratio neutrófilo-linfocito basal y diferencial, índice pronóstico de Glasgow (GPS) y el índice pronóstico internacional (PNI).

2.2. COHORTE DE CÁNCER GÁSTRICO METASTÁSICO

2.2.1 Hipótesis.

- Un estado proinflamatorio medido a través de parámetros clínicos y bioquímicos en cáncer gástrico en estadios avanzados distingue grupos con una diferente supervivencia y respuesta a tratamiento.
- El déficit en los niveles séricos de vitamina D medidos al diagnóstico distingue un grupo de pacientes con mayor riesgo de recaída y peor supervivencia global.

2.2.2 Objetivos.

- Determinar los niveles de parámetros inflamatorios y nutricionales: ratio neutrófilo-linfocito basal (bNLR) y diferencial (cNLR), índice pronóstico de Glasgow (GPS) y el índice pronóstico internacional (PNI) y analizar su relación con la supervivencia global.
- Relacionar el ratio neutrófilo-linfocito diferencial y basal con la respuesta a la quimioterapia.
- Examinar los niveles de vitamina D en el momento del diagnóstico y establecer la relación entre este valor y la supervivencia global.
- Estratificar en grupos de riesgo y relacionarlo con respuesta a tratamiento y supervivencia global.

3

Material y Métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Estudio observacional, ambispectivo y multicéntrico con dos cohortes. La cohorte de pacientes de cáncer gástrico localizado y la cohorte de pacientes con cáncer gástrico metastásico.

En la cohorte de cáncer gástrico localizado los pacientes fueron incluidos en el momento del diagnóstico y los datos fueron recogidos de forma prospectiva. En la cohorte de cáncer gástrico metastásico se realizó un estudio ambispectivo con datos retrospectivos y prospectivos. La división en las dos cohortes del estudio se basa en la diferencia en el pronóstico de ambas poblaciones. Además las medidas de efecto que se llevaron a cabo difieren en función del estadio de la enfermedad. En el caso de la enfermedad localizada el evento esperado es la recaída y la respuesta al tratamiento; en el caso de la cohorte metastásica el evento es la supervivencia.

La inclusión de sujetos en la cohorte de cáncer gástrico localizado se inició en Octubre 2015 hasta el Agosto de 2019, el periodo de seguimiento se completó hasta el Octubre de 2021. La fecha de recogida de datos y fin del estudio fue Octubre de 2021.

En la cohorte de cáncer gástrico metastásico, la inclusión de pacientes se inició en Marzo de 2009 hasta Junio de 2019, el periodo de seguimiento se completó hasta Noviembre de 2019. La fecha de recogida de datos y fin del estudio fue Noviembre de 2019.

En el momento del cierre del estudio los sujetos que no presentaron el evento fueron censurados.

Este estudio ha sido realizado en los hospitales del Sistema Público de Salud de Galicia (los cuales se detallan a continuación) y patrocinado dentro del Grupo Gallego de Investigación en Tumores Digestivos (GITuD).

3.2. POBLACIÓN DEL ESTUDIO

La población del estudio corresponde a pacientes de la Comunidad Autónoma de Galicia diagnosticados de cáncer gástrico localizado o metastásico que cumplieran los criterios de inclusión y fueron tratados y seguidos en los hospitales del Sistema Público de Salud de esta comunidad, concretamente en el Complejo Hospitalario Universitario de Pontevedra, Complejo Hospitalario Universitario de Ourense, Hospital Universitario Lucus Augusti y el Complejo Hospitalario Universitario de Ferrol. El estudio está dividido en dos cohortes en base al estadio del cáncer gástrico al diagnóstico.

El seguimiento de los pacientes en la cohorte de cáncer gástrico localizado, se realizó con visitas previas a cada ciclo de quimioterapia, previamente y posteriormente a la cirugía y a continuación en el seguimiento habitual de consultas con controles radiológicos, bioquímicos y clínicos cada 3-4 meses. En la cohorte de cáncer gástrico metastásico, el seguimiento se realizó con consultas previas a cada ciclo de quimioterapia con periodicidad dependiente del esquema utilizado y con controles radiológicos, bioquímicos y clínicos cada tres meses hasta el fin del estudio.

En el periodo del estudio fueron seleccionados un total de 279 pacientes, de los cuales cuarenta y nueve no recibieron un mínimo de dos ciclos de quimioterapia en estadio metastásico y se realizó tratamiento exclusivamente sintomático (figura 14); además doce pacientes no recibieron un mínimo de dos ciclos de quimioterapia en

estadio localizado con tratamiento perioperatorio por edad, estado general o comorbilidades. En el caso de veinticinco pacientes presentaban datos bioquímicos incompletos o historia inaccesible.

Finalmente, se analizaron un total de 193 pacientes, setenta y siete en estadio localizado y ciento dieciséis en estadio metastásico.

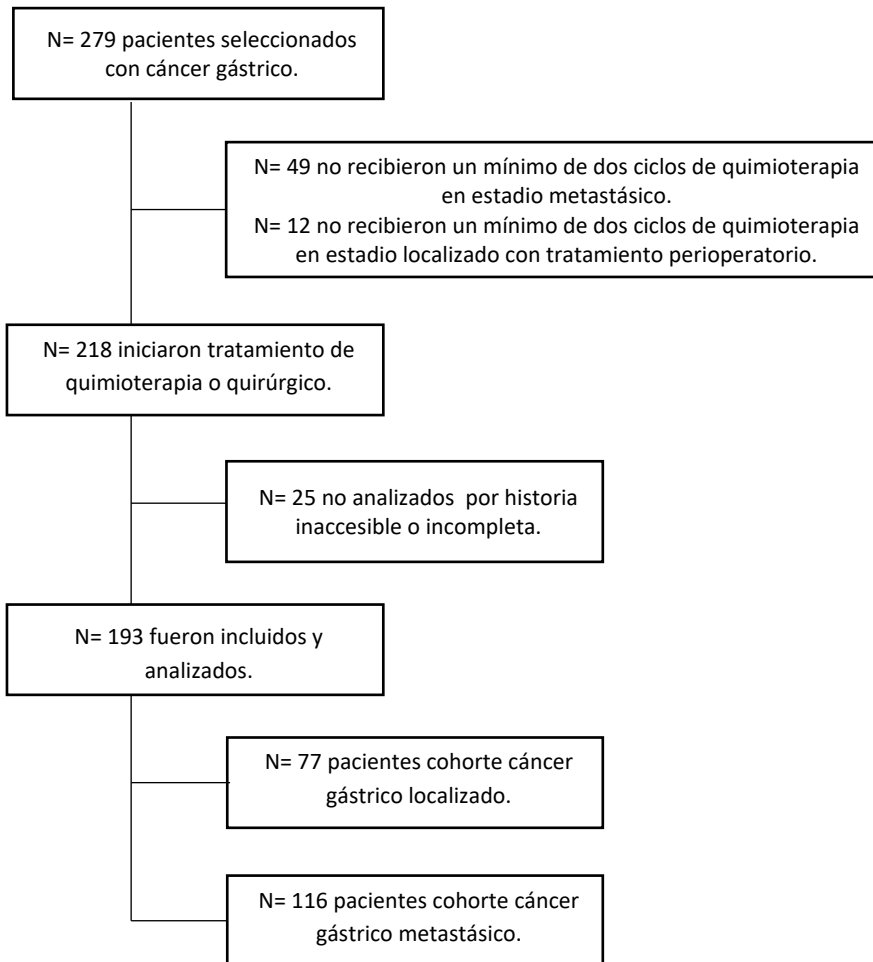


Figura 14. Diagrama de flujo.

3.2.1 Criterios de inclusión globales:

- Pacientes mayores de 18 años diagnosticados de cáncer gástrico mediante confirmación histológica.
- Los pacientes deben haber leído y firmado el consentimiento informado (anexo I) en el que se autoriza el acceso a su historia clínica a través de IANUS o en formato papel.

3.2.2 Criterios de inclusión específicos en la cohorte localizada:

- Pacientes sin evidencia de enfermedad metastásica en los estudios de extensión.
- Pacientes diagnosticados de cáncer gástrico localizado, es decir, estadio I, II y III según la clasificación TNM 8ª edición.
- Pacientes propuestos para tratamiento con intención curativa, bien con tratamiento quirúrgico de entrada o bien que hayan recibido quimioterapia perioperatoria con al menos dos ciclos de tratamiento previo a la intervención.
- Pacientes de los que se disponga de los datos analíticos, anatomopatológicos, moleculares, radiológicos y clínicos necesarios para el estudio.

3.2.3 Criterios de exclusión específicos en la cohorte localizada:

- Pacientes que no hayan completado al menos dos ciclos de tratamiento de quimioterapia en el grupo de tratamiento perioperatorio.
- Pacientes de los que no dispongamos de datos analíticos, anatomopatológicos, moleculares, radiológicos y clínicos necesarios para el estudio.

- Diagnóstico no confirmado histológicamente.
- Que rechacen la participación en el estudio o sin seguimiento posterior.
- Pacientes en curso de tratamiento con corticoides a altas dosis o con una infección activa en el momento de la inclusión en el estudio.
- Pacientes en los que se objetivó enfermedad metastásica en los estudios de extensión.

3.2.3 Criterios de inclusión específicos en la cohorte metastásica:

- Pacientes con enfermedad a distancia o metastásica, estadio IV según la clasificación TNM con lesiones medibles radiológicamente.
- Pacientes de los que se disponga de los datos bioquímicos, anatomopatológicos, moleculares, radiológicos y clínicos necesarios para el estudio.
- Pacientes con una supervivencia esperada mayor o igual a 3 meses y con planificación de recibir al menos dos ciclos de quimioterapia.

3.2.4 Criterios de exclusión específicos en la cohorte metastásica:

- Diagnóstico no confirmado histológicamente.
- Que rechacen la participación en el estudio o sin seguimiento posterior.
- Paciente en curso de tratamiento con corticoides a altas dosis o con una infección activa en el momento de la inclusión en el estudio.

- Pacientes de los que no dispongamos de datos analíticos, anatomopatológicos, moleculares, radiológicos y clínicos necesarios para el estudio.
 - Pacientes que finalmente no recibieron al menos dos ciclos de quimioterapia o en los que el tratamiento fue exclusivamente sintomático: radioterapia hemostática o analgésica, tratamiento de soporte nutricional o aquel dirigido a paliar exclusivamente sintomatología secundaria.

3.3. RECOGIDA Y FUENTES DE DATOS

El cribado de los pacientes y la inclusión, así como la obtención del consentimiento informado se realizaron en la consulta de los servicios de Oncología de cada hospital. Los datos se obtuvieron del programa público de salud, IANUS, mediante el acceso codificado y con el consentimiento de cada paciente. Este programa recoge el historial médico en formato electrónico de cada usuario.

Las variables incluidas en este estudio son las siguientes:

- Sexo definido como hombre o mujer.
- Edad definida como el intervalo desde la fecha de nacimiento hasta el momento del diagnóstico.
- Edad categorizada: mayores y menores de 65 años.
- Comorbilidad definida como presencia de más de uno de los siguientes antecedentes personales: diabetes mellitus mal controlada, aclaramiento renal menor a 30ml/min, fibrilación auricular o cardiopatía estructural con FEVI<55%.
- Localización de la enfermedad: tumor localizado en la unión gastroesofágica, cuerpo o antro gástrico.

- TNM al diagnóstico según la 8ª edición: estadio tumoral basado en el tamaño tumoral (T), afectación ganglionar (N) y afectación metastásica (M).
- Estadíaje tras neoadyuvancia: ypTNM en la intervención quirúrgica: estadio tumoral basado en el tamaño tumoral (T), afectación ganglionar (N) y afectación metastásica (M) en el acto quirúrgico tras tratamiento de quimioterapia preoperatoria.
- Estado general clínico o Performance Status medido mediante la escala ECOG, la cual define el estado general del paciente mediante una puntuación del uno al cuatro:

Tabla 2. Descripción de la escala ECOG.

Puntuación escala	Descripción de la puntuación
0	Asintomático. Actividad normal sin restricción ni ayuda.
1	Presenta síntomas que le impiden desempeñar trabajos arduos pero realiza trabajos diarios ligeros. Permanece en cama sólo durante las horas de sueño.
2	No puede desempeñar trabajos diarios. Presenta síntomas que le obligan a permanecer en cama durante menos del 50% de las horas del día. Autónomo para sus necesidades personales.
3	Precisa estar en cama más de la mitad del día. Necesita ayuda para alguna de sus necesidades personales, por ejemplo, vestirse.
4	Permanece en cama el 100% del día. Necesita ayuda para todas las necesidades personales, por ejemplo, alimentarse.

- Grado de diferenciación: se define como el nivel en el que se encuentra diferenciado el tumor, bien, moderadamente o pobremente diferenciado.
- Histología: definido como adenocarcinoma de subtipo intestinal, tipo difuso o mixto.

- Invasión linfovascular: presencia o ausencia de invasión linfovascular en el tumor.
- Invasión perineural: presencia o ausencia de invasión perineural en el tumor.
- Tejido tumoral: tejido formado por células tumorales.
- Tejido normal adyacente al tumor (NAT): tejido histológicamente no tumoral adyacente al tejido tumoral.
- Tratamiento inicial del tumor en la cohorte de cáncer gástrico localizado: quirúrgico o quimioterápico.
- Esquema perioperatorio: en pacientes sometidos a tratamiento de quimioterapia perioperatoria reciben un esquema de quimioterapia FLOT (5Fluorouracilo, Leucovorin, Oxaliplatino y Docetaxel), ECX (Cisplatino, antraciclina, capecitabina) u otros esquemas.
- Déficit de expresión de proteínas reparadoras: definido como la pérdida de expresión de al menos una de las proteínas reparadoras estudiadas mediante técnicas de inmunohistoquímica: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2.
- Niveles de expresión miRNAs realizados en muestras pareadas de tejido tumoral de cáncer gástrico y tejido normal adyacente al tumor en la cohorte localizada.
- Determinación de HER2: expresión por inmunohistoquímica de la proteína HER2 según criterios del estudio TOGA en la cohorte de cáncer gástrico metastásico (33).
- Receptor de vitamina D: expresión por inmunohistoquímica definido a través la intensidad de tinción 1+ /2+/3+.
- Déficit grave de vitamina D: valor categorizado de vitamina D inferior a 10 ng/mL.

- Insuficiencia de vitamina D: valor categorizado de vitamina D inferior a 30 ng/mL.
- Albúmina: cifra sérica de albúmina, categorizada como menor o mayor a 3.5 g/dL.
- Antígeno Carcinoembrionario o CEA: niveles CEA en sangre, categorizado como mayor o menor de 5 ng/mL.
- Proteína C reactiva o PCR: niveles de PCR en sangre, categorizada como elevación de la proteína C reactiva sérica >1.00 mg/L o normal con valores inferiores a 1.00 mg/L.
- Lactato deshidrogenasa o LDH: niveles de PCR en sangre, categorizada como mayor o menor de 420 UI/l.
- Respuesta completa (RC): Variable de respuesta definida según criterios RECIST 1.1 como desaparición de lesiones diana.
- Respuesta parcial (RP): Variable de respuesta definida según criterios RECIST 1.1 como reducción de al menos un 30% en la suma del diámetro mayor de las lesiones diana tomando como referencia la medida basal, en ausencia de aparición de nuevas lesiones.
- Enfermedad estable (EE): Variable de respuesta definida según criterios RECIST 1.1 como aquellas lesiones que no cumplen una reducción suficiente para calificarlo como respuesta ni un aumento para clasificarlo como progresión.
- Progresión de la enfermedad (PD): variable de respuesta definida según criterios RECIST 1.1 como el aumento $\geq 20\%$ de la suma del diámetro de todas las lesiones diana tomando como referencia la suma más pequeña de diámetros desde el inicio del tratamiento o aparición de una o más lesiones nuevas.

- Tiempo hasta la recaída (TTR) fue definido como el tiempo desde el inicio de tratamiento de quimioterapia neoadyuvante o la cirugía hasta la aparición de enfermedad objetivada radiológica o histológicamente en el caso de la cohorte de cáncer gástrico localizado.
- Supervivencia global: definida como el tiempo desde el inicio de tratamiento de quimioterapia neoadyuvante o cirugía en la cohorte localizada hasta la fecha de fallecimiento de paciente o fecha de último contacto. En la cohorte de cáncer gástrico metastásico fue definida como el tiempo desde el inicio quimioterapia hasta la fecha de fallecimiento de paciente o fecha de último contacto.
- Grado de respuesta a tratamiento neoadyuvante, definido como respuesta radiológica tumoral cuando existe una reducción tumoral tras tratamiento de quimioterapia previa a la cirugía o no respuesta cuando presenta estabilidad o aumento tumoral.
- Ratio neutrófilo-linfocito basal o bNLR: definido como el ratio entre la cifra de neutrófilos y linfocitos mayor o menor a 3.96 al inicio del tratamiento.
- Ratio plaqueta-linfocito o PLR: definido como el ratio entre plaquetas y linfocitos mayor o menor a 150.
- Índice pronóstico nutricional o PNI: calculado mediante la fórmula: $PNI = (10 \times \text{albúmina sérica g/dL}) + (0.005 \times \text{linfocitos/uL})$, se considera un PNI elevado aquel mayor a 43.5.
- Glasgow Prognostic Score o GPS en el que se categoriza a los pacientes en función a la alteración en los niveles de dos parámetros: albúmina y proteína C reactiva sérica. La alteración de ambos indica dos puntos, la alteración de uno de los parámetros indica un punto, y la ausencia de alteración indica cero puntos tal y como se indica en la tabla 3.

Tabla 3. Definición de la puntuación del Glasgow Prognostic Score.

albúmina <3.5 g/dL y PCR >1	2 punto
albúmina <3.5 g/dL o PCR >1	1 punto
albúmina >3.5 g/dL o PCR <1	0 puntos

- Ratio neutrófilo-linfocito diferencial (cNLR): se define como la variación del ratio entre la determinación basal y tras dos ciclos (tabla 4). Cuando esta variación ocurre hacia un incremento del ratio lo definimos como NLR diferencial positivo, en el caso de que ocurra un descenso del mismo lo definimos como NLR diferencial negativo. En el caso de ausencia de variación entre la determinación basal y tras la quimioterapia, se define como NLR neutro.

Tabla 4. Definición del ratio neutrófilo-linfocito diferencial.

NLR diferencial (cNLR)	Cálculo:
Aumento o cNLR +	NLR tras 2 ciclos mayor a NLR basal
Descenso o cNLR -	NLR tras 2 ciclos menor a NLR basal

- DScore: se define como la combinación del valor del ratio basal junto con la elevación o descenso de este tras dos ciclos de tratamiento (tabla 5):

Tabla 5. Definición de la escala de combinación de ratios.

NLR basal < 3.96 y desciende (cNLR-)	1 punto: grupo A
NLR basal > 3.96 o aumento (cNLR+)	2 puntos: grupo B
NLR basal > 3.96 y asciende (cNLR+)	3 punto: grupo C

- Escala PALV: basado en las variables relacionadas con parámetros nutricionales, inflamatorios y situación clínica: albúmina, proteína C reactiva, vitamina D y performance status o ECOG, otorgando un punto a la alteración de cada una de ellas. Posteriormente, el grupo A con cero o un parámetros alterados, grupo B con dos o tres parámetros alterados y grupo C con todos los parámetros con valores anómalos.

3.4. TRATAMIENTO DE MUESTRAS ANALÍTICAS DE SANGRE Y ANATOMOPATOLÓGICO

Este estudio analiza los resultados de intervenciones realizadas de rutina en cualquier paciente en la misma situación clínica. Los estudios bioquímicos y radiológicos recogidos forman parte de la actitud diagnóstica habitual.

Las variables extraídas del hemograma y bioquímica del análisis sangre se realizaron de forma previa al inicio del tratamiento, tras la intervención y en la recaída en la cohorte de cáncer gástrico. La extracción de sangre en la cohorte metastásica se realizó previamente al inicio del tratamiento de quimioterapia, tras la recuperación hematológica después de dos ciclos de tratamiento y a la recaída. Estos parámetros fueron medidos en analítica de sangre según los valores de referencia del laboratorio. En el caso de la vitamina D el análisis se realizó en suero a través de la determinación bioquímica de 25-OH vitamina D (D2+D3) en el laboratorio mediante inmunoensayo competitivo de detección quimioluminiscente (LIAISON). Los niveles de referencia se describen en la página 105.

Las variables radiológicas recogidas fueron el TNM según la AJCC medido en la tomografía computarizada (TC) al diagnóstico y en el momento de la recaída o progresión. Las reevaluaciones

mediante TC fueron realizadas cada tres meses. El informe radiológico fue realizado en el Servicio de Radiología de cada centro.

Las muestras histológicas quirúrgicas era muestras parafinadas de tejido tumoral y tejido normal adyacente al tumor pareadas. En un primer paso, se realizó una selección de los bloques tumorales adecuados para realizar las técnicas de inmunohistoquímica. Se seleccionaron aquellas muestras con mayor componente tumoral y en el tejido pareado sano aquellas con mejor calidad tisular, evitando zonas con hemorragia o necrosis. Estas muestras fueron codificadas mediante un número de registro. En las muestras de tejido gástrico tumoral en parafina se realizó el estudio inmunohistoquímico del estado de expresión de las proteínas reparadoras y la determinación de la proteína HER2 en el servicio de Anatomía Patológica de cada centro participante en el estudio como parte de la rutina asistencial. La evaluación de expresión de HER2 se realizó mediante el Kit Herceptest™ (Dako, Carpinteria, California USA) aprobado para la determinación por la FDA. Los casos fueron divididos en 4 grupos en función de la extensión e intensidad de la expresión: 0 como la ausencia de tinción o positividad en la tinción en <10% de las células, 1+ se corresponde con una tinción débil de membrana, casi imperceptible en al menos el 10% de las células, 2+ positividad moderada de membrana moderada en al menos el 10% de las células, 3+ es corresponde con la tinción intensa o completa de membrana en > 10% de las células. Los casos con determinación 0 o +1 fueron considerados negativos, aquellos casos con 2+ como equívocos y se consideraron positivos aquellos casos con tinción 3+.

El análisis inmunohistoquímico de las proteínas reparadoras se realizó en muestras de tejido gástrico tumoral en parafina. Se analizaron cuatro proteínas reparadoras según el protocolo establecido MLH1, PMS2, MSH2 y MSH6. Se utilizó el anticuerpo MLH1 clon ES05, el anticuerpo PMS2 clon EP51, el anticuerpo MSH2 clon 79H11 y el anticuerpo MSH6 clon EP49 (Leica Biosystems,

Barcelona, Spain) el procesador utilizado fue Leica ASP6025 (Leica Biosystems, Barcelona, Spain). La pérdida completa de expresión de alguna de las cuatro proteínas fue catalogado como muestra con déficit de proteínas reparadoras.

El análisis inmunohistoquímico del receptor de vitamina D fue realizado en muestras de tejido gástrico tumoral y pareado sano ambos fijados en parafina en el servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. En el análisis se utilizó el anticuerpo monoclonal D-6 (sc-13133, Santa Cruz Bio-Technology). En función del nivel de tinción nuclear y de membrana de las células tumorales se otorgó la siguiente puntuación: 1+ aquellas muestras con un nivel de tinción débil, 2+ con un nivel de tinción moderado y 3+ en las muestras con una tinción intensa celular.

Se realizó una selección de miRNAs en base a su posible relación con la vitamina D previamente descritos en la bibliografía. Las muestras fueron enviadas al laboratorio del Servicio de Anatomía Patológica de la Universidad de Barcelona de forma codificada y en transporte especializado para la adecuada conservación de las mismas.

El RNA total fue purificado de muestras tumorales fijadas en parafina según el método descrito (140). El RNA total fue extraído utilizando RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) según protocolo del mismo.

La determinación de los miRNAs miR-22, miR-125b, miR-143, miR-145, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-181c-5p, miR-181d-5p, miR-498, miR-532, miR-99b-3p, miR-106b se realizó utilizando la prueba comercial (TaqMan MicroRNA assays, ThermoFisher Scientific) en un sistema Step One Real-Time PCR (ThermoFisher Scientific).

Los controles negativos correspondientes fueron realizados en cada reacción. La cuantificación relativa fue calculada utilizando $2^{-\Delta\Delta C_t}$. El RNU6B se usó como normalizador y la media de los niveles de miRNA en tejido normal como calibrador.

Las medidas adoptadas para afrontar fuentes potenciales de sesgo fueron las siguientes: la medición de la vitamina fue realizada al diagnóstico ya que los niveles de este parámetro podrían verse alterados por la suplementación por vía oral a lo largo del tratamiento. En la cohorte de cáncer gástrico metastásico el tratamiento concomitante con corticoides o con infección activa en el momento de la determinación podría alterar el valor de los neutrófilos, por este motivo dichos pacientes fueron excluidos del estudio. De la misma forma que el tratamiento de quimioterapia puede disminuir la cifra de neutrófilos como efecto secundario, por lo que la determinación de los mismos se realizó tras la recuperación hematológica.

3.5. TAMAÑO MUESTRAL

El tamaño muestral ha sido calculado teniendo en cuenta los datos de prevalencia, incidencia y mortalidad descritos por el Observatorio de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) en Galicia y la SEER(14). El error tipo I asumido para dicho cálculo ha sido del 5% con un nivel de significación estadística del 95%. El poder estadístico ha sido del 80%. Teniendo en cuenta una tasa de mortalidad del 12% y una tasa de incidencia anual 19%, el tamaño muestral estimado fue de 148 pacientes. Si asumimos un 5% de porcentaje de pérdidas el tamaño muestral será de 156.

En el número estimado de sujetos a incluir en el estudio debemos tener en cuenta las limitaciones de la propia enfermedad, esto es, un porcentaje de estos pacientes no llegará recibir tratamiento de quimioterapia por su situación clínica, por sus antecedentes personales o incluso por una mala tolerancia la tratamiento que implicará una suspensión del mismo. Por lo tanto, el número real de pacientes con criterios de inclusión para analizar en este trabajo difiere con respecto al número estimado teórico por la propia evolución y limitaciones de la patología.

3.6. MÉTODO ESTADÍSTICO

Las variables fueron definidas y categorizadas según los rangos de normalidad descritos en la bibliografía o aportados por el laboratorio en el caso de variables analíticas. El punto de corte del ratio neutrófilo-linfocito basal o b-NLR fue estimado mediante las curvas ROC. Las curvas ROC fueron utilizadas para identificar miRNAs que clasificasen a los pacientes acorde con el evento recaída.

Inicialmente, se realizó un análisis descriptivo de las variables cualitativas a través de la determinación de frecuencias y porcentajes; así como un análisis descriptivo de las variables cuantitativas del estudio mediante el determinación de medias, medianas y desviación estándar. La comparación entre variables cualitativas independientes se realizó a través de test Chi-cuadrado o test de Fisher en función del tamaño de los subgrupos. En el caso de las variables cuantitativas, se realizó el test t-student para la comparación de dos grupos con distribución normal, en los casos que no siguiesen una distribución no normal se utilizó el test de Mann–Whitney. En el análisis comparativo de más de dos grupos con distribución normal se utilizó el test ANOVA y el test de Kruskal-Wallis en aquellos con una distribución no normal. La correlación de Pearson fue utilizada para cuantificar la asociación estadística entre dos variables continuas con distribución normal, en caso de no seguir una distribución normal fue utilizada la correlación de Spearman.

El tiempo hasta la recaída (TTR) fue calculado como el intervalo de tiempo entre el inicio de tratamiento y la recaída de la enfermedad o fecha del último contacto. La supervivencia global (SG) fue calculada como el tiempo transcurrido desde el inicio del primer tratamiento hasta el fallecimiento por cualquier causa o fecha del último contacto.

Un total del veinticinco pacientes presentaron datos incompletos para el seguimiento y análisis de la supervivencia global o tiempo hasta la recaída debido a la imposibilidad de acceso a la historia clínica por lo que excluyeron del estudio. Las características de estos pacientes en cuanto a los criterios de inclusión y exclusión no diferían del resto pacientes que fueron analizados.

Los análisis de supervivencia fueron realizados utilizando el método de Kaplan-Meier y comparadas a través del test long-rank.

El punto de corte óptimo para el análisis del impacto de los miRNAs analizados en tiempo hasta la recaída y supervivencia global fue identificado utilizando X-Tile v.3.6.1 (Yale University 2003-2005) (141) y validado por el test de Kaplan-Meier.

Para el análisis multivariante se utilizó el modelo de regresión de Cox, método enter, incluyéndose en este análisis las variables que habían mostrado tendencia a la significación estadística en el análisis univariante. Las variables independientes introducidas en el modelo fueron categorizadas y se tomó como categoría de referencia la última introducida. Los resultados se expresaron mediante el hazard ratio (HR) y su intervalo de confianza al 95% (IC 95%). Se definió como estadísticamente significativa una $p < 0.05$.

El análisis estadístico fue realizado utilizando SPSS Statistics v26 (IBM), SPSS v20.0 (IBM), GraphPad Prism 9.1.0 and R v4.1.1 (RStudio 2021.09.0).

3.7. ASPECTOS ÉTICO-LEGALES

El estudio no supone ningún perjuicio ni beneficio para el paciente, ya que la recogida de datos se produce después y en el protocolo del acto asistencial. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de Pontevedra-Vigo-Ourense y por la

Gerencia de Xestión Integrada Pontevedra-Salnés con fecha 22 de Noviembre de 2016 con código de registro 2016/324. Posteriormente se realizaron dos modificaciones de protocolo para ampliar el número de centros participantes en el estudio, ambas fueron aprobadas por el Comité de Ética de la Investigación de Pontevedra-Vigo-Ourense. La primera de ellas fue aprobada con fecha 21 de marzo de 2017 y la segunda con fecha 20 de marzo de 2018.

El estudio cumple con la Declaración de Helsinki y con la Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica. Se respetará la voluntad del paciente y sus derechos asistenciales conforme a la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica; y la ORDEN SCO/256/2007, de 5 de febrero, por la que se establecen los principios y las directivas detalladas de buena práctica clínica y los requisitos para autorizar la fabricación o importación de medicamentos en investigación de uso humano.

Puesto que en el estudio se empleó la historia clínica del paciente en formato electrónico IANUS, se realizó con las condiciones recogidas en la Ley 3/2005, de 7 de marzo, modificación de la Ley 3/2001, del 28 de mayo, reguladora del consentimiento informado y de la historia clínica de los pacientes. Así como según la ley de protección de datos de 3/2018. Además se entregó a cada paciente un consentimiento informado cuyo contenido se describe en el Anexo 1.

4

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS EN LA COHORTE DE CÁNCER GÁSTRICO LOCALIZADO

En el análisis descriptivo de los 77 pacientes incluidos en la cohorte de cáncer gástrico localizado observamos que la mediana de edad fue de 73 años (36-90), y el 33.8% fueron mujeres. En lo que refiere al estado general, el 73.6% presentaron un Performance Status o ECOG de 0 o 1 y el 63.6% no tenían comorbilidades relevantes. En el estudio fueron incluidos tres pacientes con un performance status o ECOG de 3 los cuales no fueron candidatos a quimioterapia de entrada por estado general y se realizó cirugía. En cuanto a las características del tumor el 50% se hallaban en el cuerpo gástrico presentando un tamaño T3-4 según la clasificación TNM en un 80.5% de los casos, la afectación ganglionar N0-1 fue del 70.1% y el grado de diferenciación más frecuente fue el indiferenciado en un 54.5% de los pacientes (tabla 6).

El tratamiento con quimioterapia previa y posterior a la intervención, esquema perioperatorio, fue realizado en un 59.7% de los pacientes; por otra parte, un 40.3% fueron intervenidos de entrada.

Entre los pacientes tratados con un esquema perioperatorio, un 41.7% recibieron quimioterapia con ECX, el esquema FLOT fue administrado en un 37.0% y un 21.7% restante, recibieron otros esquemas de tratamiento. En este grupo, un total de tres pacientes no fueron finalmente reseccables por lo que continuaron con tratamiento quimioterápico. Además, un 30.0% no finalizaron la parte de

quimioterapia tras la cirugía. En el caso de pacientes intervenidos de entrada, un 64.0% no recibieron tratamiento adyuvante.

Entre los pacientes intervenidos se practicó una gastrectomía total en el 52.6% y fue subtotal en el 43.5% de los casos.

Las características quirúrgicas más frecuentes fueron la resección completa o R0 en el 87.0% de los casos y la linfadenectomía D2 en el 80.5% (Tabla 6).

Histológicamente, la mitad de los pacientes incluidos presentaron un subtipo difuso, siendo el subtipo intestinal menos prevalente en un 38.4% de los pacientes, además pudimos observar en un 11.0% de pacientes una histología mixta. La invasión linfovascular estaba presente en el 37.7% y la invasión perineural en el 29.9% de los casos.

El receptor de vitamina D estudiado mediante inmunohistoquímica presentó expresión conservada 1+ en un paciente, 2+ en cinco pacientes y 3+ en doce pacientes. En las siguientes imágenes podemos observar el patrón de tinción (figura 15-17).

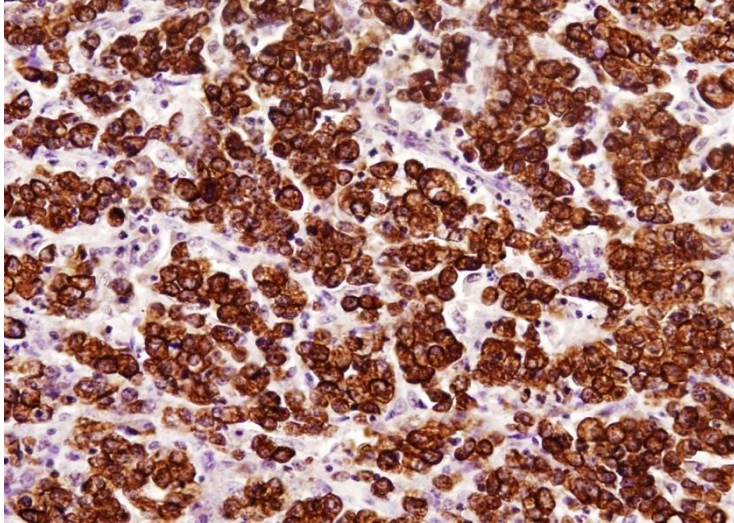


Figura 15. Microfotografía de adenocarcinoma gástrico localizado con una inmunotinción nuclear y citoplasmática correspondiente a receptor de vitamina D (VDR) VDR 3+ (Aumento original, 20x).

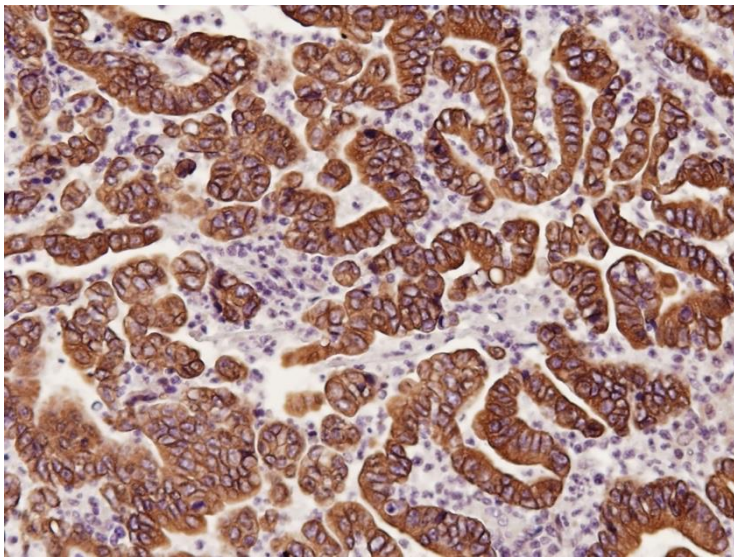


Figura 16. Adenocarcinoma gástrico localizado con positividad moderada para receptor de vitamina D (VDR) 2+. Aumento original, 20x.

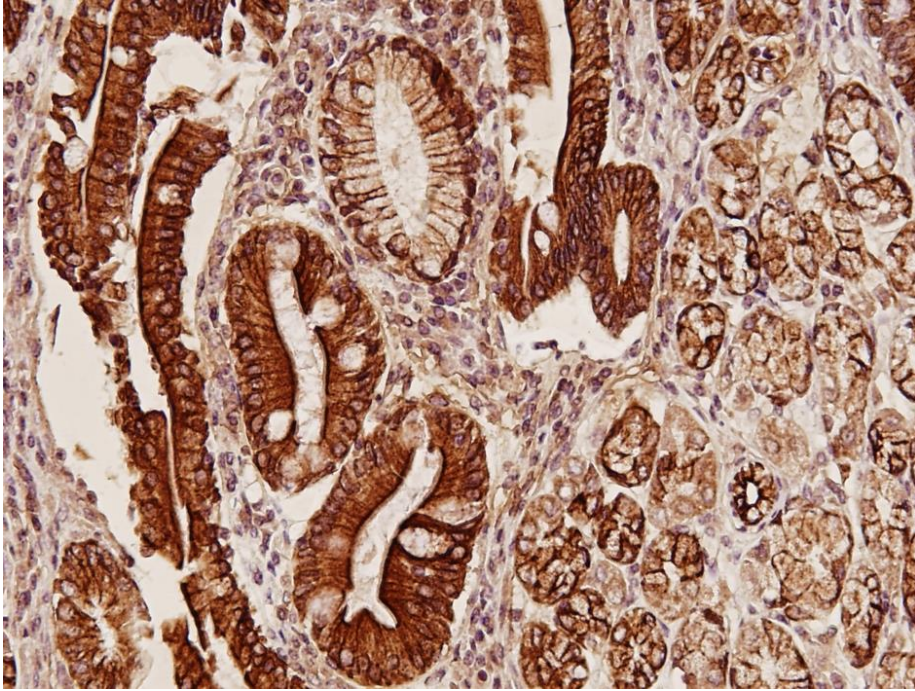


Figura 17. Tejido normal de mucosa gástrica (derecha) y metaplasia intestinal (izquierda). Se observa que la expresión del receptor de vitamina D es mucho más intensa en la metaplasia que en el tejido normal. Aumento original, 20x.

Se analizó sobreexpresión HER2 en dieciocho pacientes, seis pacientes fueron positivos, siendo doce negativos para dicha mutación. La pérdida de expresión de proteínas reparadoras estaba presente en un paciente de los 36 analizados.

Destaca la alta frecuencia de insuficiencia severa de vitamina D (medida a nivel sérico) en un 31.2% de los pacientes, así como un déficit de albúmina en el 22.1% de los casos. El índice pronóstico nutricional (PNI) presentó un valor inferior a 43.5 en un 22.1% de los pacientes y el antígeno carcinoembrionario se encontraba elevado en un 15.6%. En la escala de GPS, el 10.4% presentaron una puntuación máxima de dos y el 53.2% de cero.

En la evolución de la enfermedad el 55.0% de los pacientes habían presentado el evento recaída en el momento de finalización del estudio, siendo la recaída a distancia un 37.7% de los pacientes. El evento fallecimiento se produjo en el 55% de los casos. La mediana de tiempo de seguimiento del estudio fue de 37.7 meses (5.3-71.9 meses).

Tabla 6. Características clínico-patológicas de la cohorte de cáncer gástrico localizado.

Características clínico-patológicas (n=77)	Número de pacientes (%)
Edad (33-86 años)	
≤ 65	19 (24.7%)
> 65	58 (75.3%)
Sexo	
Hombre	51 (66.2%)
Mujer	26 (33.8%)
Comorbilidad	
Sí	28 (36.4%)
No	49 (63.6%)
Performance Status	
0-1	56 (73.6%)
2-3	18 (23.3%)
Desconocido	3 (3.1%)
Localización tumor	
UGE	14 (18.2%)
Cuerpo	39 (50.6%)
Antro	24 (31.2%)
Tamaño del tumor (T)	
T1-2	11 (14.3%)
T3-4	62 (80.5%)
Desconocido	4 (5.2%)
Afectación ganglionar (N)	
N0-1	54 (70.1%)
N2-3	16 (20.8%)
Desconocido	7 (9.1%)

Características clínico-patológicas (n=77)	Número de pacientes (%)
Histología	
Difuso	37 (50.7%)
Intestinal	28 (38.4%)
Mixto	8 (11.0%)
Desconocido	4 (5.2%)
Grado diferenciación	
Bien diferenciado	3 (3.9%)
Moderado	26 (33.8%)
Indiferenciado	42 (54.5%)
Desconocido	6 (7.8%)
Tratamiento inicial	
Perioperatorio	46 (59.7%)
Quirúrgico	31 (40.3%)
Esquema perioperatorio	
ECX	19 (41.7%)
FLOT	17 (37.0%)
Otros	10 (21.7%)
Tipo de intervención	
Total	40 (52.6%)
Subtotal	34 (43.5%)
Irreseccable	3 (3.9%)
Nivel de resección	
R0	67 (87.0%)
R1	4 (5.2%)
Desconocido	6 (7.8%)
Linfadenectomía	
D1	10 (13.0%)
D2	62 (80.5%)
Desconocido	5 (6.5%)
Invasión linfovascular	
Sí	29 (37.7%)
No	25 (32.5%)
Desconocido	23 (29.9%)

Características clínico-patológicas (n=77)	Número de pacientes (%)
Invasión perineural	
Sí	23 (29.9%)
No	30 (39.0%)
Desconocido	24 (31.2%)
Grado regresión Mandard	
TRG 1-2	8 (10.4%)
TRG 3	8 (10.4%)
TRG 4-5	2 (2.6%)
Desconocido	59 (76.6%)
Her 2	
Mutado	6 (7.8%)
No mutado	12 (15.6%)
Desconocido	59 (76.6%)
Ratio neutrófilo-linfocito basal (0.15-10.30)	
≤ 3.96	64 (83.1%)
> 3.96	12 (15.6%)
Desconocido	1 (1.3%)
Ratio plaquetas-linfocito (11.59-460)	
≤ 150	48 (62.3%)
150-300	20 (25.0%)
> 300	9 (11.8%)
NLR diferencial (cNLR)	
Descenso	48 (62.3%)
Ascenso	25 (32.5%)
Desconocido	4 (5.2%)
DScore	
A: NLR ≤ 3.96 y cNLR desciende	38 (49.4%)
B: NLR > 3.96 o cNLR asciende	33 (42.9%)
C: NLR > 3.96 y cNLR asciende	2 (2.6%)
Desconocido	4 (5.2%)

Características clínico-patológicas (n=77)	Número de pacientes (%)
Glasgow Prognostic Score	
0	41 (53.2%)
1	19 (24.7%)
2	8 (10.4%)
Desconocido	9 (11.7%)
Índice Pronóstico Nutricional (28.5-175)	
≤ 43.5	17 (22.1%)
> 43.5	55 (71.4%)
Desconocido	5 (6.5%)
Antígeno Carcinoembrionario (0.4-72 ng/mL)	
≤ 5	50 (64.9%)
> 5	12 (15.6%)
Desconocido	15 (19.5%)
Proteína C reactiva (0.01-47 mg/L)	
≤ 1	49 (63.6%)
>1	23 (29.9%)
Desconocido	5 (6.5%)
Nivel de albúmina (2.4-4.6 g/dL)	
< 3.5	17 (22.1%)
≥ 3.5	55 (71.4%)
Desconocido	5 (6.5%)
Nivel de LDH (139-558 UI/l)	
≤ 420	54 (70.1%)
> 420	7 (9.1%)
Desconocido	16 (20.8%)
Localización de recaída	
Local	5 (6.5%)
A distancia	29 (37.7%)
Ambas	9 (11.7%)
Desconocido	34 (44.2%)
Proteínas reparadoras	
Expresa	35 (45.5%)
No expresa	1 (1.3%)
Desconocido	41 (53.2%)

Características clínico-patológicas (n=77)	Número de pacientes (%)
Niveles de vitamina D (5 -50 ng/mL)	
≤ 10	24 (31.2%)
> 10	51 (66.2%)
Desconocido	2 (2.6%)
PALV score	
PALV A (bajo riesgo)	47 (61.0%)
PALV B (moderado riesgo)	13 (16.9%)
PALV C (alto riesgo)	4 (5.2%)
Desconocido	13 (16.9%)

UGE: unión gastroesofágica; NLR: ratio neutrófilo-linfocito; LDH: lactato deshidrogenasa. ECX: epirrubicina, cisplatino, capecitabina, FLOT: 5fluorouracilo, oxalipaltino, docetaxel.

4.1.1 Resultados en tiempo hasta la recaída en la cohorte de cáncer gástrico localizado.

En el análisis univariante se observó que los pacientes con respuesta al tratamiento neoadyuvante presentaron un mayor tiempo hasta la recaída estadísticamente significativo frente a los paciente que no respondieron al tratamiento neoadyuvante (NA vs. 12.84 meses) $p=0.004$ (tabla 7).

Observamos el evento recaída en 43 pacientes de los 77 analizados.

El performance status o ECOG fue la variable relacionada con las características del paciente que presentó un mayor valor pronóstico de forma estadísticamente significativa, así el tiempo hasta la recaída fue de 45.89 meses entre los pacientes con un ECOG de 0 ó 1 frente a 8.27 meses en los pacientes con ECOG 2 o 3. La edad, sexo o comorbilidad no mostraron diferencias significativas, aunque sí se observó una tendencia positiva en aquellos menores de sesenta y cinco años, varones y sin comorbilidad.

En el análisis objetivamos un menor tiempo hasta la recaída en pacientes con un déficit de vitamina D grave medido de forma basal. Los pacientes con unos niveles inferiores a 10 ng/mL presentaron un tiempo menor hasta la recaída de 15.83 meses frente a mediana no alcanzada en aquellos con una determinación mayor a diez, $p = 0.098$ (tabla 7).

No se observó una relación estadísticamente significativa entre el déficit grave de vitamina D y la respuesta al tratamiento.

Por otra parte, el perfil nutricional del paciente analizado a través del Índice Pronóstico Nutricional basal demostró un impacto significativo en el intervalo de tiempo hasta la recaída. Así, los pacientes con un valor inferior o igual a 43.51 presentaron una mediana de 7.32 meses en comparación con los 45.89 meses de aquellos casos con un Índice Pronóstico Nutricional (PNI) superior a 43.51, $p=0.001$. En el caso de la albúmina basal la diferencia fue notable aunque sin lograr significación estadística, 8.57 meses en los pacientes con valores inferiores a 3.5 g/dL y mediana no alcanzada en pacientes con valores normales, $p=0.058$.

La combinación de parámetros nutricionales e inflamatorios basales a través del Glasgow Prognostic Score (GPS) demostró asimismo un impacto significativo en el tiempo hasta la recaída. Los pacientes se agruparon según puntuación de 0, 1 y 2 con un tiempo hasta la recaída de mediana no alcanzada en el primer grupo, 11.49 meses en el segundo y 6.99 meses en el tercero (tabla 7).

Los pacientes con niveles de CEA inferior o igual a 5 ng/mL presentaron un tiempo hasta la recaída de mediana no alcanzada versus 12.72 meses en los pacientes con un CEA mayor de cinco con significación estadística. Así como la proteína C reactiva con 11.49 meses en aquellos pacientes con un valor superior a 1 y no alcanzaron la mediada aquellos con una puntuación inferior, $p<0.001$.

Los resultados obtenidos con la variable ratio neutrófilo-linfocito, el diferencial del ratio neutrófilo-linfocito o cNLR, la expresión de receptor de vitamina D o la sobreexpresión de HER2 no demostraron una variación significativa en el tiempo hasta la recaída.

La pérdida de expresión de proteínas reparadoras fue un factor pronóstico negativo en cuanto tiempo hasta la recaída. Observamos que aquellos pacientes con expresión conservada presentaron un tiempo hasta la recaída mayor que aquellos con un déficit del mismo, 14.85 vs NA, $p = 0.002$. Debemos tener en cuenta que tan sólo un paciente presentaba dicho déficit de expresión.

El tipo de resección realizada mostró que aquellos pacientes con una gastrectomía total presentaba un intervalo libre de recaída mayor que aquellos con una intervención subtotal o no intervenidos, 32.59 vs 28.15 vs 1.90 meses, $p < 0.001$. Las variables relacionadas con el tipo de tratamiento, quirúrgico frente a quimioterapia neoadyuvante, el esquema de tratamiento quimioterápico o el tipo de linfadenectomía no presentaron diferencias significativas.

Aquellos pacientes con un estadio avanzado (ypTNM III) en la pieza quirúrgica tras tratamiento neoadyuvante presentaron un menor tiempo libre de enfermedad que aquellos pacientes con un estadio precoz o con respuesta completa, $p = 0.001$.

Realizamos un estratificación de pacientes que denominamos PALV en base a las variables relacionadas con parámetros nutricionales, inflamatorios y situación clínica; albúmina, proteína C reactiva, vitamina D y performance status o ECOG, otorgando un punto a la alteración de cada una de ellas. Posteriormente, el grupo A con cero o un parámetros alterados, grupo B con dos o tres parámetros alterados y grupo C con todos los parámetros con valores anómalos. La supervivencia libre de recaída no alcanzó la mediana en el grupo A, fue de 14.81 meses en el grupo B y 6.76 meses en el grupo C, $p < 0.001$.

4.1.2 Resultados en supervivencia global en la cohorte de cáncer gástrico localizado.

En el análisis univariante realizado mediante, el déficit grave de vitamina D ≤ 10 ng/mL fue un factor pronóstico negativo (27.89 meses vs 54.63 meses, $p = 0.043$), así los pacientes con un déficit grave presentaron una supervivencia global significativamente peor (figura 18).

Otras variables como el Performance Status 2 vs 0-1 (20.30 meses vs 50.04 meses, $p = 0.004$), presencia de invasión linfovascular (26.18 meses vs NA, $p = 0.007$), proteína C-reactiva >1 mg/L (25.88 vs 54.63 meses, $p = 0.014$), valores de albúmina ≤ 3.5 g/dL (20.40 meses vs 48.13 meses, $p = 0.013$) fueron también factores pronósticos negativos (tabla 7).

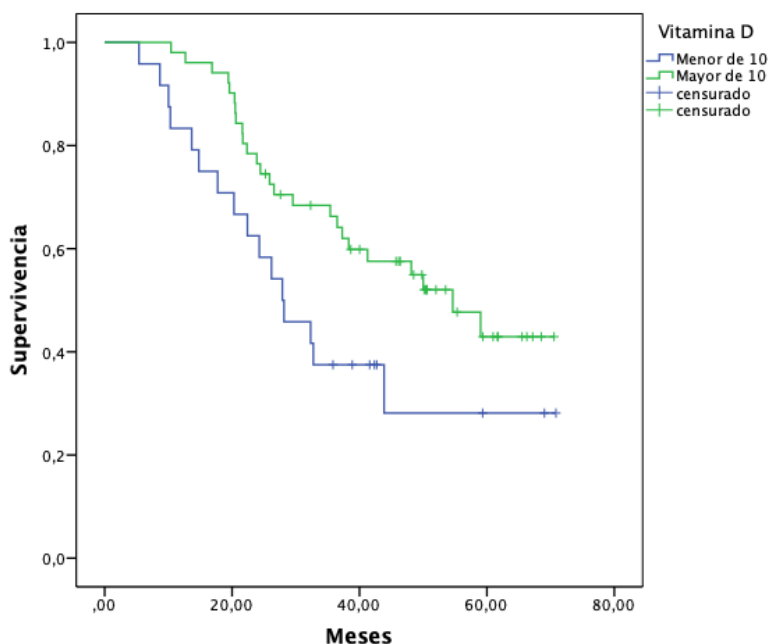


Figura 18. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia global en base a los niveles de Vitamina D.

Las variables edad, sexo, comorbilidad, localización de tumor, tamaño del tumor y afectación ganglionar, esquema de quimioterapia, tipo de tratamiento inicial, la sobreexpresión de HER2, la expresión de proteínas reparadoras y valor de CEA no fueron relacionados de forma estadísticamente significativa con una peor supervivencia global.

Los pacientes con respuesta al tratamiento neoadyuvante presentaron una mayor supervivencia global (no alcanzada vs 29.53, $p=0.004$).

Además, las variables relacionadas con el perfil nutricional e inflamatorio tumoral se objetivaron como factores pronósticos, así un valor PNI ≤ 43.5 (21.68 meses vs 50.04 meses, $p=0.004$) y Glasgow Prognostic Score 2 en relación a valores GPS 1 o 0 (13.66 meses, 25.88 meses, 59 meses, $p=0.006$) presenta una peor supervivencia (tabla 7).

Aquellos pacientes con un estadio avanzado post-neoadyuvancia (ypTNM III) en la pieza quirúrgica tras tratamiento neoadyuvante presentaron una peor supervivencia global que aquellos pacientes con un estadio precoz o con respuesta completa, $p=0.001$.

En el análisis univariante observamos además el valor pronóstico del score PALV basado en la combinación de variables de la vitamina D, albúmina, Performance Status y proteína C-reactiva. Los pacientes de grupo A o de bajo riesgo presentaron una mediana de supervivencia no alcanzada, así el grupo B o riesgo intermedio de 28.15 meses y el grupo C o de riesgo alto de 8.67 meses, $p < 0.001$ (figura 19).

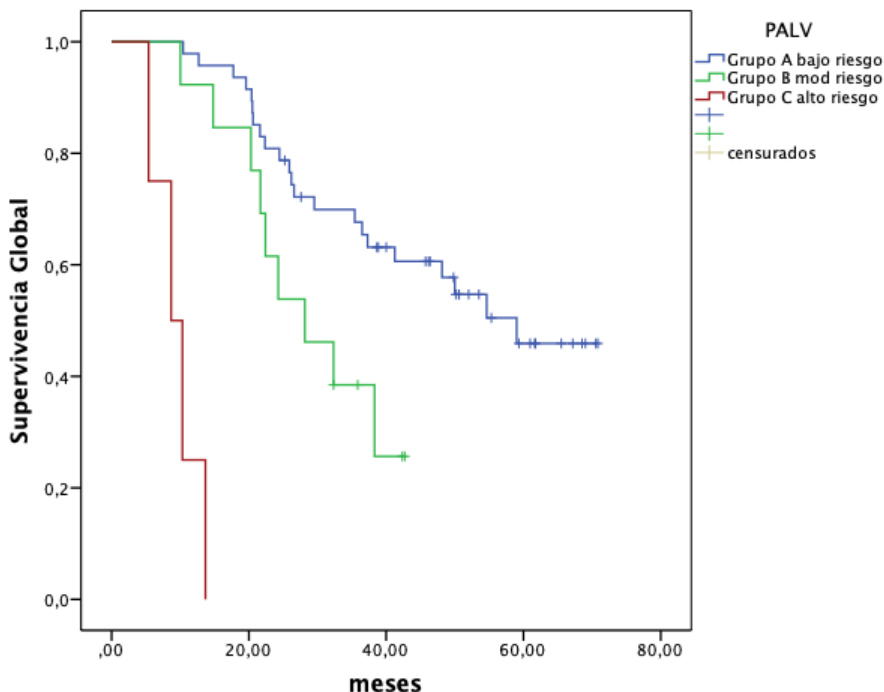


Figura 19. Curva de Kaplan-Meier de supervivencia global en base a la escala PALV.

Las variables clínicamente relevantes fueron incluidas en el análisis multivariante de supervivencia. Dicho análisis demostró que el grupo de bajo riesgo PALV A (HR: 0.37, 95% CI: 0.004 – 0.356, $p= 0.004$) y el de moderado riesgo PALV B (HR: 0.45, 95% CI: 0.003 – 0.594, $p= 0.019$) presentan un mejor pronóstico comparado con el grupo de riesgo alto PALV C, ajustados por sexo, invasión linfovascular, CEA basal y tipo de tratamiento.

Tabla 7. Análisis univariante del tiempo hasta la recaída y supervivencia global en cáncer gástrico localizado (n=77) mediante Kaplan-Meier y comparación con test log-rank.

Variables analizadas	TTR (meses) IC 95%	valor p	SG (meses) IC 95%	valor p
Edad				
≤ 65 años	NA	0.530	36.50 (10.63-62.36)	0.947
> 65 años	24.31(2.56-46.09)		43.86 (26.82-60.90)	
Sexo				
Hombre	45.89 (33.28-58.56)	0.160	50.00 (35.56-64.44)	0.084
Mujer	13.27 (7.85-18.69)		25.88 (16.77-35.00)	
Comorbilidad				
Sí	15.17(4.59-25.67)	0.368	32.32 (14.09-50.56)	0.644
No	34.66 (5.30-63.54)		48.13 (30.24-66.01)	
Performance Status				
0-1	45.89 (34.70-57.08)	0.011	50.04 (33.77-66.23)	0.004
2	8.27 (2.82-12.71)		20.30 (12.99-27.61)	
Localización tumor				
UGE	NA	0.294	NA	0.116
Cuerpo	21.35 (2.27-40.30)		37.29 (25.51-49.01)	
Antro	15.83 (23.67-45.08)		29.53 (1.42-57.65)	
Tamaño del tumor (T)		0.509		0.097
T1-T2	NA		NA	
T3-4	24.31(5.07-43.50)		37.29 (21.96-52.61)	
Afectación ganglionar (N)		0.263		0.107
N0-1	NA		NA	
N2-3	13.76 (8.13-18.56)		28.15 (12.65-43.66)	
Histología				
Difuso	21.35 (0.54-42.31)	0.278	32.75 (21.43-44.07)	0.075
Intestinal	NA		NA	
Mixto	15.83 (2.04-28.13)		27.89 (1.71-54.07)	
Grado diferenciación		0.278		0.674
Bien	NA		NA	
Moderado	28.15 (10.24-48.76)		50.04 (43.10-65.90)	
Pobremente	12.09 (2.28- 29.13)		36.50 (22.52-50.47)	
Tipo de resección				
Total	32.59 (10.23-54.32)	<0.001	43.86 (24.48-63.23)	0.063
Subtotal	28.15 (14.22-42.08)		54.63 (28.98-80.28)	
Irreseccable	1.90 (0.91-3.11)		21.68 (19.79-23.57)	

Variables analizadas	TTR (meses) IC 95%	valor p	SG (meses) IC 95%	valor p
Nivel de resección				
R0	32.59 (5.00-60.17)	0.187	48.13 (31.56-64.70)	0.076
R1	8.27 (4.70-11.85)		10.31 (5.64-14.98)	
Variación de NLR				
Descenso	32.59 (18.01-47.17)	0.532	41.26 (24.47-58.05)	0.750
Ascenso	28.15 (9.54-46.76)		48.13 (18.74-77.51)	
Glasgow Prognostic Score				
0	NA	0.004	59.00 (43.10-74.91)	0.006
1	11.49 (8.66-14.33)		25.88 (17.17-34.06)	
2	6.99 (4.90-9.03)		13.66 (7.47-19.86)	
Índice Pronóstico Nutricional				
≤ 43.5	7.32 (4.81-9.83)	0.001	21.68 (7.05-36.31)	0.004
> 43.5	45.89 (34.27-57.51)		50.04 (32.82-67.18)	
Antígeno Carcinoembrionario (µg/L)				
≤ 5	NA	0.043	50.00 (30.74-69.26)	0.162
> 5	12.71 (8.17-17.25)		23.88 (19.20-28.56)	
Proteína C-reactiva (mg/L)				
≤ 1	NA	0.024	54.63 (40.44-68.82)	0.014
> 1	11.49 (8.57-14.42)		25.88 (16.89-34.88)	
Albúmina (g/dL)				
≤ 3.5	8.57 (6.12-11.02)	0.058	20.40 (11.12-29.67)	0.031
> 3.5	NA		48.13 (29.43-66.82)	
Tratamiento inicial				
Perioperat.	32.59 (9.61-55.57)	0.924	48.13 (32.59-63.67)	0.673
Quirúrgico	28.15 (0.14-67.17)		38.30 (21.63-54.98)	
Linfadenectomía				
D1	21.35 (1.75-40.95)	0.694	32.75 (17.51-47.99)	0.550
D2	32.59 (2.38-62.79)		43.85 (29.22-58.49)	
Estadio post-neoadyuvancia				
RC	NA	0.006	NA	0.001
I	NA		NA	
II	41.49 (33.97-59.00)		54.63 (44.38-64.88)	
III	13.27 (9.27-17.27)		26.57 (21.12-32.03)	

Variables analizadas	TTR (meses) IC 95%	valor p	SG (meses) IC 95%	valor p
Esquema perioperatorio		0.989		0.794
ECX	32.59 (6.51-58.68)		48.13 (31.11-65.14)	
FLOT	21.35 (0.15-52.37)		NA	
Otros	NA		26.57 (15.43-37.72)	
Lactato deshidrogenasa (UI/L)		0.964		0.436
< 420	32.59 (2.43-62.75)		48.13 (30.22-66.03)	
> 420	NA		27.89 (16.50-39.28)	
Receptor de vitamina D		0.725		0.240
1+	NA		NA	
2+	17.97 (1.67-34.26)		NA	
3+	15.83 (0.12-45.39)		48.09 (29.11-67.08)	
Ratio plaquetas-linfocito		0.306		0.150
≤ 150	NA		NA	
150-300	21.35 (7.90-34.81)		36.50 (16.67-56.32)	
> 300	13.27 (2.61-23.98)		37.29 (5.99-68.58)	
Ratio neutrófilo-linfocito basal		0.091		0.344
≤ 3.96	34.66 (21.39-47.93)		48.13 (27.08-69.18)	
> 3.96	8.57 (0.15- 17.21)		37.29 (28.36-46.21)	
Respuesta a neoadyuvancia		0.002		0.004
Respuesta	NA		NA	
No resp.	12.84 (7.63-18.05)		29.53 (18.85-40.22)	
PALV		<0.001		<0.001
Grupo A	NA		NA	
Grupo B	14.85 (0.40-40.30)		28.15 (16.50-39.80)	
Grupo C	6.76 (4.82-9.05)		8.67 (3.84-13.50)	
Niveles de vitamina D (ng/mL)		0.098		0.043
≤ 10	15.83 (4.48-27.18)		27.89 (18.23-37.54)	
> 10	NA		54.63 (35.70-73.56)	

Variables analizadas	TTR (meses) IC 95%	valor p	SG (meses) IC 95%	valor p
Proteínas reparadoras		0.002		0.697
Expresa	14.85 (3.30-26.39)		NA	
No expresa	NA		NA	
Invasión linfovascular		0.018		0.007
Sí	13.27 (10.38-16.16)		26.18 (21.44-30.92)	
No	NA		NA	
Invasión perineural				
Sí	11.66 (10.17-13.15)	0.140	26.57 (13.31-39.84)	0.198
No	28.15 (8.27-48.03)		50.04 (28.85-71.15)	
Her 2				
Expresa	NA	0.134	26.57 (25.75-27.40)	0.641
No expresa	7.32 (2.74-11.89)		32.32 (20.09-44.55)	

TTR: tiempo hasta la recaída, SG: supervivencia global; NA: mediana no alcanzada; UGE: unión gastroesofágica; PNI: índice pronóstico nutricional; CEA; antígeno carcnoembrionario; RC: respuesta completa; ECX: epirrubicina, cisplatino, capecitabina, FLOT: 5fluorouracilo, oxalipaltino, docetaxel.

4.1.3 Perfil de miRNA en cáncer gástrico localizado.

En el trabajo analizamos las diferencias en la expresión de microRNAs entre muestras pareadas de tejido tumoral y tejido normal adyacente al tumor de veinte pacientes (un total de cuarenta muestras, veinte de tejido tumoral y veinte de tejido normal adyacente al tumor) procedentes de las piezas quirúrgicas. Entre los miRNAs analizados, miR-22, miR-99b-3p, miR-106b, miR-125b, miR-181, miR-498, miR-532 estaban más frecuentemente sobreexpresados en tejido tumoral comparado con tejido normal adyacente al tumor (NAT). Esta sobreexpresión fue estadísticamente significativa en el caso de miR-106b ($p < 0.05$), miR-181a-5p ($p < 0.05$), miR-181b-5p ($p < 0.001$) y miR-181d-5p ($p < 0.05$)

De forma interesante, miR-143 y miR-145 se encontraban más frecuentemente infraexpresados en tejido tumoral (figura 20).

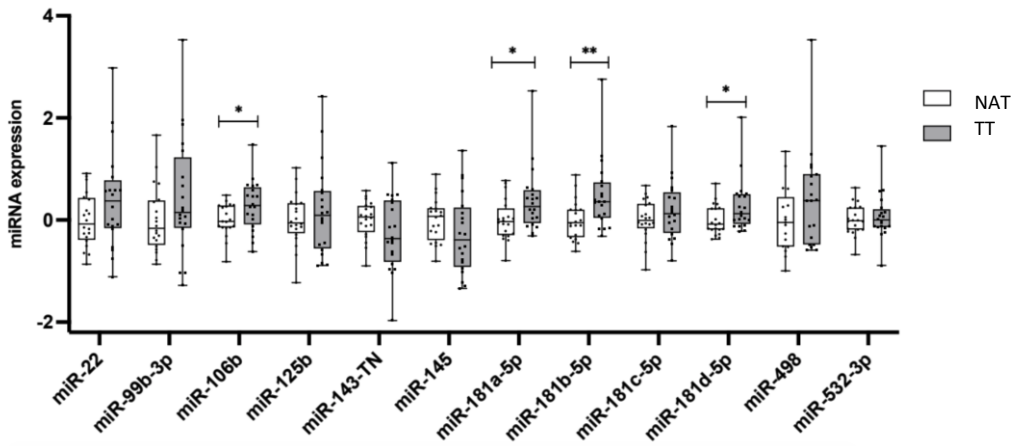


Figura 20: Comparativa entre la expresión de miRNAs entre tejido tumoral (TT) y tejido normal adyacente al tumor (NAT). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

En estas muestras pareadas de tejido tumoral y tejido normal adyacente al tumor (NAT) observamos diferencias significativas entre la expresión de los diferentes miRNAs y algunas características clínicas de los pacientes.

Así, los pacientes mayores de 65 años presentaron infraexpresión de miR-22, miR-145, miR-181b-5p y miR-181d-5p ($p < 0.05$) en comparación con pacientes más jóvenes en tejido normal adyacente al tumor (NAT).

La diferencia de expresión también la observamos en relación al sexo, así las mujeres presentaron infraexpresión de miR-22 en tejido normal adyacente al tumor (NAT), $p = 0.0134$.

En relación con la histología, en el estudio objetivamos una infraexpresión de miR-125b en tumores difusos en comparación con el subtipo intestinal o mixto, $p = 0.0174$.

En los casos con un tamaño tumoral más avanzado al diagnóstico, T3-T4, el nivel de expresión de miR-532 en tejido NAT se hallaba significativamente reducido en comparación a los pacientes con tumores más pequeños, T1-T2 ($p = 0.0368$). Además, en tejido tumoral observamos una infraexpresión de este miRNA (miR-532) en tumores con afectación ganglionar más avanzada N2-N3 ($p < 0.0254$).

De forma interesante, objetivamos infraexpresión de miR-532 en NAT en los pacientes con persistencia de tumores avanzados a pesar de tratamiento neoadyuvante (ypT3-4 vs ypT1-2, $p = 0.005$; ypTNM estadio III vs II vs I, $p = 0.002$). Por lo tanto, observamos que la infraexpresión de miR-532 se relacionan con tumores más avanzados a nivel local tanto al diagnóstico como tras la neoadyuvancia.

Los microRNAs miR-125b y miR-181d-5p se encontraron así mismo infraexpresados en tejido normal adyacente al tumor (NAT) en pacientes con estadios avanzados tras la neoadyuvancia, $p = 0.035$ y $p = 0.024$.

Analizamos la relación entre la expresión de miRNAs y la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante. Los pacientes sin respuesta a dicho tratamiento presentaron una infraexpresión de miR-106b en tejido NAT, $p < 0.05$ (figura 21A); lo que podría indicar una resistencia al tratamiento en este tipo de pacientes.

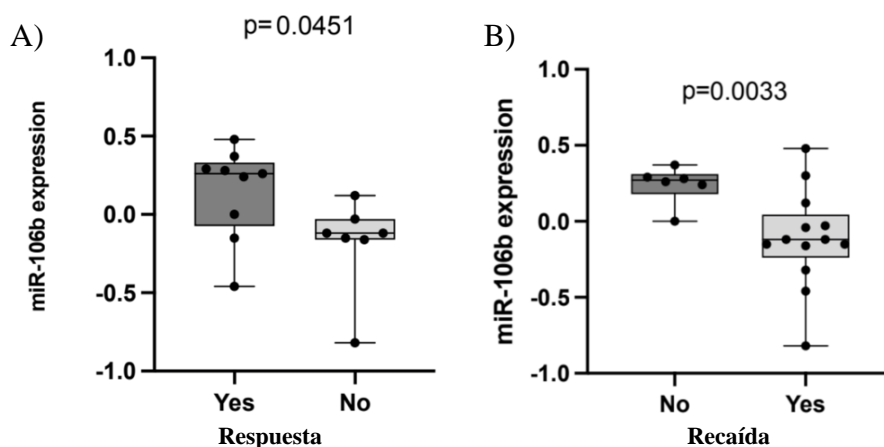


Figura 21: Infraexpresión de miR-106b en pacientes sin respuesta a tratamiento neoadyuvante (A) y presencia de recaída (B).

Observamos que aquellos pacientes con un marcador tumoral basal CEA elevado, presentaron infraexpresión de miR-106b en tejido NAT, $p = 0.0432$. A su vez en aquellos con unos niveles de LDH elevado, mayor de 420, observamos una infraexpresión de miR-145, $p = 0.028$.

Los pacientes con insuficiencia de vitamina D (niveles menores a 30 ng/mL) presentaron infraexpresión de miR-145 en tejido normal, $p = 0.0286$ (figura 22A). Además, el menor nivel de expresión de VDR, 2+ vs 3+, se relacionó con una infraexpresión de miR-498 en tejido NAT, $p = 0.033$ (figura 22B).

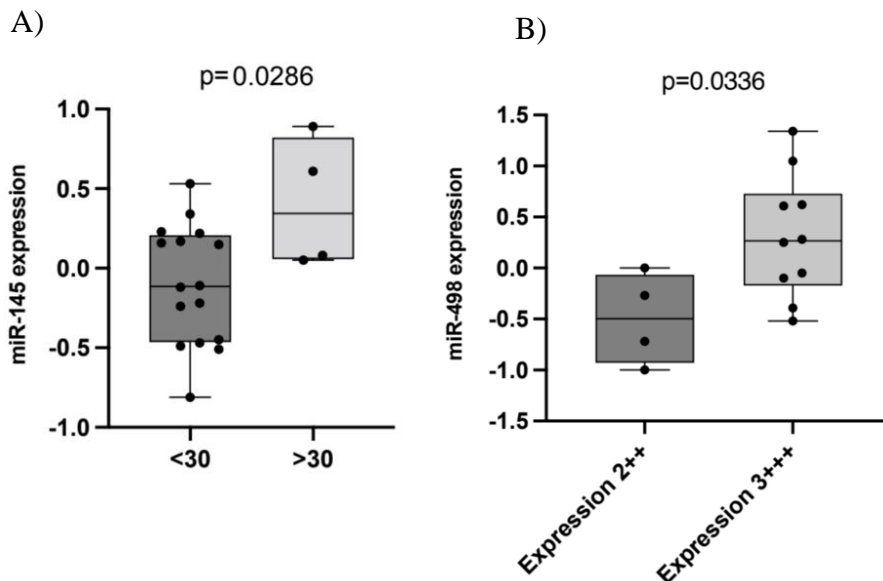


Figura 22. (A) Infraexpresión de miR-145 en pacientes con niveles bajos de vitamina D. (B) Infraexpresión de miR-498 en pacientes con expresión VDR 2+.

En el análisis de los miRNAs relacionados con la existencia de recaída observamos que aquellos pacientes con infraexpresión en tejido normal adyacente al tumor (NAT) de miR-106b (figura 21B), miR-181b-5p y miR-181c-5p presentan mayor probabilidad de recaída ($p=0.0033$, $p=0.0273$, $p=0.0383$).

En cuanto a la localización de la recaída, la infraexpresión en tejido NAT de miR-498, miR-181a-5p, miR-181a-5p y miR-181d-5p se relacionaron con mayor recaída distal ($p=0.0084$, $p=0.0052$, $p=0.0161$, $p=0.0417$).

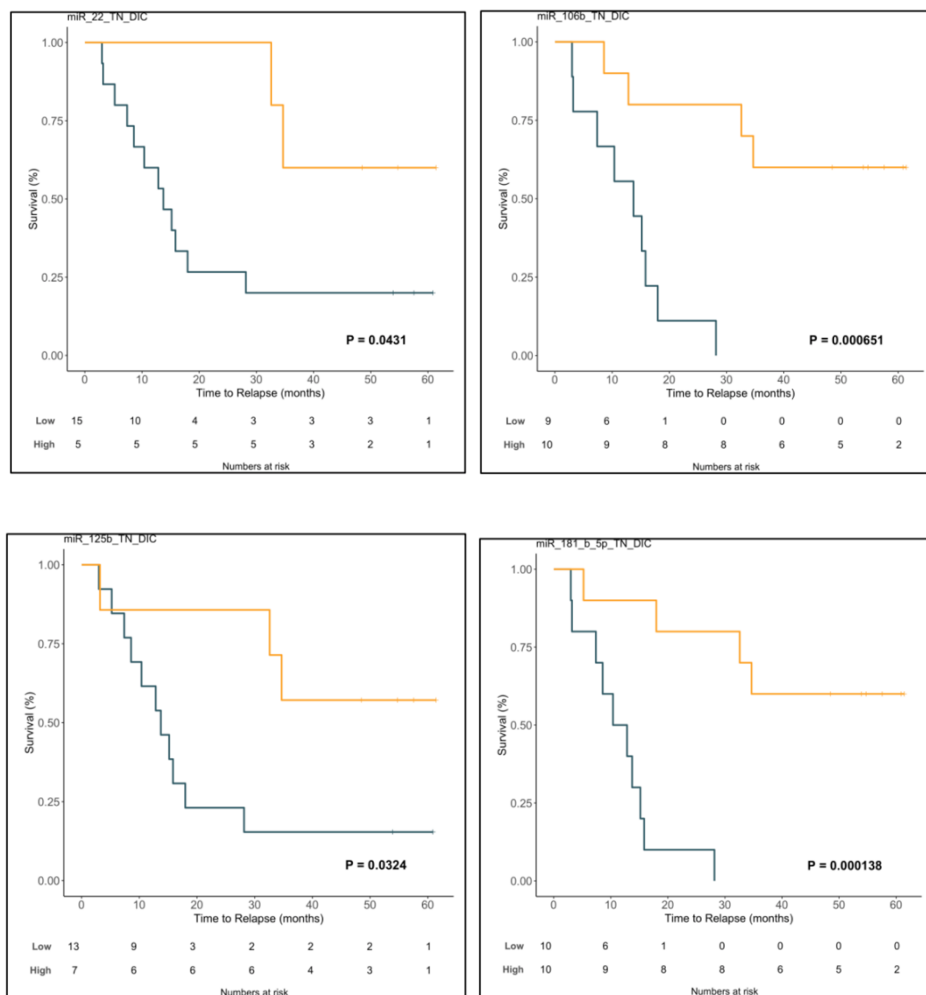


Figura 23. Curva de Kaplan-Meier. Tiempo hasta la recaída: miR-22 (superior-izquierda), miR-106b (superior-derecha), miR-125b (inferior-izquierda) y miR-181b-5p (inferior-derecha).

La infraexpresión de miR-22, miR-125b, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR181c-5p, miR-181d-5p, miR-99b-3p y miR-106b presenta un menor tiempo hasta la recaída en tejido normal adyacente al tumor (NAT) y tejido tumoral (figura 23).

Por otra parte, la infraexpresión miR-143 se relaciona exclusivamente con un menor tiempo hasta la recaída en tejido NAT, y miR-145, miR-498 y miR-532-3p en tejido tumoral.

En el análisis de supervivencia observamos que los casos con infraexpresión de miR-125b, miR-181b-5p, miR181c-5p, miR-181d-5p en ambos tejidos (tumoral y NAT) se relacionaron con un menor tiempo de supervivencia global de forma estadísticamente significativa (figura 24).

La infraexpresión de miR-143, miR-145, miR-498 y miR 532 en tejido tumoral se relaciona con menor supervivencia global. Por otra parte, la infraexpresión miR-99b-3p y miR-106b en tejido normal adyacente al tumor (NAT) se relaciona con menor supervivencia global.

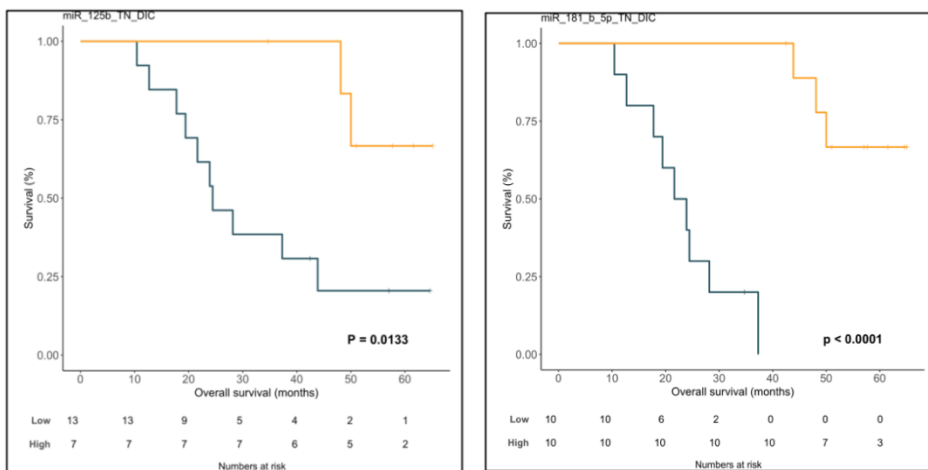


Figura 24. Curva de Kaplan-Meier. Supervivencia global: miR-125b (izquierda) y miR-181b-5p (derecha).

En el análisis multivariado observamos que miR-181b-5p en tejido normal adyacente al tumor (NAT) es una variable pronóstica independiente, junto con el estadio, el Performance Status y la respuesta a tratamiento neoadyuvante.

4.2. RESULTADOS EN LA COHORTE DE CÁNCER GÁSTRICO METASTÁSICO

Un total de 116 pacientes con cáncer gástrico metastásico confirmado histológicamente fueron elegibles para el análisis. En esta cohorte el 66% de los pacientes eran varones con una mediana de edad de 68.7 años.

El 58% de los pacientes tuvieron un PS 0-1 y 55.2% presentaban enfermedad metastásica en dos o más localizaciones. La mayoría de los pacientes (66.4%) tuvieron un bNLR inferior a 3.96. El cNLR o ratio diferencial fue evaluado en 110 pacientes y descendió en el 74.5% de los pacientes, mientras que el 25.5% tuvieron un incremento, cNLR>0.

El análisis de las características clínico-patológicas en función del aumento o descenso del cNLR revelaron diferencias no significativas entre los pacientes (tabla 8).

Tabla 8. Características clínico-patológicas de 116 pacientes con cáncer gástrico metastásico en función de la variación del ratio neutrófilo-linfocito (cNLR).

Características clínico-patológicas	N pacientes (%) (n=116)	cNLR (N=110) Descenso (74.5%) N= 82	Ascenso (25.5%) N= 28	P-valor
Edad (38-87 años)				0.511
≤65	37 (33%)	29 (35%)	8 (29%)	
>65	75 (67%)	53 (65%)	20 (71%)	
Sexo				0.511
Mujer	39 (34%)	29 (36%)	8 (28%)	
Hombre	77 (66%)	53 (64%)	20 (72%)	
Performance Status				0.070
0-1	67 (58%)	52 (70%)	12 (57%)	
2	36 (31%)	22 (28%)	12 (37%)	
Desconocido	13 (11%)	8 (2%)	4 (6%)	
Localización				0.450
UGE	25 (22%)	16 (21%)	8 (29%)	
Cuerpo	56 (50%)	43 (53%)	11 (42%)	
Antro	32 (27%)	21 (26%)	8 (29%)	

Características clínico-patológicas	N pacientes (%) (n=116)	cNLR (N=110) Descenso (74.5%) N= 82	Ascenso (25.5%) N= 28	P-valor
Subtipo				0.366
Intestinal	52 (45%)	39 (48%)	10 (36%)	
Difuso	37 (32%)	24 (29%)	11 (39%)	
Mixto	14 (12%)	11 (14%)	2 (7%)	
Desconocido	13 (11%)	8 (9%)	5 (18%)	
Metastasis Viscerales				0.179
Sí	65 (56%)	50 (61%)	13 (46%)	
No	51 (44%)	32 (39%)	15 (54%)	
Metástasis peritoneales				0.749
Sí	54 (47%)	38 (46%)	12 (43%)	
No	62 (53%)	44 (54%)	16 (57%)	
Metástasis adenopáticas				0.980
Sí	69 (59%)	50 (61%)	17 (60%)	
No	47 (41%)	32 (39%)	11 (40%)	
CEA (0.40-2660 ng/mL)				0.785
<10	70 (60%)	48 (59%)	17 (65%)	
>10	43 (37%)	32 (38%)	10 (33%)	
Desconocido	3 (3%)	2 (2%)	1 (2%)	
NLR basal (0.64-18.8)				0.006
<3.96	77 (66%)	52 (63%)	23 (82%)	
≥3.96	39 (34%)	30 (37%)	5 (18%)	
Esquema de quimioterapia				0.066
Cisplatino -docetaxel	36 (32%)	30 (36%)	5 (18%)	
Basado en 5FU	76 (68%)	52 (64%)	23 (82%)	
LDH (99-6173 UI/L)				0.824
<450	73 (63%)	52 (71%)	18 (76%)	
>450	27 (23%)	18 (18%)	7 (16%)	
Desconocido	16 (14%)	15 (11%)	4 (8%)	

UGE: unión gastroesofágica; CEA; antígeno carcinoembrionario; NLR: ratio neutrófilo-linfocito; LDH: lactato deshidrogenasa.

La mediana de tiempo de seguimiento fue de 8.70 meses (95%CI 7.08-10.33). Observamos el evento fallecimiento en 101 pacientes de los 116 analizados.

En el análisis univariante, cNLR y bNLR fueron ambos factores pronósticos negativos (tabla 9). El NLR basal ≥ 3.96 (5.97 vs 10.87 meses, $p=0.001$) y cNLR >0 (6.63 vs 10.34 meses, $p=0.021$) (figura 25).

Fueron ambos relacionados con peor supervivencia, mientras que rozaba la significación estadística la lactato deshidrogenasa o LDH >450 UI/L (5.02 vs 9.52, $p=0.052$) con peor supervivencia.

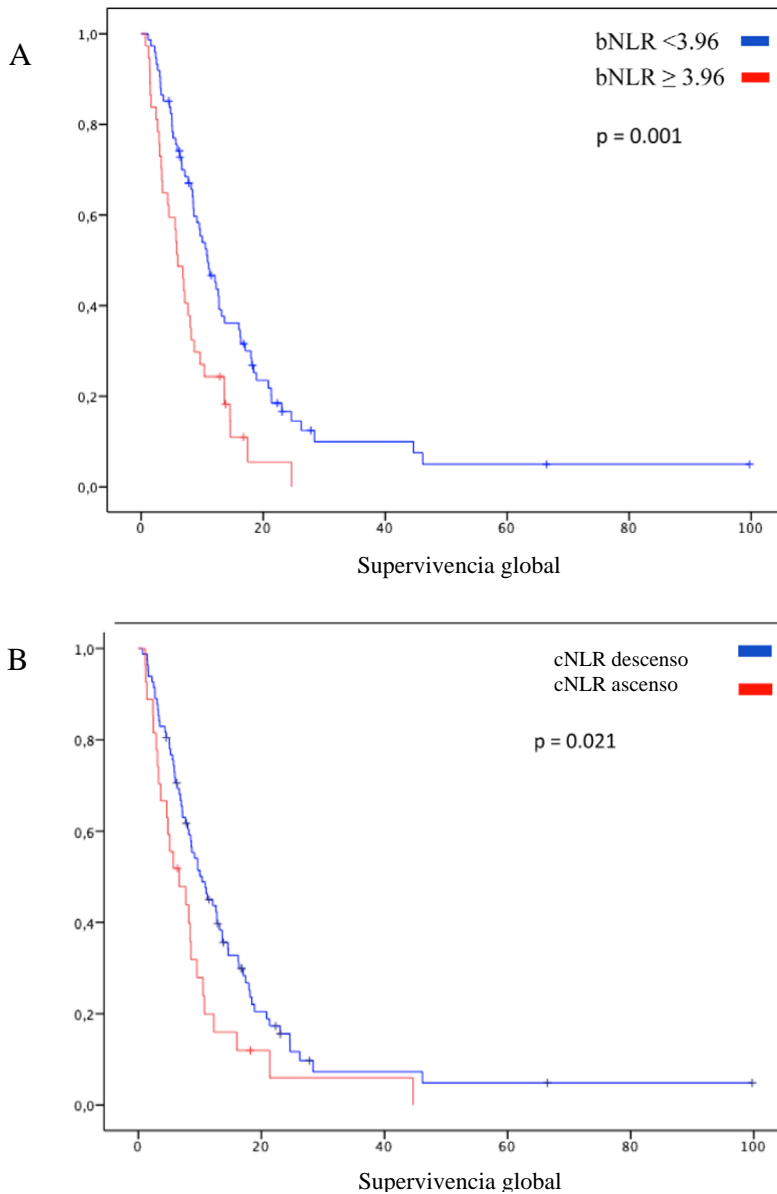


Figura 25. Supervivencia global en pacientes con cáncer gástrico metastásico en función de: A) Ratio neutrófilo-linfocito basal (bNLR) ≥ 3.96 vs < 3.96 fue de 5.97 vs 10.87 meses, respectivamente ($p=0.001$). B) Ratio neutrófilo-linfocito diferencial (cNLR): aumento vs descenso fue de 6.63 vs 10.34 meses, respectivamente ($p=0.021$).

Otras variables como el CEA >10 (5.91 vs 10.34 meses, $p=0.011$), sexo: hombre vs mujer (7.68 vs 12.09 meses, $p=0.048$) y Performance Status 2 vs 0-1 (4.63 vs 10.87 meses, $p=0.001$) fueron también factores pronósticos negativos.

Las variables de expresión de proteínas reparadoras, Índice Pronóstico Nutricional (PNI), Glasgow Prognostic Score (GPS), edad, esquema de quimioterapia, localización de la enfermedad e histología no fueron significativamente relacionadas con la supervivencia (tabla 9)

Las variables clínicamente relevantes con significación estadística fueron incluidas en el análisis multivariante. Aumento de cNLR (HR= 2.36, 95%CI: 1.35 – 4.13, $p=0.003$) y NLR basal elevado (HR=2.16, 95% CI: 1.29 – 3.61, $p=0.003$) fueron factores pronósticos negativos para supervivencia global, ajustados por sexo, Performance Status y CEA basal.

Tabla 9. Análisis univariante de la supervivencia global en cáncer gástrico metastásico (n=116) mediante Kaplan-Meier y comparación con test log-rank.

Características clínico-patológicas	SG (meses)	95%CI	Valor p
Edad (años)			0.419
≤65	8.41	6.09 - 10.72	
>65	9.65	7.47 - 11.84	
Sexo			0.048
Mujer	12.09	9.42 - 14.75	
Hombre	7.68	5.80 - 9.57	
Performance Status			0.001
0-1	10.87	8.29 - 13.46	
2	4.63	0.00 - 9.42	
Localización tumor			0.180
UGE	5.81	4.51 - 7.11	
Cuerpo	9.65	6.74 - 12.57	
Antro	9.13	5.79 - 12.47	

Características clínico-patológicas	SG (meses)	95%CI	Valor p
Subtipo			0.152
Intestinal	10.51	5.67 - 15.35	
Difuso	6.63	5.33 - 7.93	
Mixto	8.70	5.96 - 11.44	
Desconocido	9.65	6.92 - 12.39	
Metástasis viscerales(pulmón/hígado)			0.101
Sí	9.65	7.54 - 11.77	
No	8.01	5.31 - 10.72	
Metastasis peritoneales			0.730
Sí	9.13	7.27 - 10.99	
No	8.50	5.67 - 11.34	
Metastasis adenopáticas			0.138
Sí	8.50	6.52 - 10.49	
No	11.20	5.25 - 17.15	
Lactato deshidrogenasa (UI/L)			0.052
<450	9.52	7.12 - 11.93	
>450	5.02	0.00 - 0.76	
Antígeno carcinoembrionario (µg/L)			0.011
<10	10.34	7.87 - 12.82	
>10	5.91	3.16 - 8.66	
Ratio neutrófilo-linfocito basal (bNLR)			0.001
<3.96	10.87	8.26 - 13.48	
≥3.96	5.97	4.29 - 7.66	
Esquema quimioterapia			0.197
Cisplatino -docetaxel	9.65	7.87 - 11.44	
Basado en 5FU	8.18	5.18 - 11.17	
NLR diferencial (cNLR)			0.021
Descenso	10.34	7.14 - 13.55	
Ascenso	6.63	2.37 - 10.90	
Vitamina D (ng/mL)			0.975
<10	8.93	3.42 - 14.45	
≥10	11.95	6.48 - 17.43	

Características clínico-patológicas	SG (meses)	95%CI	Valor p
PLR basal			0.421
<160	9.65	7.46 -11.85	
>160	8.01	4.79-10.83	
Proteínas reparadoras			0.402
Expresa	18.89	10.88-26.89	
No expresa	3.02	1.05-20.34	
Índice Pronóstico Nutricional			0.546
≤ 43.5	6.83	4.84-8.86	
>43.5	9.65	7.82-11.49	
Glasgow Prognostic Score			0.524
0	8.50	1.29-15.72	
1	13.17	1.31-25.03	
2	6.83	0.01-13.79	

SG: supervivencia global; CI: intervalo de confianza; UGE: unión gastroesofágica; NLR: ratio neutrófilo-linfocito; 5FU: 5-fluorouracilo; PLR: ratio plaqueta-linfocito.

La combinación de ratios o DScore fue calculado en base al cNLR y NLR basal. Los pacientes con unos valores de NLR basal elevados (≥ 3.96) y un aumento de cNLR fueron asignados a una puntuación de 2. Los pacientes con alteración de unos solo de los parámetros fueron asignados a una puntuación de 1. Aquellos pacientes sin ningún parámetro alterado, NLR basal bajo y descenso de cNLR, recibieron una puntuación de cero. (Tabla 10).

Los pacientes con un score de 0 fueron definidos como DScore de bajo riesgo (44.8%), riesgo intermedio o DScore 1 (44.8%) y alto riesgo o DScore 2 (4.31%).

El marcador fue analizado mediante un análisis univariante. La mediana de supervivencia fue de 12.74 meses, 7.68 meses y 2.23 meses en estos tres grupos respectivamente, $p < 0.001$, (Tabla 10, figura 26)

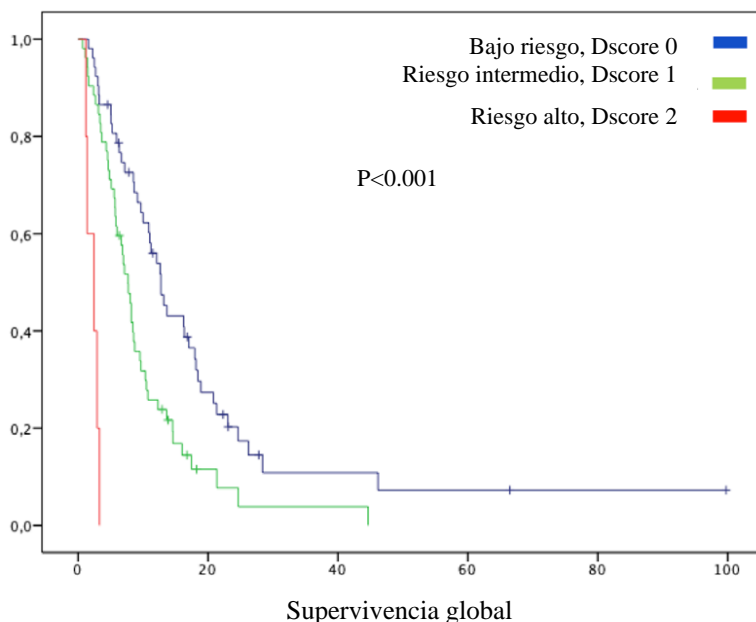


Figura 26. Supervivencia global en pacientes con cáncer gástrico metastásico en función de DScore 0, 1 and 2 fueron 12.74, 7.68 and 2.43 meses respectivamente ($p < 0.001$) mediante el método de Kaplan-Meier.

Tabla 10. Supervivencia global de los diferentes grupos de riesgo en base al DScore mediante el método de Kaplan Meier y comparación por test log-rank.

DScore	Pacientes, n	SG, meses	P valor
DScore 0 o Bajo riesgo: - bNLR <3.96 y cNLR <0	52	12.74	
DScore 1 o Riesgo intermedio: - bNLR ≥3.96 y cNLR < 0 - bNLR <3.96 y cNLR >0	52	7.68	<0.001
DScore 2 o Alto riesgo: - bNLR ≥3.96 y cNLR>0	5	2.43	

SG: supervivencia global; bNLR: ratio neutrófilo-linfocito basal; cNLR: ratio neutrófilo-linfocito diferencial.

El análisis multivariante demostró que comparado con el grupo DScore 0 (bajo riesgo), los pacientes en el grupo DScore 1 (HR: 1.83, 95% CI: 1.14-2.94, p=0.012), Dscore 2 (HR 9.62, 95% CI: 3.09-29.98, p<0.001) tuvieron peor pronóstico, ajustados por sexo, Performance Status y CEA basal. Además, el 71.2% de los pacientes correspondientes al grupo de bajo riesgo DScore 0 (NLR basal bajo y descenso de cNLR) respondieron al tratamiento de quimioterapia; sin embargo, la progresión de la enfermedad se observó en el 100% de los paciente de alto riesgo DScore 2 (NLR basal elevado y ascenso de cNLR), (Chi²= 10.26 p=0.006; Tabla 11).

Tabla 11. Relación entre puntuación DScore y respuesta radiológica a quimioterapia.

DScore	CR + PR + SD	PD	X²	P valor
DScore 0: Bajo riesgo	37 (71%)	15 (29%)		
DScore 1: Riesgo intermedio	31 (59%)	22 (41%)	10.264	0.006
DScore 2: Alto riesgo	0 (0%)	5 (100%)		

CR: respuesta radiológica completa; RP: respuesta radiológica parcial; SD: estabilización radiológica de la enfermedad, PD: progresión radiológica de la enfermedad; X²: Chi-cuadrado valor.

5

Discusión

5. DISCUSIÓN

Los sistemas de clasificación pronóstica tradicionales se han centrado exclusivamente en el análisis de las características propias del tumor, ya sean las anatómicas, histológicas o moleculares. Sin embargo el estado inmune en el que se desarrolla el tumor y el estado inflamatorio previo del paciente tienen una gran relevancia en la evolución del cáncer y en el pronóstico de la enfermedad (142).

En nuestro estudio seleccionamos parámetros relacionados con dicho estado proinflamatorio del paciente a nivel sistémico basal y en el microambiente peritumoral y los relacionamos con el pronóstico de la enfermedad.

Estos parámetros incluyen la vitamina D, así como su relación con la expresión de miRNAs en el microambiente peritumoral normal y su función a través del receptor de vitamina D (VDR), el ratio neutrófilo-linfocito y dos escalas de riesgo (una en cohorte localizada y otra en cohorte metastásica) que incluyen marcadores de estado funcional e inflamación a través de parámetros analíticos medidos en analítica de sangre y nutricionales del paciente.

Hemos estudiado los valores de la vitamina D a nivel sérico dado su posible papel en la iniciación y progresión tumoral. La variación en los niveles de vitamina D se traducen en una modulación de la inflamación en el microambiente actuando no sólo en las células tumorales sino también en las células estromales e inmunes (143,144) a través de la regulación de citoquinas, prostaglandinas, modulación de

respuesta de células T *helper* a través del balance entre Th1/Th2 (145) e inducción de células T reguladoras (146).

En la literatura se han descrito diferentes escalas de estratificación de riesgo en base al contexto inmune en el microambiente, una de las más relevantes es el Immunoscore; la cual refleja la interacción entre las células tumorales y el sistema inmune a través de la cuantificación de los linfocitos T CD3+ y CD8+ en el margen de invasión y en la zona central del tumor. Se observó que aquellos pacientes con cáncer colorrectal localizado y una alta infiltración de linfocitos (puntuación Immunoscore alta) tenían menor probabilidad de recaída y mayor supervivencia (147).

En nuestro estudio observamos un peor pronóstico en aquellos pacientes con un déficit grave de vitamina D, definido como los valores séricos de 25 (OH)D inferiores a 10 ng/mL. Así los pacientes con unos niveles bajos presentaron una peor supervivencia de forma significativa. Estos resultados se encuentran en la misma línea que los estudios publicados en otros tumores hasta el momento en los que se relaciona el déficit de vitamina D con un peor pronóstico de la enfermedad. Ren y cols. (113) observaron una menor supervivencia en aquellos pacientes diagnosticados de cáncer gástrico con insuficiencia de vitamina D y en el trabajo de Durak y cols. (114) los pacientes con un déficit grave <10ng/mL presentaban un mayor riesgo de cáncer gástrico. En nuestro análisis no observamos diferencias significativas en el tiempo hasta la recaída en los pacientes en rango de insuficiencia (<30ng/mL). Una posible explicación a estos hallazgos es el tipo de molécula utilizada en el análisis de sangre y el método empleado. Otras causas serían las posibles diferencias en la distribución de datos demográficos y geográficos, así como nuestro tamaño muestral.

A lo largo del metabolismo de la vitamina D nos encontramos con diferentes metabolitos que pudieran ser medidos en sangre: 25(OH)D y 1 α ,25(OH)2D3, siendo el primero de ellos el más frecuentemente

analizado. A pesar de que no es biológicamente el más activo ya que se encuentra en el paso anterior al metabolismo renal, sus niveles persistentes en sangre durante dos o tres semanas lo convierten en el más estable, además se encuentra en su práctica totalidad en la circulación sistémica con un porcentaje más bajo en tejidos. Por otra parte, los niveles séricos no se ven afectados por la ingesta oral, ejercicio, esto sumado a lo anterior, lo convierten en el principal metabolito que define los niveles de vitamina D en cada paciente.

En cuanto al método de análisis de 25(OH)D en sangre, éste se corresponde con la práctica estándar, existiendo en la actualidad métodos cromográficos e inmunoquímicos, siendo estos últimos los más automatizados y que además, han demostrado una buena correlación entre ellos.

Sin embargo, debemos tener en cuenta que no estamos midiendo la forma activa de la vitamina D, aquella que se une al receptor de vitamina D para ejercer su acción; sino que, por el contrario, es preciso un último paso renal para su activación. Esto implica que un déficit enzimático a ese nivel (CYP27B1) pudiera producir unos niveles séricos normales de 25(OH)D con un déficit de la forma biológicamente activa.

La siguiente razón por la que podríamos explicar la variabilidad de resultados con los diferentes niveles en sangre de vitamina D, sería plantear si los niveles séricos traducen de forma eficaz la acción de la vitamina D en los genes diana. Para esto debemos tener en cuenta que el paso principal para llevar a cabo la acción de la vitamina D, es la unión con el receptor de vitamina D (VDR). Este receptor tiene como función la internalización del calcitriol a la célula y su transporte hasta el núcleo, siendo el mediador exclusivo de los efectos fisiológicos de la vitamina D; es por esto que el gen VDR se encuentra expresado en más de la mitad de los 400 tejidos celulares humanos (148). En nuestro trabajo realizamos un estudio inmunohistoquímico para

analizar la posible pérdida de expresión de dicho receptor y que, de este modo, la alteración de la función de la vitamina D pudiera ser independiente de sus niveles séricos. Sin embargo, no observamos diferencias significativas de expresión relacionadas con el pronóstico ni con los niveles de vitamina D. En los trabajos de Yin y cols (149), Cong y cols (150) se describe presencia de polimorfismos en el gen VDR relacionados con el cáncer gástrico. Esto es, determinadas variaciones genéticas como polimorfismos (SNPs, single nucleotide polymorphism) podrían alterar la función del receptor con la consiguiente pérdida de unión con la vitamina D, alteración de la actividad transcripcional, unión con VDREs y finalmente modular o inactivar la acción de la vitamina D en sus genes diana.

La regulación post-transcripcional de la función de la vitamina D a través de la acción de los miRNAs en el VDR fue descrita en el estudio de Mohri y cols (77), en el que demuestran que miR-125b inhibe los efectos antiproliferativos de 1,25-alfa(OH)₂D a través de la regulación post-transcripcional de VDR. En los trabajos publicados previamente en la literatura, se describe la relación entre la vitamina D, el VDR y la expresión de miR-125b en tejido tumoral.

De forma novedosa en nuestro estudio, seleccionamos nueve microRNAs en base a su posible relación con la vitamina D(151) y analizamos la diferencia en la expresión y valor pronóstico de cada microRNA entre tejido tumoral y el tejido normal adyacente al tumor (NAT) del paciente. En el trabajo observamos una implicación pronóstica y una asociación en la alteración de la expresión de microRNAs con variables clínico patológicas en tejido normal adyacente al tumor. El microambiente del tejido normal adyacente al tumor (NAT) no se corresponde con tejido verdaderamente sano, sino que en dicho microambiente existen cambios moleculares tal y como describe B. Kim en su trabajo (152), definiéndolo como un microambiente histopatológicamente normal pero con alteraciones

genéticas o epigenéticas no visibles. En dicho artículo se demuestra una alteración en la expresión de miRNAs en tejidos adyacentes al tumor y su posible utilización como biomarcador para distinguir “*ambientes tumorales propensos o cancer-prone environments*”. En esta dirección el programa en marcha Pre-Cancer Genome Atlas (PCA) (153) analiza las alteraciones genéticas (entre ellas, asociación con la expresión de miRNAs) en lesiones premalignas y microambientes propensos para una detección precoz y prevención. En el trabajo publicado en 2019 de Pereira y cols. (154) hace referencia a este concepto “*cancer-prone environments o field cancerization*” analizando la expresión de diferentes miRNA en tejido tumoral, tejido adyacente y tejidos controles de pacientes sanos. En este trabajo se observó una expresión alterada en tejido tumoral y adyacente en comparación con los controles. Los hallazgos observados en nuestro estudio confirman la presencia de estas alteraciones en el tejido adyacente tumoral.

En el análisis de expresión de miRNA en dicho tejido normal adyacente al tumor y su relación con la vitamina D, observamos una relación significativa entre la infraexpresión de miR-498 con un menor nivel de expresión de VDR (2+ versus 3+). Por lo tanto, aquellos pacientes con infraexpresión de miR-498 en tejido NAT presentaron una menor expresión de VDR.

Por otra parte, la adición de vitamina D produce una inhibición significativa del crecimiento celular a través de la sobreexpresión de miR-145 in vitro tal y como se describe en el estudio de Chang et. al (67). En el mismo sentido que el trabajo descrito, en nuestro estudio observamos una infraexpresión de miR-145 en tejido NAT en aquellos pacientes con unos niveles de vitamina D menores a 30 ng/mL ($p=0.0286$). En el análisis pronóstico los pacientes con infraexpresión de miR-145 presentaron una peor supervivencia global.

La infraexpresión de miR-125b, miR-181b-5p, miR181c-5p, miR-181d-5p en tejido NAT se relaciona con peor supervivencia global de forma estadísticamente significativa. También observamos una peor supervivencia global, aunque no significativa, en los pacientes con infraexpresión de miR-99b-3p y miR-106b en tejido normal adyacente al tumor (NAT).

La asociación con características clínico-patológicas objetiva una relación con determinados perfiles de expresión.

Así, la infraexpresión de miR-532-3p en tejido NAT se relaciona con tumores con un tamaño y afectación ganglionar mayores (T3-4, N2-3) al diagnóstico y tras la neoadyuvancia.

Además podemos observar que una infraexpresión de miR106b en tejido tumoral es más frecuente en pacientes mayores de 65 años, y en tejido normal adyacente al tumor (NAT) en aquellos que han sufrido una recaída y en los que no han respondido a tratamiento neoadyuvante lo que podría indicar una resistencia al tratamiento en este tipo de pacientes. En este sentido, el estudio publicado por Fang y colaboradores (155) demuestra que una alteración en los niveles de miR-106b se relaciona con resistencia a tratamiento de quimioterapia con Cisplatino.

Por otra parte, también se ha relacionado la expresión de determinados miRNAs con la regulación de factores claves en la respuesta a fármacos de inmunoterapia, como es el caso de la regulación de expresión de PD-L1 por miR-200 en cáncer de pulmón (156).

La resistencia a tratamiento también fue descrita en pacientes con déficit de proteínas reparadoras en el contexto de quimioterapia adyuvante tras intervención (157). Por lo tanto, en nuestra cohorte de cáncer gástrico estadio localizado analizamos el valor predictivo y pronóstico del déficit de expresión de proteínas reparadoras. Este

análisis fue realizado en cuarenta y un pacientes, presentando un déficit de expresión (dMMR) en tan solo uno de ellos por lo tanto las conclusiones que podemos extraer son exclusivamente hipótesis. Este paciente presentó un tiempo hasta la recaída y una supervivencia inferior a los pacientes con expresión conservada. Hemos analizado este caso y se trata de un paciente que recibió tratamiento neoadyuvante con quimioterapia y posteriormente fue intervenido. En el análisis de evaluación de respuesta no observamos ninguna modificación tras el tratamiento. Los datos de nuestro estudio no nos permiten extraer conclusiones, aunque esta falta de respuesta observada en nuestro paciente y una peor supervivencia va en relación a los resultados prospectivos del estudio de Kim S. y colaboradores(32), en cuyo trabajo se demuestra una mejor supervivencia en pacientes MSI/dMMR en estadio II y III cuando son tratados con cirugía exclusivamente en comparación con una peor supervivencia en aquellos con cirugía y quimioterapia adyuvante. Los autores describen que este efecto pronóstico positivo se pierde cuando reciben quimioterapia, concretamente y de una forma más relevante en pacientes con un subtipo difuso como es el caso de nuestro paciente. Esta misma hipótesis se describe en el trabajo de Smyth y cols. (157) en el que realizan un análisis retrospectivo de la cohorte de pacientes del estudio MAGIC (analiza beneficio de quimioterapia perioperatoria versus cirugía). Los autores describen un efecto deletéreo en este tipo de paciente con déficit de expresión. Finalmente, en el metaanálisis de Pietrantonio y colaboradores (158) recomiendan continuar la investigación a través de estudios prospectivos tras obtener los mismos resultados.

Analizamos además otras variables con valor pronóstico en esta cohorte de cáncer gástrico localizado, así observamos que aquellos pacientes que presentaron respuesta al tratamiento neoadyuvante obtuvieron un tiempo libre de enfermedad significativamente más

largo. Además aquellos pacientes con buen estado general (PS 0-1) y con valores de marcador tumoral CEA bajos al diagnóstico presentaron un tiempo hasta la recaída mayor. Estos resultados están en relación a los publicados anteriormente en la bibliografía, ya que el Performance Status nos permite clasificar a los pacientes en función de su estado general, para de esta forma, adecuar el enfoque terapéutico y la agresividad de los tratamientos. Por otro lado, el marcador tumoral CEA es un biomarcador conocido en cáncer gástrico aunque no específico de este tipo de tumor, su elevación puede estar presente en otros tumores como el cáncer colorrectal.

En nuestro estudio observamos que el estado nutricional de los pacientes impacta de forma significativa en el tiempo libre de enfermedad, así aquellos con unos valores mayores de 43.5 (función nutricional conservada) presenta un tiempo hasta la recaída de 45.89 meses en comparación con 7.32 meses en aquellos pacientes con un peor estado nutricional. Este biomarcador ya ha sido analizado en otros estudios (159) con unos resultados similares a los obtenidos en nuestro trabajo. Además, otro parámetro interesante que combina los valores de albúmina con la proteína C reactiva es el Glasgow Prognostic Score (GPS), el cual de forma también muy interesante demuestra que aquellos pacientes con valores bajos de albúmina y PCR elevada presentan un tiempo hasta la recaída de 6.99 meses en comparación con la mediana no alcanzada en los pacientes con valores conservados, $p=0.004$.

Los resultados de supervivencia global en nuestra cohorte apoyan el valor pronóstico de estos parámetros, observándose una mayor supervivencia en paciente con un PS 0-1, un buen perfil nutricional ($\text{PNI}>43.5$), valor GPS bajo ($\text{PCR} <1 \text{ mg/L}$ y $\text{albúmina} > 3.5 \text{ g/dL}$) y de forma muy importante en aquellos que obtuvieron respuesta al tratamiento neoadyuvante.

Hemos propuesto una escala de riesgo denominada PALV teniendo en cuenta los resultados de los parámetros individuales en los análisis de supervivencia y atendiendo a que la combinación de marcadores puede aproximarnos de una manera más eficaz al pronóstico de la enfermedad.

Así en la escala PALV incluimos parámetros que reflejan el estado nutricional, inflamatorio y clínico del paciente: albúmina, proteína C reactiva, vitamina D y performance status o ECOG, otorgando un punto a la alteración de cada una de ellas. De esta forma, el grupo A de bajo riesgo presenta cero o un parámetro alterado, grupo B de riesgo intermedio con dos o tres parámetros alterados y grupo C de alto riesgo con todos los parámetros con valores anómalos.

A través de esta escala de riesgo PALV podemos clasificar a los pacientes en función del riesgo para así poder orientar el tratamiento. Los resultados muestran una diferencia importante de casi cuarenta meses entre el grupo de alto y bajo riesgo, siendo así la supervivencia libre de recaída de 45.8 meses, 14.8 y 6.76 meses en los grupo de bajo, intermedio y alto riesgo consecutivamente, $p < 0.001$ con una diferencia muy importante entre los distintos pacientes. Observamos una diferencia entre grupos de 51 meses en la supervivencia global. Los pacientes con un score PALV de bajo riesgo o grupo A presentaron una mediana de 59 meses y aquellos de alto riesgo de 8.67 meses, $p < 0.001$. Esta escala precisaría una validación en otra cohorte con mayor número de pacientes, sin embargo no se ha llevado a cabo por la dificultad de reclutamiento.

Realizamos una análisis multivariante en el que se incluyeron otras variables relevantes en cáncer gástrico como fueron el tipo de tratamiento inicial (quimioterapia perioperatoria o cirugía de entrada), la invasión linfovascular, el valor del marcador tumoral CEA al diagnóstico y el sexo. Observamos que comparado con el grupo C de alto riesgo, los grupos A y B tienen menos riesgo y mejor pronóstico

de forma estadísticamente significativa y se confirma como marcador pronóstico independiente.

Por lo tanto, en base al análisis de nuestro estudio, la combinación de la vitamina D, albúmina, PCR y estado general por Performance Status nos permite clasificar a los pacientes en tres grupos que se relacionan de forma independiente con la supervivencia global. Esto lo convierte en una herramienta importante al diagnóstico en cáncer gástrico localizado y una vía de investigación en futuros estudios prospectivos con mayor número de pacientes; ya que una de las limitaciones de nuestro estudio es el escaso tamaño muestral.

Por otra parte, parámetros como la expresión de HER2, la expresión del receptor de vitamina D, y el ratio neutrófilo-linfocito no fueron relacionados con peor supervivencia.

Observamos una discordancia entre los resultados del ratio neutrófilo-linfocito basal y cNLR en cáncer gástrico localizado y metastásico, probablemente debido al distinto papel de los neutrófilos en los diferentes estadios, así como diferencias en el estado proinflamatorio en la evolución de la enfermedad. De esta forma en estadios localizados este estado puede que por sí mismo no presente tanto impacto pronóstico y sea más determinante la combinación con otros factores (nutricional, estado general, vitamina). En otras neoplasias como en cáncer colorrectal, el cambio en el valor de NLR en el contexto adyuvante se relacionó con la supervivencia global (160). En nuestro estudio no hemos podido encontrar esta asociación en cáncer gástrico localizado.

En cuanto al análisis del estado inmune en estadios avanzados, en nuestro estudio analizamos el impacto pronóstico y predictivo del estado proinflamatorio en la cohorte de cáncer gástrico metastásico a través de parámetros analíticos como el ratio neutrófilo-linfocito, la proteína C reactiva y la albúmina. En este contexto existe también una

interrelación con el microambiente tumoral ya que la alteración en la expresión de diferentes miRNAs pueden alterar la maduración, función y desarrollo de células inmunes como los linfocitos T y los neutrófilos.

En el caso de miR-125a, Quin y colaboradores (161) demuestran en su estudio el papel modulador de este miRNA sobre los neutrófilos a través de la estimulación de la granulopoyesis. Por otra parte el miR-181a regula la sensibilidad del receptor de la célula T en el reconocimiento de antígenos presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (162) y, en el caso de miR145 su inhibición produce una menos diferenciación en la maduración de los neutrófilos (163).

El papel pronóstico de los ratios fue analizado en la cohorte de cáncer gástrico metastásico y encontramos que el NLR basal y cNLR son factores pronósticos independientes para supervivencia global en pacientes con quimioterapia paliativa. Combinando ambas medidas, también observamos la relación entre DScore con el pronóstico y respuesta radiológica.

En los últimos años, investigaciones recientes se han centrado en el estado inflamatorio del paciente y en la respuesta inmune, representando una nueva característica del cáncer. Varios estudios han establecido la relación entre marcadores inflamatorios y pronóstico en cáncer gástrico y otros tumores sólidos (127–130,164). Las células inmunes participan en esta respuesta, la cual es un proceso dinámico que puede ser modificado por el tratamiento. Sin embargo, el papel principal de los neutrófilos es la carcinogénesis no está completamente claro.

El NLR basal refleja el balance entre la respuesta inmune del paciente y la reacción inflamatoria tumoral en un punto estático de la enfermedad, el cual tiene un valor pronóstico en nuestro estudio. En

base a nuestros datos, un NLR basal elevado (≥ 3.96) fue un marcador pronóstico negativo (5.97 vs 10.87 meses, $p=0.001$) acorde con los datos publicados en la literatura (165,166). En el análisis multivariante, NLR basal también fue relacionado con supervivencia global (HR=2.16, 95% CI: 1.29- 3.61, $p=0.003$).

En base a este escenario dinámico, una determinación puntual de NLR podría no informar de forma adecuada sobre las modificaciones fisiológicas producidas por la quimioterapia en el tiempo, por lo tanto definimos el cNLR.

El Ratio neutrófilo-linfocito diferencial (cNLR) después del tratamiento es un factor importante a determinar porque podría reflejar una variación en el tumor y en las células inmunes después de la quimioterapia.

Por consiguiente, nuestra hipótesis está basada en que la relación entre el cambio en NLR después de dos ciclos tiene valor pronóstico en términos de supervivencia global. Nuestro estudio mostró que el incremento en el NLR después de dos ciclos de quimioterapia en primera línea (cNLR >0) fue significativamente relacionado con una peor supervivencia global (HR=2.36, 95% CI: 1.35-4.13, $p=0.003$) en pacientes con cáncer gástrico metastásico, apoyando que un cambio en NLR tiene un valor pronóstico significativo con mayor valor que una única determinación basal.

Combinamos ambas medidas, bNLR y cNLR, en DScore. Los pacientes fueron categorizados en tres grupos. El grupo de alto riesgo o DScore 2 presentó una supervivencia significativamente peor (diez meses) que el grupo de bajo riesgo o DScore 0 (mediana 2.43 vs 12.74 meses, $p<0.001$). El grupo de riesgo intermedio o DScore 1 presentó una mediana de supervivencia global de 7.68 meses.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que un parámetro dinámico, más que un valor puntual, podría tener mayor valor

pronóstico en términos de supervivencia global y predecir la respuesta tumoral de forma eficaz.

Además de lo anteriormente descrito, analizamos el valor predictivo de DScore. El grupo de alto riesgo o DScore 2 fue relacionado con peor respuesta a quimioterapia ($\chi^2=10.26$, $p=0.006$), mientras que el bNLR de forma aislada no fue relacionado con la respuesta, demostrando que esta determinación refleja solo el estado puntual basal y no la evolución tras el tratamiento. Esta clasificación nos ofrece un potencial método que nos permita una identificación temprana (tras dos ciclos) de los pacientes que se podrían beneficiar de un tratamiento quimioterápico y distinguirlos de aquellos que podrían no beneficiarse. Entonces, DScore podría ser considerado un factor de estratificación en futuros ensayos clínicos.

Podemos concluir que el estado inmune del paciente influye de forma significativa en el pronóstico del cáncer gástrico. Tanto a nivel postranscripcional, como bioquímico y clínico, la combinación de parámetros nos permite categorizar el riesgo de los pacientes y orientar la estrategia terapéutica.

5.1. LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO

Las limitaciones del estudio pueden afectar a la validez interna y externa del estudio. En el caso de la primera se incluyen los sesgos de confusión, selección, medición y análisis.

En lo que refiere al sesgo de confusión, éste puede afectar en estudios que investiguen una causalidad entre la exposición y el efecto, produciendo así una distorsión de los resultados. En el caso de la cohorte de cáncer gástrico localizado, el parámetro de la vitamina D podría verse alterado por la suplementación de la misma por vía oral a lo largo del tratamiento, por este motivo, la medición de la vitamina fue realizada al diagnóstico. En la cohorte de cáncer gástrico

metastásico el principal factor de confusión que podría alterar el valor de los neutrófilos (y así variar el ratio neutrófilo-linfocito) sería el tratamiento concomitante con corticoides o con infección activa en el momento de la determinación, por este motivo dichos pacientes fueron excluidos del estudio. Además debemos tener en cuenta que el tratamiento de quimioterapia puede tener como efecto secundario la neutropenia (niveles de neutrófilos por debajo de la normalidad), para evitar este factor de confusión, la determinación de neutrófilos tras dos ciclos de tratamiento se realizó tras la recuperación hematológica.

Los pacientes fueron seleccionados en las consultas de Oncología de los hospitales que participaron en el estudio, por lo tanto se trata de una muestra amplia conformada por pacientes de diferentes áreas sanitarias que cumplían con los criterios de inclusión de estudio.

La medición de parámetros bioquímicos, anatomopatológicos y moleculares ha sido realizada mediante técnicas validadas y de uso en la práctica clínica habitual en los hospitales de Galicia. Sin embargo, debemos tener en cuenta la posible variabilidad en la interpretación de los mismos, especialmente aquellos en los que exista una mayor dependencia del observador y entre los diferentes centros. Un problema de medición relevante, tal y como comentaba previamente en la discusión, es el metabolito de vitamina D utilizado en los análisis de laboratorio. De forma estandarizada se mide la 25(OH)D que es el metabolito previo a la activación dada su mayor estabilidad en sangre. Es necesario un último paso para llegar a la forma activa, de tal forma que en caso de existir un déficit de la enzima encargada de la activación, no estaremos observando el valor sérico real y activo de la vitamina D.

En el análisis del estudio se realizaron pruebas paramétricas y no paramétricas (éstas en el caso de número inferior de casos). El punto de corte de variables a estudio como el ratio neutrófilo-linfocito se realizó mediante curvas ROC y el análisis multivariante se llevó a

cabo para ajustar determinadas variables que podrían afectar a la relación de causalidad del parámetro analizado. Otras de las limitaciones de este trabajo, son el escaso número de pacientes en la cohorte de cáncer gástrico localizado y el diseño retrospectivo de la cohorte de cáncer gástrico metastásico.

Como se ha comentado anteriormente el estudio fue realizado en las consultas de Oncología de diferentes hospitales de la Comunidad Autónoma de Galicia por lo que el diseño multicéntrico es una de las fortalezas del estudio aunque con la limitación en la extrapolación a otras razas o etnias.

En conjunto, el estudio se adapta a las directrices de la iniciativa STROBE (Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology), como se hace constar en el Anexo a esta tesis.

Este estudio ha sido patrocinado dentro del Grupo Gallego de Investigación en Tumores Digestivos (GITuD).

Las fortalezas del estudio se han comentado de forma paralela a las limitaciones, posiblemente una de las mayores fortalezas sea que hemos usado determinaciones y parámetros de práctica clínica que están estandarizados y son homogéneos en lo resultados.

6

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

6.1 CONCLUSIONES EN LA COHORTE DE CÁNCER GÁSTRICO LOCALIZADO

- En nuestra cohorte de cáncer gástrico localizado un tercio de los pacientes presentan un déficit grave de vitamina D, el cual se relaciona de forma estadísticamente significativa con una menor supervivencia global. Estos pacientes con déficit grave de vitamina D presentan un menor tiempo hasta la recaída aunque de forma no significativa, además no demostramos una relación con el evento recaída ni con la respuesta a quimioterapia neoadyuvante.
- Observamos una sobreexpresión de miR-106b y de los miR-181-5p estudiados en tejido tumoral en comparación con el tejido normal adyacente. En el resto de miRNAs analizados no observamos diferencias significativas en los niveles de expresión entre ambos tejidos.
- Los pacientes con insuficiencia vitamina D presentan infraexpresión de miR-145 en tejido normal adyacente al tumor.
- La infraexpresión de miR106b en tejido normal adyacente al tumor se relaciona con el evento recaída, ausencia de respuesta a tratamiento neoadyuvante y menor supervivencia global.
- Observamos que los pacientes con infraexpresión de miR-125b, miR-181b-5p, miR181c-5p, miR-181d-5p en tejido

tumoral y adyacente al tumor presentan un menor tiempo hasta la recaída y peor supervivencia global.

- La puntuación de la escala PALV basada en los niveles basales de proteína C reactiva, albúmina, vitamina D y estado funcional ECOG distinguió un grupo de pacientes de alto riesgo (grupo C) con menor tiempo hasta la recaída y peor supervivencia global en comparación con los pacientes de bajo y riesgo intermedio de forma significativa e independiente.
- Los pacientes con un estado proinflamatorio (GPS elevado) y un peor estado nutricional (PNI bajo) presentan un tiempo hasta la recaída menor y peor supervivencia global.

6.2 CONCLUSIONES EN LA COHORTE DE CÁNCER GÁSTRICO METASTÁSICO

- Los pacientes con unos niveles basales elevados de NLR y un aumento del ratio neutrófilo-linfocito diferencial presentan una peor supervivencia global estadísticamente significativa. Los parámetros GPS y PNI no nos permiten distinguir a un subgrupo de pacientes con mejor pronóstico.
- Así la estratificación a través de la puntuación DScore, que combina el ratio neutrófilo-linfocito basal y diferencial, se relaciona con supervivencia global y respuesta a tratamiento de quimioterapia paliativo de forma significativa e independiente.
- Los niveles de vitamina D no se relacionan con la supervivencia global.

7

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Tsugane S, et al. Salt and salted food intake and subsequent risk of gastric cancer among middle-aged Japanese men and women. *Br J Cancer*. 2004;90(1):128–34.
2. Sung H, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–49.
3. Ferlay J, et al. World Health Organization (WHO) Database. Section of Cancer Surveillance, International Agency for Research on Cancer. Accessed 09 August 2019. p. Accessed 09 August 2019.
4. Parkin DM, et al. Epidemiology of cancer: Global patterns and trends. *Toxicol Lett*. 1998;102–103:227–34.
5. Bray F, et al. 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.
6. Balakrishnan M, et al. Changing Trends in Stomach Cancer Throughout the World. *Curr Gastroenterol Rep*. 2017;19(8).
7. Clinton SK, et al. The World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Third Expert Report on Diet, Nutrition, Physical Activity, and Cancer: Impact and Future Directions. *J Nutr*. 2020 Apr 1;150(4):663–671.
8. Rawla P, et al. Epidemiology of gastric cancer: Global trends, risk factors and prevention. *Prz Gastroenterol*. 2019;14(1):26–38.

9. Singh K, et al. Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer: An Asian enigma. *World J Gastroenterol*. 2006;12(9):1346–51.
10. Mukaisho KI, et al. Two distinct etiologies of gastric cardia adenocarcinoma: Interactions among pH, *Helicobacter pylori*, and bile acids. *Front Microbiol*. 2015;6:1–7.
11. Wu S, et al. Epstein–Barr Virus—Associated Gastric Carcinomas: Relation to *H. pylori* infection and genetic alterations. *Gastroenterology*. 2000;118:1031–8.
12. Lin XJ, et al. Body mass index and risk of gastric cancer: A meta-analysis. *Jpn J Clin Oncol*. 2014;44(9):783–91.
13. Krejs G, et al. Gastric Cancer. Epidemiology and Risk Factors. *Gastric Cancer Epidemiol Risk Factors*. 2010;28:600–3.
14. Howlader N, et al. SEER Cancer Statistics Review. Natl Cancer Institute Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/, Accessed 09 August 2021. p. Accessed 09 August 2021.
15. World Health Organization (WHO) Database,” Section of Cancer Tomorrow”. GLOBOCAN 2018. (<http://gco.iarc.fr/>) International Agency for Research on Cancer 2018. Accessed 09 August 2019.
16. Van Cutsem E, et al. Gastric cancer. *Lancet*. 2016;388:2654–6.
17. Siewert JS, et al. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Br J Surg*. 1998;85:1457–59.
18. Amin, MB, et al. AJCC Cancer Staging Manual, 8th edn. New York, NY: *Springer*, 2017.
19. Lauren P, et al. 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.
20. Bass AJ, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517):202–9.

21. Alsina M, et al. A Intratumoral heterogeneity in gastric cancer: a new challenge to face. *Ann Oncol*. 2017;28(5):912–3.
22. Chia N, et al. Molecular classification of gastric cancer. *Ann Oncol*. 2016;27:763–9.
23. Böger C, et al. Distinct molecular subtypes of gastric cancer: from Laurén to molecular pathology. *Oncotarget*. 2018;7(17).
24. Raziee HR, et al. Systematic review of the predictors of positive margins in gastric cancer surgery and the effect on survival. *Gastric Cancer*. 2012;15(suppl 1):116–24.
25. Songun I, et al. Surgical treatment of gastric cancer: 15-year follow-up results of the randomised nationwide Dutch D1D2 trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(5):439–49.
26. Cunningham D, et al. Perioperative Chemotherapy versus Surgery Alone for Resectable Gastroesophageal Cancer. *N Engl J Med*. 2006;355(1):11–20.
27. Al-Batran SE, 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 ra. *Lancet*. 2019;393(10184):1948–57.
28. Sung HN, 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*. 2014;15:1389–96.
29. Diaz-Nieto R, et al. Post-surgical chemotherapy versus surgery alone for resectable gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;(9):1465–858.
30. Macdonald JS, 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.

31. Smyth C, et al. Mismatch repair protein and gastric cancer MAGIC. *JAMA Oncol.* 2017 Sep 1;3(9):1197-1203.
32. Kim SY, 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.
33. Bang Y-J, 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.
34. Wilke H, 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. *Lancet Oncol.* 2014;15(11):1224–35.
35. Fuchs CS, et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2014;383(9911):31–9.
36. Fuchs CS, et al. Safety and efficacy of pembrolizumab monotherapy in patients with previously treated advanced gastric and gastroesophageal junction cancer: Phase 2 clinical KEYNOTE-059 trial. *JAMA Oncol.* 2018;4(5):1–8.
37. Abdel-Rahman O, et al. Immune checkpoints aberrations and gastric cancer; assessment of prognostic value and evaluation of therapeutic potentials. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;97:65–71.
38. Kang Y-K, et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-

- blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2017;390(10111):2461–71.
39. Janjigian YY, et al. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (CheckMate 649): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2021;398(10294):27–40.
 40. Vogelstein B, et al. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;340(6127):1546–58.
 41. Esteller M., et al. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011;12(12):861–74.
 42. Crick F, et al. Central dogma of molecular biology. *Nature*. 1970;227:561–3.
 43. Dunham I, et al. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012;489(7414):57–74.
 44. Taft RJ, et al. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *BioEssays*. 2007;29(3):288–99.
 45. Storz G, et al. An Expanding Universe of Noncoding RNAs. *Science* 2002;296:1260–3.
 46. Ghildiyal M, et al. Small silencing RNAs: An expanding universe. *Nat Rev Genet*. 2009;10(2):94–108.
 47. Mannoor K, et al. Small nucleolar RNAs in cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2012;1826(1):121–8.
 48. Kim VN, et al. Small RNAs just got bigger: Piwi-interacting RNAs (piRNAs) in mammalian testes. *Genes Dev*. 2006;20(15):1993–7.
 49. Kurokawa R, et al. Long noncoding RNAs structures and functions. *Long Noncoding RNAs Structures and Functions*. ISBN 978-4-431-55575-9. Japón, 2015. 1–257

50. Carthew RW, et al. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4):642–55.
51. Xiao C, et al. MicroRNA Control in the Immune System: Basic Principles. *Cell*. 2009;136(1):26–36.
52. Kent OA, et al. A small piece in the cancer puzzle: MicroRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*. 2006;25(46):6188–96.
53. Alessandrini L, et al. Proposed molecular and miRNA classification of gastric cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6).
54. Wightman B, et al. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855–62.
55. Feinbaum R, A et al. The *C. elegans* Heterochronic Gene lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to lin-14. *Cell*. 2004;116(116):843–54.
56. He L, et al. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004;5(7):522–31.
57. Zhang Z, et al. MicroRNA and signaling pathways in gastric cancer. *Cancer Gene Ther*. 2014;21(8):305–16.
58. Tchernitsa O, et al. Systematic evaluation of the miRNA-ome and its downstream effects on mRNA expression identifies gastric cancer progression. *J Pathol*. 2010;222(3):310–9.
59. Wu HH, et al. Advances in molecular biomarkers for gastric cancer: MiRNAs as emerging novel cancer markers. *Expert Rev Mol Med*. 2014;16(January):1–18.
60. Zhang Z, et al. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Lab Investig*. 2008;88(12):1358–66.
61. Cui Y, et al. MiR-29a inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest through the downregulation of p42.3 in human gastric cancer. *PLoS One*. 2011;6(10):1–8.

62. Takagi T, et al. Decreased Expression of MicroRNA-143 and-145 in Human Gastric Cancers. *Oncology*. 2009;77(1):12–21.
63. Lewis BP, et al. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*. 2003;115:787–98.
64. Gao P, et al. The molecular mechanism of microRNA-145 to suppress invasion-metastasis cascade in gastric cancer. *Oncogene*. 2013;32(4):491–501.
65. Wang J, et al. Effect of miR-145 on gastric cancer cells. *Mol Med Rep*. 2019;49(5):3403–10.
66. Lei C, et al. MIR-143 & MIR-145 inhibit gastric cancer cell migration & metastasis by suppressing MYO6. *Cell Death Dis* . 2017;8(10).
67. Chang S 'e, et al. miR-145 mediates the antiproliferative and gene regulatory effects of vitamin D3 by directly targeting E2F3 in gastric cancer cells. *Oncotarget*. 2015;1–11.
68. Chen JJ, et al. Reverse correlation between microRNA-145 and FSCN1 affecting gastric cancer migration and invasion. *PLoS One*. 2015;10(5):1–13.
69. Jiang SB, et al. MicroRNA-145-5p inhibits gastric cancer invasiveness through targeting N-cadherin and ZEB2 to suppress epithelial-mesenchymal transition. *Onco Targets Ther*. 2016;9:2305–15.
70. Kou YB, Z et al. Knockdown of MMP11 inhibits proliferation and invasion of gastric cancer cells. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013;26(2):361–70.
71. Qiu T, et al. MiR-145, miR-133a and miR-133b inhibit proliferation, migration, invasion and cell cycle progression via targeting transcription factor Sp1 in gastric cancer. *FEBS Lett* . 2014;588(7):1168–77.
72. Zhang HB, et al. miR-143 suppresses the proliferation of NSCLC cells by inhibiting the epidermal growth factor receptor. *Exp Ther Med*. 2016;12(3):1795–802.

73. Su J, et al. MiR-143 and MiR-145 regulate IGF1R to suppress cell proliferation in colorectal cancer. *PLoS One*. 2014;9(12):1–15.
74. Huang SJ, et al. Study of miR-143 expression in stomach cancer. *Oncol Lett*. 2018;16(4):4367–71.
75. Li X, et al. Identification of new aberrantly expressed miRNAs in intestinal-type gastric cancer and its clinical significance. *Oncol Rep*. 2011;26(6):1431–9.
76. Wu XL, et al. MicroRNA-143 suppresses gastric cancer cell growth and induces apoptosis by targeting COX-2. *World J Gastroenterol*. 2013;19(43):7758–65.
77. Mohri T, et al. MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int J Cancer*. 2009;125(6):1328–33.
78. Fassan M, et al. The HER2-miR125a5p/miR125b loop in gastric and esophageal carcinogenesis. *Hum Pathol*. 2013;44(9):1804–10.
79. Zhang X, et al. The functional mechanism of miR-125b in gastric cancer and its effect on the chemosensitivity of cisplatin. *Oncotarget*. 2018;9(2):2105–19.
80. Wu S, et al. MIR-125b Suppresses Proliferation and Invasion by Targeting MCL1 in Gastric Cancer. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
81. Yang P, et al. MicroRNA-338 inhibits growth, invasion and metastasis of lung cancer by targeting NRP1 expression. *PLoS One*. 2014;9(4):e94422.
82. Guo B, et al. miR-338-3p suppresses gastric cancer progression through a PTEN-AKT axis by targeting P-REX2a. *Mol Cancer Res*. 2014;12(3):313–21.
83. Fassan M, et al. Early miR-223 Upregulation in Gastroesophageal Carcinogenesis. *Am J Clin Pathol*. 2017;147(3):301–8.

84. Wang Z, et al. MiR-99b-5p and miR-203a-3p function as tumor suppressors by targeting IGF-1R in gastric cancer. *Sci Reports Nat.* 2018;8(1):1–12.
85. Kasiappan R, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses telomerase expression and human cancer growth through microRNA-498. *J Biol Chem.* 2012;287(49):41297–309.
86. Zhao T, et al. Upregulating microRNA-498 inhibits gastric cancer proliferation invasion and chemoresistance through inverse interaction of Bmi1. *Cancer Gene Ther.* 2019;26(11–12):366–73.
87. Alvarez-Díaz S, et al. MicroRNA-22 is induced by vitamin D and contributes to its antiproliferative, antimigratory and gene regulatory effects in colon cancer cells. *Hum Mol Genet.* 2012;21(10):2157–65.
88. Zuo QF, et al. MicroRNA-22 inhibits tumor growth and metastasis in gastric cancer by directly targeting MMP14 and Snail. *Cell Death Dis.* 2015;6(11):1–12.
89. Lu Q, et al. MicroRNA-181a functions as an oncogene in gastric cancer by targeting caprin-1. *Front Pharmacol.* 2019;9:1–10.
90. Li LQ, et al. MicroRNA-181b inhibits glycolysis in gastric cancer cells via targeting hexokinase 2 gene. *Cancer Biomarkers.* 2016;17(1):75–81.
91. Yang TS, et al. MicroRNA-106b in cancer-associated fibroblasts from gastric cancer promotes cell migration and invasion by targeting PTEN. *FEBS Lett* 2014;588(13):2162–9.
92. Guo W, et al. Promotion of cell proliferation through inhibition of cell autophagy signalling pathway by Rab3IP is restrained by microRNA-532-3p in gastric cancer. *J Cancer.* 2018;9(23):4363–73.
93. Dai X, et al. Circular RNA circFGD4 suppresses gastric cancer progression via modulating miR-532-3p/APC/ β -catenin signalling pathway. *Clin Sci.* 2020;134(13):1821–39.

94. Navarro-Moreno M, et al. Puesta al día : Metabolismo óseo . Vitamina D pruebas de laboratorio Y PTH en Endocrinología y Nutrición. *Endocrinol Nutr.* 2006;53(3):199–208.
95. Zeljic K, et al. New insights into vitamin D anticancer properties: focus on miRNA modulation. *Mol Genet Genomics.* 2017;292(3):511–24.
96. Feldman D, et al. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(5):342–57.
97. Deeb KK, et al. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(9):684–700.
98. Bises G, et al. 25-Hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase expression in normal and malignant human colon. *J Histochem Cytochem.* 2004;52(7):985–9.
99. Cross HS, et al. The Vitamin D endocrine system of the gut - Its possible role in colorectal cancer prevention. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;97(1–2):121–8.
100. Goyal H, et al. Vitamin D and Gastrointestinal Cancers: A Narrative Review. *Dig Dis Sci.* 2019;64(5):1098–109.
101. Palmieri C, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels in early and advanced breast cancer. *J Clin Pathol.* 2006;59(12):1334–6.
102. Feldman D, et al. Vitamin D and prostate cancer. *Endocrinology.* 2000;141(1):5–9.
103. Giovannucci E, et al. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(7):451–9.
104. Hargrove L, et al. Vitamin D and GI cancers : shedding some light on dark diseases. *Annals of Translational Medicine* 2014;2(2):1–9.
105. Vuolo L, et al. Vitamin D and cancer. *Front Endocrinol.* 2012;3:1–13.

106. Lamprecht SA, et al. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: Molecular mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(8):601–14.
107. Jiang F, et al. Induction of ovarian cancer cell apoptosis by 1,25-dihydroxyvitamin D 3 through the down-regulation of telomerase. *J Biol Chem*. 2004;279(51):53213–21.
108. Lopes N, et al. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D 3 induces de novo E-cadherin expression in triple-negative breast cancer cells by CDH1-promoter demethylation. *Anticancer Res*. 2012;32:249–57.
109. Bao BY, et al. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits prostate cancer cell invasion via modulation of selective proteases. *Carcinogenesis*. 2006;27(1):32–42.
110. Shany S, et al. Vitamin D and myofibroblasts in fibrosis and cancer: At cross-purposes with TGF- β /SMAD signaling. *Anticancer Res*. 2016;36(12):6225–34.
111. Bao A, et al. Tumor-suppressive effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in gastric cancer cells. *Hepatogastroenterology*. 2013;60(124):943–8.
112. Baek S, et al. Vitamin D3 regulates cell viability in gastric cancer and cholangiocarcinoma. *Journal of Biosciences* 2011;44(3):204.
113. Ren C, et al. Prognostic effects of 25-hydroxyvitamin D levels in gastric cancer. *J Transl Med*. 2012;10(1):16.
114. Durak Ş, et al. The effects of serum levels, and alterations in the genes of binding protein and receptor of vitamin D on gastric cancer. *Mol Biol Rep*. 2019;(0123456789).
115. Chang S, et al. miR-99b-3p is induced by vitamin D3 and contributes to its antiproliferative effects in gastric cancer cells by targeting HoxD3. *Biol Chem*. 2019;400(8):1079–86.

116. Colotta F, et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1073–81.
117. Topalian SL, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2443–54.
118. Le DT, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2509–20.
119. Giampieri R, et al. Mismatch repair deficiency may affect clinical outcome through immune response activation in metastatic gastric cancer patients receiving first-line chemotherapy. *Gastric Cancer*. 2016;20(1):156–63.
120. Waldner MJ, et al. Colitis-associated cancer: The role of T cells in tumor development. *Semin Immunopathol*. 2009;31(2):249–56.
121. Mantovani A, et al. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436–44.
122. Grivennikov SI, et al. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*. 2010;140(6):883–99.
123. Crusz SM, et al. Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(10):584–96.
124. Shankaran V, et al. IFN γ , and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001;410(6832):1107–11.
125. Dunn GP, et al. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*. 2004;21:137–48.
126. Wargo JA, A et al. Immune Effects of Chemotherapy, Radiation, and Targeted Therapy and Opportunities for Combination With Immunotherapy. *Semin Oncol*. 2015;42(4):601–16.

127. Diakos CI, et al. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol.* 2014;15(11):e493–503.
128. Li S, et al. Systemic Inflammation Response Index (SIRI), cancer stem cells and survival of localised gastric adenocarcinoma after curative resection. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2017;
129. Sun X, et al. Albumin concentrations plus neutrophil lymphocyte ratios for predicting overall survival after curative resection for gastric cancer. *Onco Targets Ther.* 2016;Volume 9:4661–9.
130. Saito H, et al. Prognostic Significance of the Preoperative Ratio of C-Reactive Protein to Albumin and Neutrophil–Lymphocyte Ratio in Gastric Cancer Patients. *World J Surg.* 2017;42(6):1819–25.
131. Ocana A, et al. Neutrophils in cancer: prognostic role and therapeutic strategies. *Mol Cancer.* 2017;16(1).
132. Jadwiga J, et al. The regulation of pre-metastatic niche formation by neutrophils. *Oncotarget.* 2017;8(67):112132–44.
133. Liang W, et al. The Complex Role of Neutrophils in Tumor Angiogenesis and Metastasis. *Cancer Immunol Res.* 2016;4(2):83–91.
134. Coffelt SB, et al. Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(7):431–46.
135. Fridlender ZG, et al. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell.* 2009;16(3):183–94.
136. Grenader T, et al. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in advanced oesophago-gastric cancer: exploratory analysis of the REAL-2 trial. *Ann Oncol.* 2016;27(4):687–92.
137. Chen L, et al. Monocyte to lymphocyte ratio predicts survival in patients with advanced gastric cancer undergoing

- neoadjuvant chemotherapy. *Onco Targets Ther.* 2017;Volume 10:4007–16.
138. Shimada H, et al. High preoperative neutrophil-lymphocyte ratio predicts poor survival in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2010;13(3):170–6.
139. Chen J, et al. Meta-analysis of associations between neutrophil-to-lymphocyte ratio and prognosis of gastric cancer. *World J Surg Oncol.* 2015;13(1).
140. Benitez JC, et al. Lincp21-rna as predictive response marker for preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *J Pers Med.* 2021;11(5).
141. Camp RL, et al. X-tile: A new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimization. *Clin Cancer Res.* 2004;10(21):7252–9.
142. Dunn GP, et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002 Nov;3(11):991-8.
143. Wu X, et al. Repurposing vitamin D for treatment of human malignancies via targeting tumor microenvironment. *Acta Pharm Sin B.* 2019;9(2):203–19.
144. Liu W, et al. The anti-inflammatory effects of vitamin D in tumorigenesis. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9).
145. Fraga M, et al. Immunomodulation of T Helper Cells by Tumor Microenvironment in Oral Cancer Is Associated With CCR8 Expression and Rapid Membrane Vitamin D Signaling Pathway. *Front Immunol.* 2021;12(May):1–20.
146. Karkeni E, et al. Vitamin D controls tumor growth and CD8+ T Cell infiltration in breast cancer. *Front Immunol.* 2019;10:1–12.
147. Marliot F, et al. Analytical validation of the Immunoscore and its associated prognostic value in patients with colon cancer. *J Immunother Cancer.* 2020;8(1):13–5.

148. TheHumanProteinAtlas. www.proteinatlas.org. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000115009-CCL20/tissue>. Accessed 09 August 2021. p. Accessed 09 August 2021.
149. Yin J, et al. Polymorphisms of VDR gene and risk of gastric cardiac adenocarcinoma in Chinese population. *Oncotarget*. 2017;8(28):45531–43.
150. Cong L, et al. Foki polymorphism of the vitamin d receptor gene is associated with susceptibility to gastric cancer: A case-control study. *Tohoku J Exp Med*. 2015;236(3):219–24.
151. Gallardo Martin E, et al. Vitamin D modulation and microRNAs in gastric cancer : prognostic and therapeutic role. *Transl Cancer Res*. 2021;10(6).
152. Kim B, et al. Dysregulated miRNA in a cancer-prone environment: A study of gastric non-neoplastic mucosa. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–9.
153. Srivastava S, et al. The PreCancer Atlas (PCA). *Trends in Cancer* . 2018;4(8):513–4.
154. Pereira AL, et al. Epigenetic field cancerization in gastric cancer: MicroRNAs as promising biomarkers. *J Cancer*. 2019;10(6):1560–9.
155. Fang Y, et al. MiR-106a confers cisplatin resistance by regulating PTEN/Akt pathway in gastric cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin* . 2013;45(11):963–72.
156. Chen L, et al. Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nat Commun*. 2014;5:1–12.
157. Smyth EC, 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;3(9):1197–203.

158. Pietrantonio F, et al. Individual Patient Data Meta-Analysis of the Value of Microsatellite Instability As a Biomarker in Gastric Cancer. *J Clin Oncol*. 2019;JCO.19.01124.
159. Migita K, et al. A decrease in the prognostic nutritional index is associated with a worse long-term outcome in gastric cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Surg Today*. 2017;47(8):1018–26.
160. Li Z, Z et al. The dynamic change of neutrophil to lymphocyte ratio can predict clinical outcome in stage I-III colon cancer. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–8.
161. Qin Y, et al. MiR-125a Is a critical modulator for neutrophil development. *PLoS Genet*. 2017;13(10):1–22.
162. Li QJ, et al. miR-181a Is an Intrinsic Modulator of T Cell Sensitivity and Selection. *Cell*. 2007;129(1):147–61.
163. Batliner J, et al. Inhibition of the miR-143/145 cluster attenuated neutrophil differentiation of APL cells. *Leuk Res*. 2012;36(2):237–40.
164. Templeton AJ, et al. Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JNCI J Natl Cancer Inst* . 2014 Jun 1;106(6):dju124–dju124.
165. Zhang X, et al. Prognostic Significance of Neutrophil Lymphocyte Ratio in Patients with Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2014;9(11):e111906.
166. Dell’Aquila E, et al. Prognostic and predictive role of neutrophil/ lymphocytes ratio in metastatic colorectal cancer: A retrospective analysis of the TRIBE study by GONO. *Ann Oncol*. 2018;29(4):924–30.

8

Anexos

ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO

HOJA DE INFORMACIÓN AL/LA PARTICIPANTE ADULTO/A

TÍTULO DEL ESTUDIO: Biomarcadores en cáncer gástrico avanzado y metastásico, el papel predictivo y pronóstico de la vitamina D.

INVESTIGADOR: *(a cubrir por el investigador)*

CENTRO: Servicio de Oncología de *(a cubrir por el investigador)*

Este documento tiene por objeto facilitarle información sobre un estudio de investigación en

el que se le invita a participar. Este estudio fue aprobado por el Comité de ética de la Investigación.

Si decide participar en el mismo, debe recibir información personalizada del investigador, leer antes este documento y hacer todas las preguntas que precise para comprender los detalles sobre el mismo.

Si así lo desea, puede llevar el documento, consultarlo con otras personas, y tomar el tiempo necesario para decidir si participar o no.

La participación en este estudio es completamente voluntaria. Ud. puede decidir no participar o, si acepta hacerlo, cambiar de parecer retirando el consentimiento en cualquier momento sin tener que dar explicaciones. Le aseguramos que esta decisión no afectará a su

relación con el médico ni a la asistencia sanitaria a la que Ud. tiene derecho.

¿Cuál es el propósito del estudio?

Este estudio tiene como objetivo estudiar la relación del nivel de vitamina D en sangre con la evolución de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

¿Por qué me ofrecen participar a mí?

Ud. es invitado a participar porque está diagnosticado de cáncer gástrico y se encuentra a tratamiento/seguimiento en el Servicio de Oncología.

¿En qué consiste mi participación?

Su participación implica el acceso a su historia clínica para la recogida y el análisis de datos referentes a su enfermedad: análisis de sangre, pruebas radiológicas y visitas médicas.

Además si está de acuerdo en la participación en el estudio, se realizarán estudios moleculares en la muestra obtenida durante la cirugía a la que haya sido sometido previamente. Su participación no implicará análisis o consultas adicionales a las necesarias en base a su patología y situación clínica.

El investigador puede decidir finalizar el estudio antes de lo previsto o interrumpir a su participación. En todo caso se le informará de los motivos de su retirada.

¿Qué molestias o inconvenientes tiene?

Su participación no implica molestias adicionales a las de la práctica asistencial habitual.

¿Obtendré algún beneficio por participar?

No se espera que Ud. obtenga beneficio directo por participar en el estudio. Esta información podrá ser de utilidad en un futuro para otras personas.

¿Recibiré la información que se obtenga del estudio?

Si Ud. lo desea, se le facilitará un resumen de los resultados del estudio. También podrá recibir los resultados de las pruebas que se realicen con sus muestras si así lo solicita dirigiéndose al investigador. Estos resultados pueden no tener aplicación clínica ni una interpretación clara, por lo que, si quiere disponer de ellos, deberían ser comentados con el médico del estudio.

¿Se publicarán los resultados de este estudio?

Los resultados de este estudio serán remitidos a publicaciones científicas para su difusión, pero no se transmitirá ningún dato que pueda llevar a la identificación de los participantes.

¿Cómo se protegerá la confidencialidad de mis datos y muestras?

El tratamiento, comunicación y cesión de sus datos se hará conforme a lo dispuesto por la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal y la ley 3/2018 de protección de datos.

Solo el equipo investigador, y las autoridades sanitarias, que tienen el deber de guardar la confidencialidad, tendrán acceso a todos los datos recogidos por el estudio. Se puede transmitir a terceros información que no pueda ser identificada. En el caso de que alguna información sea transmitida a otros países, se realizará con un nivel de protección de los datos equivalente, como mínimo, al exigido por la normativa de nuestro país.

Sus datos y muestras biológicas serán recogidos y conservados durante el estudio de modo:

- Codificados, que quiere decir que poseen un código con el que el equipo investigador podrá conocer a quien pertenecen.

- Al terminar el estudio:

Las muestras de suero sanguíneo serán destruidas tras una semana desde la extracción.

Las muestras de tejido tumoral serán devueltas al Servicio de Anatomía Patológica para el almacenaje habitual con fines asistenciales.

El responsable de la custodia de los códigos de asociación de sus datos es el investigador principal de su centro *(a cubrir por el investigador)*

Usted puede solicitar el acceso, la rectificación, cancelación u oposición sobre el uso sus datos personales indicándolo ante el personal médico sanitario del Servicio de Oncología. Sus datos serán eliminados de la base de datos del estudio y las muestras devueltas al Servicio de

Anatomía Patológica para su almacenaje habitual de muestras con fines asistenciales.

¿Existen intereses económicos en este estudio?

Esta investigación es promovida por el Servicio de Oncología de Pontevedra sin fondos aportados por ningún organismo.

El investigador no recibirá retribución específica por la dedicación al estudio.

Ud. no será retribuido por participar.

¿Cómo contactar con el equipo investigador de este estudio?

Ud. puede contactar con el investigador principal de su centro:
..... (*a cubrir por el investigador*)

En el teléfono:(*a cubrir por el investigador*) o
bien mediante correo electrónico: estudiosobrevitaminad@gmail.com

Muchas gracias por su colaboración.

ANEXO 2.

LISTA DE VERIFICACIÓN DE RECOMENDACIONES PARA TESIS EDI SAÚDE. GENERAL

Sí-No-N/A		Página
Para todas las Tesis		
Sí	Declaración de potenciales conflictos de interés por parte del autor	9
Sí	Declaración sobre el origen y copyright de las figuras no originales y permiso en caso necesario. Incluirlos en el pie de cada figura no original.	9
N/A	Lista de adecuación estadística en caso de no cubrir ninguna de las otras tres checklist específicas.	
Para Tesis que implican a seres humanos, sus muestras o sus datos de carácter personal		
Sí	Declaración sobre su aprobación por el comité de ética de la investigación	112-113
Sí	Código de registro del estudio	112
Sí	Copia del informe favorable	209-214
N/A	Declaración de que los datos se basan en información anónima y por tanto no se necesita aprobación del comité de ética de la investigación	
Sí	Si el estudio es observacional, checklist STROBE	201-205
Para Tesis que describen un ensayo clínico		
N/A	Declaración sobre su autorización por la Agencia Española de Medicamentos y productos sanitarios.	
N/A	Copia de la autorización	
N/A	Checklist CONSORT	

Sí-No-N/A		Página
Para Tesis que usan células troncales humanas, embrionarias o inducidas		
N/A	Declaración sobre su autorización	
N/A	Referencia de la autorización	
N/A	Copia de la autorización	
Para Tesis que incluyen estudios con animales de experimentación		
N/A	Declaración de su autorización	
N/A	Número de la autorización del proyecto de experimentación animal	
N/A	Registro del centro de usuario autorizado si es español	
N/A	Copia del certificado de capacitación si los experimentos los ha hecho el doctorando	
N/A	Indicación de la persona, empresa o servicio que llevó a cabo el experimento en su caso	
N/A	Checklist ARRIVE	

Firma doctorando

Antía Cousillas

ANEXO 3.

LISTA DE VERIFICACIÓN PARA TESIS CON ESTUDIOS OBSERVACIONALES. EPIDEMIOLOGÍA STROBE

Sí/no/NA		página
Título y resumen		
Sí	Indique, en el título o en el resumen, el diseño del estudio	11
Sí	Proporcione en el resumen una sinopsis informativa y equilibrada de lo que se ha hecho y lo que se ha encontrado.	11
Introducción		
Sí	Indique el fundamento científico de la Investigación que se comunica	35-85
Objetivos		
Sí	Indique los objetivos específicos, incluida cualquier hipótesis preespecificada	89-91
Material y métodos		
Diseño del estudio		
Sí	Presente los elementos clave del diseño del estudio	95
Contexto		
Sí	Describa el marco, los lugares y las fechas relevantes, incluidos los períodos de reclutamiento, exposición, seguimiento y recogida de datos.	95-96
Participantes		
Sí	Para estudios de cohortes: proporcione los criterios de elegibilidad, así como las fuentes y el método de selección de los participantes. Especifique los métodos de seguimiento	96-100

Sí/no/NA		página
N/A	Estudios de casos y controles: proporcione los criterios de elegibilidad, así como las fuentes y el proceso diagnóstico de los casos y el de selección de los controles. Proporcione las razones para la elección de casos y controles.	NA
N/A	Estudios transversales: proporcione los criterios de elegibilidad y las fuentes y métodos de selección de los participantes	NA
N/A	Estudios de cohortes apareados. Proporcione los criterios para la formación de parejas y el número de participantes con y sin exposición	NA
N/A	Estudios de casos y controles apareados. Proporcione los criterios para la formación de las parejas y el número de controles por cada caso	NA
Variables		
Sí	Defina claramente todas las variables: de respuesta, exposiciones, predictoras, confusoras y modificadoras del efecto. Si procede, proporcione los criterios diagnósticos.	100-106
Fuentes de datos/medidas		
Sí	Para cada variable de interés, proporcione las fuentes de datos y los detalles de los métodos de valoración (medida).	106-109
Sí	Si hubiera más de un grupo, especifique la comparabilidad de los procesos de medida	106-109
Sesgos		
Sí	Especifique todas las medidas adoptadas para afrontar fuentes potenciales de sesgo	109, 165-167
Tamaño muestral		
Sí	Explique cómo se determinó el tamaño muestral	109-110
VARIABLES CUANTITATIVAS		
Sí	Explique cómo se trataron las variables cuantitativas en el análisis. Si procede, explique cómo se categorizaron y por qué	110
MÉTODOS ESTADÍSTICOS		
Sí	Especifique todos los métodos estadísticos, incluidos los empleados para controlar los factores de confusión	110-112

Sí/no/NA		página
Sí	Especifique todos los métodos utilizados para analizar subgrupos e interacciones	110-112
Sí	Explique el tratamiento de los datos ausentes (missing data)	111
Sí	Estudio de cohortes: si procede, explique cómo se afrontan las pérdidas en el seguimiento	111
N/A	Estudios de casos y controles: si procede, explique cómo se aparearon casos y controles	NA
N/A	Estudios transversales: si procede, especifique cómo se tiene en cuenta en el análisis la estrategia de muestreo	NA
Sí	Describa los análisis de sensibilidad	110-112
Resultados		
Participantes		
Sí	Número de participantes en cada fase del estudio; por ejemplo: cifras de los participantes potencialmente elegibles, los analizados para ser incluidos, los confirmados elegibles, los incluidos en el estudio, los que tuvieron un seguimiento completo y los analizados	96-97
Sí	Razones de la pérdida de participantes en cada fase	97
Sí	Considere el uso de un diagrama de flujo	97
Datos descriptivos		
Sí	Características de los participantes en el estudio (p. ej., demográficas, clínicas, sociales) e información sobre exposiciones y posibles factores de confusión	117-125, 142-144
Sí	Número de participantes con datos ausentes en cada variable de interés	121-125, 142-144
Sí	Estudios de cohortes: resume el período de seguimiento (p. ej., promedio y total)	121, 144
Datos de las variables de resultado		
Sí	Estudios de cohortes: describa el número de eventos del efecto, o bien proporcione medidas resumen a lo largo del tiempo	125- 142,144- 150
N/A	Estudios de casos y controles: describa el número de participantes en cada categoría de exposición, o bien proporcione medidas resumen de exposición	NA

Sí/no/NA		página
N/A	Estudios transversales: describa el número de eventos del efecto, o bien proporcione medidas resumen	NA
Resultados principales		
Sí	Proporcione estimaciones crudas (no ajustadas) y, si procede, ajustadas por factores de confusión, así como su precisión (p. ej., intervalos de confianza del 95%). Especifique los factores de confusión por los que se ajusta y las razones para incluirlos	132-135, 143-147
Sí	Si categoriza variables continuas, describa los límites de los intervalos	121-125, 142-144
N/A	Si fuera pertinente, valore acompañar las estimaciones del riesgo relativo con estimaciones del riesgo absoluto para un período de tiempo relevante	NA
Otros análisis		
N/A	Describa otros análisis efectuados (de subgrupos, interacciones o sensibilidad)	NA
Discusión		
Resultados clave		
Sí	Resuma los resultados principales de los objetivos del estudio	153-165
Limitaciones		
Sí	Discuta las limitaciones del estudio, teniendo en cuenta posibles fuentes de sesgo o de imprecisión. Razone tanto sobre la dirección como sobre la magnitud de cualquier posible sesgo	165-167
Interpretación		
Sí	Proporcione una interpretación global prudente de los resultados considerando objetivos, limitaciones, multiplicidad de análisis, resultados de estudios similares y otras pruebas empíricas relevantes	153-165
Generabilidad		
Sí	Discuta la posibilidad de generalizar los resultados (validez externa)	166-167

Sí/no/NA		página
Financiación		
Sí	Especifique la financiación y el papel de los patrocinadores del estudio y, si procede, del estudio previo en el que se basa el presente trabajo	167

Basado en la declaración STROBE. Lista de puntos esenciales que deben describirse en la publicación de estudios observacionales

Firma Doctorando

ANEXO 4.

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA



Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral. Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 548425; ceic@sergas.es



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE PONTEVEDRA-VIGO-OURENSE

María Asunción Verdejo González, secretaria del Comité de Ética de la Investigación de Pontevedra-Vigo-Ourense

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 22/11/16 el estudio:

Título: Biomarcadores en cáncer gástrico avanzado y metastásico, el papel predictivo y pronóstico de la vitamina D

Promotor: Antía Cousillas Castiñeiras

Tipo de estudio:

Version:

Código del Promotor:

Código de Registro:2016/324

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos de la Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para la realización del estudio **por el/la investigador/a del centro:**

Centros	Investigadores Principales
C.H. de Pontevedra	Antía Cousillas Castiñeiras



Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es



Y HACE CONSTAR QUE:

1. El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Pontevedra-Vigo-Ourense cumple los requisitos legales vigentes (Ley 14/2007 de Investigación Biomédica y el Decreto 63/2013 por el que se regulan los comités de ética de investigación en Galicia).
2. El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Pontevedra-Vigo-Ourense tanto en su composición como en sus procedimientos normalizados de trabajo cumple las Normas de Buena Práctica Clínica (CPMP/ICH/135/95).
3. La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Pontevedra-Vigo-Ourense es:
 - D. Alfonso Casas Losada (**Presidente**). Médico especialista en Psiquiatría
 - D. Santiago Pérez Cachafeiro (**Vicepresidente**). Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.
 - D^a. Asunción Verdejo González (**Secretaria**). Médica Especialista en Farmacología Clínica.
 - D. Víctor del Campo Pérez (**Secretario Suplente**). Médico Especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública.
 - D^a. Iria Aparicio Rodríguez. Médica especialista en Obstetricia y Ginecología.
 - D^a. Aurelia Constenla Castro. Diplomada Universitaria de Enfermería.
 - D^a. Patricia Iglesias López. Licenciada en Derecho.
 - D. Jorge Luis Arias Otero. Licenciado en Físicas.
 - D. Adolfo Paradela Carreiro. Farmacéutico de Atención Especializada.
 - D^a. María Eva Pérez López. Médica Especialista en Oncología Médica.
 - D^a. María de las Mercedes Guerra García. Farmacéutica de Atención Primaria.
 - D^a. Cristina Torreira Banzas. Médica Especialista en Análisis Clínicos.
 - D^a. Miriam Vázquez Campo. Diplomada Universitaria de Enfermería.

Para que conste donde proceda, y a petición del promotor / investigador.

En Vigo, a 29 de Noviembre de 2016





Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral. Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; oeic@sergas.es



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE PONTEVEDRA-VIGO-OURENSE

Maria Asunción Verdejo González, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de Pontevedra-Vigo-Ourense

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 21/03/2017 la modificación al estudio:

Título: Biomarcadores en cáncer gástrico avanzado y metastásico, el papel predictivo y pronóstico de la vitamina D

Promotor: *Antía Cousillas Castiñeiras*

Enmienda: ampliación Complejo Hospitalario de Vigo; Hospital Universitario Lucus Augusti; Complejo Hospitalario Universitario de Ourense; Complejo Hospitalario Universitario de Ferrol

Código del Promotor:

Código de Registro: 2016/324

Y que este Comité emite un **INFORME FAVORABLE** de conformidad con sus procedimientos normalizados de trabajo y tomando en cuenta los requisitos éticos, metodológicos y legales exigibles a los estudios de investigación con seres humanos, sus muestras o registros, que dicha enmienda sea incorporada al estudio de investigación que se está realizando en los centros aprobados.



Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es



Y HACE CONSTAR QUE:

1. El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Pontevedra-Vigo-Ourense cumple los requisitos legales vigentes (Ley 14/2007 de Investigación Biomédica y el Decreto 63/2013 por el que se regulan los comités de ética de investigación en Galicia).
2. El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Pontevedra-Vigo-Ourense tanto en su composición como en sus procedimientos normalizados de trabajo cumple las Normas de Buena Práctica Clínica (CPMP/ICH/135/95).
3. La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Pontevedra-Vigo-Ourense es:
 - D. Alfonso Casas Losada (**Presidente**). Médico especialista en Psiquiatría
 - D. Santiago Pérez Cachafeiro (**Vicepresidente**). Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.
 - D^a. Asunción Verdejo González (**Secretaria**). Médica Especialista en Farmacología Clínica.
 - D. Víctor del Campo Pérez (**Secretario Suplente**). Médico Especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública.
 - D^a. Iria Aparicio Rodríguez. Médica especialista en Obstetricia y Ginecología.
 - D^a. Aurelia Constenla Castro. Diplomada Universitaria de Enfermería.
 - D^a. Patricia Iglesias López. Licenciada en Derecho.
 - D. Jorge Luis Arias Otero. Licenciado en Físicas.
 - D. Adolfo Paradela Carreiro. Farmacéutico de Atención Especializada.
 - D^a. María Eva Pérez López. Médica Especialista en Oncología Médica.
 - D^a. María de las Mercedes Guerra García. Farmacéutica de Atención Primaria.
 - D^a. Cristina Torreira Banzas. Médica Especialista en Análisis Clínicos.
 - D^a. Miriam Vázquez Campo. Diplomada Universitaria de Enfermería.

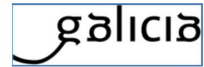
Para que conste donde proceda, y a petición del promotor / investigador.

En Vigo, a 24 de Marzo de 2017





Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral. Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; oeic@sergas.es



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE PONTEVEDRA-VIGO-OURENSE

María Asunción Verdejo González, secretaria del Comité de Ética de la Investigación de Pontevedra-Vigo-Ourense

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 20/03/18, la enmienda del estudio:

Título: Biomarcadores en cáncer gástrico avanzado y metastásico, el papel predictivo y pronóstico de la vitamina D

Enmienda: ampliación al C.H. Universitario de Santiago (Yolanda Vidal Insua) y al C.H. Universitario de A Coruña (Nieves Martínez Lago)

Promotor: *Antía Cousillas Castiñeiras*

Código del Promotor:

Código de Registro: 2016/324

Y que este Comité acepta de conformidad con sus procedimientos normalizados de trabajo y tomando en cuenta los requisitos éticos, metodológicos y legales exigibles a los estudios de investigación con seres humanos, sus muestras o registros, que dicha enmienda sea incorporada al estudio de investigación que se está realizando en los centros aprobados.



Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral. Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es



Y HACE CONSTAR QUE:

1. El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Pontevedra-Vigo-Ourense cumple los requisitos legales vigentes (Ley 14/2007 de Investigación Biomédica y el Decreto 63/2013 por el que se regulan los comités de ética de investigación en Galicia).
2. El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Pontevedra-Vigo-Ourense tanto en su composición como en sus procedimientos normalizados de trabajo cumple las Normas de Buena Práctica Clínica (CPMP/ICH/135/95).
3. La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Pontevedra-Vigo-Ourense es:
 - D. Alfonso Casas Losada (**Presidente**). Médico especialista en Psiquiatría.
 - D^a. Iria Aparicio Rodríguez (**Vicepresidenta**). Médica especialista en Obstetricia y Ginecología.
 - D^a. Asunción Verdejo González (**Secretaria**). Médica Especialista en Farmacología Clínica.
 - D. Víctor del Campo Pérez (**Secretario Suplente**). Médico Especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública.
 - D^a. Marisol Aira Quintela. Médica Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.
 - D. Jorge Luis Arias Otero. Licenciado en Físicas.
 - D^a. María de las Mercedes Guerra García. Farmacéutica de Atención Primaria.
 - D. Adolfo Paradelo Carreiro. Farmacéutico de Atención Especializada.
 - D^a. María Eva Pérez López. Médica Especialista en Oncología Médica.
 - D^a María Ponte García. Licenciada en Derecho.
 - D. Juan Carlos Rodríguez García. Médico Especialista en Medicina Interna.
 - D^a. Cristina Torreira Banzas. Médica Especialista en Análisis Clínicos.
 - D^a. Miriam Vázquez Campo. Diplomada Universitaria de Enfermería.

Para que conste donde proceda, y a petición del promotor / investigador.

En Vigo, a 21 de Marzo de 2018

Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES,serialNumber=3060063L,
sn=VERDEJO GONZALEZ,
givenName=ASUNCIÓN,
o=VERDEJO GONZALEZ MARIA
ASUNCIÓN,ou=306063L,
Fecha: 2018.03.21 13:18:19
+0100
SECRETARÍA DE SANIDADE

ANEXO 5.
DYNAMIC PERSPECTIVE OF THE
NEUTROPHIL-TO-LYMPHOCYTE RATIO
IN METASTATIC GASTRIC CANCER

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34761627/>

ORIGINAL ARTICLE

Dynamic perspective of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in metastatic gastric cancer

Antia Cousillas Castineiras¹, Elena Gallardo Martin², Ana Fernandez Montes³, Marta Carmona Campos⁴, Marta Covela Rua⁵, Mercedes Salgado Fernandez⁶, María Luz Pellon Augusto⁷, Nieves Martínez Lago⁸, Yolanda Vidal Insua⁹, Elena Brozos Vazquez¹⁰, Juan De La Camara¹¹, Ana Alonso Herrero¹², Jose Carlos Mendez Mendez¹³

¹Medical Oncology Department. University Hospital of Pontevedra, Pontevedra, Spain. ²Medical Oncology Department, University Hospital Alvaro Cunqueiro. Vigo, Pontevedra, Spain. ³Medical Oncology Department. University Hospital of Ourense. Ourense, Spain. ⁴Medical Oncology Department. University Hospital Lucus Augusti. Lugo, Spain. ⁵Medical Oncology Department. University Hospital Lucus Augusti. Lugo, Spain. ⁶Medical Oncology Department. University Hospital of Ourense. Ourense, Spain. ⁷Medical Oncology Department. University Hospital Arquitecto Marcide, Ferrol A Coruna, Spain. ⁸Medical Oncology Department. University Hospital of A Coruña. A Coruna, Spain. ⁹Medical Oncology Department. University Hospital of Santiago de Compostela. Santiago de Compostela A Coruna, Spain. ¹⁰Medical Oncology Department. University Hospital of Santiago de Compostela. Santiago de Compostela A Coruna, Spain. ¹¹Medical Oncology Department. University Hospital Arquitecto Marcide. Ferrol A Coruna, Spain. ¹²Medical Oncology Department. University Hospital Alvaro Cunqueiro. Vigo Pontevedra, Spain. ¹³Medical Oncology Department. Sanatorio Nosa Señora dos Ollos Grandes. Lugo, Spain.

On behalf of Galician Research Group on Digestive Tumors (GITuD).

Summary

Purpose: The neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) is an accessible marker from a routine blood test. This study explored the prognostic and predictive value of a change in NLR (c-NLR) after chemotherapy, baseline NLR (bNLR) and chemotherapy response, in metastatic gastric cancer (mGC) patients.

Methods: A total of 116 mGC patients treated between 2009 to 2019 at seven hospitals from Galician Research Group on Digestive Tumors (GITuD) were reviewed in a multicentre, ambispective and observational study. NLR was calculated and the optimal cut-off was defined as NLR=3.96 based on ROC method. NLR was determined at baseline and after two chemotherapy cycles in first line treatment. Change NLR was calculated as NLR after two chemotherapy cycles minus bNLR. The relation of bNLR and c-NLR to overall survival (OS) was evaluated by Kaplan-Meier method and compared by log-rank test. Dynamic Score (DScore) based on c-NLR and baseline NLR were correlated with OS and radiological

response. Univariate, multivariate and chi-square analyses were performed.

Results: Median patient age was 68.7 years, and 66% were male. Univariate analysis showed OS correlation for bNLR ≥ 3.96 (5.97 vs 10.87 months, $p=0.001$), c-NLR increase (6.63 vs 10.34 months, $p=0.021$) and DScore (12.74 vs 7.68 vs 2.43 months, $p<0.001$). High DScore was associated with radiological progression after two cycles ($\chi^2=10.26$, $p=0.006$). Multivariate analysis: bNLR ≥ 3.96 (HR=2.16, $p=0.003$) and c-NLR increase (HR= 2.36, $p=0.003$) were prognostic factors of poor OS.

Conclusion: High bNLR and increased NLR after chemotherapy were associated with worse outcome. Dynamic measurement of NLR provides information for stratifying patients to guide optimal treatment.

Key words: metastatic gastric cancer, NLR, change NLR, prognostic value, lymphocyte ratio, Dynamic Score

Introduction

Gastric cancer is a heterogeneous disease associated with poor survival in the metastatic setting, with one-year overall survival (OS) rate of

approximately 5%. In recent years, a multidisciplinary approach has emerged, while new drugs have also been approved, which will hopefully

Corresponding author: Antia Cousillas, MD. Department of Medical Oncology, Complejo Hospitalario de Pontevedra, C/ Loureiro Crespo, 2 36002, Pontevedra, Spain.

Tel: +34 986 807025; Fax: +34 986 807080; Email: Antia4@gmail.com

Received: 16/11/2020; Accepted: 29/12/2020

 This work by JBUON is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

show improved outcomes over time. In 2010, the ToGA trial [1] was the first targeted therapy trial in gastric cancer to show a survival benefit, with an improvement of 2.7 months in OS in HER2-positive patients with advanced disease treated with trastuzumab plus chemotherapy. Subsequently, anti-VEGF therapy with ramucirumab associated to paclitaxel also demonstrated a survival benefit in second-line treatment in the RAINBOW trial [2], and in monotherapy in patients previously treated in the REGARD trial [3]. Recent research has focused on immunotherapy approaches, with the anti-PD-L1 agent pembrolizumab being the first immunotherapy approved for gastric cancer in pre-treated patients in 2017 [4]. Nonetheless, despite major improvements, gastric cancer outcome remains with poor OS.

With many patients not responding to these treatments, several trials have explored different classification systems and biomarkers in attempts to early identify high risk patients, to better guide treatment decisions and to avoid unnecessary toxicity. In this regard, a radiological reevaluation performed after two chemotherapy cycles is recommended in hematological tumors, such as Hodgkin lymphoma [5]. This early assessment of response is related with OS and guide us to subsequent regimen in non-responsive tumors. In the molecular setting, a study by the Cancer Genome Atlas Research Network described four subtypes: microsatellite instability, chromosomal instability, genomically stable and Epstein-Bar virus positivity [6]. This molecular signature, as well as the model described by Singapore-Duke group [7] identifying mesenchymal, proliferative and metabolic groups, has been integrated into large molecular trials in reference laboratories, implicating expensive and advanced technology. However, while these molecular signatures were shown to be associated with OS outcome and prognosis, they have not been widely adopted in clinical practice given their cost and the non-availability of the required infrastructure in the majority of hospitals.

The immune system offers a source of alternative biomarkers, one of which is the neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) which can be calculated from whole blood, and has been linked to the immune status of the patient. Recent investigations in the field of immunotherapy have focused on the importance of boosting the immune system by activating T lymphocytes to avoid immunotolerance [8,9], with different immune cells participating in this dynamic process. Neutrophils play an important role in carcinogenesis and recent research supports that they can promote tumor progression [10]. Therefore, the NLR may be a

biomarker representing the balance between the patient's pro-tumor inflammatory status and anti-tumor immune status [11]. It has been studied as a personalized marker to stratify patients as a risk-based approach [12]. It has the added advantage of being both accessible and inexpensive. Several studies have evaluated NLR in the context of gastric cancer, most of which have focused on a single baseline determination [13-18]. However, in gastric cancer, dynamic measurement of NLR (i.e. before and during/after treatment), to determine change in NLR (c-NLR), has only been performed in patients with resectable-stage disease [19].

In this study, we evaluated bNLR and c-NLR in metastatic gastric cancer patients to explore its prognostic impact in terms of OS. We also propose a new score (DScore) with a potential predictive value to identify chemo-resistant patients and subsequently, to guide towards a new therapeutic treatment.

Methods

Ethical approval

This study complied with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethical Committee of Pontevedra-Vigo-Ourense, Spain (approval no.2017/382). Informed consent was signed from all patients who were alive at the study initiation. All laboratory tests, radiological evaluations and treatment procedures were performed as part of routine practice. Clinical data were obtained from medical records.

Cohort description and sample collection

In this ambispective study were analyzed data from 116 patients with metastatic gastric cancer at diagnosis who were treated at seven hospitals from Galician Research Group on Digestive Tumors (GITuD) between March 2009 and November 2019. Inclusion criteria were age >18 years, histologically confirmed gastric carcinoma, radiological or histological evidence of metastatic disease, administration of at least two cycles of chemotherapy as first-line treatment in the metastatic setting, no chemotherapy or radiotherapy within six months before starting chemotherapy for metastatic disease, no steroid treatment at baseline, no treatment with growth cell-stem factor (G-CSF) during the first two cycles and a normal complete blood count and data available in the electronic medical records. Patients were excluded if they had clinical evidence of inflammatory or infectious disease or incomplete follow-up data. Patient demographics (age, sex), clinical and disease characteristics at baseline were recorded including performance status (PS; Eastern Cooperative Oncology Group) at the time of diagnosis.

The chemotherapy regimens administered were based on doublets with fluoropyrimidines, except if contraindications existed. In this case, they received a doublet with taxane and platinum. Laboratory meas-

Dynamic neutrophil-to-lymphocyte ratio

2133

Table 1. Overall clinicopathological features of 116 patients with metastatic gastric cancer, and according to change of neutrophil-to-lymphocyte ratio

Characteristics	Patients (n=116) n (%)	c-NLR (N=110)		p value
		n (%)		
		Decrease (74.5%) N= 82	Increase (25.5%) N= 28	
Age (years)				0.511
≤65	37 (33)	29 (35)	8 (29)	
>65	75 (67)	53 (65)	20 (71)	
Sex				0.511
Female	39 (34)	29 (36)	8 (28)	
Male	77 (66)	53 (64)	20 (72)	
ECOG performance status				0.070
0-1	67 (58)	52 (70)	12 (57)	
2	36 (31)	22 (28)	12 (37)	
Unknown	13 (11)	8 (2)	4 (6)	
Tumor location				0.450
Gastroesophageal junction	25 (22)	16 (21)	8 (29)	
Middle	56 (50)	43 (53)	11 (42)	
Antrum/pylorus	32 (28)	21 (26)	8 (29)	
Subtype				0.366
Intestinal	52 (45)	39 (48)	10 (36)	
Diffuse	37 (32)	24 (29)	11 (39)	
Mixed	14 (12)	11 (14)	2 (7)	
Unknown	13 (11)	8 (9)	5 (18)	
Visceral metastases				0.179
Yes	65 (56)	50 (61)	13 (46)	
No	51 (44)	32 (39)	15 (54)	
Peritoneal metastases				0.749
Yes	54 (47)	38 (46)	12 (43)	
No	62 (53)	44 (54)	16 (57)	
Node metastases				0.980
Yes	69 (59)	50 (61)	17 (60)	
No	47 (41)	32 (39)	11 (40)	
LDH (UI/L)				0.824
<450	73 (63)	52 (71)	18 (76)	
>450	27 (23)	18 (18)	7 (16)	
Unknown	16 (14)	15 (11)	4 (8)	
CEA (µg/L)				0.785
<10	70 (60)	48 (59)	17 (65)	
>10	43 (37)	32 (38)	10 (35)	
Unknown	3 (3)	2 (2)	1 (2)	
NLR baseline				0.066
<3.96	77 (66)	52 (63)	23 (82)	
≥3.96	39 (34)	30 (37)	5 (18)	
Chemotherapy regimen				0.066
Cisplatin -docetaxel	36 (32)	30 (36)	5 (18)	
5FU based	76 (68)	52 (64)	23 (82)	

LDH: lactate dehydrogenase; CEA: carcinoembryonic antigen; NLR: neutrophil-to-lymphocyte ratio; c-NLR: change neutrophil-to-lymphocyte ratio; 5FU: 5-fluorouracil

urements included lymphocyte, platelet and neutrophil counts. Laboratory data used blood samples collected before starting chemotherapy and after two chemotherapy cycles. In previous studies a range of incidence of neutropenia has been reported, so a blood sample was collected at the time of hematologic recovery to avoid myelosuppression. Radiological tumor response was assessed according to routine clinical practice (every 8 to 12 weeks) and it was determined according to RECIST 1.1. OS was defined as the time from the date of the first chemotherapy administration for metastatic disease until death from any cause. Patients who were still alive at the last follow-up were censored.

Data collection

All the enrolled patients had complete electronic medical record information, and their clinicopathological characteristics are summarized in Table 1.

The NLR was calculated as the absolute neutrophil count divided by the absolute lymphocyte count. NLR was calculated at baseline and after two cycles of chemotherapy, in order to capture predictive tumor response as early as possible (and prior to radiological evaluation). Given the heterogeneity of thresholds proposed in previous studies, we chose the ROC method which established 3.96 as the optimal cut-off value. The c-NLR was calculated by subtracting baseline NLR from NLR after two cycles of chemotherapy.

The dynamic score (DScore) was calculated based on bNLR and c-NLR. Patients with high baseline NLR (≥ 3.96) and increase c-NLR (>0) were assigned as score 2. Patients with only one abnormal value were given a score 1. Patients with neither of these high values (low bNLR and decrease c-NLR) were characterized with score 0 (Table 2).

Statistics

Survival curves were estimated using the Kaplan-Meier method and compared by the log-rank test. Receiver operating characteristics (ROC) were performed to determine the optimal cut-off value for baseline NLR in terms of OS as 3.96. The baseline value was used to calculate the change in NLR (c-NLR), as NLR after two chemotherapy cycles minus NLR at baseline. Chi-square test was used to assess the relationship between c-NLR, DScore and the clinicopathological features of the patients. The relation between DScore and response to chemotherapy was determined using chi-square test. Univariate and multivariate analyses were performed to determine the significance of prognostic variables using the Cox proportional hazards models. A *p* value less than 0.05 was considered significant. Statistical analyses were carried out using SPSS software (v20.0).

Results

Patient population

In total, 116 patients with histologically-confirmed metastatic gastric carcinoma were eligible for analysis. The study cohort included 66% men

with a median age of 68.7 years. Overall, 58% of the patients had ECOG PS 0-1 and 55.2% had two or more metastatic sites (Table 1). Most patients (66.4%) had a baseline NLR below 3.96. C-NLR was evaluable in 110 patients and a decrease in change NLR (c-NLR <0) was seen in 74.5%, while 25.5% had an increase in NLR (c-NLR >0). Analysis of clinicopathological characteristics according to c-NLR, revealed no statistical differences between patients in terms of c-NLR increase vs decrease (Table 1).

Relationship between NLR and survival

Patients were followed up for survival for a median of 8.70 months (95%CI 7.08 to 10.33). In univariate analysis, c-NLR and baseline NLR were both negative prognostic factors (Table 3). Baseline NLR ≥ 3.96 (5.97 vs 10.87 months, *p*=0.001) and change NLR >0 (6.63 vs 10.34 months, *p*=0.021) both correlated with poorer survival (Figure 1A and B), while borderline significance was seen for lactate dehydrogenase (LDH) >450 UI/L (5.02 vs 9.52, *p*=0.052) with poor OS. Other variables such as CEA >10 (5.91 vs 10.34 months, *p*=0.011) sex (male versus female); 7.68 vs 12.09 months, *p*=0.048) and performance status 2 vs 0-1 (4.63 vs 10.87 months, *p*=0.001) were also negative prognostic factors. Age, chemotherapy regimen, disease location and histology were not significantly related to prognosis (Table 3).

Clinically relevant variables with statistical significance were included in multivariate analysis. Increased c-NLR (HR=2.36, 95%CI: 1.35-4.13, *p*=0.003) and high baseline NLR (HR=2.16, 95% CI: 1.29-3.61, *p*=0.003) were strong negative prognostic factors for OS when adjusted by sex and PS and baseline CEA (Table 4a).

DScore as a prognostic factor for outcome

DScore was performed based on baseline NLR and c-NLR in three 'combination' categories (Table 2). Overall, 52 (44.8%) patients were classified as low risk or DScore 0, whereas 52 (44.8%) and 5 (4.31%) patients were classified as intermediate risk or DScore 1 and high risk or DScore 2, respectively. This was further analyzed in light of their significance in the multivariate analysis. Median OS was 12.74 vs 7.68 vs 2.43 months in these four groups, respectively (*p* <0.001 ; Table 3; Figure 1C).

Multivariate comparative analysis showed that compared to group DScore 0 (low risk), patients in group DScore 1 (HR: 1.83, 95% CI: 1.14-2.94, *p*=0.012), Dscore 2 (HR 9.62, 95% CI: 3.09-29.98, *p* <0.001), had a poorer prognosis, after adjustment for sex, and PS, and baseline CEA.

Table 2. Comparison of OS among various risk groups

Risk Group	Risk	Patients, n	OS, months	p value
Low risk: bNLR <3.96 and c-NLR <0	0	52	12.74	<0.001
Intermediate risk: - bNLR ≥3.96 and c-NLR <0 - bNLR <3.96 and c-NLR >0	1	52	7.68	
High risk: bNLR ≥3.96 and cNLR>0	2	5	2.43	

NLR: neutrophil-to-lymphocyte ratio; c-NLR: change of neutrophil-to-lymphocyte ratio, OS: overall survival

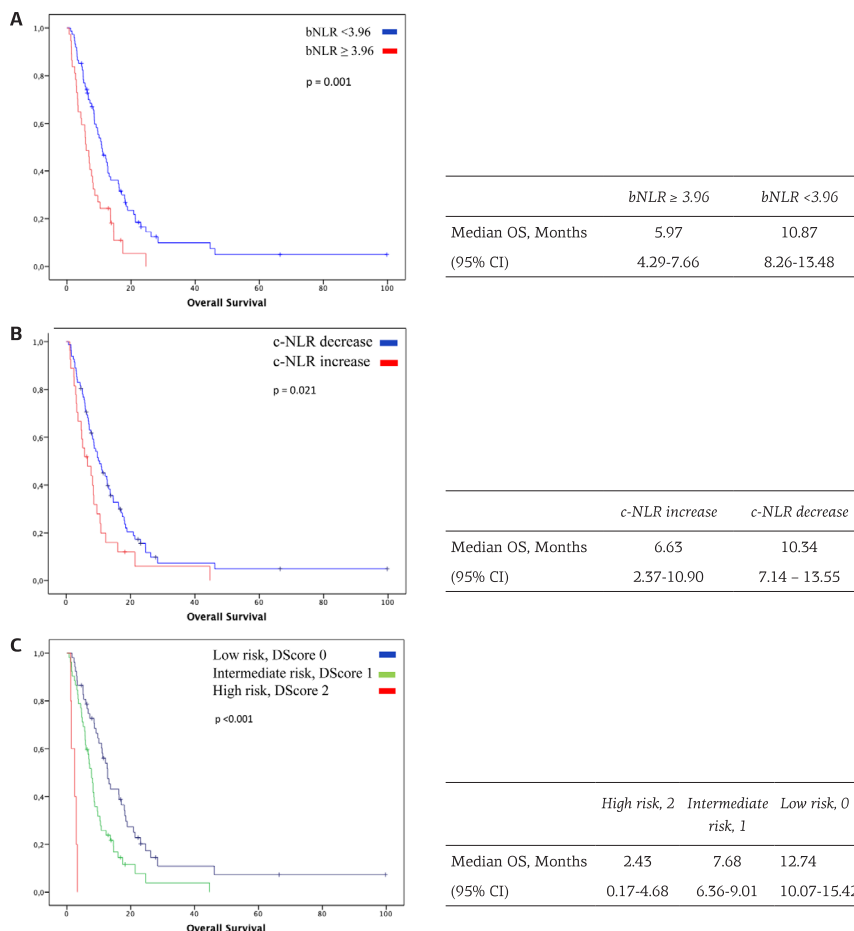


Figure 1. Overall survival (OS) in patients with metastatic gastric cancer according to: **A:** baseline NLR; median OS for NLR ≥ 3.96 vs <3.96 cohorts was 5.97 vs 10.87 months, respectively (p=0.001). **B:** c-NLR; median OS of c-NLR increase vs decrease was 6.63 vs 10.34 months, respectively (p=0.021). **C:** DScore 0, 1 and 2 was 12.74, 7.68 and 2.43 months respectively (p<0.001).

Table 3. Univariate analysis of the association between clinicopathological features and survival

Characteristics	OS Median (months)	95%CI	p value
Age (years)			0.419
≤65	8.41	6.09 - 10.72	
>65	9.65	7.47 - 11.84	
Sex			0.048
Female	12.09	9.42 - 14.75	
Male	7.68	5.80 - 9.57	
ECOG performance status			0.001
0-1	10.87	8.29 - 13.46	
2	4.63	0.00 - 9.42	
Tumor location			0.180
Gastroesophageal junction	5.81	4.51 - 7.11	
Middle	9.65	6.74 - 12.57	
Antrum/pylorus	9.13	5.79 - 12.47	
Subtype			0.152
Intestinal	10.51	5.67 - 15.35	
Diffuse	6.63	5.33 - 7.93	
Mixed	8.70	5.96 - 11.44	
Unknown	9.65	6.92 - 12.39	
Visceral metastases (lung/liver)			0.101
Yes	9.65	7.54 - 11.77	
No	8.01	5.31 - 10.72	
Peritoneal metastases			0.730
Yes	9.13	7.27 - 10.99	
No	8.50	5.67 - 11.34	
Node metastases			0.138
Yes	8.50	6.52 - 10.49	
No	11.20	5.25 - 17.15	
LDH (UI/L)			0.052
<450	9.52	7.12 - 11.93	
>450	5.02	0.00 - 0.76	
CEA (µg/L)			0.011
<10	10.34	7.87 - 12.82	
>10	5.91	3.16 - 8.66	
NLR baseline			0.001
<3.96	10.87	8.26 - 13.48	
≥3.96	5.97	4.29 - 7.66	
Chemotherapy regimen			0.197
Cisplatin -docetaxel	9.65	7.87 - 11.44	
5FU Based	8.18	5.18 - 11.17	
NLR change (c-NLR)			0.021
Decrease	10.34	7.14 - 13.55	
Increase	6.63	2.37 - 10.90	
Vitamin D ng/mL			0.643
<20	10.74	5.59 - 16.09	
≥20	12.09	3.70 - 20.48	
PLR baseline			0.421
<160	9.65		
>160	8.01		

OS: overall survival; LDH: lactate dehydrogenase; CEA: carcinoembryonic antigen; NLR: neutrophil-to-lymphocyte ratio; c-NLR: change of neutrophil-to-lymphocyte ratio; CI: confidence interval

Dynamic score and response to chemotherapy

Overall, 71.2% of the patients who had a low bNLR and decreased c-NLR (DScore 0) responded to chemotherapy; however, disease progression was observed in 100% of patients with high bNLR plus increased c-NLR (DScore 2) ($\chi^2=10.26$, $p=0.006$; Table 4b).

Discussion

In this study, we found that baseline NLR and c-NLR were independent prognostic factors for OS in patients with metastatic gastric cancer who were treated with palliative chemotherapy. By combining both measures, the relation of DScore with prognosis and radiological response to chemotherapy was also demonstrated.

In recent years, research has focused on patient's inflammatory and immune responses, representing a new hallmark of cancer. Several studies have established the relation between inflammatory markers and prognosis in gastric and other solid tumors [12,18,20-22]. A range of immune cells participate in this response, which is a dynamic process, that furthermore can be modified by treatment. However, the main role of neutrophils in carcinogenesis is not completely understood. Neutrophils have been studied as a surrogate marker of this inflammatory reaction and they are a very important element in the metastatic cascade for extravasation and formation of premetastatic niches (accumulation of neutrophils in visceral organs before the arrival of metastatic cells) [23,24]. The baseline NLR reflects the balance between the host's immune response and the pro-tumor inflam-

matory reaction in a static point of the disease, which had prognostic value in our study. On the basis of our data, high baseline NLR (≥ 3.96) was shown to be a negative prognostic marker (5.97 vs 10.87 months, $p=0.001$) according to the published literature [25,26]. In multivariate analysis, baseline NLR was also related to OS (HR=2.16, 95% CI: 1.29-3.61, $p=0.003$).

Based on this dynamic scenario, a single determination of NLR may not be adequate to inform physicians about physiological modifications over time with chemotherapy, therefore we performed c-NLR. The NLR change after treatment is a significant factor to assess because it could reflect a variation in tumor and immune cells after chemotherapy. Hence, our hypothesis was based on the relation between the change in NLR after two cycles has prognostic value in terms of OS. Our study showed that an increase in the NLR after two cycles of first-line chemotherapy (c-NLR>0) was significantly related to poorer OS (HR=2.36, 95%CI: 1.35-4.13, $p=0.003$) in patients with metastatic gastric cancer, supporting that a change in NLR has a significant prognostic value, and that it is prognostic to a greater extent than a single baseline NLR determination. Previous studies have underlined the relation of change NLR with OS in different solid tumors, and our results are consistent with these trials. In patients with metastatic renal cancer treated with targeted therapy, Templeton et al demonstrated that early decline of NLR is associated with favourable prognosis [27]. Kim et al reported that change in NLR during chemotherapy in advanced ovarian cancer is an independent prognostic factor for progression-free survival (PFS). In that study, an increase NLR during chemotherapy

Table 4. A: Multivariate analysis c-NLR and bNLR, adjusted by sex, PS and CEA. **B:** Relation between DScore and chemotherapy radiological response

A Variables	OS	
	HR (95% CI)	p value
Sex (female/male)	1.92 (1.18 – 3.12)	0.009
Performance status (0-1/2)	1.97 (1.24 – 3.13)	0.004
Baseline NLR (<3.96/ ≥ 3.96)	2.16 (1.29 – 3.61)	0.003
c-NLR (decrease <0/increase >0)	2.36 (1.35 – 4.13)	0.003
CEA (<10/>10 $\mu\text{g/L}$)	1.39 (0.86 – 2.27)	0.175

B DScore	CR + PR + SD n (%)	PD n (%)	χ^2	p value
DScore 0: Low risk	37 (71%)	15 (29%)		
DScore 1: Intermediate risk	31 (59%)	22 (41%)	10.264	0.006
DScore 2: High risk	0 (0%)	5 (100%)		

CR: complete response; PR: partial response; SD: stable disease; PD: progression disease, χ^2 , OS: overall survival; HR: hazard ratio; LDH: lactate dehydrogenase; CEA: carcinoembryonic antigen; NLR: neutrophil-to-lymphocyte ratio; c-NLR: change in neutrophil-to-lymphocyte ratio

showed significantly poorer survival [28]. Furthermore, another study in biliary tract cancer by Cho et al showed that a dynamic change of increasing NLR and PLR during chemotherapy was associated with worse PFS and OS [29]. These results are also reported in early-stage pancreatic, gastric and colon cancer [30-33].

According to our results, longitudinal measurement of NLR provides not only more information about prognosis than baseline NLR, but also reflects the evolution of the patient's immune status and response to treatment. A decrease in c-NLR after chemotherapy was more frequent in patients with PS 0-1, those aged over 65 years, intestinal subtype, baseline LDH <450 IU/L, baseline NLR <3.96 and fluoropyrimidines-based chemotherapy. Of note, the incidence of neutropenia associated with each regimen was considered irrelevant because blood samples were collected after hematologic recovery. On the basis of the results of baseline and change NLR as independent prognostic factors for OS, we performed an exploratory score that reflects the basal inflammatory situation and the dynamic change with chemotherapy. By combining both measures bNLR and c-NLR in DScore, patients were categorized in three groups. High risk group or DScore 2 significantly improved the prognosis (by over ten months) compared with low risk group or DScore 0 (median OS 12.74 vs 2.43 months, $p < 0.001$). Intermediate risk group or DScore 1 presented a median OS of 7.68 months. Combining baseline and change NLR (after two cycles) was investigated in a recent retrospective analysis in advanced pancreatic adenocarcinoma by Chen et al [34]. They categorized patients into four risk groups with significant prognostic value: group A (low baseline and decrease), group B (high baseline and increase), group C (low baseline and increase) and group D (high and increase) presenting a median OS of 15.2, 7.6, 6.8 and 3.8 months, respectively ($p < 0.001$). Our findings reproduced this dynamic combination of NLR in metastatic gastric cancer and the results were consistent with previous studies in pancreatic cancer. Therefore, our results suggest that dynamic changes rather than a single baseline NLR could have more prognostic value in OS and effectively predict tumor response. The use of both NLR and c-NLR in DScore had stronger statistical weight for predicting OS when they are considered separately.

In addition to previous literature, we assessed the predictive value of DScore. High risk group or DScore 2 was related to worse response to chemotherapy ($\chi^2 = 10.26$, $p = 0.006$), whereas only baseline NLR was not related to response, reflecting the fact

that baseline NLR reflects only basal static disease situation, and not possible changes with treatment. This thus offers a potential mean of allowing patients likely to benefit from a favorable response to chemotherapy to be identified early (after two cycles of chemotherapy) from patients unlikely to benefit. Then, DScore may be considered as an stratification factor in future trials.

Potential limitation of the study is the small sample size and its ambispective nature.

The significant value of this study lies in the fact that – to the best of our knowledge – this is the first study to investigate the role of dynamic change in NLR as a prognostic and predictive biomarker in metastatic gastric cancer. This analysis allowed the identification of a relation between dynamic measurement of NLR (DScore) before and after two chemotherapy cycles and not only survival, but also with radiological response to chemotherapy. Given the relatively small sample size of this center study, prospective analyses and a large cohort are necessary to validate this hypothesis.

In conclusion, an increase in c-NLR after two cycles of chemotherapy and higher baseline NLR are negative independent prognostic factors (alone or combined) for outcome in metastatic gastric cancer. The significant relation between DScore and response would guide physicians to assess early tumor radiological evaluation and to offer another effective chemotherapy treatment as in other hematological tumors. This unique combination biomarker of baseline NLR and c-NLR (DScore) may be considered as a new parameter to explore in future trials.

Acknowledgements

We would like to thank to Dr. Gonzalez-Quintela for critically reviewing this manuscript, and Sarah MacKenzie (PhD) for manuscript editing.

Author's contributions

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Antía Cousillas, Elena Gallardo Martín, Ana Fernandez Montes, Marta Carmona Campos, Marta Covela Rua, Mercedes Salgado, María Luz Pellon Augusto, Nieves Martínez Lago, Yolanda Vidal Insua, Elena Brozos, Juan De La Camara, Ana Alonso, Juan Carlos Menéndez. The first draft of the manuscript was written by Antía Cousillas and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

AFM reports personal fees from Amgen, Merck, Roche, Sanofi, Servier, Bayer, Lilly, BMS, Eisai outside the submitted work; ACC reports personal fees from Merck, Sanofi, Servier, Rovi outside the submitted work; JCOMM, MEGM, MCC, MCR, YVI have nothing to declare, EMBV reports personal fees from Rovi and Leopharma outside the submitted work; JCG

reports personal fees from Merck, Amgen, Roche, Sanofi outside the submitted work, MLPA reports personal fees from Roche and grants from Merck and Ipsen outside the submitted work; NML reports personal fees from Amgen, Merck, Roche, Sanofi, Lilly, BMS, Pfizer, Leopharma, Ipsen; MSF reports grants from Amgen, Servier, Merck, Roche, Sanofi and BMS outside the submitted work, AAH reports grants from Pfizer, Roche outside the submitted work.

References

- Bang Y-J, Van Cutsem E, Feyereislova 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;376:687-97.
- Wilke H, Muro K, Van Cutsem E 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. *Lancet Oncol* 2014;15:1224-35.
- Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): An international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2014;383:31-9.
- Muro K, Chung HC, Shankaran V et al. Pembrolizumab for patients with PD-L1-positive advanced gastric cancer (KEYNOTE-012): a multicentre, open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol* 2016;17:717-26.
- Seshachalam A, Karpurmath S V, Rathnam K et al. Does Interim PET Scan After 2 Cycles of ABVD Predict Outcome in Hodgkin Lymphoma? Real-World Evidence. *J Glob Oncol* 2019;:1-13.
- Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014;513:202-9.
- Lei Z, Tan IB, Das K et al. Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to PI3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil. *Gastroenterology* 2013;145:554-65.
- Kang YK, Boku N, Satoh T et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017;390:2461-71.
- Atkins MB, Larkin J. Immunotherapy Combined or Sequenced With Targeted Therapy in the Treatment of Solid Tumors: Current Perspectives. *J Natl Cancer Inst* 2016;108:djv414-djv414.
- Swierczak A, Mouchemore KA, Hamilton JA, Anderson RL. Neutrophils: important contributors to tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2015;34:735-51.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011;144:646-74.
- Templeton AJ, McNamara MG, Šeruga B et al. Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Natl Cancer Inst* 2014;106:dju124-dju124.
- Grenader T, Waddell T, Peckitt C et al. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in advanced oesophago-gastric cancer: exploratory analysis of the REAL-2 trial. *Ann Oncol* 2016;27:687-92.
- 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.
- Lieto E, Galizia G, Auricchio A et al. Preoperative Neutrophil to Lymphocyte Ratio and Lymphocyte to Monocyte Ratio are Prognostic Factors in Gastric Cancers Undergoing Surgery. *J Gastrointest Surg* 2017;21:1764-74.
- Wang J, Qu J, Li Z et al. Combination of platelet count and neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic marker to predict chemotherapeutic response and survival in metastatic advanced gastric cancer. *Biomark Med* 2017;11:835-45.
- Sun J, Chen X, Gao P et al. Can the Neutrophil to Lymphocyte Ratio Be Used to Determine Gastric Cancer Treatment Outcomes? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dis Markers* 2016;2016:1-10.
- Sun X, Wang J, Liu J, Chen S, Liu X. Albumin concentrations plus neutrophil lymphocyte ratios for predicting overall survival after curative resection for gastric cancer. *Oncol Targets Ther* 2016;9:4661-9.
- Min KW, Kwon MJ, Kim DH 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;7:13967.
- Diakos CI, Charles KA, McMillan DC, Clarke SJ. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol* 2014;15:e493-e503.
- Li S, Lan X, Gao H et al. Systemic Inflammation Re-

- sponse Index (SIRI), cancer stem cells and survival of localised gastric adenocarcinoma after curative resection. *J Cancer Res Clin Oncol* 2017;143:2455-68.
22. Saito H, Kono Y, Murakami Y et al. Prognostic Significance of the Preoperative Ratio of C-Reactive Protein to Albumin and Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Gastric Cancer Patients. *World J Surg* 2017;42:1819-25.
 23. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW et al. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* 2015;522:345.
 24. Wculek SK, Malanchi I. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature* 2015;528:413.
 25. Xi Zhang, Wei Zhang, Feng LJ. Prognostic Significance of Neutrophil Lymphocyte Ratio in Patients with Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One* 2014;9:e111906.
 26. Dell'Aquila E, Cremolini C, Zeppola T et al. Prognostic and predictive role of neutrophil/ lymphocytes ratio in metastatic colorectal cancer: A retrospective analysis of the TRIBE study by GONO. *Ann Oncol* 2018;29:924-30.
 27. Templeton AJ, Knox JJ, Lin X et al. Change in Neutrophil-to-lymphocyte Ratio in Response to Targeted Therapy for Metastatic Renal Cell Carcinoma as a Prognosticator and Biomarker of Efficacy. *Eur Urol* 2016;70:358-64.
 28. Kim YJ, Lee I, Chung YS et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio and its dynamic change during neoadjuvant chemotherapy as poor prognostic factors in advanced ovarian cancer. *Obstet Gynecol Sci* 2018;61:227-34.
 29. Cho KM, Park H, Oh DY et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, platelet-to-lymphocyte ratio, and their dynamic changes during chemotherapy is useful to predict a more accurate prognosis of advanced biliary tract cancer. *Oncotarget* 2017;8:2329-41.
 30. Mori M, Shuto K, Kosugi C 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;18:1-8.
 31. Li Z, Zhao R, Cui Y, Zhou Y, Wu X. The dynamic change of neutrophil to lymphocyte ratio can predict clinical outcome in stage I-III colon cancer. *Sci Rep* 2018;8:1-8.
 32. Kim EY, Hong TH. Changes in total lymphocyte count and neutrophil-to-lymphocyte ratio after curative pancreatotomy in patients with pancreas adenocarcinoma and their prognostic role. *J Surg Oncol* 2019;120:1102-11.
 33. Lin JX, Wang ZK, Huang YQ et al. Dynamic Changes in Pre- and Postoperative Levels of Inflammatory Markers and Their Effects on the Prognosis of Patients with Gastric Cancer. *J Gastrointest Surg* 2021;25:387-96.
 34. Chen Y, Yan H, Wang Y, Shi Y, Dai G. Significance of baseline and change in neutrophil-to-lymphocyte ratio in predicting prognosis: a retrospective analysis in advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep* 2017;7:753.



En esta tesis relacionamos parámetros inmunes e inflamatorios del paciente con el pronóstico del cáncer gástrico.

En la cohorte localizada de este estudio observacional ambispectivo demostramos un peor pronóstico en los pacientes con un déficit severo de vitamina D y aquellos con infraexpresión en tejido normal adyacente al tumor (NAT) de miR-125b, miR-181b-5p, miR181c-5p, miR-181d-5p, miR-99b-3p y miR-106b. Los pacientes de alto riesgo en nuestra escala PALV presentaron una peor supervivencia con una diferencia de 51 meses con respecto al grupo de bajo riesgo. En la cohorte metastásica el NLR basal y el cNLR son factores pronósticos independientes para supervivencia global en pacientes con quimioterapia paliativa; además la combinación de ambas medidas tiene un valor predictivo de respuesta a primera línea de quimioterapia.