



Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

***“BIOMARCADORES CIRCULANTES PREDICTIVOS DE  
RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA PREOPERATORIA EN  
UNA COHORTE PROSPECTIVA DE PACIENTES CON CÁNCER  
GASTROESOFÁGICO LOCALIZADO”.***

Tesis Doctoral presentada por

***FEDERICO LONGO MUÑOZ.***

Director

*Prof. Alfredo Carrato Mena.*

Alcalá de Henares, 2023.

*Para mis jefas Maru, Victoria y Alejandra.*

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

|   |    |
|---|----|
| Abreviaturas .....  | 5  |
| Resumen .....   | 7  |
| Introducción .....  | 9  |
| Cáncer gastroesofágico.....                               | 9  |
| Tratamiento del cáncer gastroesofágico .....              | 15 |
| Grado de regresión tumoral .....                          | 18 |
| Micro-RNAs y cáncer gastroesofágico .....                 | 24 |
| Hipótesis de trabajo y objetivos.....                     | 26 |
| Hipótesis de trabajo .....                                | 26 |
| Objetivos.....  | 26 |
| Objetivo primario .....                                   | 26 |
| Objetivos secundarios.....                                | 27 |
| Metodología .....   | 28 |
| Diseño .....  | 28 |
| Población del estudio .....                               | 28 |
| Variables del estudio .....                               | 29 |
| Recogida y procesamiento de las muestras de sangre.....   | 30 |
| Tamaño muestral y análisis estadístico de los datos ..... | 32 |
| Aspectos éticos del estudio.....                          | 33 |
| Etapas del desarrollo del estudio:.....                   | 34 |
| Resultados.....   | 36 |
| Análisis de la muestra inicial .....                      | 36 |
| Características de la muestra inicial.....                | 36 |

|   |    |
|---|----|
| Marcadores tumorales en la muestra inicial .....                          | 42 |
| Micro-RNA en la muestra inicial .....                                     | 48 |
| Búsqueda del mejor modelo predictivo del grado de regresión tumoral ..... | 52 |
| Análisis de la muestra completa.....                                      | 54 |
| Características de los pacientes en la muestra completa .....             | 54 |
| Análisis de los marcadores tumorales en la muestra completa ..            | 61 |
| Micro-RNAs en la muestra completa .....                                   | 64 |
| Modelo predictivo del grado de regresión tumoral .....                    | 66 |
| Discusión.....  | 68 |
| Marcadores tumorales .....  | 68 |
| Micro-RNAs .....  | 71 |
| Modelo predictivo del grado de regresión tumoral .....                    | 74 |
| Limitaciones del estudio.....   | 76 |
| Conclusiones.....   | 78 |
| Anexos.....   | 79 |
| Resolución del Comité de Ética .....                                      | 79 |
| Hoja de consentimiento informado para los pacientes.....                  | 80 |
| Agradecimientos.....  | 84 |
| Bibliografía .....  | 86 |

## ABREVIATURAS

AJCC: *American Joint Cancer Committee*.

CGE: cáncer gastroesofágico.

CT: número de ciclos en los que se alcanza un umbral de expresión.

DFS: *disease-free survival*, supervivencia libre de enfermedad.

EUS: endoscopia digestiva alta con ultrasonidos.

ECF: epirubicina, cisplatino y 5-fluorouracilo.

FLOT: 5-fluorouracilo, leucovorin, oxaliplatino y docetaxel.

HER-2: *human epidermal growth factor receptor type 2*, receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

HR: *hazard ratio*, razón de riesgos.

IC95%: intervalo de confianza al 95%.

OS: *overall survival*, supervivencia global.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PET: tomografía por emisión de positrones.

QT: quimioterapia.

QTRT: quimio-radioterapia concurrente.

RT: transcriptasa inversa.

TAP: tórax, abdomen y pelvis.

TC: tomografía computarizada.

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*, proyecto del atlas del genoma humano del cáncer.

TNM: *tumor, node, metastasis*; clasificación según la extensión del tumor primario (T), la afectación ganglionar regional (N) y metástasis a distancia (M).

TRG: *tumour regression grade*, grado de regresión tumoral.

UGE: unión gastroesofágica.

## RESUMEN

Los pacientes con adenocarcinoma gastroesofágico en estadio locorregional, en ausencia de metástasis a distancia, tienen la oportunidad de alcanzar la curación mediante el uso de tratamientos multimodales que combinen la cirugía completa del tumor, el tratamiento sistémico con quimioterapia y el tratamiento complementario con radioterapia en casos seleccionados. A pesar de un correcto enfoque multidisciplinar, la supervivencia a largo plazo se alcanza en menos de la mitad de los casos y, por ello, son necesarios nuevos avances en este campo.

El grado de regresión tumoral evaluado en la pieza quirúrgica tras un tratamiento preoperatorio con quimioterapia y/o radioterapia; se asocia con un beneficio en la supervivencia de los pacientes con adenocarcinoma gastroesofágico. Los biomarcadores predictivos de eficacia utilizados en los estadios avanzados de la enfermedad para seleccionar terapias biológicas frente a dianas específicas no han sido implantados en la práctica clínica habitual para los estadios locorregionales hasta el momento. La expresión diferencial de micro-RNAs, tanto en tejido como en sangre, podrían ser utilizados como nuevos biomarcadores de predicción del grado de regresión tumoral en este escenario.

Para la defensa de esta tesis doctoral, presentamos un estudio observacional que reclutó 57 pacientes diagnosticados de adenocarcinoma gastroesofágico en estadio locorregional, atendidos de forma consecutiva en el Hospital Universitario Ramón y Cajal, a los cuales se determinó la expresión de micro-RNAs en muestras de sangre obtenidas previamente al inicio del tratamiento preoperatorio. El objetivo principal del estudio fue demostrar que la expresión diferencial de micro-RNAs en sangre en el momento preoperatorio, tenía la

capacidad de predecir el grado de regresión tumoral obtenido con el tratamiento sistémico preoperatorio. Como objetivo secundario se exploró si el perfil de micro-RNA se correlacionaba con la supervivencia de los pacientes.

Aproximadamente un 30% de los pacientes alcanzó un adecuado grado de regresión tumoral (TRG0-1). Los pacientes con TRG0-1 presentaban un porcentaje mayor de estadios I-II, y menor de estadios III-IV, con respecto a los pacientes que no alcanzaron respuesta patológica. Los niveles séricos de los marcadores tumorales CEA, CA19-9 y CA-125; no se correlacionaron con la obtención de TRG0-1. Sin embargo, los niveles séricos de los micro-RNAs miR-19a-3p y miR-130b-3p; sí se asociaron de forma significativa con la TRG0-1 de los pacientes en el análisis univariante. En el análisis multivariante, la firma de biomarcadores séricos que incluyó CA-125, miR-19a-3p miR-130-3p, miR-154-5p y miR-423-5p; se asoció de forma significativa con la TRG0-1 obtenida. Finalmente, los niveles elevados de CA-125 (> 35 U/ml) y de miR-19a-3p también se asociaron una peor supervivencia de los pacientes.

En conclusión, hemos identificado que el perfil de expresión de micro-RNAs en sangre se correlaciona con la TRG y la supervivencia de los pacientes con adenocarcinoma gastroesofágico localizado que reciben un tratamiento sistémico preoperatorio. Para la implementación de estos biomarcadores en la práctica clínica habitual, estos resultados deben ser confirmados en futuros estudios de mayor dimensión.

# INTRODUCCIÓN

## Cáncer gastroesofágico

Existe una gran variabilidad geográfica en la distribución mundial del cáncer de estómago y de esófago. Según los datos del Observatorio Global del Cáncer de la Organización Mundial de la Salud, las áreas de mayor incidencia de ambas neoplasias se sitúan en el continente asiático, seguido de Sudamérica (Figura 1). España, a semejanza de otros países occidentales, se encuentra en un grado intermedio de incidencia en cáncer gástrico y esofágico en el contexto global. El cáncer gástrico supone el décimo tumor maligno en incidencia en nuestro país, con 7.684 de nuevos casos; y el séptimo en mortalidad, con 5.609 fallecimientos. El cáncer de esófago se estima como el vigésimo segundo tumor maligno en incidencia, con 2.311 nuevos casos; y el décimo en mortalidad con 2.026 decesos. Si tenemos en cuenta al cáncer gástrico y esofágico como una única entidad, el cáncer gastroesofágico (CGE) se sitúa como la séptima neoplasia maligna en incidencia; y la tercera en mortalidad en nuestro país, sólo superada por el cáncer de pulmón y el cáncer colorrectal.<sup>1</sup>

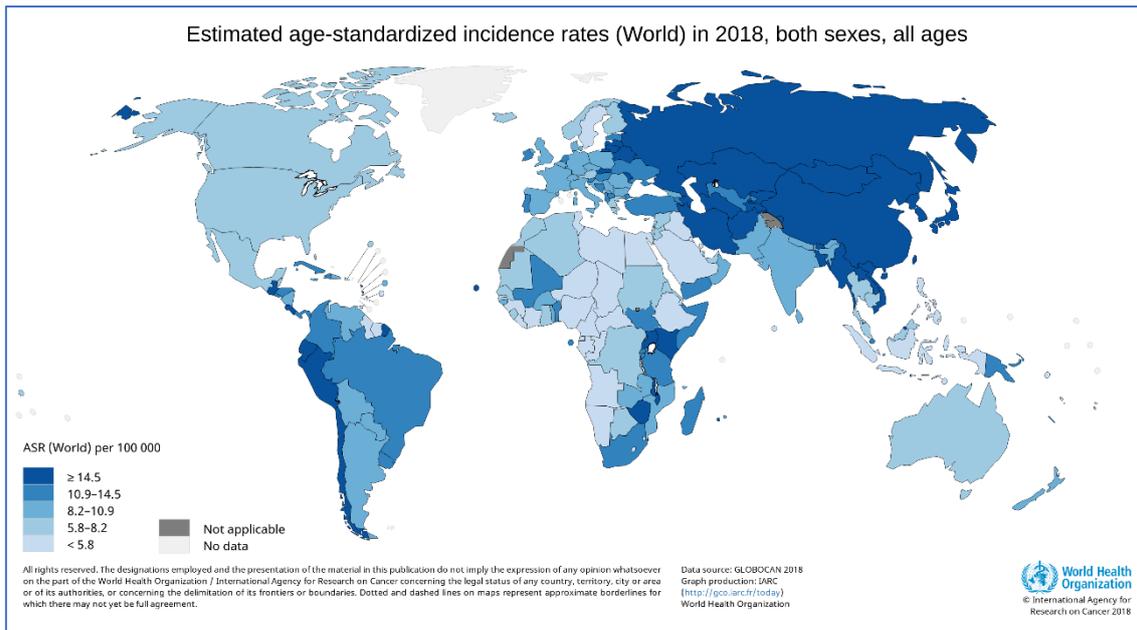


Figura 1 - Incidencia mundial del cáncer gastroesofágico por la OMS.

La carcinogénesis del CGE a partir del revestimiento epitelial normal del esófago y estómago, no obedece a una única causa, siendo éste un proceso multifactorial. Están bien establecidos algunos factores de riesgo ambientales que aumentan el riesgo de aparición de CGE, como son la dieta, el tabaquismo, el consumo perjudicial de alcohol, la obesidad y la enfermedad por reflujo gastroesofágico, entre otros. Ciertos agentes infecciosos se asocian a la aparición y desarrollo del CGE, como son la infección por *Helicobacter pylori* o por el virus de Epstein-Barr. Finalmente, se estima que en torno al 10% de los casos de CGE se debe a una causa genética con agregación familiar y que aproximadamente del 1% al 3% de los casos se puede encuadrar en algún síndrome de cáncer hereditario.<sup>2</sup>

El CGE es una enfermedad heterogénea y en la práctica clínica se debe realizar una buena clasificación para una correcta planificación del tratamiento que los pacientes van a recibir. La primera clasificación se establece según la localización anatómica del tumor primario. En

nuestro país, aproximadamente el 60% de todos los tumores se localizan en el estómago, el 20% en la unión gastroesofágica (UGE) y el 20% restante en el esófago. Los tumores localizados en la UGE pueden subdividirse a su vez en tres subtipos según la clasificación de Siewert: el subtipo I para los tumores situados entre 1 cm y 5 cm sobre el cardias; el subtipo II para los tumores situados entre 1 cm por encima del cardias y 2 cm por debajo del mismo; y el subtipo III para aquellos tumores situados entre los 2 cm y los 5 cm por debajo del cardias. La segunda clasificación que se realiza es en función del tipo histológico observado por el patólogo en la muestra histológica del diagnóstico inicial. La histología predominante en los tumores de esófago es el carcinoma epidermoide (70% de todos los casos), apareciendo de forma preferente en el tercio medio y superior del esófago. En los tumores del esófago distal, UGE y estómago, la histología principal es el adenocarcinoma, que será el objetivo de nuestro estudio.<sup>3</sup> Los adenocarcinomas gástricos y de la UGE pueden subdividirse a su vez en adenocarcinomas de tipo intestinal, tipo difuso y tipo mixto, conocida como clasificación de Lauren. El subtipo intestinal se caracteriza por su estructura adenomatosa que recuerda a los carcinomas colorrectales. El subtipo difuso se distingue por la presencia de células dispersas, sin una estructura clara, con una pérdida de adhesión intercelular y abundante presencia de gránulos de secreción mucosa. Esta clasificación también se correlaciona con algunas características clínicas de los pacientes con CGE. Así, el subtipo difuso se caracteriza por un mayor porcentaje de mujeres, edades al diagnóstico más precoces, mucosa normal circundante al tumor con apenas metaplasia, tumores más excavados, mayor porcentaje de linitis plástica, localización antropilórica y peor pronóstico con medianas de supervivencia más cortas.<sup>4</sup> Finalmente, una nueva clasificación molecular ha sido desarrollada por el grupo de investigación *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). A partir de 295

tumores primarios gástricos y previamente a cualquier tratamiento antitumoral, se procesaron las muestras mediante seis plataformas moleculares (análisis del número de copias somáticas, secuenciación completa del exoma, análisis de la metilación del DNA, secuenciación del RNA mensajero, secuenciación de micro-RNAs y análisis de proteómica). Tras el análisis bioinformático se establecieron cuatro subtipos moleculares que se reflejan en la Figura 2: el subtipo asociado a la infección por el virus de Epstein-Barr (10%), el subtipo caracterizado por tener inestabilidad de microsatélites (20%), el subtipo con inestabilidad cromosómica (50%) y el subtipo considerado genómicamente estable (20%).<sup>5</sup> Esta clasificación, debido a su complejidad técnica a la hora de establecer los subtipos, no tiene aplicación clínica fuera de proyectos de investigación, salvo el grupo MSI que ha mostrado una gran sensibilidad a la inmunoterapia.<sup>6</sup>

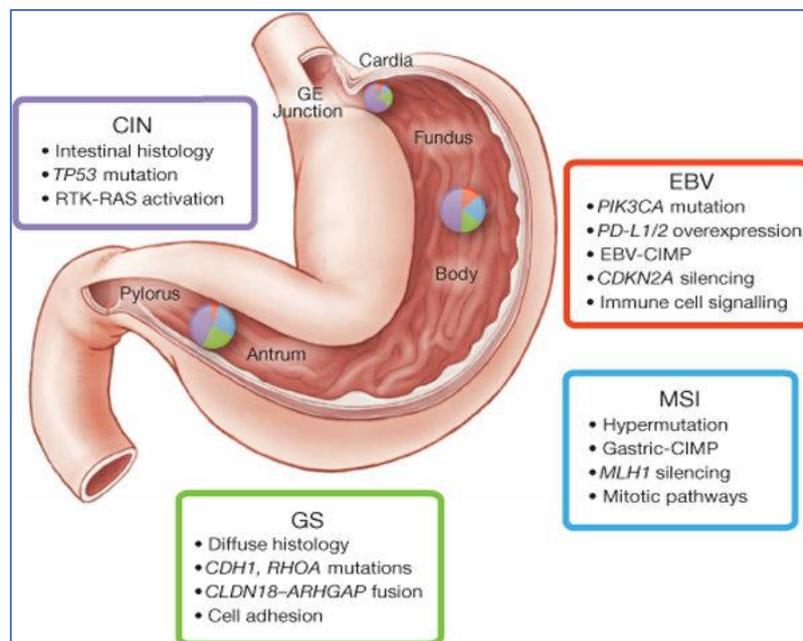


Figura 2 - Clasificación molecular del cáncer gástrico del TCGA.

Tras obtener el diagnóstico histopatológico inicial del CGE, el siguiente procedimiento a realizar es un adecuado estudio de extensión de la enfermedad para posteriormente clasificar el caso en estadios pronósticos. El estudio de extensión inicial consiste en la realización de una tomografía computarizada de tórax, abdomen y pelvis (TC-TAP); incluyendo la región cervical en el caso de tumores localizados en el esófago. En el caso de evidenciar enfermedad a distancia, no serían necesarias más exploraciones salvo las dirigidas en función de la sospecha clínica. Si no se evidencian metástasis en la TC, se realizarán los procedimientos de estadificación previos a un abordaje terapéutico multidisciplinar: la endoscopia digestiva alta con ultrasonidos (EUS), la laparoscopia exploradora con citología abdominal y la tomografía por emisión de positrones (PET-TC) en casos seleccionados.<sup>7</sup> Con los resultados de estas pruebas complementarias ya podemos asignar los niveles de la clasificación TNM (*tumour, node and metastasis*) de la enfermedad en sus etapas o estadios pronósticos de la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) que se reflejan en la Tabla I.<sup>8</sup> En concreto se muestra la estadificación clínica cTNM que se establece inicialmente antes de realizar ningún tratamiento oncológico, existiendo por otro lado las clasificaciones para la estadificación tras la cirugía y estudio anatomopatológico (pTNM) y tras los tratamientos neoadyuvantes (ypTNM). Los tumores de esófago y de unión gastroesofágica tienen una clasificación TNM propia, que diferencia además si la histología es adenocarcinoma o carcinoma epidermoide.

Tabla I - Clasificación clínica TNM para cáncer gástrico (8ª edición de la AJCC).

| Estadio    | TNM   | Descripción  |
|------------|---|--|
| <b>0</b>   | TisN0M0   | Tis: carcinoma in situ con displasia de alto grado o células cancerosas en capas más superficiales de la mucosa sin llegar a la lámina propia. |
| <b>I</b>   | T1N0M0<br>T2N0M0  | T1: invasión de la lámina propia, muscularis mucosae o capa submucosa.<br>T2: invasión de la capa muscular propia.                             |
| <b>IIA</b> | T1N1M0<br>T1N2M0<br>T1N3M0<br>T2N1M0<br>T2N1M0<br>T2N3M0    | T3: invasión de la capa subserosa.<br>T4a: invasión de la capa serosa sin invasión de órganos o estructuras adyacentes.                        |
| <b>IIB</b> | T3N0M0<br>T4aN0M0   | T4b: invasión de órganos o estructuras adyacentes a través de la pared gástrica.   |
| <b>III</b> | T3N1M0<br>T3N2M0<br>T3N3M0<br>T4aN1M0<br>T4aN2M0<br>T4aN3M0 | -----<br>N0: ausencia de ganglios regionales afectados.<br>N1: entre 1 y 2 ganglios regionales afectados.                                      |
| <b>IVA</b> | Cualquier<br>T4bM0  | N2: entre 3 y 6 ganglios regionales afectados.   |
| <b>IVB</b> | Cualquier<br>M1   | N3: 6 o más ganglios regionales afectados.<br>-----<br>M0: ausencia de metástasis a distancia.<br>M1: presencia de metástasis a distancia.     |

## Tratamiento del cáncer gastroesofágico

Aproximadamente la mitad de los pacientes con CGE debutan con metástasis a distancia (estadio IV) debido a la sintomatología no específica y a la ausencia de protocolos de prevención primaria y cribado poblacional en los países occidentales. En torno al 30% de los pacientes se presenta inicialmente como estadios regionales de la enfermedad (estadio III) y un 20% de los casos en estadios localizados (estadios I y II).<sup>9</sup> Los pacientes con CGE en estadio IV no tienen opción de tratamiento curativo en el momento actual. La quimioterapia (QT) con combinaciones de fluoropirimidinas y agentes derivados del platino, es el tratamiento indicado en esta situación aunque con resultados francamente mejorables, pues la mediana de supervivencia global (OS) con QT se sitúa en torno a los 11 meses frente a los 4,3 meses con los mejores cuidados de soporte.<sup>10</sup> Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal que actúa sobre el receptor HER-2 (*human epidermal growth factor receptor type 2*), combinado con la QT habitual, consigue aumentar la supervivencia de los pacientes con sobreexpresión o amplificación de HER-2, alcanzando medianas de OS de 13,8 meses.<sup>11</sup> Recientemente, la combinación de QT y la inmunoterapia con nivolumab, un anticuerpo monoclonal frente a PD-1 (*programmed cell death protein 1*), también ha demostrado aumentar la supervivencia de los pacientes con CGE que presentan sobreexpresión de PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) definida como un CPS (*combined positive score*) mayor o igual a 5, alcanzando medianas de OS de 14,4 meses.<sup>12</sup> En pacientes refractarios a una primera línea de tratamiento, la combinación de paclitaxel con ramucirumab, un anticuerpo monoclonal que bloquea el VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor receptor type 2*) mejora la supervivencia de los pacientes alcanzando medianas de OS de 9,6

meses.<sup>13</sup> Finalmente, el único agente de QT autorizado como tratamiento de tercera línea en CGE es trifluridina/tipiracilo, que consigue medianas de OS de 5,7 meses.<sup>14</sup>

En el escenario de la enfermedad localizada precoz (estadio I) del CGE, el tratamiento estándar es la cirugía con intención curativa, sin necesidad de asociar tratamientos complementarios. Sin embargo, en la enfermedad localmente avanzada, en la que vemos una mayor afectación en profundidad de la pared gastroesofágica o afectación ganglionar regional (estadios II y III), el abordaje terapéutico debe ser multidisciplinar. Las decisiones en la enfermedad localmente avanzada del CGE se toman dentro de un comité disciplinar de tumores para planificar el tratamiento multimodal, que incluye tanto terapias locales (cirugía y/o radioterapia) como tratamientos sistémicos (QT, terapias dirigidas e inmunoterapia). Existen tres aproximaciones terapéuticas en la enfermedad localmente avanzada del CGE que mostramos en la Tabla II: el enfoque americano con quimio-radioterapia concurrente (QTRT) adyuvante<sup>15</sup>, el enfoque europeo con QT perioperatoria<sup>16</sup> y el enfoque asiático con QT adyuvante<sup>17</sup>.

Tabla II - Enfoques de tratamiento multimodal en CGA.

| Enfoque          | Tratamiento                 | N    | OS 5 años |
|------------------|-----------------------------|------|-----------|
| <b>Americano</b> | Cirugía<br>+                | 556  | 43%       |
|                  | QTRT adyuvante (5FU)*       |      |           |
| <b>Europeo</b>   | QT neoadyuvante (FLOT)<br>+ | 716  | 45%       |
|                  | Cirugía<br>+                |      |           |
|                  | QT adyuvante (FLOT)**       |      |           |
| <b>Asiático</b>  | Cirugía<br>+                | 1035 | 78%       |
|                  | QT adyuvante (XELOX)*       |      |           |

\* *Brazo control: cirugía exclusiva.* \*\* *Brazo control: QT perioperatoria con ECF.*  
 5FU = 5-fluorouracilo. FLOT = 5-fluorouracilo, leucovorin, oxaliplatino y docetaxel. ECF = epirubicina, cisplatino y 5-fluorouracilo. XELOX = capecitabina y oxaliplatino.

Detallaremos el tratamiento perioperatorio al ser la práctica predominante en Europa y que será el escenario de nuestro trabajo de investigación. Hasta hace unos años, el tratamiento estándar de QT perioperatoria consistía en la administración del esquema ECF (epirubicina, cisplatino y 5-fluorouracilo) en función de los resultados del estudio MAGIC.<sup>18</sup> En dicho ensayo clínico fase III, 503 pacientes con adenocarcinoma gástrico o de la UGE en estadio resecable fueron aleatorizados a recibir QT perioperatoria con ECF o un tratamiento estándar con cirugía exclusiva. El estudio alcanzó su objetivo principal consiguiendo una mejoría en la OS de los pacientes tratados en la rama experimental con una HR (*hazard ratio*) de 0,75; siendo el intervalo de confianza al 95% (IC95%) de 0,6 a 0,95; y una p estadísticamente significativa de 0,009). La OS a 5 años fue del 36% en la rama de QT

perioperatoria frente al 23% de la rama de cirugía exclusiva. Recientemente, el esquema ECF ha sido desplazado como estándar de tratamiento en la QT perioperatoria por el régimen FLOT (5-fluorouracilo, leucovorin, oxaliplatino y docetaxel) en base a los resultados del ensayo clínico FLOT4-AIO.<sup>16</sup> En este estudio fase III, 716 pacientes con adenocarcinoma gástrico o de la UGE en estadios resecables fueron aleatorizados a recibir el tratamiento estándar con ECF perioperatorio o el tratamiento experimental con FLOT perioperatorio. Se alcanzó el objetivo principal del estudio observando una mejoría de la OS en la rama con FLOT con una HR de 0,77 (IC95% de 0,63 a 0,94;  $p = 0,012$ ). El régimen perioperatorio con FLOT fue también superior al esquema con ECF en diferentes objetivos secundarios del estudio como la OS a 5 años (57% versus 48%), la supervivencia libre de progresión (HR 0,75; IC95% de 0,62 a 0,91;  $p = 0,004$ ), la tasa de resecciones totales (94% versus 87%) y la tasa de resecciones completas (84% versus 77%). Por todo ello, la QT perioperatoria estándar hoy en día es la combinación FLOT.

## **Grado de regresión tumoral**

El grado de regresión tumoral (TRG) es una herramienta que ayuda a evaluar la respuesta patológica obtenida en el espécimen de una cirugía oncológica cuando se ha administrado un tratamiento antitumoral previo a dicho procedimiento. El uso de escalas de medición del TRG está bien establecido en algunas neoplasias, como en el caso del cáncer de recto, en el cual el tratamiento preoperatorio con QTRT es un estándar de tratamiento. A modo de ejemplo, Ryan y colaboradores establecieron un sistema de clasificación del TRG en 3 categorías con predicción pronóstica de la supervivencia basándose en

el análisis de 60 pacientes con cáncer de recto sometidos a un tratamiento neoadyuvante.<sup>19</sup>

Existen diferentes escalas publicadas para evaluar el TRG en los pacientes con CGE sometidos a tratamientos preoperatorios entre las que destacan la clasificación de Mandard y la de Becker. La clasificación de Mandard establece cinco categorías de TRG, que se asemejan a las definidas por Ryan en cáncer de recto: TRG1 con regresión completa y ausencia de cáncer residual; TRG2 con células tumorales residuales aisladas entre la fibrosis; TRG3 con fibrosis que predomina sobre el cáncer residual; TRG4 con cáncer residual que sobrepasa la fibrosis; y TRG5 con ausencia de cambios regresivos. En un estudio con 93 pacientes con cáncer de esófago sometidos a QTRT preoperatoria, la proporción de pacientes según la TRG alcanzada fue del 42% (TRG1-2), 20% (TRG3) y 33% (TRG4-5). El análisis multivariante de supervivencia encontró que la regresión tumoral definida como TRG1-3 resultó ser un factor pronóstico independiente para la supervivencia de los pacientes.<sup>20</sup> La clasificación de Mandard ha sido evaluada en el estudio fase III MAGIC comentado previamente, encontrando como factores pronósticos la respuesta definida como TRG1-2 y la afectación ganglionar. Sin embargo, sólo la afectación ganglionar se demostró como un factor pronóstico independiente en el análisis multivariante de supervivencia.<sup>21</sup>

La clasificación de Becker establece los siguientes grados de TRG: TRG1a con ausencia de tejido tumoral residual; TRG1b con menos del 10% de tejido tumoral residual; TRG2 con tejido tumoral residual entre el 10% y el 50%; y TRG3 con más del 50% de tejido tumoral residual. En un estudio con 480 pacientes con cáncer gástrico sometidos a QT preoperatoria basada en combinaciones de cisplatino, la distribución de los diferentes grados de TRG fue del 21% (TRG1a+b), 25% (TRG2) y 54% (TRG3). La regresión tumoral resultó ser un factor pronóstico

independiente en el análisis multivariante de supervivencia.<sup>22</sup> La clasificación de Becker también ha sido evaluada dentro del ensayo fase II aleatorizado que estudió la eficacia de FLOT perioperatorio que posteriormente se amplió al ensayo fase III FLOT4-AIO previamente comentado. En este estudio, el esquema FLOT fue superior al esquema ECF en las TRG1 obtenidas, 37% frente al 23%, siendo este resultado estadísticamente significativo con una p de 0,02.<sup>23</sup>

Las clasificaciones de Mandard y de Becker fueron comparadas en un estudio el cual también se analizaron otras escalas de TRG como la japonesa, la americana y la china. Para la comparativa se utilizaron las muestras de 192 pacientes con adenocarcinoma gástrico tratados con QT neoadyuvante. Las cinco clasificaciones resultaron ser factores pronósticos en el análisis univariante de supervivencia. Sin embargo, únicamente el nivel T y N postquirúrgicos, y las resecciones completas R0 resultaron ser factores pronósticos independientes en el análisis multivariante. La recomendación de los autores fue la de utilizar la clasificación de Mandard ya que en su estudio discriminaba mejor en función del pronóstico a los pacientes con ausencia de regresión<sup>24</sup> Un estudio algo más reciente ha comparado las clasificaciones de Mandard y de Becker en un estudio retrospectivo con 290 pacientes con cáncer gástrico sometidos a QT neoadyuvante. Ambas clasificaciones se asociaron con la supervivencia de los pacientes, tanto en la OS como en la supervivencia libre de enfermedad (DFS), sin encontrar diferencias significativas entre las dos escalas de TRG.<sup>25</sup> Por todo ello y de forma global, se considera que ninguna escala de TRG en CGE ha sido lo suficientemente validada como para convertirse en un procedimiento estándar. La recomendación actual entre las diferentes guías americanas es la de adoptar para el CGE el TRG de Ryan modificado de cuatro categorías utilizado en cáncer de recto debido a su buena reproducibilidad interobservador (Tabla III).<sup>26</sup>

Tabla III - Gradación de la regresión tumoral tras un tratamiento neoadyuvante.

| TRG      | Descripción   |
|----------|---|
| <b>0</b> | Respuesta completa: ausencia de células tumorales residuales.   |
| <b>1</b> | Respuesta casi completa: células tumorales residuales aisladas o pequeños grupos de células tumorales residuales. |
| <b>2</b> | Respuesta parcial: cáncer residual con reacción desmoplásica.   |
| <b>3</b> | Respuesta pobre o no respuesta: mínima evidencia de regresión tumoral o ausencia de la misma.                     |

La predicción del TRG tras un tratamiento neoadyuvante en pacientes con CGE, nos podría resultar de gran utilidad para un diseño de población más homogénea en los ensayos clínicos, la individualización de los tratamientos y conseguir una medicina más personalizada. Una primera aproximación para la predicción del TRG podría ser el uso de las pruebas complementarias que ya se utilizan en el diagnóstico de extensión de los pacientes con CGE. La EUS podría ser de utilidad en la detección del *downstaging* o disminución del estadio TNM antes y después del tratamiento neoadyuvante.<sup>27</sup> Asimismo, el estudio radiológico por ultrasonidos utilizando doble contraste también podría ser una técnica de utilidad.<sup>28</sup> En cuanto a la TC, diferentes parámetros analizados por TC antes y después de la administración de neoadyuvancia podrían ser predictivos del TRG. Existen diferentes publicaciones que analizan la variación de captación de yodo<sup>29</sup>, la reducción del diámetro máximo tumoral<sup>30</sup>, el análisis de texturas<sup>31</sup>, el uso de imágenes de perfusión<sup>32,33</sup>, o el empleo de parámetros de radiómica.<sup>34</sup> El papel de la respuesta metabólica analizada por PET también ha sido motivo de estudio como predictor del TRG, no

obstante, la baja sensibilidad y especificidad han sido la norma hasta la fecha e inferiores a lo esperado.<sup>35,36,37,38</sup> La resonancia magnética con imágenes de difusión ha sido evaluada como predictora de la TRG en algunos estudios con una buena sensibilidad y especificidad.<sup>39,40</sup> Sin embargo, todos los estudios comentados previamente adolecen de un suficiente número de pacientes en sus análisis, por lo que no son considerados procedimientos estándares en el momento actual.

Otra aproximación para predecir el TRG ha consistido en utilizar datos clínico-patológicos fáciles de obtener en la práctica. Chen y colaboradores desarrollaron un nomograma predictivo del TRG a partir de las características clínico-patológicas de 208 pacientes con CGE sometidos a QT neoadyuvante. Las variables seleccionadas para dicho nomograma fueron: el grado de diferenciación histológica, los niveles de CEA (antígeno carcinoembrionario) en sangre, los niveles de monocitos en sangre y el porcentaje de linfocitos en sangre.<sup>41</sup> En otro estudio clínico con 116 pacientes con CGE se encontró que la presencia de células tumorales en el lavado gástrico y los niveles reducidos de hemoglobina en sangre se asociaban de forma estadísticamente significativa con el TRG.<sup>42</sup> Finalmente, un estudio basado en 41 pacientes encontró una asociación significativa entre la ratio de plaquetas y linfocitos en sangre, y el TRG alcanzado.<sup>43</sup>

La caracterización molecular buscando biomarcadores predictivos del TRG en CGE también ha sido motivo de investigación. Uno de los mecanismos de acción de la QT citotóxica, y sobre todo de los agentes derivados del platino, consiste en dañar de forma directa el DNA de las células tumorales. En este sentido, la caracterización de los mecanismos de reparación del DNA se postularía como un potencial biomarcador predictivo de respuesta al tratamiento con QT y por tanto del TRG. En un estudio de 245 pacientes con CGE encontró que la expresión nuclear de ERCC1 (*excision repair cross-complementing 1*),

medida por inmunohistoquímica en la muestra tumoral, se asociaba de forma estadísticamente significativa a una ausencia de regresión tumoral a la QT preoperatoria basada en derivados del platino ( $p=0,006$ ) y a una peor OS ( $p=0.04$ ).<sup>44</sup> En un ensayo clínico fase II con 43 pacientes tratados con QT preoperatoria usando la combinación de docetaxel, cisplatino y S1; se estudió la expresión por inmunohistoquímica de ERCC1 y de DDB2 (*damage DNA binding protein complex subunit 2*) en las muestras tumorales antes de la administración del tratamiento preoperatorio. La expresión alta de ERCC1 y/o de DDB2 se asoció de forma estadísticamente significativa con un peor TRG ( $p<0,0001$ ).<sup>45</sup> La expresión proteica de HER-2, FOXP3 y MET analizada por inmunohistoquímica de las biopsias tumorales fue explorada en un estudio retrospectivo con 54 pacientes con CGE tratados con QT preoperatoria. Desafortunadamente, la expresión de dichos genes no se asoció al TRG obtenido con la QT neoadyuvante.<sup>46</sup> El ensayo fase II COMPASS estudió el beneficio de la QT neoadyuvante con combinaciones de cisplatino en 83 pacientes con CGE. El subestudio de biomarcadores evidenció que los niveles altos de expresión de los genes TIMP1 (*metallopeptidase inhibitor 1*), DSG2 (*desmoglein-2*), RRM1 (*ribonucleotide reductase catalytic subunit M1*) y MUC2 (*mucin-2*); y los niveles bajos de expresión de los genes EGFR (*epidermal growth factor receptor*), ZDHHC14 (*DHHC-type palmitoyl transferase 14*) y CLDN18.2 (*claudin-18 isoform 2*); se asociaban de forma estadísticamente significativa con un mayor grado de regresión tumoral.<sup>47</sup> Por último, otros estudios sugieren que la presencia de niveles altos de cisplatino intratumoral<sup>48</sup>, el índice apoptótico<sup>49</sup> y la citoqueratina 18 asociada a caspasas<sup>50</sup> como potenciales biomarcadores predictivos del TRG. De nuevo, todos estos biomarcadores comentados no son empleados en la práctica clínica habitual dado que no han sido validados adecuadamente.

## Micro-RNAs y cáncer gastroesofágico

Los micro-RNAs son RNAs no codificantes de pequeño tamaño, aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, cuya función es interaccionar por complementariedad con RNA mensajero diana para la regulación negativa de la expresión génica a nivel postranscripcional. Un mismo micro-RNA puede interaccionar sobre diferentes RNA diana y, a su vez, distintos micro-RNAs pueden interaccionar sobre el mismo RNA diana; creando así una compleja red de regulación de la expresión génica y la traducción de proteínas.<sup>51</sup> En cuanto a la producción y maduración de los micro-RNAs, a partir de un determinado gen, la RNA polimerasa II genera precursores o premicro-RNAs de una longitud mayor, que son procesados por la ribonucleasa Drosha en el núcleo. Posteriormente son transportados al citoplasma por medio de mecanismos dependientes de exportina-5 y Ran-GTP, para volver a ser procesados por la ribonucleasa Dicer y dar lugar así a los micro-RNAs maduros.<sup>52</sup>

En los pacientes con CGE, los estudios realizados sobre micro-RNAs han evidenciado su implicación en distintos procesos como la proliferación celular, el crecimiento celular, la invasión, la migración y la apoptosis.<sup>53,54</sup> Además de su papel como potenciales factores pronósticos y diagnósticos, los micro-RNAs podrían ser utilizados como factores predictivos de respuesta y resistencia a los tratamientos aplicados a los pacientes con CGE.<sup>55,56</sup>

Los micro-RNAs pueden ser identificados directamente sobre muestras de tejido tumoral, aunque también tienen la capacidad de ser secretados al medio extracelular, pudiendo ser detectados de forma libre en fluidos corporales como la sangre, tanto en forma de

microvesículas, cuerpos apoptóticos, estructuras de HDL o formando complejos con proteínas del complejo RISC como argonauta-2. Esto hace que los micro-RNAs queden protegidos de la acción de RNAsas, dotando a los micro-RNAs de una gran estabilidad para su actividad, detección y análisis.<sup>57,58</sup>

# HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

## Hipótesis de trabajo

El tratamiento con QT neoadyuvante administrado a los pacientes con CGE diagnosticados en estadios loco-regionales se pauta de forma no individualizada sin asegurar una adecuada respuesta al mismo.

Los micro-RNAs son moléculas reguladoras de distintos procesos biológicos, como la sensibilidad o resistencia de las células tumorales al tratamiento citotóxico.

Proponemos que el perfil de expresión de micro-RNAs en sangre podría ayudarnos a identificar qué pacientes con CGE pueden beneficiarse en mayor medida del tratamiento con QT neoadyuvante, permitiendo distinguir aquellos pacientes que no obtendrán un beneficio de dicho tratamiento y solamente serían expuestos a una toxicidad innecesaria.

## Objetivos

### Objetivo primario

- Determinar si el perfil de expresión de micro-RNAs en sangre de pacientes con cáncer gastroesofágico localizado puede distinguir entre aquellos pacientes que obtienen respuesta tras la QT preoperatoria de los que no responderán a dicho tratamiento.

### Objetivos secundarios

- Determinar si el perfil de expresión de micro-RNAs aporta información pronóstica en cuanto a la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes.
- Determinar si el perfil de expresión de micro-RNAs aporta información pronóstica en cuanto a la OS global de los pacientes.

# METODOLOGÍA

## Diseño

Presentamos en esta tesis doctoral un estudio observacional, prospectivo, de una cohorte de pacientes con cáncer gastroesofágico en estadio loco-regional, tratados con QT preoperatoria y atendidos en el servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid.

## Población del estudio

Los criterios de inclusión que debían cumplir todos los participantes para ser incluidos en el estudio fueron los siguientes:

- Pacientes mayores de 18 años.
- Firma del consentimiento informado previamente a la realización de cualquier procedimiento del estudio.
- Autorización del proyecto por el Comité de Ética y Ensayos Clínicos del Hospital Universitario Ramón y Cajal.
- Diagnóstico histológico de un adenocarcinoma de estómago, unión gastroesofágica o esófago distal.
- Estadio loco-regional no metastásico de la enfermedad (estadios I a III) tras un estudio básico que incluya una tomografía computarizada de tórax, abdomen y pelvis, y la realización de una ecoendoscopia digestiva alta con biopsia. La exploración quirúrgica por laparoscopia y citología del lavado peritoneal, así como el FDG-PET, se consideraron como procedimientos recomendables, aunque no mandatorios.

- Indicación de un tratamiento preoperatorio con QT seguido de cirugía con intención curativa, tras la discusión del caso en el comité multidisciplinar de tumores del hospital.

### Variables del estudio

Para alcanzar los objetivos del estudio se recogieron las siguientes variables:

- Relacionadas con la demografía de los pacientes: fecha de nacimiento y sexo.
- Relacionadas con la enfermedad: localización del tumor primario (estómago, unión gastroesofágica o esófago); subtipo histológico de Lauren (difuso, intestinal, mixto o indeterminado); grado de diferenciación histológica (bien, moderada o pobremente diferenciado); y estadio TNM pre y postoperatorio.
- Relacionadas con el tratamiento administrado: fecha de inicio y fin del tratamiento preoperatorio; tipo de esquema de QT utilizado; tipo de resección quirúrgica realizada (resección completa, enfermedad residual microscópica y enfermedad residual macroscópica); y grado de regresión tumoral (TRG 0 a 3).
- Relacionadas con la evolución de los pacientes: fecha del diagnóstico histológico, fecha del inicio del tratamiento quimioterápico, fecha de la cirugía, estado y fecha de la recaída de la enfermedad; y estado y fecha del último seguimiento.
- Biomarcadores circulantes: niveles basales de los marcadores tumorales séricos habituales (CEA, CA19-9 y CA125) y niveles de expresión de los micro-RNAs basales en sangre.

A partir de estas variables, se generaron las siguientes nuevas variables calculadas:

- Edad en el momento del diagnóstico.
- Supervivencia libre de enfermedad (DFS): definida como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad hasta la recaída de la enfermedad o la muerte por cualquier causa.
- Supervivencia global (OS): definida como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad hasta la muerte por cualquier causa.
- Respuesta histológica al tratamiento quimioterápico: agrupación de TRG0-1 versus TRG2-3, según escala de Ryan modificada, para diferenciar los pacientes con buena respuesta histológica al tratamiento con QT frente a los pacientes con una respuesta histológica subóptima.
- Categorización de los niveles de marcadores tumorales en sangre: se consideraron niveles elevados si CEA > 10 ng/ml, CA19-9 > 37 U/ml y CA125 > 35 U/ml. Además, se generó una variable categórica que recogió los pacientes con algún marcador tumoral alto frente a aquellos con todos los marcadores tumorales normales.

### Recogida y procesamiento de las muestras de sangre

Para el estudio de los biomarcadores circulantes, se realizaron las siguientes extracciones de sangre en diferentes momentos de la evolución de los pacientes:

1. Antes del inicio del tratamiento preoperatorio.
2. Después de finalizar el tratamiento preoperatorio y antes de la cirugía curativa.

### 3. Después de la cirugía curativa.

Previamente a la realización de nuestro estudio y en colaboración con la Unidad Central de Apoyo de Biomarcadores y Dianas Terapéuticas del IRYCIS (Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria), se realizó un *array* de expresión de micro-RNAs. Se estudió la expresión de 762 diferentes micro-RNAs en suero de dos grupos reducidos con cáncer gastroesofágico sometidos a QT: 4 pacientes con respuesta a la QT y otros 4 pacientes sin respuesta a la misma. Para cada paciente se utilizaron muestras antes y después del tratamiento con QT. En este estudio preliminar, 60 micro-RNAs exhibían expresión diferencial entre la muestra pretratamiento y postratamiento, así como entre los individuos que respondieron y los que no. De estos micro-RNAs se seleccionaron 15 micro-RNAs que exhibían mayor diferencia entre los grupos de respondedores y no respondedores para su posterior validación en nuestro estudio. Los micro-RNAs seleccionados fueron: miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-20a-3p, miR-34a-3p, miR-98-5p, miR-130b-3p, miR-154-5p, miR-155-5p, miR-199-5p, miR-221-5p, miR-331-3p, miR-423-5p, miR-483-5p, miR-502-3p y miR-548a-3p.

Para la determinación de la expresión de micro-RNAs, las muestras de sangre se recogieron en tubos VACUETTE (*z serum sep clot activator*) de 4ml, que fueron centrifugados a 2.500 rpm 10 minutos. El suero separado por la centrifugación se recogió, alicuotó y almacenó conforme a los criterios del Biobanco del Hospital Ramón y Cajal (tubos anonimizados, código único y en congelador de -80°C). Para la extracción de RNA total enriquecido en micro-RNAs en sangre, se utilizó el miRNeasy Serum Kit (Qiagen) Kit, apropiado para la extracción de micro-RNAs en sangre. Previo a la extracción del RNA, se añadieron RNAs sintéticos (Spike-in y cel 39) para el control técnico del análisis de las qRT-PCRs. El RNA total extraído se cuantificó y se valoró su integridad mediante Nanodrop y bioanalyzer. Los micro-RNAs

seleccionados se determinaron por qRT-PCR individuales, utilizando primers específicos con modificación LNA (Exiqon) y SYBRGreen. Se utilizó la amplificación del cel 39, añadido exógenamente, como control de RT. Y los resultados se normalizaron frente a los niveles de miR103 y miR191, como miRNAs de expresión estable (miRNAs referentes). De forma previa a las determinaciones de los micro-RNAs seleccionados, se estimó el grado de hemólisis por diferencia en expresión de los micro-RNAs miR23a y miR451-3p. En caso de valores por encima de 7, se descartó la muestra por alto grado de hemólisis, ya que altos niveles de hemoglobina pueden inhibir la reacción de PCR. Dichas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Lightcycler 480 (Roche). En todos los casos, los valores de niveles de los micro-RNAs se expresaron como delta-CT (dCT) relativizado frente al housekeeping.

#### Tamaño muestral y análisis estadístico de los datos

Tomando como base una proporción de respuesta patológica TRG0-1 del 30% tras el tratamiento con QT preoperatoria, con un error alfa del 5% y una potencia del 80 %, estimamos que se necesitarían 52 pacientes para demostrar que nuestra firma de micro-RNAs identificase un subgrupo de pacientes respondedores con una TRG0-1 del 50%, frente a un grupo de no respondedores con una TRG0-1 del 10 %.

Para el objetivo principal del estudio, analizamos mediante regresión logística la relación entre los diferenciales de CT o dCT (el nivel de micro-RNA problema menos el nivel de micro-RNA referente) de los micro-RNAs y la respuesta patológica obtenida (TRG0-1 versus TRG2-3). Para la selección de la firma de micro-RNAs se seleccionaron en una primera muestra de 40 pacientes los potenciales micro-RNAs

predictivos de TRG que obtuvieran una  $p < 0,3$  en el análisis univariable por regresión logística. Para una mejor selección de la firma de micro-RNAs se realizó un estudio de todos los modelos posibles predictivos de TRG por regresión logística para obtener la selección final de micro-RNAs a analizar en la muestra total.

Para el análisis de supervivencia (DFS y OS), utilizamos curvas de Kaplan-Meier, la prueba de log-rank y la regresión de Cox. La relación entre los dCT de expresión de los micro-RNAs y las variables clínico-patológicas recogidas en el estudio, se realizó mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon/Mann-Whitney para las variables cuantitativas, y la prueba de Fisher para las variables cualitativas. Se consideraron estadísticamente significativos los resultados con una  $p < 0,05$  bilateral. El estudio estadístico se realizó con el paquete informático STATA 15.

#### Aspectos éticos del estudio

El presente estudio se realizó de acuerdo con el protocolo desarrollado, los principios establecidos en la última versión de la Declaración de Helsinki, y siguiendo la normativa legal vigente, la ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.

El tratamiento de los datos de carácter personal en el estudio, en especial en lo que al consentimiento se refiere, se ajustó a lo establecido en la Ley Orgánica 15/99 de Protección de Datos de carácter Personal y el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal.

Previamente a la inclusión de los pacientes, el proyecto ha sido valorado y autorizado por el Comité de Ética de la Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal (ver Anexo 1). Todos los pacientes incluidos en el estudio aceptaron su participación mediante la firma del consentimiento informado del estudio (ver Anexo 2).

### Etapas del desarrollo del estudio:

El estudio ha tenido una duración de 5 años.

| Momentos           | Acciones   |
|--------------------|--|
| <b>Día 0</b>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Presentación del protocolo y la hoja del consentimiento informado al comité de ética de investigación para su autorización.</li> <li>• Creación de la base de recogida de datos en formato Excel.</li> <li>• Creación del circuito de pacientes y de recogida y almacenamiento de las muestras biológicas.</li> </ul> |
| <b>Mes 1 - 30</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Identificación de los pacientes de la muestra inicial (N = 40).</li> <li>• Extracción de las muestras de sangre y almacenamiento de las mismas.</li> </ul>  |
| <b>Mes 30 - 33</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procesamiento de las muestras de sangre de la muestra inicial para el análisis de expresión de micro-RNAs.</li> <li>• Expresión de micro-RNAs en sangre por qRT-PCR en la muestra inicial.</li> </ul>   |
| <b>Mes 33 - 36</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Análisis estadístico de los datos e interpretación de los resultados en la muestra inicial.</li> <li>• Selección de los biomarcadores para la muestra total (N = 65).</li> <li>• Identificación de nuevos pacientes y extracción de muestras.</li> </ul>  |

|                    |  |
|--------------------|--|
| <b>Mes 36 - 48</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Identificación de nuevos pacientes y extracción de muestras.</li> </ul>   |
| <b>Mes 48 - 51</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Procesamiento de las muestras de sangre de las muestras finales.</li> <li>• Expresión de micro-RNAs en sangre por qRT-PCR de la muestra final.</li> </ul> |
| <b>Mes 51 - 54</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Análisis estadístico de los datos de la muestra final.</li> <li>• Interpretación de los resultados de la muestra final.</li> </ul>                        |
| <b>Mes 54 - 60</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Redacción del manuscrito final.</li> </ul>  |

Para la consecución de este trabajo hemos obtenido la magnífica colaboración del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Ramón y Cajal, de su laboratorio de biología molecular asociado, del Biobanco, del Servicio de Anatomía Patológica y de la Unidad Central de Apoyo de Biomarcadores y Dianas Terapéuticas del IRYCIS.

# RESULTADOS

## Análisis de la muestra inicial

### Características de la muestra inicial

Entre mayo de 2014 y noviembre de 2016, se reclutaron de forma prospectiva 40 pacientes que cumplían los criterios de selección del estudio. La mediana de seguimiento de los pacientes fue de 56,8 meses en el momento del análisis del estudio y un total de 23 pacientes habían recaído y fallecido. La mediana de supervivencia libre de enfermedad (DFS) fue de 22,3 meses con un intervalo de confianza al 95% (IC95%) de 14,1 a 34,3 meses (Figura 3). La mediana de supervivencia global (OS) fue de 39,8 meses con un IC95% de 23,9 meses con el límite superior del intervalo no alcanzado (Figura 4).

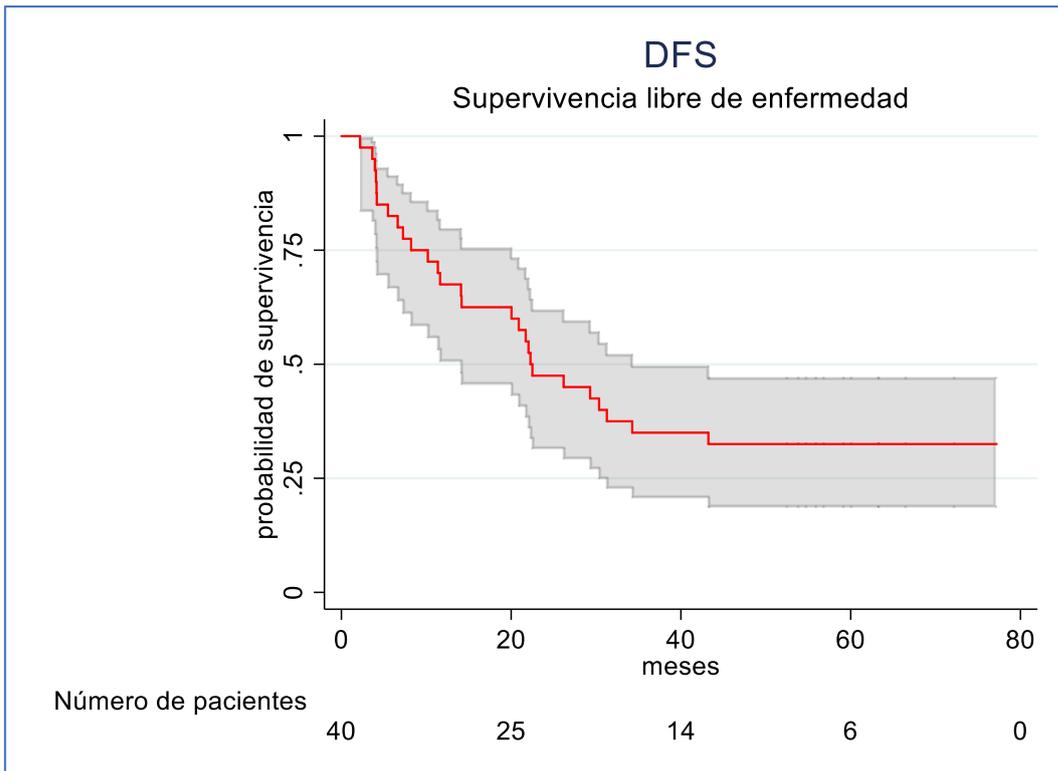


Figura 3 - Curva de supervivencia libre de enfermedad (DFS) de la muestra inicial.

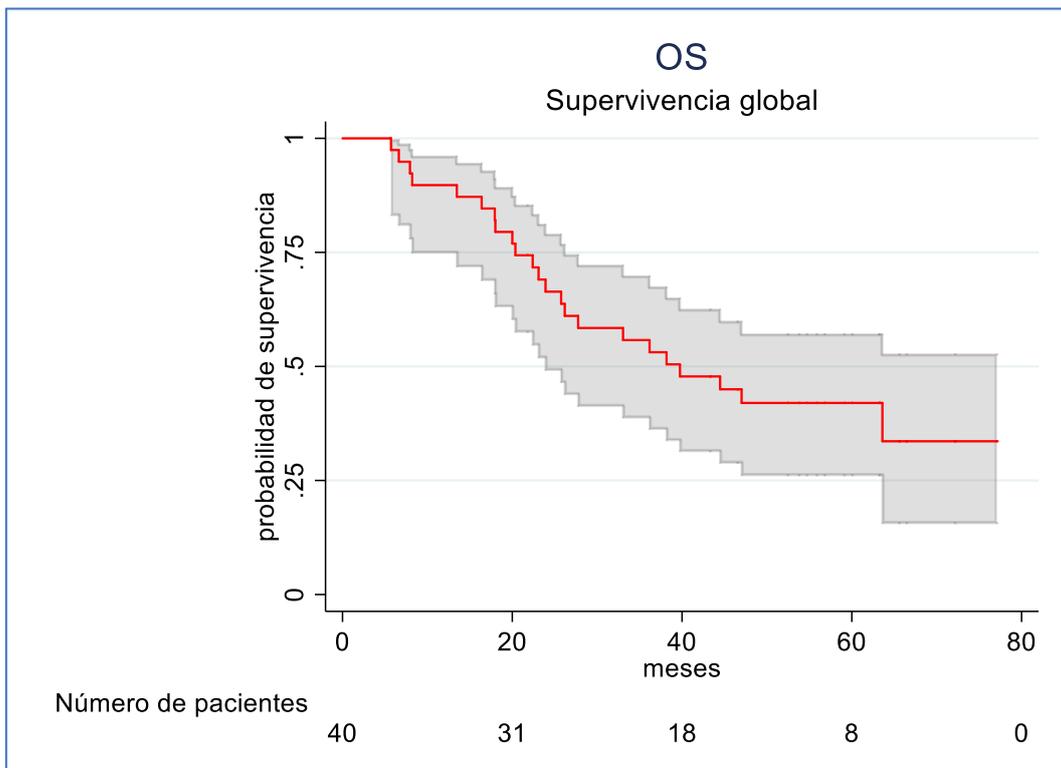


Figura 4 - Curva de supervivencia global (OS) de la muestra inicial.

Las características de los pacientes incluidos en la muestra inicial del estudio se muestran en la Tabla IV. La mediana de edad fue de 69,2 años con un rango intercuartílico (IQR) de 60,5 a 75,8 años. El 62,5 % de los pacientes fueron varones. En un 67,5 % de los casos el tumor primario se localizaba en el estómago. El subtipo histológico según la clasificación de Lauren fue del 37,5 % para el tipo difuso y del 52,5 % para el tipo intestinal. Un 67,5 % de los tumores mostraban un grado histológico pobremente diferenciado. El estado de sobreexpresión o amplificación de HER-2 se determinó en un 50% de los casos, siendo la positividad del 10 % (2 pacientes). El hecho de no disponer de información del estado de HER2 en todos los pacientes se debió a que es un biomarcador de uso exclusivo en la enfermedad avanzada y no en la localizada, como es el caso de nuestro estudio. Todos los pacientes recibieron tratamiento con QT preoperatoria y el 95 % de los pacientes fueron sometidos a cirugía, existiendo 2 pacientes no operados con intención curativa, al encontrar la enfermedad irresecable en el acto quirúrgico. En el 73,7 % de los pacientes operados se obtuvo una resección completa (R0); el 10,5 % presentaron borde afecto a nivel microscópico (R1); y en el 15,8 % de los casos se detectó enfermedad residual macroscópica en el acto quirúrgico (R2). En cuanto a la tasa de regresión tumoral, el 27,5 % alcanzaron respuesta histológica (TRG0-1) al tratamiento quimioterápico preoperatorio; mientras que el 72,5 % restante no mostraron respuesta (TRG2-3). El 82,1 % de los pacientes recibieron tratamiento sistémico con QT postoperatoria.

Tabla IV - Características de los pacientes de la muestra inicial.

|  | N  | % o mediana |
|--|----|-------------|
| <b>Edad</b>                                | 40 | 69,2 años   |
| <b>Sexo</b>                                |    |             |
| • Masculino                                | 25 | 62,5 %      |
| • Femenino                                 | 15 | 37,5 %      |
| <b>Localización anatómica</b>              |    |             |
| • Esófago distal                           | 2  | 5 %         |
| • Unión GE                                 | 11 | 27,5 %      |
| • Estómago                                 | 27 | 67,5%       |
| <b>Subtipo histológico de Lauren</b>       |    |             |
| • Difuso                                   | 15 | 37,5 %      |
| • Intestinal                               | 21 | 52,5 %      |
| • Mixto                                    | 2  | 5 %         |
| • Desconocido                              | 2  | 5 %         |
| <b>Grado de diferenciación histológica</b> |    |             |
| • Bien diferenciado                        | 3  | 7,5 %       |
| • Moderadamente diferenciado               | 8  | 20 %        |
| • Pobremente diferenciado                  | 27 | 67,5 %      |
| • Desconocido                              | 2  | 5 %         |
| <b>HER-2</b>                               |    |             |
| • Positivo                                 | 2  | 5 %         |
| • Negativo                                 | 18 | 45 %        |
| • Desconocido                              | 20 | 50 %        |
| <b>Tratamiento quimioterápico</b>          |    |             |
| • Preoperatorio                            | 40 | 100 %       |
| • Postoperatorio                           | 32 | 82,05 %     |
| <b>Cirugía realizada</b>                   | 38 | 95 %        |
| <b>Tipo de resección</b>                   |    |             |
| • R0                                       | 28 | 73,68 %     |
| • R1                                       | 4  | 10,53 %     |
| • R2                                       | 6  | 15,79 %     |
| <b>Grado de regresión tumoral</b>          |    |             |
| • TRG0-1                                   | 11 | 27,5%       |
| • TRG2-3                                   | 29 | 72,5 %      |

La distribución TNM y por estadios, tanto en el momento basal antes de administración de quimioterapia y en el momento postoperatorio, se muestra en la Tabla V y la Figura 5. En el estudio preoperatorio destaca que el 80 % de los pacientes presentaban niveles de T avanzados (T3-4), mientras los niveles de T precoces (T0-2) solo fueron el 3 %. En el estudio postoperatorio, el 74 % de los pacientes presentaban niveles T3-4 y el 26 % niveles T0-2. En cuanto a la afectación ganglionar en el estudio preoperatorio, el 50 % de los casos presentaban baja carga ganglionar (N0-1) y el 33 % alta carga ganglionar (N2-3). Tras el estudio postoperatorio, el 66 % presentaron N0-1 y el 34 % N2-3. En siete pacientes (18 %) no se obtuvieron los datos de afectación T ni N, debido a la imposibilidad para realizarse un estudio preoperatorio con EUS, ante la necesidad de no demorar el inicio del tratamiento con QT, en beneficio del paciente. Dos pacientes (5 %) fueron clasificados como M1 tras evidenciar afectación metastásica en el momento de la cirugía. No fueron operados. La distribución por estadios en el momento previo a la cirugía fue del 30 % para los estadios precoces (0 a II), del 48 % para el estadio III y del 5 % para el estadio IV. Por otro lado, la distribución por estadios tras la cirugía fue del 53 % para los estadios 0 a II, del 29 % para el estadio III y del 18 % para el estadio IV.

Tabla V – Clasificación TNM pre- y postcirugía en la muestra inicial.

|          | Nivel    | Preoperatorio | Postoperatorio |
|----------|----------|---------------|----------------|
| <b>T</b> | <b>0</b> | -             | 2,63 %         |
|          | <b>1</b> | -             | 10,53 %        |
|          | <b>2</b> | 2,5 %         | 13,16 %        |
|          | <b>3</b> | 60 %          | 42,11 %        |
|          | <b>4</b> | 20 %          | 31,58 %        |
|          | <b>x</b> | 17,5 %        | -              |
| <b>N</b> | <b>0</b> | 20 %          | 47,37 %        |
|          | <b>1</b> | 30 %          | 18,42 %        |
|          | <b>2</b> | 27,5 %        | 28,95 %        |
|          | <b>3</b> | 5 %           | 5,26 %         |
|          | <b>x</b> | 17,5 %        | -              |
|          | <b>M</b> | <b>0</b>      | 95 %           |
| <b>1</b> |          | 5 %           | 18,42 %        |

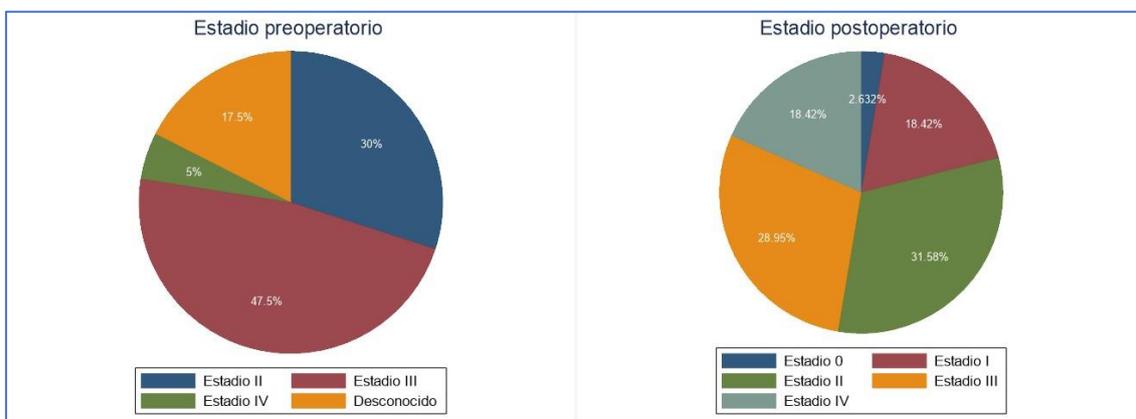


Figura 5 - Distribución por estadios pre- y postoperatorios en la muestra inicial.

## Marcadores tumorales en la muestra inicial

Los marcadores tumorales (MT) analizados en sangre en la muestra inicial estudio fueron el CEA, CA19-9 y CA125. En la Figura 6 se muestran los diagramas de caja de cada uno de los MT expresados como el nivel basal emitido por el laboratorio, así como el logaritmo neperiano de cada uno de ellos para facilitar la visualización. La mediana de los niveles basales de CEA fue de 1,7 ng/ml (IQR de 1,2 a 8,75). Un 20 % presentaban niveles elevados de CEA con un punto de corte en 10. La mediana de los niveles basales de CA19-9 fue de 9,2 U/ml (IQR de 4,65 a 42,75). Un 28 % de pacientes presentaban niveles elevados de CA19-9 con un punto de corte en 37. La mediana de los niveles basales de CA125 fue de 15 U/ml (IQR de 9,2 a 25,7). Un 13 % de pacientes presentaban niveles elevados de CA125 con un punto de corte en 35. El 57,5 % de los pacientes no presentaban elevación de ninguno de los MT; el 27,1 % tenían niveles altos de un marcador; el 12,5 % de dos marcadores; y el 2,5 % mostraban elevación de todos los marcadores.

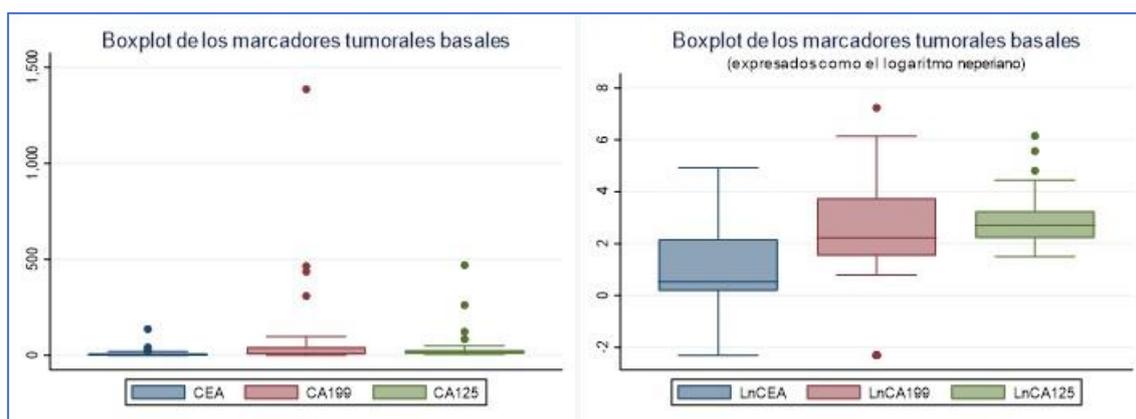


Figura 6 - Diagrama de caja de los niveles de marcadores tumorales

La Figura 7 muestra los diagramas de caja de los niveles de los MT en función de la TRG obtenida, es decir, en función de si en la muestra histológica se evidenciaba respuesta patológica o no. En el análisis estadístico no paramétrico y por regresión logística, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de los MT y la TRG. Para la selección de variables potenciales para el análisis conjunto de biomarcadores posterior, con una  $p = 0,18$  por análisis no paramétrico y  $p = 0,08$  por análisis en regresión logística, el CA19-9 sería el único marcador tumoral para incluir en el modelo final. La Tabla VI muestra estos resultados. Cuando analizamos por regresión logística los MT categorizados (normal versus elevado) y la variable generada como cualquier marcador tumoral elevado, no encontramos diferencias significativas en la TRG obtenida para cada grupo.

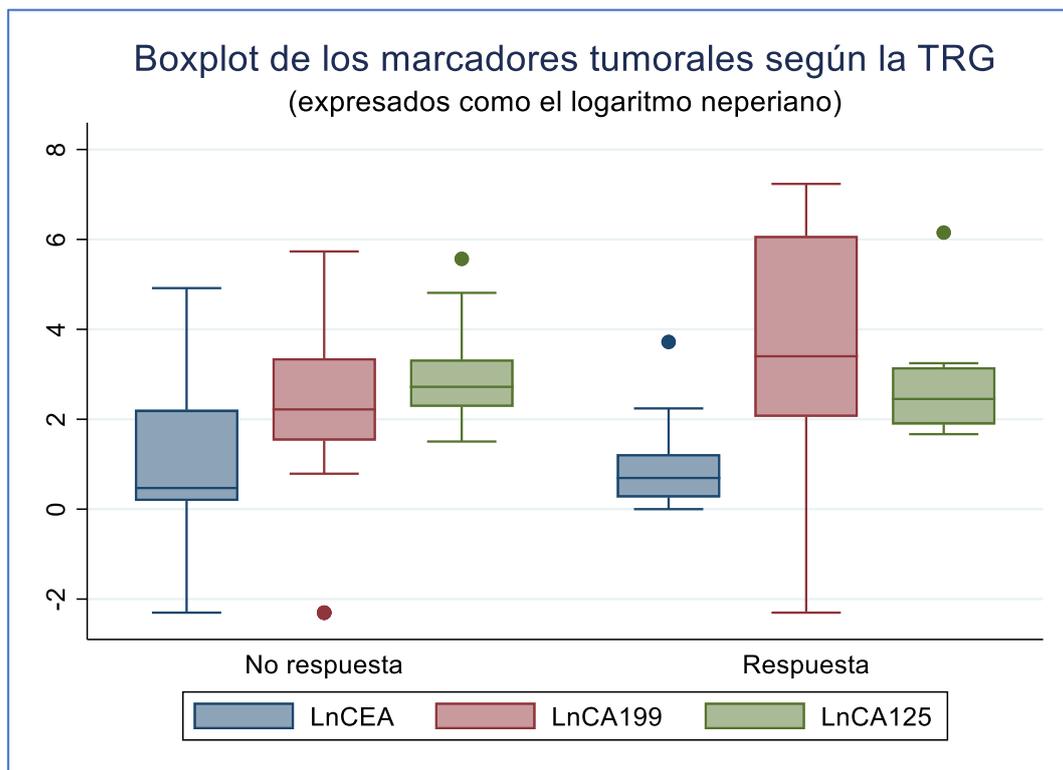


Figura 7 – Boxplot de los MT en función de la TRG obtenida en la muestra inicial.

Tabla VI - Análisis de los niveles de MT en función de la TRG en la muestra inicial.

| Marcador tumoral            | Test de Wilcoxon<br>(p) | Regresión logística<br>(OR ; p) |
|-----------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| <b>CEA</b>                  | 0,49                    | 0,99 ; 0,66                     |
| <b>CA19-9</b>               | 0,18                    | 1,0 ; 0,09                      |
| <b>CA125</b>                | 0,3                     | 1,0 ; 0,46                      |
| <b>Cualquier MT elevado</b> | -                       | 1,18 ; 0,82                     |

Las curvas de supervivencia para la DFS en función de los niveles basales de MT se muestran en la Figura 8. La Tabla VII muestra los resultados del análisis univariable realizado para la DFS, mediante regresión de Cox, tanto para las variables continuas de los niveles basales de cada MT, como para cada MT categorizado como normal versus elevado, así como para la variable categórica que compara los pacientes con algún MT elevado versus los pacientes con todos los MT en rango normal. No hemos encontrado diferencias significativas en la DFS según los niveles de CEA ni de CA19-9. Tampoco hemos encontrado diferencias significativas en DFS para los niveles cuantitativos de CA125. Sin embargo, los pacientes con niveles basales elevados de CA125, tienen una DFS inferior a aquellos con niveles normales de CA125, siendo la diferencia estadísticamente significativa (HR 4,66 y  $p = 0,01$ ). Además, los pacientes con algún MT elevado presentaban también una peor DFS con respecto a aquellos pacientes con MT normales, con una diferencia cercana a la significación estadística (HR 1,93 y  $p = 0,09$ ). En el análisis multivariable realizado para DFS incluyendo las variables categóricas de los MT, únicamente la elevación de CA125 se asociaba a una peor DFS una vez corregido por los otros MT (Tabla VIII).

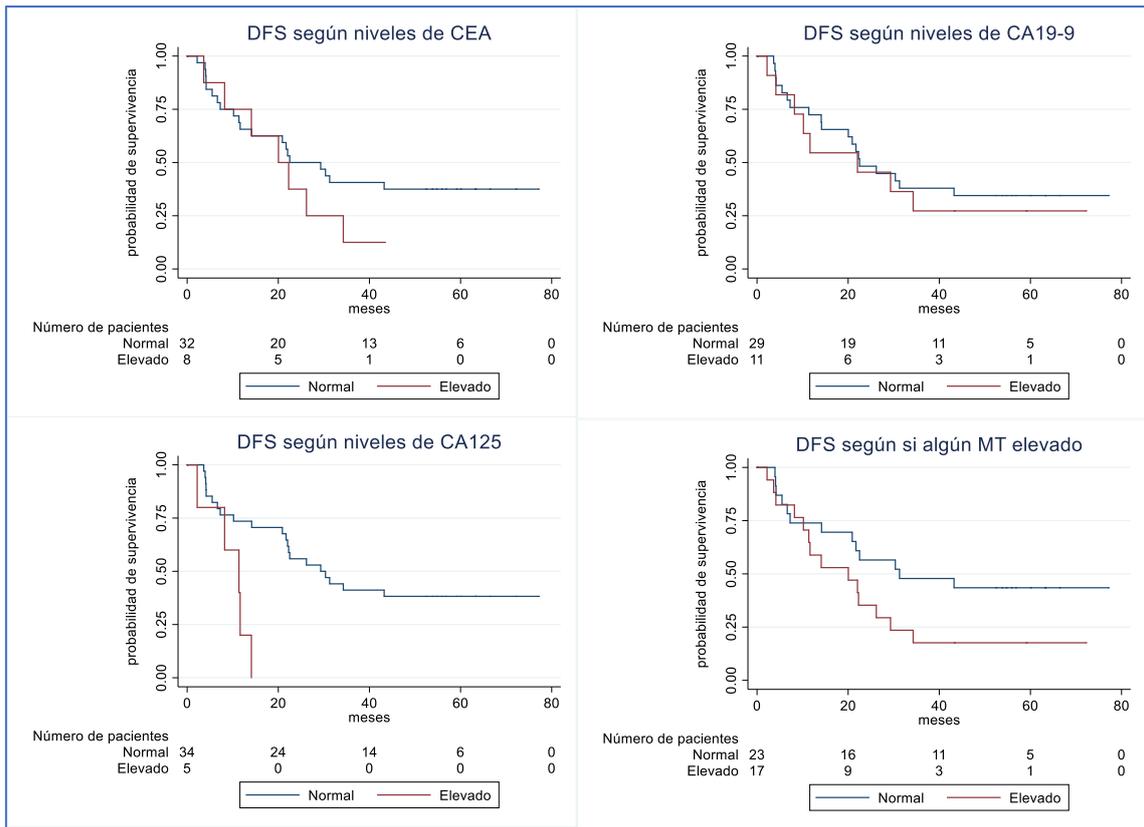


Figura 8 - Curvas de supervivencia para la DFS según los niveles de MT en la muestra inicial.

Tabla VII – Análisis de supervivencia univariable para la DFS según los niveles de MT en la muestra inicial.

| Variable                    | HR   | p     | IC95%        |
|-----------------------------|------|-------|--------------|
| <b>CEA (continuo)</b>       | 1,0  | 0,64  | 0,99 – 1,02  |
| <b>CEA elevado</b>          | 1,61 | 0,283 | 0,68 – 3,82  |
| <b>CA19-9 (continuo)</b>    | 1,0  | 0,68  | 1,0 – 1,0    |
| <b>CA19-9 elevado</b>       | 1,22 | 0,64  | 0,53 – 2,78  |
| <b>CA125 (continuo)</b>     | 1,00 | 0,32  | 1,0 – 1,0    |
| <b>CA125 elevado</b>        | 4,66 | 0,01  | 1,54 – 14,04 |
| <b>Cualquier MT elevado</b> | 1,93 | 0,09  | 0,91 – 4,16  |

Tabla VIII - Análisis de supervivencia multivariable para DFS y MT en la muestra inicial.

| Variable              | HR   | p           | IC95%        |
|-----------------------|------|-------------|--------------|
| <b>CEA elevado</b>    | 1,13 | 0,81        | 0,42 – 3,05  |
| <b>CA19-9 elevado</b> | 1,06 | 0,9         | 0,44 – 2,52  |
| <b>CA125 elevado</b>  | 4,41 | <b>0,01</b> | 1,38 – 14,07 |

Las curvas de supervivencia para la OS en función de los niveles basales de MT se muestran en la Figura 9. La Tabla IX muestra los resultados del análisis univariable realizado para la OS de idéntica forma a lo comentado previamente para la DFS. De igual manera, no encontramos diferencias significativas en OS en función de los niveles de CEA, aunque las curvas de supervivencia indican una clara tendencia a una peor supervivencia para los pacientes con niveles altos de CEA, no para CA19-9. De forma consecuente con lo evidenciado en DFS, los niveles elevados de CA125 indican un peor pronóstico de los pacientes con respecto a los pacientes con CA125 normal, siendo la diferencia estadísticamente significativa (HR 9,63 y  $p < 0,01$ ). Los pacientes con algún MT elevado presentan de igual manera una peor supervivencia en comparación con los pacientes con MT normales, siendo en este caso la diferencia estadísticamente significativa (HR 9,0 y  $p < 0,01$ ). En el análisis multivariable mostrado en la Tabla X, únicamente la elevación de CA125 aparece como factor pronóstico una vez corregido por los otros MT.

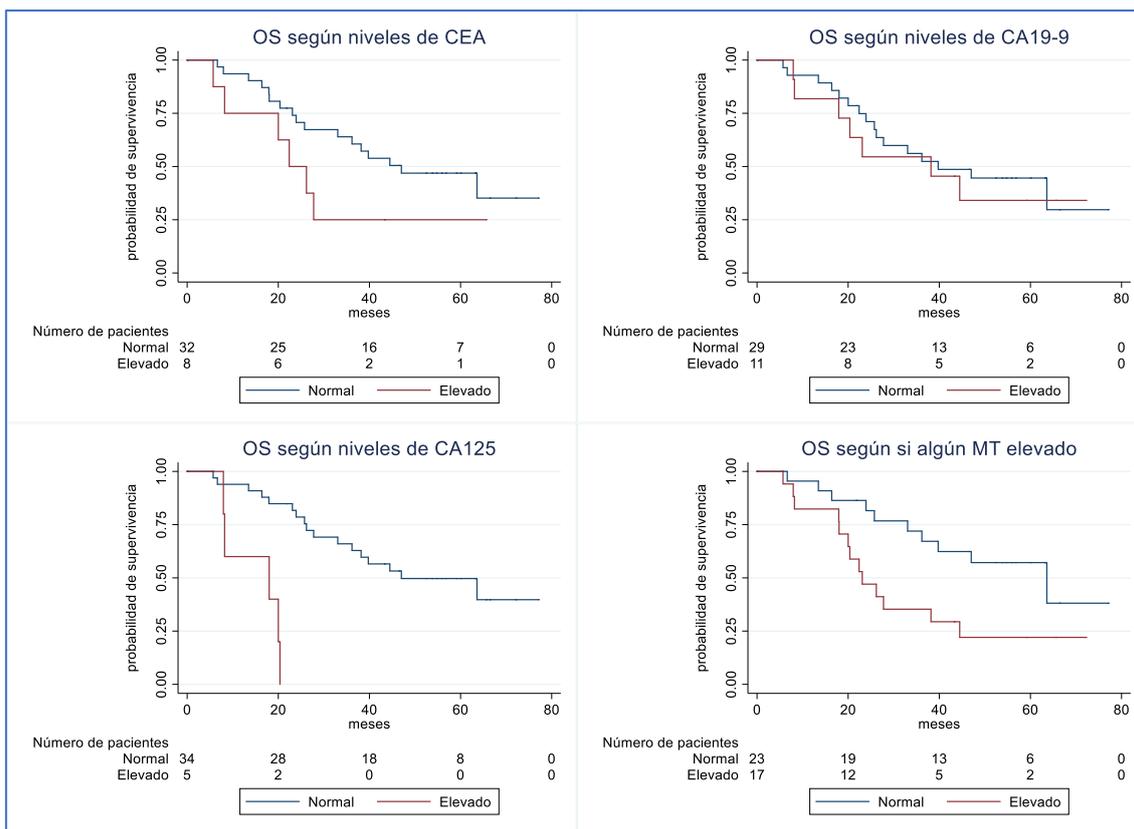


Figura 9 - Curvas de supervivencia para la OS según los niveles de MT en la muestra inicial.

Tabla IX - Análisis de supervivencia univariable para la OS según los niveles de MT en la muestra inicial.

| Variable                    | HR   | p     | IC95%        |
|-----------------------------|------|-------|--------------|
| <b>CEA (continuo)</b>       | 1,00 | 0,69  | 0,98 - 1,01  |
| <b>CEA elevado</b>          | 1,99 | 0,15  | 0,78 - 5,1   |
| <b>CA19-9 (continuo)</b>    | 1,0  | 0,51  | 1,0 - 1,0    |
| <b>CA19-9 elevado</b>       | 1,20 | 0,69  | 0,49 - 2,92  |
| <b>CA125 (continuo)</b>     | 1,01 | <0,01 | 1,0 - 1,01   |
| <b>CA125 elevado</b>        | 9,63 | <0,01 | 2,72 - 34,15 |
| <b>Cualquier MT elevado</b> | 2,48 | 0,03  | 1,08 - 5,71  |

Tabla X - Análisis de supervivencia multivariable para OS y MT en la muestra inicial.

| Variable              | HR   | p               | IC95%        |
|-----------------------|------|-----------------|--------------|
| <b>CEA elevado</b>    | 1,36 | 0,57            | 0,47 – 3,92  |
| <b>CA19-9 elevado</b> | 0,97 | 0,96            | 0,38 – 2,47  |
| <b>CA125 elevado</b>  | 9,0  | <b>&lt;0,01</b> | 2,44 – 33,23 |

### Micro-RNA en la muestra inicial

Los niveles de expresión de los micro-RNAs analizados en los primeros 40 pacientes (miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-20a-3p, miR-34a-3p, miR-98-5p, miR-130b-3p, miR-154-5p, miR-155-5p, miR-199-5p, miR-221-5p, miR-331-3p, miR-423-5p, miR-483-5p, miR-502-3p y miR-548a-3p) se muestran en la Tabla XI. El análisis de la expresión de micro-RNAs en función de la TRG obtenida se muestra en la Tabla XII. Los micro-RNAs con una  $p < 0,30$  en ambos tests estadísticos fueron considerados como potenciales predictores de la TRG para el análisis conjunto posterior. Estos micro-RNAs son: miR-19a-3p, miR-34a-3p, miR-130b-3p, miR-199-5p, miR-423-5p, miR-502-3p. La Figura 10 muestra los diagramas de caja de los seis micro-RNAs seleccionados.

Tabla XI - Niveles de expresión de micro-RNAs en la muestra inicial.

| Micro-RNAs         | Media | sd   | p25   | Mediana | p75   |
|--------------------|-------|------|-------|---------|-------|
| <b>miR-19a-3p</b>  | -2,77 | 0,79 | -3,12 | -2,80   | -2,44 |
| <b>miR-19b-3p</b>  | -1,76 | 5,97 | -3,00 | -2,67   | -2,31 |
| <b>miR-20a-3p</b>  | 7,44  | 1,29 | 7,32  | 7,59    | 7,90  |
| <b>miR-34a-3p</b>  | 10,08 | 2,05 | 9,7   | 10,29   | 11,17 |
| <b>miR-98-5p</b>   | 6,28  | 1,24 | 6,01  | 6,38    | 6,88  |
| <b>miR-130b-3p</b> | 4,42  | 0,97 | 4,19  | 4,46    | 5,05  |
| <b>miR-154-5p</b>  | 7,36  | 1,75 | 6,86  | 7,20    | 8,58  |

|                    |      |      |      |      |      |
|--------------------|------|------|------|------|------|
| <b>miR-155-5p</b>  | 7,18 | 1,23 | 7,09 | 7,31 | 7,63 |
| <b>miR-199-5p</b>  | 4,49 | 1,07 | 3,93 | 4,49 | 5,20 |
| <b>miR-221-5p</b>  | 9,22 | 1,65 | 8,99 | 9,41 | 9,63 |
| <b>miR-331-3p</b>  | 4,07 | 0,85 | 3,82 | 4,13 | 4,52 |
| <b>miR-423-5p</b>  | 2,98 | 0,89 | 2,63 | 3,00 | 3,54 |
| <b>miR-483-5p</b>  | 8,64 | 2,51 | 8,32 | 8,75 | 9,66 |
| <b>miR-502-3p</b>  | 5,13 | 1,17 | 4,94 | 5,28 | 5,65 |
| <b>miR-548a-3p</b> | 7,69 | 1,40 | 7,38 | 7,87 | 8,30 |

Tabla XII - Análisis de la expresión de micro-RNAs en función de la TRG en la muestra inicial.

| Micro-RNAs         | Mann-Whitney | Regresión logística |      |              |
|--------------------|--------------|---------------------|------|--------------|
|                    | p            | OR                  | p    | IC95%        |
| <b>miR-19a-3p</b>  | 0,07         | 1,92                | 0,18 | 0,74 - 4,98  |
| <b>miR-19b-3p</b>  | 0,06         | 0,97                | 0,71 | 0,82 - 1,15  |
| <b>miR-20a-3p</b>  | 0,80         | 1,30                | 0,58 | 0,51 - 3,30  |
| <b>miR-34a-3p</b>  | 0,26         | 1,48                | 0,21 | 0,81 - 2,71  |
| <b>miR-98-5p</b>   | 0,83         | 1,10                | 0,76 | 0,59 - 2,07  |
| <b>miR-130b-3p</b> | 0,09         | 3,68                | 0,08 | 0,85 - 15,90 |
| <b>miR-154-5p</b>  | 0,51         | 0,89                | 0,57 | 0,61 - 1,32  |
| <b>miR-155-5p</b>  | 0,44         | 1,77                | 0,48 | 0,36 - 8,81  |
| <b>miR-199-5p</b>  | 0,13         | 2,03                | 0,12 | 0,83 - 4,98  |
| <b>miR-221-5p</b>  | 0,26         | 1,34                | 0,46 | 0,61 - 2,97  |
| <b>miR-331-3p</b>  | 0,66         | 1,58                | 0,42 | 0,52 - 4,80  |
| <b>miR-423-5p</b>  | 0,04         | 3,84                | 0,03 | 1,17 - 12,55 |
| <b>miR-483-5p</b>  | 0,67         | 1,29                | 0,31 | 0,79 - 2,09  |
| <b>miR-502-3p</b>  | 0,01         | 4,00                | 0,04 | 1,09 - 14,71 |
| <b>miR-548a-3p</b> | 0,42         | 1,01                | 0,97 | 0,61 - 1,63  |

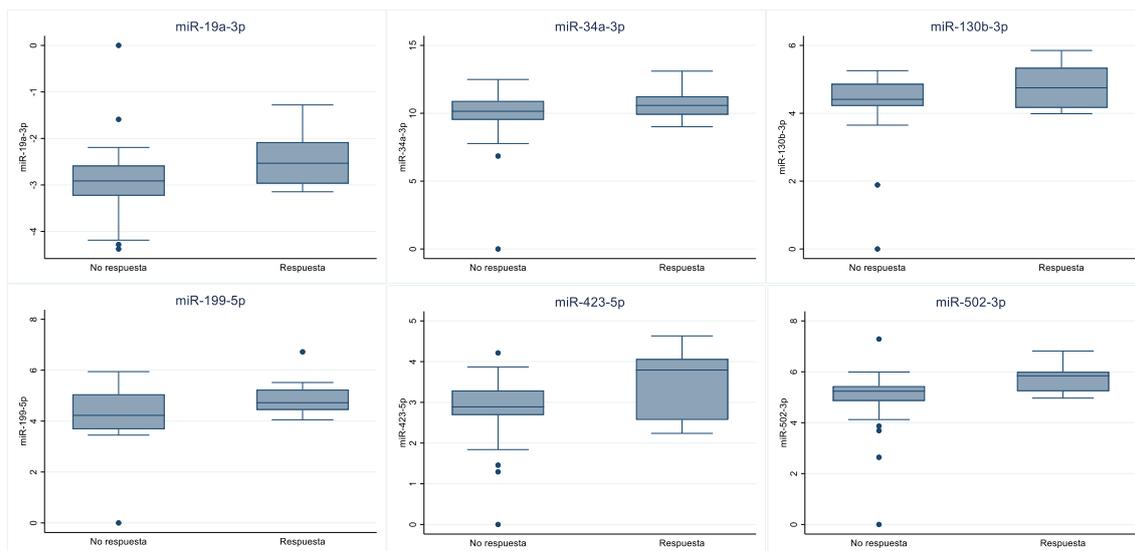


Figura 10 - Boxplot de la expresión de micro-RNAs según la TRG en la muestra inicial.

La Tabla XIII muestra los resultados del análisis de supervivencia univariante para la DFS en función de la expresión de los micro-RNAs analizados. Los micro-RNAs con un potencial papel pronóstico para la DFS seleccionados con una  $p < 0,3$  fueron: miR-19a-3p, miR-34a-3p, miR-423-5p, miR-483-5p y miR-502-3p. La Tabla XIV muestra los resultados del análisis de supervivencia univariante para la OS en función de la expresión de los micro-RNAs analizados. Los micro-RNAs con un potencial papel pronóstico para la DFS seleccionados con una  $p < 0,3$  son miR-19a-3p, miR-34a-3p, miR-423-5p y miR-502-3p. Coinciden con los seleccionados en el análisis realizado para la DFS excepto la ausencia de miR-483-5p.

Tabla XIII - Análisis de supervivencia univariable para la DFS por la expresión de micro-RNAs en la muestra inicial.

| Micro-RNAs         | HR   | p    | IC95%       |
|--------------------|------|------|-------------|
| <b>miR-19a-3p</b>  | 0,74 | 0,26 | 0,44 - 1,25 |
| <b>miR-19b-3p</b>  | 1,01 | 0,75 | 0,95 - 1,07 |
| <b>miR-20a-3p</b>  | 1,01 | 0,95 | 0,74 - 1,38 |
| <b>miR-34a-3p</b>  | 0,91 | 0,19 | 0,79 - 1,05 |
| <b>miR-98-5p</b>   | 1,11 | 0,61 | 0,75 - 1,62 |
| <b>miR-130b-3p</b> | 0,85 | 0,37 | 0,60 - 1,21 |
| <b>miR-154-5p</b>  | 1,00 | 0,97 | 0,79 - 1,28 |
| <b>miR-155-5p</b>  | 0,92 | 0,55 | 0,72 - 1,19 |
| <b>miR-199-5p</b>  | 0,95 | 0,75 | 0,67 - 1,33 |
| <b>miR-221-5p</b>  | 0,98 | 0,88 | 0,78 - 1,23 |
| <b>miR-331-3p</b>  | 1,17 | 0,57 | 0,68 - 2,01 |
| <b>miR-423-5p</b>  | 0,73 | 0,12 | 0,49 - 1,08 |
| <b>miR-483-5p</b>  | 0,88 | 0,06 | 0,77 - 1,00 |
| <b>miR-502-3p</b>  | 0,81 | 0,11 | 0,63 - 1,05 |
| <b>miR-548a-3p</b> | 1,06 | 0,72 | 0,76 - 1,49 |

Tabla XIV - Análisis de supervivencia univariable para la OS por la expresión de micro-RNAs en la muestra inicial.

| Micro-RNAs         | HR   | p    | IC95%       |
|--------------------|------|------|-------------|
| <b>miR-19a-3p</b>  | 0,71 | 0,28 | 0,39 – 1,31 |
| <b>miR-19b-3p</b>  | 1,03 | 0,40 | 0,97 – 1,09 |
| <b>miR-20a-3p</b>  | 0,94 | 0,70 | 0,68 – 1,30 |
| <b>miR-34a-3p</b>  | 0,86 | 0,06 | 0,74 – 1,01 |
| <b>miR-98-5p</b>   | 0,95 | 0,78 | 0,67 – 1,34 |
| <b>miR-130b-3p</b> | 0,93 | 0,75 | 0,61 – 1,42 |
| <b>miR-154-5p</b>  | 1,10 | 0,55 | 0,81 – 1,48 |
| <b>miR-155-5p</b>  | 0,87 | 0,35 | 0,66 – 1,16 |
| <b>miR-199-5p</b>  | 0,83 | 0,31 | 0,58 – 1,19 |
| <b>miR-221-5p</b>  | 0,95 | 0,70 | 0,73 – 1,23 |
| <b>miR-331-3p</b>  | 1,01 | 0,98 | 0,58 – 1,75 |
| <b>miR-423-5p</b>  | 0,78 | 0,29 | 0,50 – 1,23 |
| <b>miR-483-5p</b>  | 0,99 | 0,85 | 0,85 – 1,15 |
| <b>miR-502-3p</b>  | 0,83 | 0,22 | 0,61 – 1,12 |
| <b>miR-548a-3p</b> | 1,00 | 0,99 | 0,70 – 1,45 |

#### Búsqueda del mejor modelo predictivo del grado de regresión tumoral

De cara a una mejor selección de los biomarcadores circulantes para ser utilizados en la ampliación de la muestra, hemos realizado un análisis del mejor modelo predictivo por el método de todas las ecuaciones posibles. La Figura 11 muestra los 10 primeros modelos en el análisis del mejor modelo predictivo de TRG utilizando la expresión de micro-RNAs en sangre y limitando el número máximo de variables a seis. De los micro-RNAs seleccionados tras el análisis univariante, únicamente miR-19a-3p y miR-199-5p no aparecían representados en ningún modelo. Por otro lado, otros micro-RNAs no seleccionados con representación en los primeros 10 modelos fueron: miR-154-5p (9 modelos), miR-331 (2 modelos), miR-98 (1 modelo) y miR-155 (1

modelo). Tras realizar el mismo análisis añadiendo los niveles de marcadores tumorales en sangre, no encontramos ningún biomarcador adicional a los ya seleccionados.

| NVar | Variables                            | pValue | AIC  | BIC  | AUC   | Se   | Sp   | pfitHL |
|------|--------------------------------------|--------|------|------|-------|------|------|--------|
| 1.   | 2 miR1545p miR4235p                  | 0.006  | 42.7 | 47.8 | 0.705 | 63.6 | 96.6 | 0.006  |
| 2.   | 2 miR1545p miR5023p                  | 0.006  | 42.9 | 47.9 | 0.799 | 45.5 | 89.7 | 0.573  |
| 3.   | 3 miR34a3p miR1545p miR4235p         | 0.008  | 43.2 | 49.9 | 0.803 | 54.5 | 96.6 | 0.080  |
| 4.   | 2 miR130b3p miR1545p                 | 0.009  | 43.6 | 48.7 | 0.759 | 54.5 | 93.1 | 0.511  |
| 5.   | 3 miR1545p miR4235p miR5023p         | 0.010  | 43.6 | 50.4 | 0.768 | 63.6 | 93.1 | 0.311  |
| 6.   | 4 miR985p miR1545p miR3313p miR5023p | 0.010  | 43.8 | 52.3 | 0.824 | 45.5 | 89.7 | 0.667  |
| 7.   | 3 miR1545p miR1555p miR4235p         | 0.011  | 44.0 | 50.8 | 0.746 | 63.6 | 96.6 | 0.347  |
| 8.   | 3 miR1545p miR3313p miR5023p         | 0.012  | 44.1 | 50.9 | 0.799 | 45.5 | 93.1 | 0.655  |
| 9.   | 1 miR5023p                           | 0.009  | 44.2 | 47.5 | 0.768 | 18.2 | 96.6 | 0.794  |
| 10.  | 3 miR130b3p miR1545p miR5023p        | 0.012  | 44.2 | 50.9 | 0.781 | 54.5 | 86.2 | 0.605  |

Figura 11 - Estudio del modelo predictivo de TRG01 por todas las posibles ecuaciones en la muestra inicial.

Tras el análisis anteriormente descrito, la Tabla XV resume los micro-RNAs seleccionados para el análisis predictivo de TRG en la muestra ampliada.

Tabla XV - Micro-RNAs seleccionados

| Micro-RNAs         | Predicción de TRG<br>(uni- o multivariable) | Factor pronóstico de supervivencia |
|--------------------|---|------------------------------------|
| <b>miR-19a-3p</b>  | Univariable                                 | DFS, OS                            |
| <b>miR-34a-3p</b>  | Ambos modelos                               | DFS, OS                            |
| <b>miR-130b-3p</b> | Ambos modelos                               | No                                 |
| <b>miR-154-5p</b>  | Multivariable                               | No                                 |
| <b>miR-199-5p</b>  | Univariable                                 | No                                 |
| <b>miR-331-3p</b>  | Multivariable                               | No                                 |
| <b>miR-423-5p</b>  | Ambos modelos                               | DFS, OS                            |
| <b>miR-502-3p</b>  | Ambos modelos                               | DFS, OS                            |

## Análisis de la muestra completa

### Características de los pacientes en la muestra completa

La muestra final se compone de 57 pacientes diagnosticados entre diciembre de 2013 y marzo de 2019. En el momento del análisis final, en mayo de 2021, la mediana de seguimiento de los pacientes fue de 48,7 meses; 31 pacientes habían recaído o progresado; y 27 pacientes habían fallecido. La mediana de DFS fue de 26,4 meses (IC95% de 20,9 a 43,2 meses; Figura 12) y la mediana de OS fue de 47 meses (IC95% de 33 meses con el límite superior no alcanzado; Figura 13).

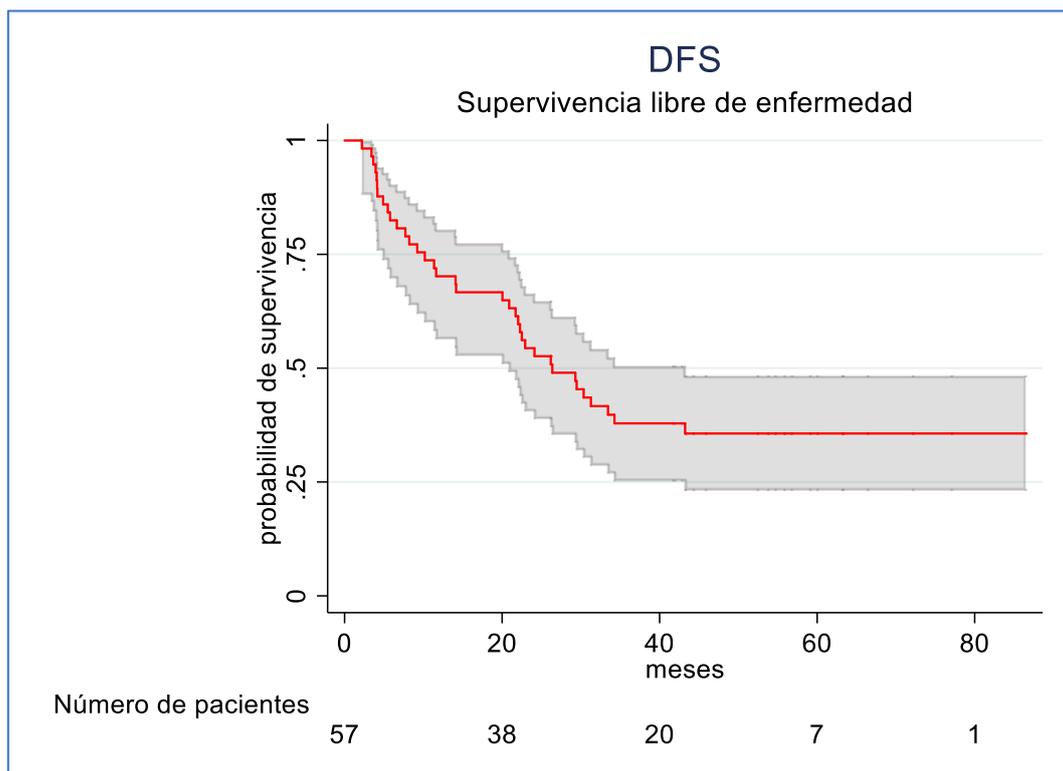


Figura 12 – Curva de supervivencia para la DFS en la muestra completa

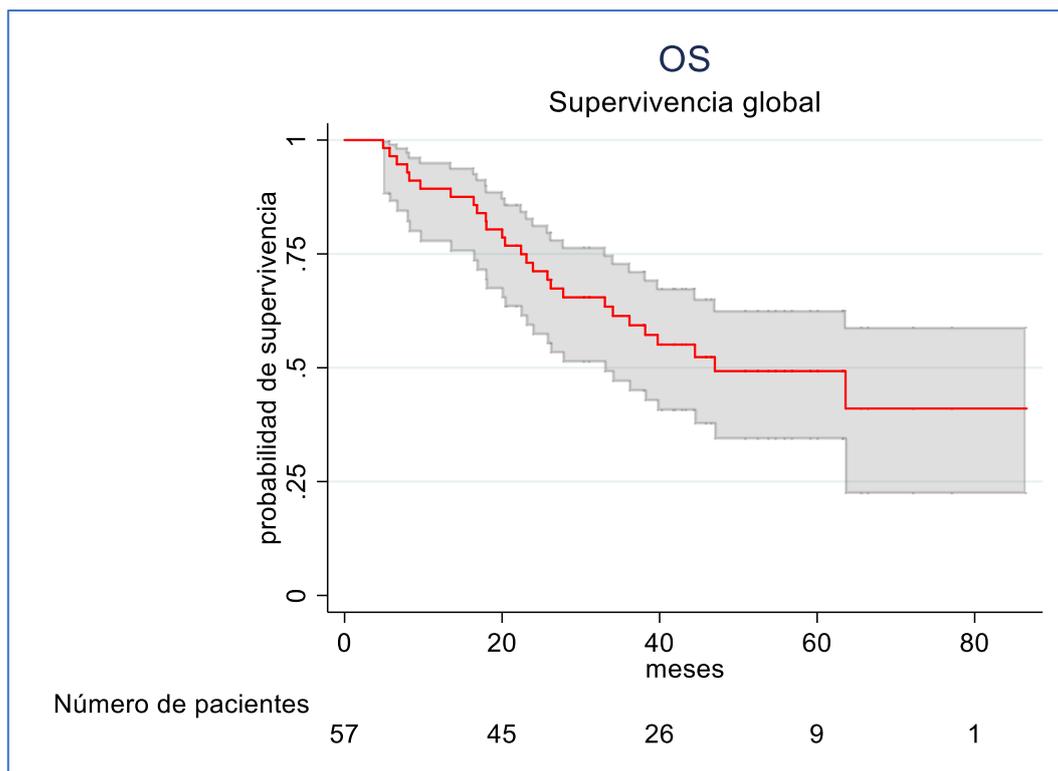


Figura 13 - Curva de supervivencia para la OS en la muestra completa

La Tabla XVI muestra las características clínico-patológicas de los pacientes de la muestra global, diferenciando los 17 pacientes (29,8%) que obtuvieron una buena respuesta patológica en la pieza quirúrgica tras la administración del tratamiento preoperatorio (TRG0-1) frente a los 40 pacientes (70,2%) que no alcanzaron dicha respuesta (TRG2-3).

La mediana de edad fue de 67,4 años (IQR de 59,6 a 75,6 años). El 60% de los pacientes fueron varones. La localización más frecuente fue la gástrica (68%), mientras que el subtipo histológico más frecuente fue el intestinal (53%). El 63% de los pacientes presentaban una pobre diferenciación histológica; en 3 pacientes se detectó la positividad para HER-2; y en 1 paciente se detectó un defecto en las proteínas MMR (*mismatch-repair*). Todos los pacientes recibieron tratamiento con QT preoperatoria, aunque sólo 82% recibieron

tratamiento sistémico tras la cirugía, bien por deterioro clínico tras la cirugía o bien por progresión de la enfermedad que requirió el inicio de una primera línea para la enfermedad avanzada. Principalmente se administraron tripletes de quimioterapia (81 % de los casos), con mayor presencia del uso de epirubicina en los casos más antiguos y de docetaxel en los diagnósticos más recientes. Trastuzumab fue asociado al tratamiento con quimioterapia en 1 paciente, y la administración de radioterapia concurrente a la quimioterapia se produjo en 3 pacientes. El 96% de los pacientes fueron sometidos a cirugía, persistiendo únicamente 2 pacientes no operados al encontrar la enfermedad irresecable en el acto quirúrgico. Las tasas de resección R0 y R1 fueron del 71 % y el 16 % respectivamente. En el 58 % de los pacientes se consiguió una disección ganglionar D2 o D3, obteniendo una mediana de ganglios examinados de 22. La presencia de invasión linfocelular (ILV) o invasión perineural (IPN) en la pieza quirúrgica se detectó en el 25 % y el 26 % de los casos respectivamente.

Los pacientes TRG0-1 presentaban algunas características diferenciales con respecto a los pacientes que no alcanzaron respuesta patológica que alcanzaban la significación estadística: mayor proporción de tumores localizados en esófago y unión gastroesofágica; mayor porcentaje de pacientes HER-2 positivos; menor uso de fluoropirimidinas; mayor proporción de pacientes que recibieron radioterapia; y menor porcentaje de ILV.

Tabla XVI - Característica de los pacientes en la muestra completa y según la TGR.

|                                | Muestra completa | Pacientes TRG0-1 | Pacientes TRG2-3 | P     |
|--------------------------------|------------------|------------------|------------------|-------|
| <b>Número de pacientes</b>     | 57               | 17               | 40               | -     |
| <b>Edad</b>                    | 67,4             | 67.5             | 66.4             | 0.8   |
| <b>Sexo</b>                    |                  |                  |                  |       |
| • Masculino                    | 59.7%            | 70.6%            | 55%              | 0.38  |
| • Femenino                     | 40.4%            | 29.4%            | 45%              |       |
| <b>Localización anatómica</b>  |                  |                  |                  |       |
| • Esófago distal               | 7%               | 17.7%            | 2.5%             | 0.04  |
| • Unión GE                     | 24.6%            | 35.3%            | 20%              |       |
| • Estómago                     | 68.4%            | 47%              | 77.5%            |       |
| <b>Subtipo de Lauren</b>       |                  |                  |                  |       |
| • Difuso                       | 33.3%            | 17.6%            | 40%              | 0.09  |
| • Intestinal                   | 52.7%            | 58.8%            | 50%              |       |
| • Mixto                        | 10.5%            | 11.8%            | 10%              |       |
| • No evaluado                  | 3.5%             | 11.8%            | 0%               |       |
| <b>Grado de diferenciación</b> |                  |                  |                  |       |
| • Bien diferenciado            | 7%               | 5.9%             | 7.5%             | 0.25  |
| • Moderadamente dif.           | 26.3%            | 41.2%            | 20%              |       |
| • Pobremente dif.              | 63.2%            | 47%              | 70%              |       |
| • No evaluado                  | 3.5%             | 5.9%             | 2.5%             |       |
| <b>HER-2</b>                   |                  |                  |                  |       |
| • Positivo                     | 5.3%             | 17.7%            | 0%               | 0.001 |
| • Negativo                     | 50.9%            | 17.7%            | 65%              |       |
| • No evaluado                  | 43.8%            | 64.6%            | 35%              |       |
| <b>MMR</b>                     |                  |                  |                  |       |
| • Defectuosas                  | 1.8%             | 0%               | 25%              | 0.5   |
| • Conservadas                  | 21%              | 11.8%            | 2.5%             |       |
| • No evaluado                  | 77.2%            | 88.2%            | 72.5%            |       |
| <b>Tratamiento</b>             |                  |                  |                  |       |
| • Preoperatorio                | 100%             | 100%             | 100%             | -     |
| • Postoperatorio               | 82.5%            | 76.5%            | 85%              | 0.4   |
| <b>Tipo de tratamiento</b>     |                  |                  |                  |       |
| • Dobletes de QT               | 19%              | 29%              | 23%              | 0.7   |
| • Tripletes de QT              | 81%              | 71%              | 77%              |       |

|  |       |       |       |      |
|--|-------|-------|-------|------|
| • 5FU/capecitabina   | 95%   | 82%   | 100%  | 0.02 |
| • Cisplatino   | 51%   | 35%   | 58%   | 0.2  |
| • Oxaliplatino   | 44%   | 47%   | 43%   | 0.8  |
| • Epirubicina  | 53%   | 35%   | 60    | 0.1  |
| • Docetaxel  | 23%   | 35%   | 18%   | 0.2  |
| • Trastuzumab  | 2%    | 6%    | 0%    | 0.3  |
| • Radioterapia   | 5%    | 18%   | 0%    | 0.02 |
| <b>Cirugía realizada</b>   | 96.4% | 100%  | 95%   | 1    |
| <b>Tipo de resección</b>   |       |       |       |      |
| • R0   | 71.4% | 82.4% | 66.7% | 0.5  |
| • R1   | 16.1% | 11.7% | 18%   |      |
| • R2   | 12.5% | 5.9%  | 15.4% |      |
| <b>Diseción ganglionar</b>   |       |       |       |      |
| • D1   | 7%    | 6%    | 7.5%  | 0.5  |
| • D1+  | 9%    | 6%    | 10%   |      |
| • D2   | 53%   | 47%   | 55%   |      |
| • D3   | 5%    | 6%    | 5%    |      |
| • 1 campo  | 2%    | 6%    | 0%    |      |
| • 2 campos   | 14%   | 23%   | 10%   |      |
| • No evaluado  | 10%   | 6%    | 12.5% |      |
| <b>Afectación ganglionar</b>   |       |       |       |      |
| • Ganglios examinados  | 22,5  | 20    | 23    | 0.4  |
| • Ganglios positivos   | 0     | 0     | 1     | 0.2  |
| <b>Invasión linfovascular</b>  |       |       |       |      |
| • Presente   | 24.6% | 11.8% | 30%   | 0.09 |
| • Ausente  | 42.1% | 64.7% | 32.5% |      |
| • No evaluado  | 33.3% | 23.5% | 37.5% |      |
| <b>Invasión perineural</b>   |       |       |       |      |
| • Presente   | 26.4% | 5.9%  | 35%   | 0.01 |
| • Ausente  | 36.8% | 64.7% | 25%   |      |
| • No evaluado  | 36.8% | 29.4% | 40%   |      |
| <i>Los datos cualitativos se expresan como porcentajes, mientras que los datos cuantitativos se reflejan por sus medianas.</i> |       |       |       |      |

La Figura 14 muestra la distribución de los estadios pronósticos según la clasificación TNM en el momento del diagnóstico y tras el tratamiento quirúrgico, tanto para la muestra completa como para los pacientes según la respuesta patológica tras el tratamiento neoadyuvante. No hemos encontrado diferencias significativas en la distribución por estadios preoperatorios entre los pacientes según la respuesta patológica obtenida. Sin embargo, la diferente distribución de los estadios en el postoperatorio sí resultó significativa ( $p=0,048$ ). Los pacientes con TRG0-1 tenían mayor porcentaje de estadios 0 a II (82,3%) y menor porcentaje de estadios III (11,8%) y IV (5,9%); en comparación con los pacientes sin respuesta patológica (40%; 37,5%; y 20%; respectivamente).

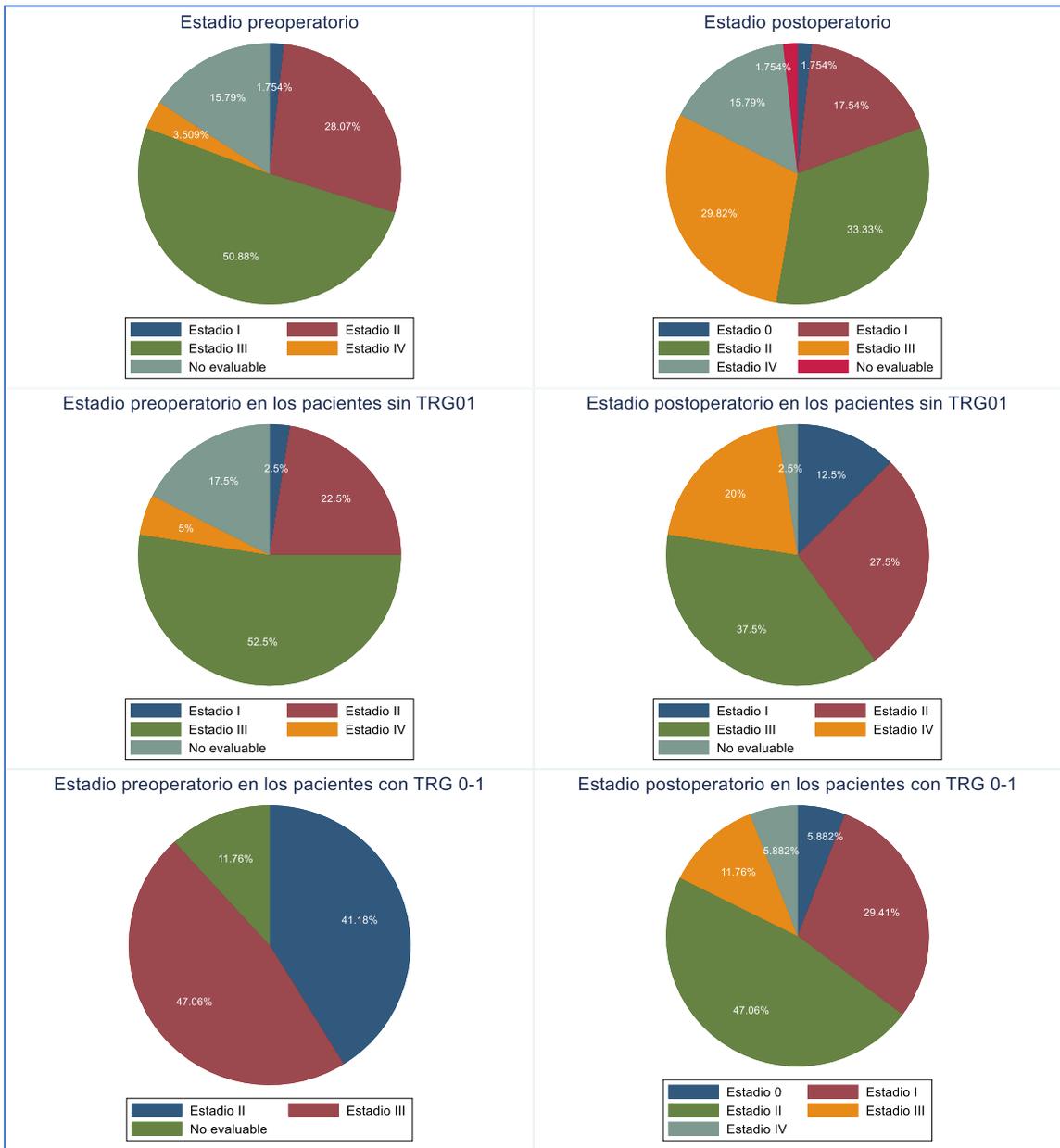


Figura 14 Distribución por estadios pre- y postoperatorios.

## Análisis de los marcadores tumorales en la muestra completa

El 40 % de los pacientes presentaban algún marcador tumoral en el momento del diagnóstico y antes de recibir cualquier tratamiento neoadyuvante. Niveles elevados de CEA, CA-199 y Ca-125 se encontraron en el 19 %, 26 % y 14 % de los casos, respectivamente. No hemos encontrado ninguna asociación significativa entre los niveles de estos marcadores tumorales y la respuesta patológica obtenida tras el tratamiento con quimioterapia (Figura 15).

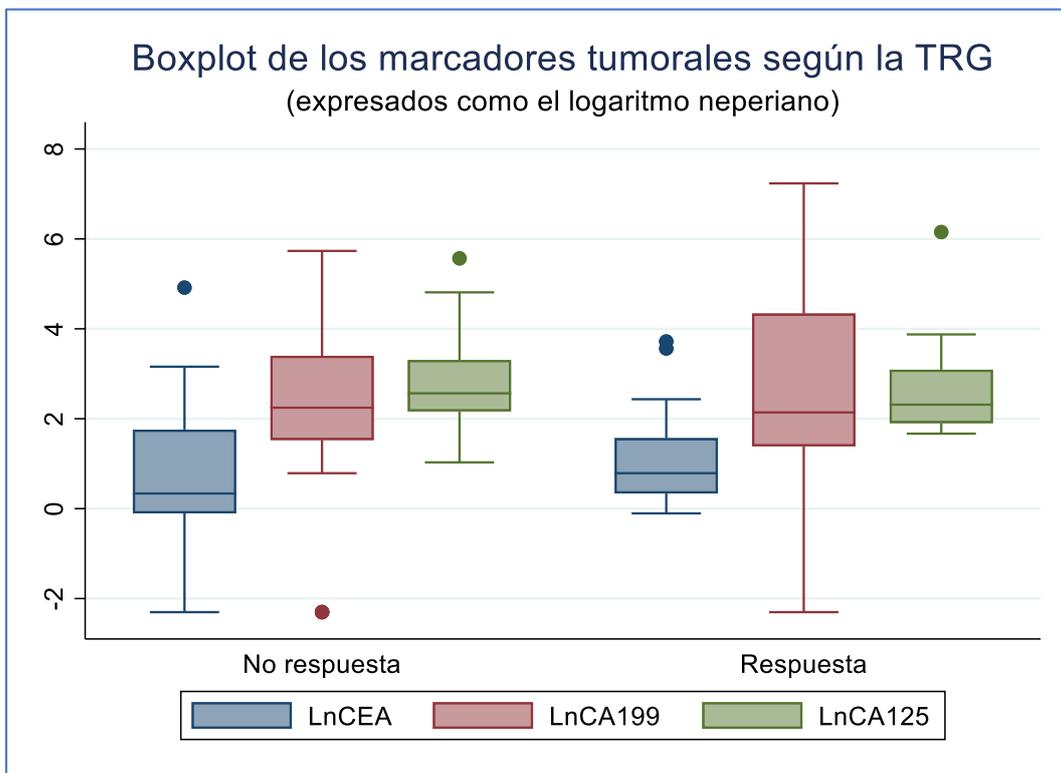


Figura 15 - Boxplot de los MT en función de la TRG obtenida en la muestra completa.

Encontramos peores resultados en la DFS para aquellos pacientes que presentaban niveles elevados de CA-125 (HR 4,98; IC95% 2,09 - 11,86;  $p < 0,001$ ) y en aquellos pacientes que presentaban algún marcador tumoral elevado (HR 2,59; IC95% 1,33 - 5,05;  $p = 0,005$ ). Sin embargo, los niveles de CEA y CA-199 no se asociaron a una peor DFS (Figura 16). De forma consistente, en el análisis de OS se evidenció una peor supervivencia en los pacientes con niveles elevados de CA-125 (HR 5,23; IC95% 1,88 - 14,57;  $p = 0,002$ ). Los pacientes con niveles elevados de CEA, CA-199, y aquellos pacientes con algún marcador elevado; no se asociaron a una peor supervivencia de forma significativa (Figura 17).

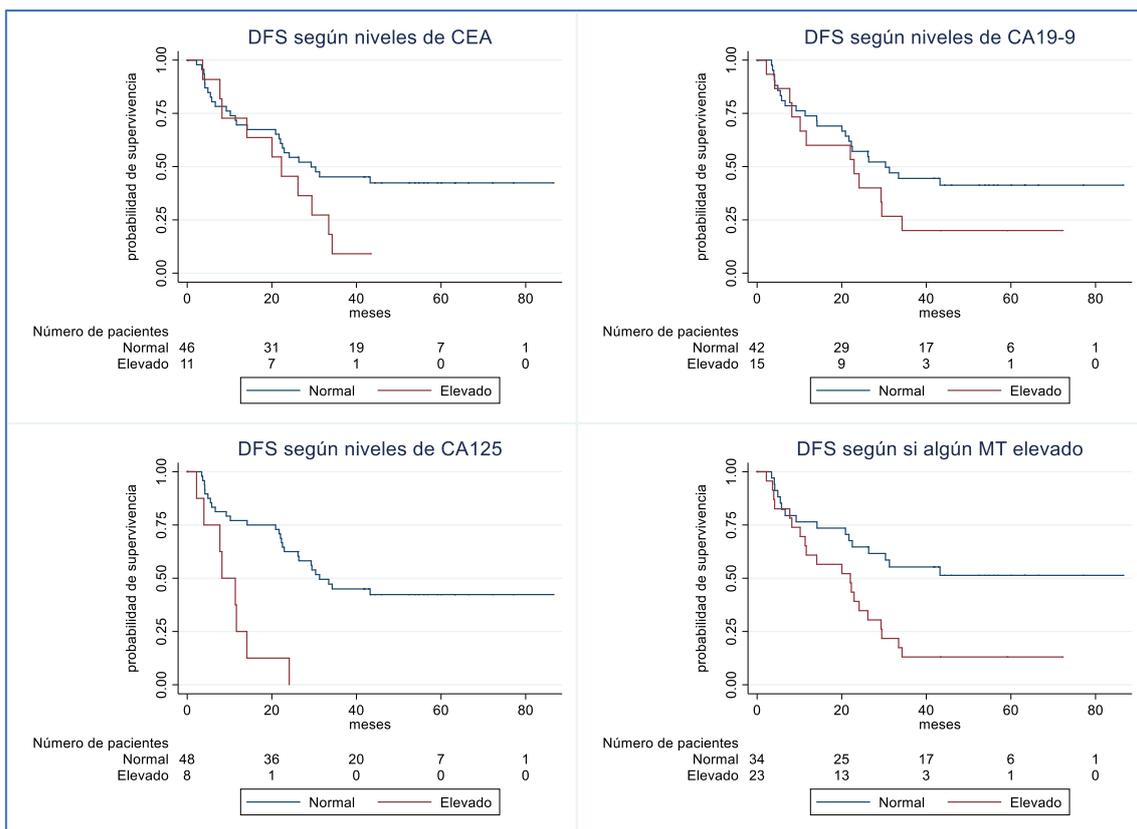


Figura 16 – Curvas de supervivencia libre de enfermedad en función de los niveles de marcadores tumorales en sangre en la muestra final.

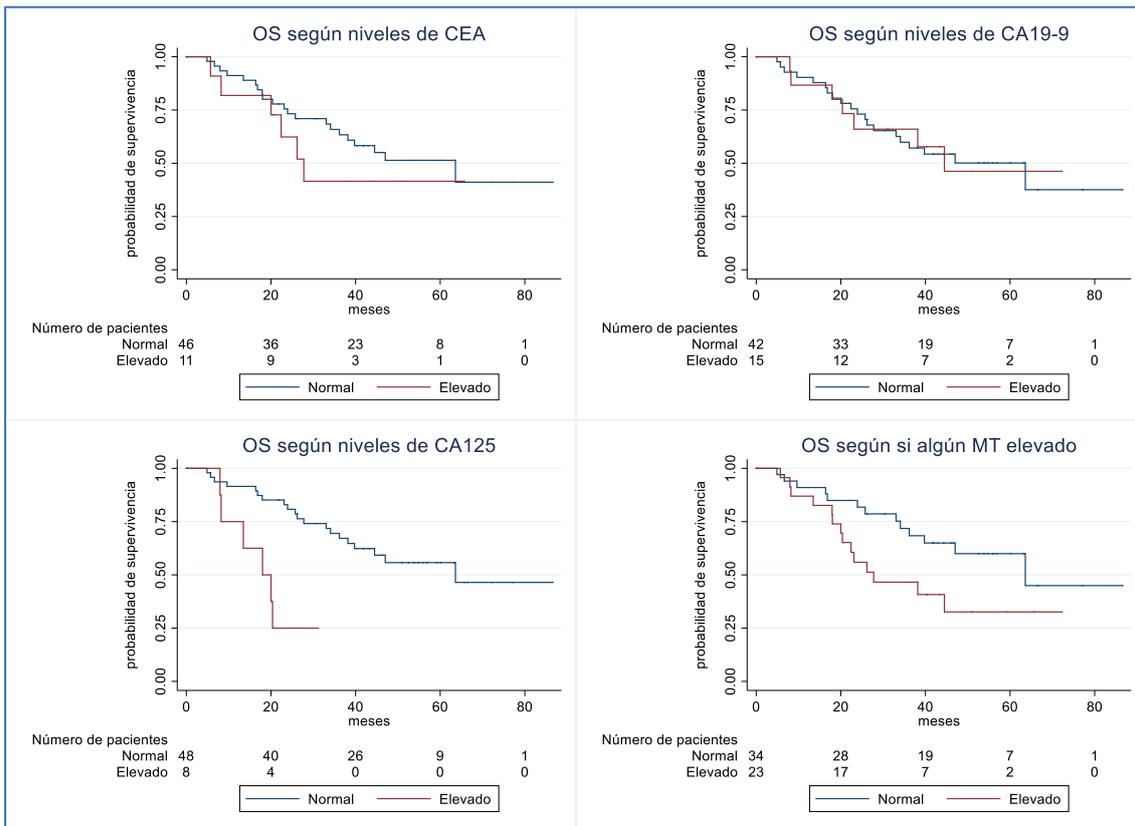


Figura 17 - Curvas de supervivencia global en función de los niveles de marcadores tumorales en sangre en la muestra final

## Micro-RNAs en la muestra completa

De los 8 micro-RNAs seleccionados en la muestra inicial, los niveles de miR-19a-3p y miR-130b-3p se asociaron de forma significativa a la obtención de respuesta patológica TRG0-1 en el análisis univariable (Tabla XVII). Por otro lado, miR-423-5p y miR-502-3p quedaron cerca de la significación estadística ( $p=0,07$  y  $p=0,06$  respectivamente). La Figura 18 muestra los diagramas de caja de estos biomarcadores.

*Tabla XVII – Resultados de la expresión de los micro-RNAs en la predicción de TRG, DFS y OS en la muestra final.*

| Micro-RNAs         | TRG0-1       | DFS                | OS                 |
|--------------------|--------------|--------------------|--------------------|
| <b>miR-19a-3p</b>  | <b>0.048</b> | HR 0,73 ; $p=0,17$ | HR 0,70 ; $p=0,22$ |
| <b>miR-34a-3p</b>  | 0,54         | HR 0,94 ; $p=0,43$ | HR 0,92 ; $p=0,35$ |
| <b>miR-130b-3p</b> | <b>0,03</b>  | HR 0,82 ; $p=0,21$ | HR 0,84 ; $p=0,37$ |
| <b>miR-154-5p</b>  | 0,41         | HR 1,02 ; $p=0,87$ | HR 1,15 ; $p=0,33$ |
| <b>miR-199-5p</b>  | 0,92         | HR 0,99 ; $p=0,92$ | HR 1,00 ; $p=0,98$ |
| <b>miR-331-3p</b>  | 0,89         | HR 1,21 ; $p=0,48$ | HR 1,25 ; $p=0,45$ |
| <b>miR-423-5p</b>  | <b>0,07</b>  | HR 0,89 ; 0,31     | HR 0,93 ; $p=0,57$ |
| <b>miR-502-3p</b>  | <b>0,06</b>  | HR 0,82 ; $p=0,14$ | HR 0,85 ; $p=0,34$ |

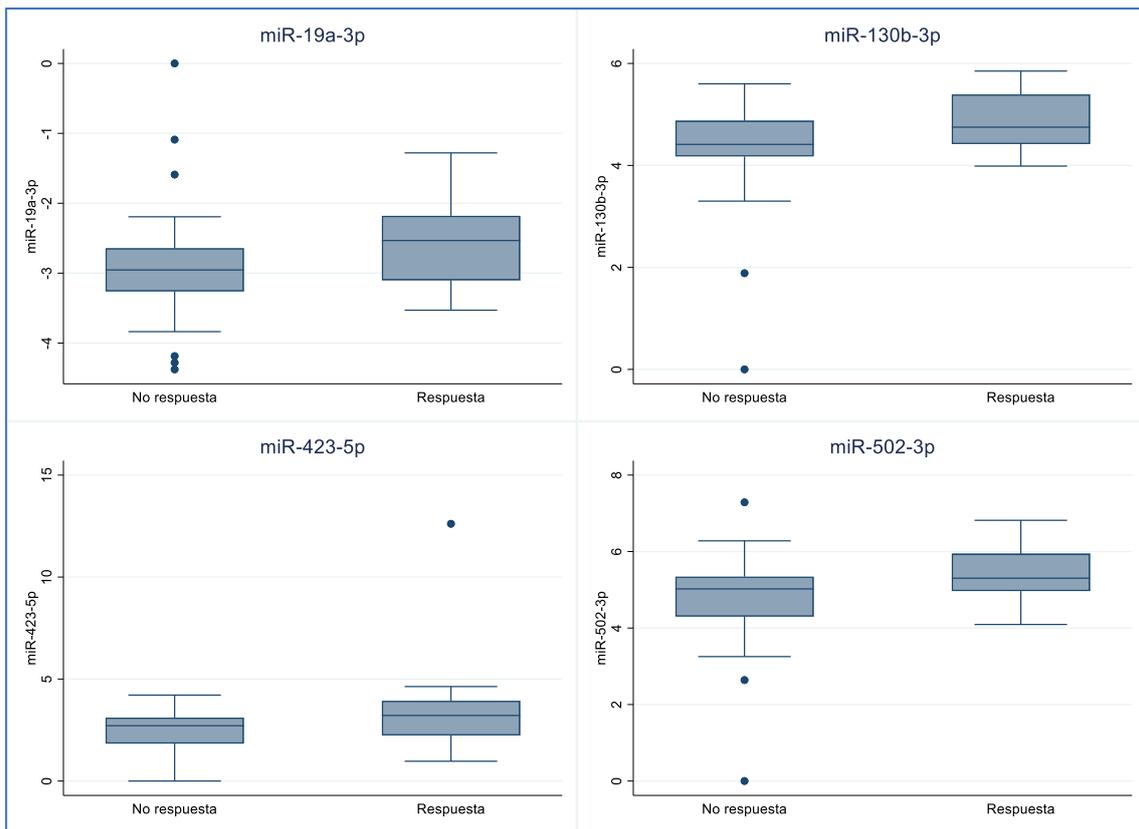


Figura 18 - Boxplot de los MT en función de la TRG obtenida en la muestra final.

En el análisis de supervivencia, los niveles de los micro-RNA seleccionados no se asociaron de forma significativa con el pronóstico de los pacientes, tanto para la DFS como para la OS (Tabla XVII). Tras categorizar los niveles de micro-RNAs por cuartiles, únicamente miR-19a-3p fue único biomarcador que mostró potencial pronóstico para una mejor supervivencia tanto en DFS (HR 0,35; IC95% 0,13 – 0,89;  $p=0,028$ ) y OS (HR 0,30; IC95% 0,091 – 1,01;  $p=0,05$ ) para aquellos pacientes con niveles del micro-RNA en el cuartil 4 (Q4) (Figura 19).

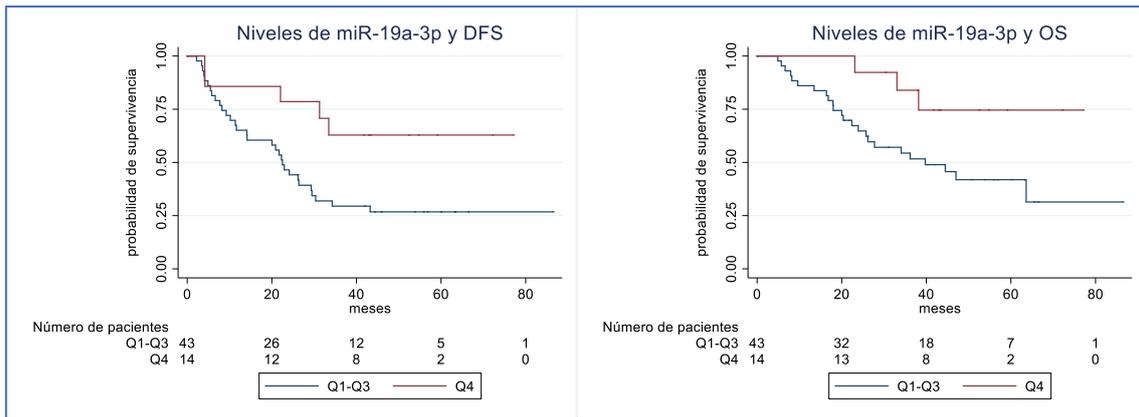


Figura 19 - miR-19a como factor pronóstico para DFS y OS.

### Modelo predictivo del grado de regresión tumoral

Tras realizar un análisis de los mejores modelos predictivos de la TRG, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente, se seleccionó el modelo que incluía los siguientes biomarcadores: CA-125, miR-19a-3p miR-130-3p, miR-154-5p y miR-423-5p. El modelo seleccionado presenta un área bajo la curva de 0,81 (IC95% 0,68 – 0,95); muestra una sensibilidad del 64,7%; y una especificidad del 92,1%. El análisis multivariable por regresión logística del modelo predictivo seleccionado se muestra en la Figura 20. En él se puede visualizar que los biomarcadores miR-130-3p ( $p=0,008$ ) y miR-154-5p ( $p=0,008$ ) resultaron ser factores predictivos independientes de la TRG. La Figura 21 muestra la comparativa de las curvas ROC del modelo seleccionado frente al modelo global con todos los biomarcadores analizados inicialmente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas curvas ( $p=0,25$ ).

| Logistic regression         |            | Number of obs | =     | 56     |                      |          |
|-----------------------------|------------|---------------|-------|--------|----------------------|----------|
|                             |            | LR chi2(5)    | =     | 19.33  |                      |          |
|                             |            | Prob > chi2   | =     | 0.0017 |                      |          |
| Log likelihood = -24.710591 |            | Pseudo R2     | =     | 0.2812 |                      |          |
| TRG01                       | Odds Ratio | Std. Err.     | z     | P> z   | [95% Conf. Interval] |          |
| CA125                       | 1.009412   | .0050156      | 1.89  | 0.059  | .9996294             | 1.019291 |
| miR19a3p                    | 1.350148   | .7428483      | 0.55  | 0.585  | .4592533             | 3.969269 |
| miR130b3p                   | 5.790701   | 3.830923      | 2.65  | 0.008  | 1.583457             | 21.17659 |
| miR1545p                    | .3425595   | .1376443      | -2.67 | 0.008  | .1558524             | .7529367 |
| miR4235p                    | 1.613542   | .5408995      | 1.43  | 0.154  | .8364429             | 3.112606 |
| _cons                       | .0987253   | .2639415      | -0.87 | 0.386  | .0005233             | 18.62564 |

Figura 20 - Modelo logístico multivariable de biomarcadores circulantes predictivo de TRG.

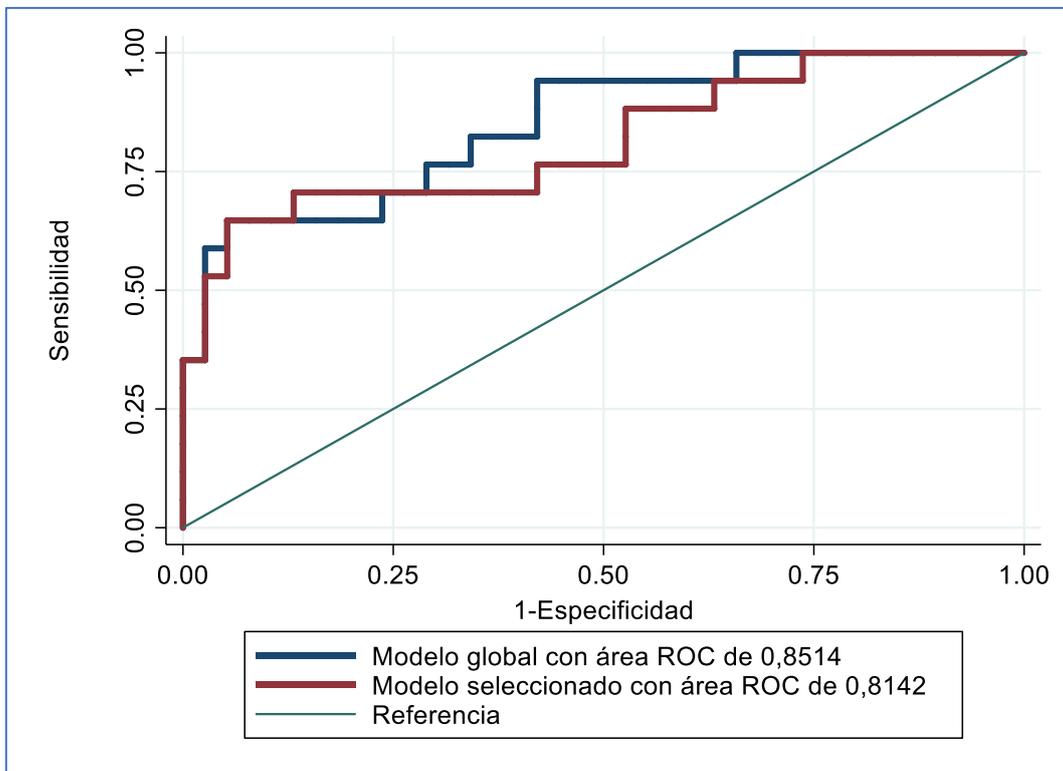


Figura 21 - Curvas ROC del modelo predictivo de TRG.

# DISCUSIÓN

## Marcadores tumorales

Los marcadores tumorales (MT) séricos pueden ser una herramienta de valiosa utilidad para la evaluación del pronóstico y la predicción de respuesta o resistencia a las terapias antitumorales en pacientes con cáncer. La posibilidad de realizar un simple análisis en una muestra de sangre nos ofrece ventajas a los clínicos y pacientes para evaluar la enfermedad en diferentes puntos de su recorrido, aproximación a una terapia personalizada, así como evitar procedimientos invasivos con el fin de obtener tejido tumoral para el estudio de biomarcadores. Sin embargo, existen también una serie de limitaciones para la aplicación de MT séricos en la práctica clínica habitual, como el hecho de que sólo una proporción no mayoritaria de pacientes con cáncer presentan valores séricos elevados de marcadores tumorales. Otro inconveniente es su falta de especificidad pues pueden detectarse valores elevados de MT en sangre en patologías benignas no oncológicas, lo que dificulta la interpretación de los resultados. Algunos estudios han planteado la posibilidad del uso de los MT en sangre como maniobras de screening poblacional, sin embargo, su baja sensibilidad y especificidad para dicho cometido hace que las principales guías clínicas no recomienden su uso para dicha indicación.<sup>59,60,61</sup>

En los pacientes con CGE, los siguientes nueve MT séricos están certificados oficialmente para su uso en la monitorización de la enfermedad: CEA o antígeno carcinoembrionario, CA19-9, CA50, STN, CA72-4, CA125, AFP o alfa-fetoproteína, IAP y TPA. Una reciente revisión sistemática ha analizado el papel de estos MT séricos en pacientes con CGE. Nos centraremos en los MT disponibles en nuestro

centro y que hemos incorporado a nuestro estudio. La positividad de CEA y CA19-9 se sitúan por debajo del 30% de los pacientes, siendo mayor el porcentaje de positividad a mayor estadio TNM. La positividad de CEA fue del 14%, 23%, 26% y 40% para los estadios I, II, III y IV, respectivamente. Por otro lado, la positividad de CA19-9 fue del 9%, 20%, 22% y 45% para los estadios I, II, III y IV respectivamente, aunque los pacientes con antígeno de Lewis negativo tienden a no expresar CA 19.9. Los niveles séricos elevados de CEA y CA19-9 se asociaron a un peor pronóstico de los pacientes independientemente de su estadio. Finalmente, los niveles elevados de CA125 se asociaron a la presencia de enfermedad peritoneal con una precisión diagnóstica del 90%.<sup>62</sup> En un estudio retrospectivo se estudió el papel de los MT séricos CEA y CA19-9 en 149 pacientes con CGE en etapas iniciales de la enfermedad. La positividad de CEA y CA19-9 en el momento preoperatorio fue del 17% y el 7% respectivamente. Los pacientes en estadio III presentaban mayor porcentaje de positividad de los MT con respecto a los estadios I-II, 21% en el caso de CEA y 15% para CA19-9. La positividad para CA19-9 en el momento preoperatorio, pero no para CEA, se asoció a un peor pronóstico de la enfermedad en el análisis univariante. Sin embargo, solamente el estadio TNM resultó ser un factor pronóstico en el análisis multivariante.<sup>63</sup> Los datos resultantes de nuestro estudio son acordes a lo publicado en la literatura, y hemos encontrado niveles elevados de CEA, CA-19-9 y CA-125 en el 19 %, 26 % y 14 % de los casos analizados previamente a iniciar el tratamiento preoperatorio. Al analizar el potencial pronóstico de los MT, vimos que la positividad de CA-125 se asoció de forma significativa a una peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes. Sin embargo, ni la positividad de CEA ni de CA19-9 se asoció de forma significativa a un peor pronóstico de los pacientes.

Otra aproximación interesante consiste en valorar la combinación de los MT alterados más que su elevación por separado. En este sentido un estudio con 1134 pacientes evaluó un score que incluía los MT CEA, CA19-9 y CA72-4. Los autores encontraron una positividad de 22%, 18% y 21%, respectivamente. Los pacientes con todos los MT negativos presentaban una supervivencia significativamente superior frente a los pacientes con algún marcador elevado, siendo este beneficio en supervivencia independiente del estadio de la enfermedad.<sup>64</sup> En nuestro estudio hemos explorado también este escenario, encontrando que los pacientes con algún MT elevado dentro de los tres analizados (CEA, CA19-9 y CA-125) presentaban una peor supervivencia libre de enfermedad de forma significativa y una tendencia a una peor supervivencia global que no alcanzó la significación estadística, todo ello consistente con la bibliografía ya comentada.

Otros estudios han evaluado la modificación de los MT en pacientes con CGE en etapas iniciales sometidos a tratamiento con QT neoadyuvante como es el caso de la población diana de nuestro estudio. Un estudio retrospectivo con 184 pacientes con CGE tratados con FOLFOX neoadyuvante seguido de cirugía curativa, evaluó el papel de los MT séricos CEA, CA19-9, CA72-4 y CA125. La positividad de los MT fue del 37,9%, 28,7%, 36,4% y 26,4%; respectivamente. La positividad de CA19-9 y CA72-4 se asoció a un peor pronóstico de los pacientes con una supervivencia significativamente inferior en el análisis multivariante, sin encontrar diferencias significativas para CEA ni CA125. Los niveles de MT descendieron de forma significativa para CEA, CA72-4 y CA-125; sin encontrar diferencias para CA19-9. La reducción de MT se asoció a un mejor control clínico de la enfermedad, mientras que sólo los niveles de CA72-4 se asociaron con una mayor respuesta patológica.<sup>65</sup> Nuestra aproximación en el estudio que

presentamos no ha sido valorar la magnitud del cambio en los MT séricos para evaluar la respuesta radiológica y clínica de los pacientes, aunque podría ser una línea de investigación en futuros proyectos. Sin embargo, sí que hemos explorado la posibilidad que los MT puedan indicar la posibilidad de una respuesta patológica tras la aplicación de un tratamiento con quimioterapia preoperatoria, aspecto apenas explorado en la bibliografía hasta el momento actual. En este sentido, no hemos encontrado diferencias significativas en los niveles de los MT séricos CEA, CA19-9 y CA-125; entre los pacientes que consiguieron una buena respuesta patológica (TRG0-1) frente a los malos respondedores (TRG2-3).

Únicamente en un paciente de nuestra muestra se detectó la presencia de un defecto en la proteínas de reparación del DNA (MMR) y dicho paciente fue remitido a la consulta monográfica de cáncer hereditario. En el resto de los pacientes, no se encontró ninguna agregación familiar sugerente de la presencia de mutaciones en el gen CDH1 u otras alteraciones relacionadas con otros síndromes de cáncer familiar.

## **Micro-RNAs**

Con el objetivo de mejorar la predicción de los MT séricos que hemos comentado anteriormente, nuestro estudio plantea la posibilidad de incorporar la determinación de micro-RNAs circulantes para explorar su potencial pronóstico y su capacidad predictiva de respuesta patológica tras la administración de quimioterapia preoperatoria, como reflejo de un potencial factor predictivo de resistencia a la quimioterapia. En un primer análisis univariante, nuestro estudio refleja que los niveles bajos de expresión de tanto miR-19a como de miR-130b se asociaron de forma significativa a una mejor respuesta

patológica (TRG0-1) tras el tratamiento con quimioterapia. De forma adicional, la expresión baja de miR-19a pero no de miR-130b, se asoció a una mejor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global, de forma significativa. No encontramos diferencias significativas para la predicción de respuesta patológica ni para la supervivencia con el resto de micro-RNAs circulantes analizados.

La familia de micro-RNA miR-19 está compuesta por miR-19a, miR-19b-1 y miR-19b-2; procedentes de los clústers miR-17-92 y miR-106a-363; dentro de los cromosomas 3 y X respectivamente. Esta familia de micro-RNAs está involucrada en la regulación de diferentes procesos fisiológicos y patológicos como la inflamación, la fibrosis tisular, el envejecimiento, el metabolismo y la carcinogénesis. Se conoce que miR-19b actúa sobre p53 inhibiendo la cascada de señalización de BAX y p21 en las células tumorales. Por otro lado, miR-19a tiene capacidad para interactuar con TNF $\alpha$ , mientras que miR-19b tiene como diana de RNF11 de la vía de señalización de NF $\kappa$ B. Myc y E2F son inductores de la expresión de la familia miR-19, existiendo un feedback negativo de los productos de miR-17-92 sobre Myc y E2F.<sup>66</sup>

MiR-19a se ha visto que puede ser útil como biomarcador en tumores gastrointestinales. La sobreexpresión de miR-19a se ha detectado en distintos tumores gastrointestinales como el cáncer colorrectal, el cáncer de páncreas o el hepatocarcinoma; teniendo también un potencial papel pronóstico de la enfermedad, como hemos encontrado en nuestro estudio.<sup>67, 68</sup> De forma similar a nuestro trabajo, otro grupo de investigadores ha evidenciado que los niveles circulantes de miR-19a podrían ser utilizados como biomarcador en los pacientes con CGE. Este estudio evidenció que los pacientes con CGE en estadios precoces presentaban niveles de expresión de miR-19a significativamente superiores con respecto a los pacientes con gastritis.<sup>69</sup> Estudios

preclínicos muestran que miR-19a regula la proliferación celular, el ciclo celular y la apoptosis; mediante su interacción con PTEN y actuando sobre la vía PIK3CA/AKT. La sobreexpresión de miR-19a aumenta la expresión de BCL2 y la ciclina D1; mientras que, por otro lado, reduce la expresión de p27 y BAX.<sup>70</sup> En un estudio clínico de un grupo español, se demostró que miR-19a se encuentra sobreexpresado de forma significativa en el tejido tumoral con respecto al tejido sano adyacente en muestras procedentes de pacientes con CGE. De forma adicional, este grupo encontró una correlación significativa entre miR-19a y la presencia de inestabilidad de microsatélites.<sup>71</sup> En nuestro estudio, la determinación de la inestabilidad de microsatélites se obtuvo en aquellos pacientes con agregación familiar de cáncer, pero no se determinó en todos los pacientes, al no ser una alteración válida para la elección del tratamiento. Por último, cabe destacar que miR-19a se ha descrito que puede hacer diana frente a otros muchos mRNA (BCL2L11, Bim, CCND1, CTGF, DPYSL2, ERBB4, ESR1, HOXA5, MECP2, MYCN, NR4A2, PRMT5, PTEN, RAB14, Smad4, SOCS1, TGFBR2, THBS1, TNF-a, VPS4B) y lncRNA (H19 y AP000288.2) en los pacientes con CGE para sus funciones reguladoras.<sup>72</sup>

MiR-130b es otro potencial biomarcador en pacientes con cáncer gastroesofágico. La expresión de miR-130b puede ser detectada en exosomas circulantes y se ha visto un aumento de expresión en el suero de pacientes con cáncer gástrico en comparación con pacientes sanos.<sup>73</sup> A semejanza con miR-19a en el estudio del grupo español comentado previamente, miR-130b se ha visto sobreexpresado en tejido tumoral con respecto a tejido sano, asociándose con un estadio clínico más avanzado y con la presencia de inestabilidad de microsatélites.<sup>71</sup> Asimismo, en este estudio se encontró una correlación significativa con otros micro-RNAs como miR-128 y miR-34 en pacientes con sobreexpresión de cMET, por lo que estos tres micro-

RNAs podrían funcionar como un único componente en este escenario. Otro interesante estudio asiático también evidenció que miR-130b se encontraba sobreexpresado en tejido tumoral de pacientes con cáncer gástrico con respecto al tejido sano circundante en las muestras.<sup>74</sup> A nivel clínico, la expresión de miR-130 se asoció con el tamaño tumoral, la presencia de metástasis ganglionares y un estadio TNM más avanzado. De forma adicional, encontraron una relación entre la expresión de miR-130b y la presencia de macrófagos M2. La sobreexpresión de miR-130b se asoció con aumento de BCL2 y VEGF, así como descenso de BAX y Caspasa 3. La posible diana de acción de miR-130b parece ser MLL3 y GRHL2, cuya inhibición por miR-130b induce un aumento de macrófagos M2 y, en consecuencia, se produce un aumento de la viabilidad tumoral, supresión de la apoptosis, aumento de la migración, de la invasión celular y promoción de angiogénesis tumoral. Otros estudios postulan que en el mecanismo de acción de carcinogénesis de miR-130b podría estar involucrada la vía de TGFBR2, de tal forma que una sobreexpresión de miR-130b condicionaría una menor expresión de TGFBR2.<sup>75</sup> Por último, miR-130b también puede ser una buena diana terapéutica, ya que se ha descrito que lncRNAs como MRLP39 pueden interaccionar con miR-130b, inhibiendo su acción y actuando como supresores de la carcinogénesis.<sup>76</sup>

## **Modelo predictivo del grado de regresión tumoral**

Nuestro principal objetivo en este trabajo era encontrar una firma de biomarcadores circulantes, recogidos antes de realizar cualquier tratamiento antitumoral, que funcionara como un modelo predictivo de la respuesta patológica alcanzada tras la administración del tratamiento sistémico preoperatorio. Tras el análisis estadístico de

todos modelos multivariable predictivos posibles, decidimos escoger el modelo que incluía los siguientes marcadores: CA-125, miR-19a-3p, miR-130b-3p, miR-154-5p y miR-423-5p. Este modelo ofrece una más que interesante área bajo la curva ROC de 0,81; sin encontrar diferencias significativas entre el modelo seleccionado y el modelo global teniendo en cuenta todos los biomarcadores séricos. Esta aproximación que hemos realizado es única en la literatura científica, pues no hemos encontrado ningún trabajo publicado que utilice una firma combinada de marcadores tumorales y micro-RNAs circulantes para la predicción de la TRG en pacientes con CGE sometidos a quimioterapia preoperatoria.

Previamente hemos comentado el papel biológico en CGE de los biomarcadores CA-125, miR-19 y miR-130. Con respecto a miR-154, no hemos encontrado en la literatura científica el papel que pudiera ejercer en pacientes con adenocarcinomas gastroesofágicos. Sin embargo, en otros tipos tumorales como los carcinomas escamosos de esófago, se ha visto que puede ser detectado como biomarcador en exosomas circulantes. MiR-154 funcionaría como un supresor tumoral, actuando sobre la diana KIF14, de manera que su sobreexpresión se asociaría a una reducción de la progresión y la angiogénesis tumoral en este tipo de tumores.<sup>77</sup> Finalmente, el biomarcador miR-423 ha sido descrito como un potencial biomarcador molecular circulante en pacientes con CGE. Un estudio asiático con 164 casos y 127 controles encontró una firma de micro-RNAs circulantes (miR-1, miR-20a, miR-27a, miR-34 y miR-423-5p) con capacidad diagnóstica de CGE. La expresión de miR-423 resultó ser dos veces mayor en los pacientes con CGE con respecto a los controles.<sup>78</sup> MiR-423 es capaz de interactuar con TFF1 (*trefoil factor 1*), un péptido presente en la mucosa del tubo digestivo que está involucrado en la reparación de la mucosa ante un daño tisular y cuya alteración ha sido descrita en diversos tipos de

cáncer. TFF1 es una diana de miR-423, de manera que éste induce una menor expresión de TFF1 causando un aumento de la invasión y la proliferación celular en cáncer gástrico, por medio de incremento de ciclinas D1, D3 y  $\beta$ -catenina.<sup>79</sup> Trabajos posteriores también han apuntado a una interacción entre miR-423 y la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina involucrada en el desarrollo y la progresión de cáncer gástrico y otros tumores.<sup>80,81</sup> Por último, un reciente estudio apunta a que la capacidad diagnóstica de miR-423 circulante para el CGE podría ser superior a la de marcadores tumorales como CEA y CA-19-9. Asimismo, miR-423 interaccionaría con la diana SUFU (*suppressor of fused protein*), causando una inhibición de éste para promocionar la proliferación celular, la migración y la diseminación ganglionar en los pacientes con CGE.<sup>82</sup>

## **Limitaciones del estudio**

Como todo estudio observacional, nuestro proyecto de investigación presenta las limitaciones inherentes a este tipo de estudios. La población seleccionada en nuestro estudio se ha realizado mediante un reclutamiento consecutivo en un único centro, por lo que podemos haber incurrido en un sesgo de selección y que nuestra muestra no sea representativa de la población general. Las variables clínico-patológicas recogidas en nuestro análisis son las que generalmente se detallan en estudios con pacientes con cáncer gástrico. Sin embargo, es probable que no hayamos tenido en cuenta algunas variables que estén influyendo sobre nuestros resultados tanto como factores de interacción o factores de confusión. El tamaño muestral de nuestro estudio es limitado, lo que condiciona el carácter exploratorio del trabajo que aquí presentamos. Se requiere una validación de estos resultados en estudios de mayor envergadura para poder aplicar el uso

de estos biomarcadores a la práctica clínica habitual. El déficit nutricional es un factor que puede influir en la tolerancia al tratamiento, y, por ende, a su respuesta. Recomendamos su implementación en los pacientes con CEG.

Finalmente, otra de las limitaciones de nuestro estudio reside en que hemos escogido el uso de muestras de sangre para la detección de los biomarcadores, en lugar de analizar muestras tumorales, que a su vez son heterogéneas en su composición celular y pueden mostrar resultados equívocos. Somos conscientes de que los micro-RNAs analizados en las muestras de sangre podrían no ser específicos de tumor y, por lo tanto, estar siendo influidos los resultados por "ruido de fondo". Esta limitación supone a su vez una oportunidad, la de monitorizar los cambios tumorales provocados por la dinámica del tumor y la presión del tratamiento con fines pronósticos y terapéuticos, y la de desarrollar proyectos futuros en líneas celulares de cáncer gastroesofágico para determinar la expresión de los micro-RNAs seleccionados en los organoides, cultivos celulares y en sus sobrenadantes, demostrando que dichos micro-RNAs pueden ser secretados por dichas células tumorales al torrente sanguíneo y ejercer sus funciones.

## CONCLUSIONES

- ❖ Los niveles de expresión de **miR-19a** se asociaron de forma significativa a la respuesta patológica, medida como grado de regresión tumoral, obtenida tras el tratamiento sistémico preoperatorio en pacientes con cáncer gastroesofágico en estadio locorregional. La sobreexpresión de miR-19a podría ser utilizada como un marcador predictivo de **resistencia a la quimioterapia** en este escenario.
- ❖ Los niveles de expresión de **miR-130b** se asociaron de forma significativa a la respuesta patológica, medida como grado de regresión tumoral, obtenida tras el tratamiento sistémico preoperatorio en pacientes con cáncer gastroesofágico en estadio locorregional. La sobreexpresión de miR-130b podría ser utilizada como un marcador predictivo de **resistencia a la quimioterapia** en este escenario.
- ❖ En el análisis multivariante, la firma de biomarcadores compuesta por los niveles de **CA-125, miR-130-3p, miR-154-5p y miR-423-5p**; resultó ser un modelo **predictivo de TRG**.
- ❖ Los niveles elevados de **CA-125** (> 35 U/ml) y de **miR-19a-3p** (cuartil-4) se asociaron a un **peor pronóstico** tanto en la supervivencia libre enfermedad como en la supervivencia global.

# ANEXOS

## Resolución del Comité de Ética

|   |  |
|---|--|
|  | <b>COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA</b> |
|---|--|

### Conformidad de la Dirección del Centro

Dra. Victoria Ureña Vilardell Subdirectora Médico de Docencia e Investigación del Hospital "Ramón y Cajal" y vista la autorización del Comité Ético de Investigación Clínica de este Centro

### CERTIFICA

Que conoce la propuesta para que sea realizado en el Hospital Ramón y Cajal el Proyecto de Investigación titulado:

**ESTUDIO PROSPECTIVO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES CIRCULANTES PREDICTIVOS DE RECAÍDA EN TUMORES GASTROINTESTINALES SOMETIDOS A CIRUGÍA CURATIVA.**

Y que será realizado por el **Dr. Federico Longo**, como Investigador Principal.

Servicio: **Oncología Médica**

Que acepta la realización de dicho Proyecto de Investigación en este Hospital siempre y cuando no implique ningún gasto adicional para el centro.

Lo que firma en Madrid a 13 de Febrero de 2014


Fdo. Dra. Victoria Ureña Vilardell

# Hoja de consentimiento informado para los pacientes

## **ANEXO 1 - HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO**

### ***TÍTULO DEL ESTUDIO***

"Estudio prospectivo para la identificación de biomarcadores circulantes predictivos de recaída en tumores gastrointestinales sometidos a cirugía curativa".

### ***INVESTIGADOR PRINCIPAL***

Federico Longo Muñoz. Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Teléfono: 913368263.

### ***INTRODUCCIÓN***

Nos dirigimos a usted para informarle sobre el desarrollo del estudio en el que se le propone participar. Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación.

Su participación es voluntaria y puede revocar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio en sus cuidados médicos. En caso de retirar el consentimiento para participar en el estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de un nuevo análisis.

### ***FUNDAMENTO DEL ESTUDIO***

El estudio que se va a llevar a cabo es un estudio promovido por el Dr. Federico Longo, perteneciente al Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Ramón y Cajal, con el fin de identificar biomarcadores circulantes en sangre periférica e intentar correlacionarlo con el estadio de su enfermedad, la respuesta que ha tenido su enfermedad al tratamiento y el tiempo a la progresión de la misma.

Por lo tanto, el objetivo final del estudio es intentar hallar biomarcadores circulantes mediante un análisis de sangre y correlacionarlo con su enfermedad.

### ***BENEFICIOS ESPERADOS E INCONVENIENTES***

Este estudio no tiene ningún beneficio para usted, pero sí que podría reportar en un beneficio para otros pacientes si se evidencia algún tipo de relación entre estos análisis y su enfermedad.

Como posibles inconvenientes son los vinculados con la donación y obtención de la muestra, incluida la posibilidad de ser contactado con posterioridad con el fin de recabar nuevos datos u obtener otras muestras.

### ***MANEJO DE LAS MUESTRAS Y CONFIDENCIALIDAD***

Tenga en cuenta que la investigación descrita en este documento se realizará conforme a la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y con 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 la investigación Biomédica.

Las muestras sanguíneas recogidas para el presente estudio serán utilizadas para la determinación de biomarcadores circulantes. Las muestras son extraídas en la consulta de enfermería de la -2D y llevadas en mano al laboratorio (Dra. Julie Earl) que se encuentra en la misma planta en mano. Serán necesarias tres muestras de 10 ml de sangre realizándose la determinación en el laboratorio de oncología médica (Dra. Julie Earl) y almacenándose en este laboratorio durante los 5 años de proyecto. No se utilizarán las muestras fuera del proyecto que aquí se detalla y una vez transcurridos los 5 años previstos para la realización del estudio, las muestras serán destruidas.

Todos los datos recogidos para el estudio, procedentes de su Historia Clínica o facilitados por usted mismo, serán tratados con las medidas de seguridad establecidas en cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal. Debe saber que tiene derecho de acceso, rectificación y cancelación de los mismos en cualquier momento. Sólo aquellos datos de la historia clínica que estén relacionados con el estudio serán objeto de comprobación. Esta comprobación la realizará el Investigador Principal/Investigadores Colaboradores, responsables de garantizar la confidencialidad de todos los datos de las historias clínicas pertenecientes a los sujetos participantes en el estudio. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y

sólo el investigador principal/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica.

Todas las muestras sanguíneas que se obtengan para el estudio serán codificadas de forma que no sea posible su identificación y no será posible establecer de nuevo el nexó con sus datos personales.

#### ***FINANCIACIÓN DEL PROYECTO***

Debe saber que usted no recibirá ningún pago por participar en este estudio. Asimismo, el equipo investigador de este estudio tampoco recibirá ningún pago por su participación en este estudio. Los investigadores del estudio no persiguen ningún ánimo de lucro sino simplemente un avance científico en el conocimiento de los tumores gastrointestinales. El equipo investigador sí que tiene previsto la publicación de los resultados obtenidos a partir de este estudio para compartir dicha información con el resto de la comunidad científica.

El estudio de investigación en el que se le propone participar ha sido desarrollado a partir de ideas originales del equipo investigador del estudio. No existe ninguna financiación externa privada otorgada para la realización de este estudio. La financiación necesaria para poder llevar a cabo nuestro estudio procede de la Fundación del Hospital Ramón y Cajal, en concreto, de los ingresos obtenidos de la investigación clínica que se desarrolla en nuestro centro y gracias a otros pacientes, que como usted, decidieron participar en otros estudios y ensayos clínicos abiertos en nuestro centro.

#### ***OTROS ASPECTOS DE INTERÉS***

En caso de necesitar cualquier información o por cualquier otro motivo no dude en contactar con los investigadores principales del estudio en el teléfono 913368263. Así mismo, en caso de dudas respecto a sus derechos debe dirigirse al Servicio de Atención al Paciente del hospital.

**Nombre del paciente:** .....

**Firma del paciente:**.....

**Fecha:**.....

**Nombre del Investigador:**.....

**Firma del investigador:**.....

**Fecha:**.....

**Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el paciente**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento al director de este trabajo, el profesor Alfredo Carrato. Muchas gracias por tu tutela durante estos años y tus sabios consejos para hacer mejor esta tesis. De igual modo, me gustaría agradecer los años que nos has brindado como jefe de servicio y como compañero en el hospital. Tu visión y enseñanzas te aseguro que han dejado una huella en nosotros y nos marcará para siempre. Con tu marcha como jefe, hemos iniciado una nueva aventura que nos llevará aún más lejos gracias a los cimientos que tú nos has dejado. Por todo ello, muchísimas gracias, Alfredo, y como se escucha en los ambientes marineros: *a la mar me voy, mis hechos dirán quién soy.*

No quiero olvidarme de agradecer a todos mis compañeros del servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Ramón y Cajal, tanto facultativos como residentes. He sido realmente afortunado en poder coincidir con todos vosotros y aprender cada día un poco más con vuestros consejos y enseñanzas. Por supuesto, también debo agradecer a todos los compañeros de otras especialidades del hospital y, en especial, a todos los miembros del comité de tumores gastroesofágicos, un equipo de grandes profesionales y amigos. Finalmente y no por ello menos importante, una mención especial a mis queridos investigadores básicos, sin los que este trabajo nunca podría haber visto la luz. Muchas gracias a Julie y Marien, por permitirme iniciarme en los estudios de biomarcadores y en la recogida de las muestras de los pacientes. Muchas gracias a Laura, Elisa y el resto de compañeros del laboratorio de dianas terapéuticas que me han ayudado con la determinación e interpretación de los micro-RNAs de las muestras.

A mis compañeros de fatigas durante los años de universidad, Iván y Jorge, gracias. Da igual lo que nos depare el futuro, siempre fieles a juntarnos para disfrutar del buen cine, y del malo también claro. Lo que nos hemos reído y reiremos, sobre todo de nosotros mismos, porque no hay que ponerle límites al humor. A mis otros compañeros de fatigas extrauniversitarias, desde hace unos años bautizados como *Hortaleza Shore*, gracias. Me habéis forjado tal y como soy, me habéis hecho disfrutar sin límites, y habéis sido mi válvula de escape en los momentos difíciles. Os debo muchas y que el *rock 'n' roll* no cese.

Gracias a mi familia, a mis padres, a mis hermanos, a mis tíos, a mis primos... a todos sin excepción. Sin vosotros, esta andadura no hubiera sido posible ni tan siquiera imaginable. Vuestro apoyo, generosidad, comprensión y paciencia han sido claves para poder llegar a ser médico, oncólogo y, en estos momentos, doctor. Me será muy difícil el poder saldar esta deuda, pero se intentará, cuestión de honor. Abuela, allá donde estés, también este trabajo es para ti; por poco, no lo has podido ver.

Y por encima de todo, mi último agradecimiento es para quienes ya he dedicado esta tesis, mi mujer y mis dos hijas. Vuestra generosidad ha sido infinita para concederme el tiempo necesario para poder llevar a cabo este proyecto. Me resulta muy difícil poner en palabras todo lo que tendría que expresar como gratitud. Sois el motor de mi vida y me hacéis querer ser una persona mejor. Os quiero ahora y por siempre.

*Fede.*

## BIBLIOGRAFÍA

---

- <sup>1</sup> Data source: GLOBOCAN 2018 Graph production: IARC (<http://gco.iarc.fr/today>) World Health.
- <sup>2</sup> Van Cutsem E, Sagaert X, Topal B, Haustermans K, Prenen H. Gastric cancer. *Lancet*. 2016 Nov 26;388(10060):2654-2664. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30354-3. Epub 2016 May 5. PMID: 27156933.
- <sup>3</sup> Aragonés N, Izarzugaza MI, Ramos M, Chirlaque MD, Almar E, Martínez C; Oesophago-gastric Cancer Working Group. Trends in oesophago-gastric cancer incidence in Spain: analysis by subsite and histology. *Ann Oncol*. 2010 May;21 Suppl 3:iii69-75. doi: 10.1093/annonc/mdq083. PMID: 20427363.
- <sup>4</sup> Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31-49. doi: 10.1111/apm.1965.64.1.31. PMID: 14320675.
- <sup>5</sup> Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014 Sep 11;513(7517):202-9. doi: 10.1038/nature13480. Epub 2014 Jul 23. PMID: 25079317; PMCID: PMC4170219.
- <sup>6</sup> Neoadjuvant Nivolumab Plus Ipilimumab and Adjuvant Nivolumab in Localized Deficient Mismatch Repair/Microsatellite Instability-High Gastric or Esophagogastric Junction Adenocarcinoma: The GERCOR NEONIPIGA Phase II Study. Thierry André, David Tougeron, Guillaume Piessen et al. published at [ascopubs.org/journal/jco](https://ascopubs.org/journal/jco) on August 15, 2022: DOI <https://doi.org/10.1200/JCO.22.00686>.
- <sup>7</sup> Smyth EC, Verheij M, Allum W, Cunningham D, Cervantes A, Arnold D; ESMO Guidelines Committee. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2016 Sep;27(suppl 5):v38-v49. doi: 10.1093/annonc/mdw350. PMID: 27664260.
- <sup>8</sup> American Joint Committee on Cancer. Stomach Cancer. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York, NY: Springer; 2017:203-220.
- <sup>9</sup> Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020 Jan;70(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21590. Epub 2020 Jan 8. PMID: 31912902.
- <sup>10</sup> Wagner AD, Syn NL, Moehler M, Grothe W, Yong WP, Tai BC, Ho J, Unverzagt S. Chemotherapy for advanced gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Aug 29;8(8):CD004064. doi: 10.1002/14651858.CD004064.pub4. PMID: 28850174; PMCID: PMC6483552.

---

<sup>11</sup> Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Rüschoff J, Kang YK; ToGA Trial Investigators. 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 Aug 28;376(9742):687-97. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X. Epub 2010 Aug 19. Erratum in: *Lancet*. 2010 Oct 16;376(9749):1302. PMID: 20728210.

<sup>12</sup> Moehler M, Shitara K, Garrido M, Salman P, Shen L, Wyrwicz L, Yamaguchi K, Skoczylas T, Campos Bragagnoli A, Liu T, Schenker M, Yanez P, Tehfe M, Poulart V, Cullen D, Lei M, Kondo K, Li M, Ajani JA, Janjigian YY. Nivolumab (nivo) plus chemotherapy (chemo) versus chemo as first-line (1L) treatment for advanced gastric cancer/gastroesophageal junction cancer (GC/GEJC)/esophageal adenocarcinoma (EAC): First results of the CheckMate 649 study. *Annals of Oncology* (2020) 31 (suppl\_4): S1142-S1215. 10.1016/annonc/annonc325.

<sup>13</sup> Wilke H, Muro K, Van Cutsem E, Oh SC, Bodoky G, Shimada Y, Hironaka S, Sugimoto N, Lipatov O, Kim TY, Cunningham D, Rougier P, Komatsu Y, Ajani J, Emig M, Carlesi R, Ferry D, Chandrawansa K, Schwartz JD, Ohtsu A; RAINBOW Study Group. 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 Oct;15(11):1224-35. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70420-6. Epub 2014 Sep 17. PMID: 25240821.

<sup>14</sup> Shitara K, Doi T, Dvorkin M, Mansoor W, Arkenau HT, Prokharau A, Alsina M, Ghidini M, Faustino C, Gorbunova V, Zhavrid E, Nishikawa K, Hosokawa A, Yalçın Ş, Fujitani K, Beretta GD, Cutsem EV, Winkler RE, Makris L, Ilson DH, Tabernero J. Trifluridine/tipiracil versus placebo in patients with heavily pretreated metastatic gastric cancer (TAGS): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018 Nov;19(11):1437-1448. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30739-3. Epub 2018 Oct 21. Erratum in: *Lancet Oncol*. 2018 Dec;19(12):e668. PMID: 30355453.

<sup>15</sup> Smalley SR, Benedetti JK, Haller DG, Hundahl SA, Estes NC, Ajani JA, Gunderson LL, Goldman B, Martenson JA, Jessup JM, Stemmermann GN, Blanke CD, Macdonald JS. Updated analysis of SWOG-directed intergroup study 0116: a phase III trial of adjuvant radiochemotherapy versus observation after curative gastric cancer

---

resection. *J Clin Oncol*. 2012 Jul 1;30(19):2327-33. doi: 10.1200/JCO.2011.36.7136. Epub 2012 May 14. PMID: 22585691; PMCID: PMC4517071.

<sup>16</sup> Al-Batran SE, Homann N, Pauligk C, Goetze TO, Meiler J, Kasper S, Kopp HG, Mayer F, Haag GM, Luley K, Lindig U, Schmiegel W, Pohl M, Stoehlmacher J, Folprecht G, Probst S, Prasnikař N, Fischbach W, Mahlberg R, Trojan J, Koenigsmann M, Martens UM, Thuss-Patience P, Egger M, Block A, Heinemann V, Illerhaus G, Moehler M, Schenk M, Kullmann F, Behringer DM, Heike M, Pink D, Teschendorf C, Löhř C, Bernhard H, Schuch G, Rethwisch V, von Weikersthal LF, Hartmann JT, Kneba M, Daum S, Schulmann K, Weniger J, Belle S, Gaiser T, Oduncu FS, Güntner M, Hozaeel W, Reichart A, Jäger E, Kraus T, Mönig S, Bechstein WO, Schuler M, Schmalenberg H, Hofheinz RD; FLOT4-AIO Investigators. Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial. *Lancet*. 2019 May 11;393(10184):1948-1957. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32557-1. Epub 2019 Apr 11. PMID: 30982686.

<sup>17</sup> Noh SH, Park SR, Yang HK, Chung HC, Chung IJ, Kim SW, Kim HH, Choi JH, Kim HK, Yu W, Lee JI, Shin DB, Ji J, Chen JS, Lim Y, Ha S, Bang YJ; CLASSIC trial investigators. Adjuvant capecitabine plus oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): 5-year follow-up of an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014 Nov;15(12):1389-96. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70473-5. Epub 2014 Oct 15. PMID: 25439693.

<sup>18</sup> Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJ, Nicolson M, Scarffe JH, Lofts FJ, Falk SJ, Iveson TJ, Smith DB, Langley RE, Verma M, Weeden S, Chua YJ, MAGIC Trial Participants. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med*. 2006 Jul 6;355(1):11-20. doi: 10.1056/NEJMoa055531. PMID: 16822992.

<sup>19</sup> Ryan R, Gibbons D, Hyland JMP, et al. Pathological response following long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Histopathology*. 2005;47:141-146.

<sup>20</sup> Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, Marnay J, Henry-Amar M, Petiot JF, Roussel A, Jacob JH, Segol P, Samama G, et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer*. 1994 Jun 1;73(11):2680-6. doi: 10.1002/1097-0142(19940601)73:11<2680::aid-cnrc2820731105>3.0.co;2-c. PMID: 8194005.

- 
- <sup>21</sup> Smyth EC, Fassan M, Cunningham D, Allum WH, Okines AF, Lampis A, Hahne JC, Rugge M, Peckitt C, Nankivell M, Langley R, Ghidini M, Braconi C, Wotherspoon A, Grabsch HI, Valeri N. Effect of Pathologic Tumor Response and Nodal Status on Survival in the Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy Trial. *J Clin Oncol*. 2016 Aug 10;34(23):2721-7. doi: 10.1200/JCO.2015.65.7692. Epub 2016 Jun 13. PMID: 27298411; PMCID: PMC5019747.
- <sup>22</sup> Becker K, Langer R, Reim D, Novotny A, Meyer zum Buschenfelde C, Engel J, Friess H, Hofler H. Significance of histopathological tumor regression after neoadjuvant chemotherapy in gastric adenocarcinomas: a summary of 480 cases. *Ann Surg*. 2011 May;253(5):934-9. doi: 10.1097/SLA.0b013e318216f449. PMID: 21490451.
- <sup>23</sup> Al-Batran SE, Hofheinz RD, Pauligk C, Kopp HG, Haag GM, Luley KB, Meiler J, Homann N, Lorenzen S, Schmalenberg H, Probst S, Koenigsmann M, Egger M, Prasnikař N, Caca K, Trojan J, Martens UM, Block A, Fischbach W, Mahlberg R, Clemens M, Illerhaus G, Zirlik K, Behringer DM, Schmiegel W, Pohl M, Heike M, Ronellenfitch U, Schuler M, Bechstein WO, Königsrainer A, Gaiser T, Schirmacher P, Hozaeel W, Reichart A, Goetze TO, Sievert M, Jäger E, Mönig S, Tannapfel A. Histopathological regression after neoadjuvant docetaxel, oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin versus epirubicin, cisplatin, and fluorouracil or capecitabine in patients with resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4-AIO): results from the phase 2 part of a multicentre, open-label, randomised phase 2/3 trial. *Lancet Oncol*. 2016 Dec;17(12):1697-1708. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30531-9. Epub 2016 Oct 22. PMID: 27776843.
- <sup>24</sup> Zhu Y, Sun Y, Hu S, Jiang Y, Yue J, Xue X, Yang L, Xue L. Comparison of five tumor regression grading systems for gastric adenocarcinoma after neoadjuvant chemotherapy: a retrospective study of 192 cases from National Cancer Center in China. *BMC Gastroenterol*. 2017 Mar 14;17(1):41. doi: 10.1186/s12876-017-0598-5. PMID: 28292272; PMCID: PMC5351213.
- <sup>25</sup> Tong Y, Zhu Y, Zhao Y, Shan Z, Liu D, Zhang J. Evaluation and Comparison of Predictive Value of Tumor Regression Grades according to Mandard and Becker in Locally Advanced Gastric Adenocarcinoma. *Cancer Res Treat*. 2020 Aug 10. doi: 10.4143/crt.2020.516. Epub ahead of print. PMID: 32777876.
- <sup>26</sup> Chanjuan Shi, MD, PhD\*; Jordan Berlin, MD; Philip A. Branton, MD; Patrick L. Fitzgibbons, MD; Wendy L. Frankel, MD; Wayne L. Hofstetter, MD; Sanjay Kakar, MD; David Kelsen, MD; Veronica Klepeis, MD, PhD; Jason Talmadge Lewis, MD; Laura H. Tan, MD, PhD; Mary K. Washington, MD, PhD With guidance from the CAP Cancer

---

and CAP Pathology Electronic Reporting Committees. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Carcinoma of the Stomach. Version: Stomach 4.1.0.0. Protocol Posting Date: February 2020. College of American Pathologist (CAP). Website: <https://documents.cap.org/protocols/cp-giupper-stomach-20-4100.pdf>.

<sup>27</sup> Guo T, Yao F, Yang AM, Li XY, Zhong DR, Wu DS, Wu X, Lu XH. Endoscopic ultrasound in restaging and predicting pathological response for advanced gastric cancer patients after neoadjuvant chemotherapy. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2014 Jun;10(2):e28-32. doi: 10.1111/ajco.12045. Epub 2012 Dec 21. PMID: 23279745.

<sup>28</sup> Ang J, Hu L, Huang PT, Wu JX, Huang LN, Cao CH, Zheng YX, Chen L. Contrast-enhanced ultrasonography assessment of gastric cancer response to neoadjuvant chemotherapy. *World J Gastroenterol*. 2012 Dec 21;18(47):7026-32. doi: 10.3748/wjg.v18.i47.7026. PMID: 23323004; PMCID: PMC3531690.

<sup>29</sup> Tang L, Li ZY, Li ZW, Zhang XP, Li YL, Li XT, Wang ZL, Ji JF, Sun YS. Evaluating the response of gastric carcinomas to neoadjuvant chemotherapy using iodine concentration on spectral CT: a comparison with pathological regression. *Clin Radiol*. 2015 Nov;70(11):1198-204. doi: 10.1016/j.crad.2015.06.083. Epub 2015 Jul 15. PMID: 26188843.

<sup>30</sup> Mazzei MA, Bagnacci G, Gentili F, Nigri A, Pelini V, Vindigni C, Mazzei FG, Baiocchi GL, Pittiani F, Morgagni P, Petrella E, Mura G, Verdelli B, Bencivenga M, Giacomuzzi S, Marrelli D, Roviello F, Volterrani L. Gastric Cancer Maximum Tumour Diameter Reduction Rate at CT Examination as a Radiological Index for Predicting Histopathological Regression after Neoadjuvant Treatment: A Multicentre GIRCG Study. *Gastroenterol Res Pract*. 2018 Mar 15;2018:1794524. doi: 10.1155/2018/1794524. PMID: 29736166; PMCID: PMC5875045.

<sup>31</sup> Giganti F, Marra P, Ambrosi A, Salerno A, Antunes S, Chiari D, Orsenigo E, Esposito A, Mazza E, Albarello L, Nicoletti R, Staudacher C, Del Maschio A, De Cobelli F. Pre-treatment MDCT-based texture analysis for therapy response prediction in gastric cancer: Comparison with tumour regression grade at final histology. *Eur J Radiol*. 2017 May;90:129-137. doi: 10.1016/j.ejrad.2017.02.043. Epub 2017 Mar 1. PMID: 28583623.

<sup>32</sup> Sun Z, Cheng X, Ge Y, Shao L, Xuan Y, Yan G. An application study of low-dose computed tomography perfusion imaging for evaluation of the efficacy of neoadjuvant chemotherapy for advanced gastric adenocarcinoma. *Gastric Cancer*. 2018 May;21(3):413-420. doi: 10.1007/s10120-017-0763-0. Epub 2017 Sep 4. PMID: 28871423.

- 
- <sup>33</sup> Sun ZQ, Yan G, Ge YX, Li J, Jin LF, Xie ZH, Zhao P. Can low-dose CT perfusion imaging accurately assess response of advanced gastric cancer with neoadjuvant chemotherapy? *J Xray Sci Technol.* 2017;25(6):981-991. doi: 10.3233/XST-17271. PMID: 28697579.
- <sup>34</sup> Li Z, Zhang D, Dai Y, Dong J, Wu L, Li Y, Cheng Z, Ding Y, Liu Z. Computed tomography-based radiomics for prediction of neoadjuvant chemotherapy outcomes in locally advanced gastric cancer: A pilot study. *Chin J Cancer Res.* 2018 Aug;30(4):406-414. doi: 10.21147/j.issn.1000-9604.2018.04.03. PMID: 30210220; PMCID: PMC6129565.
- <sup>35</sup> Cabral F, Cruz A, Casaca R, Monteiro C, Ramos P, Pedro C, Brandão F, Fonseca R, Ratão P, Salgado L, Pinto I, Abecasis N. Complete pathological response (pCR) in gastroesophageal cancer: Correlation with metabolic response. *Cancer Radiother.* 2020 Nov 12:S1278-3218(20)30286-9. doi: 10.1016/j.canrad.2020.05.013. Epub ahead of print. PMID: 33191120.
- <sup>36</sup> Morgagni P, Bencivenga M, Colciago E, Tringali D, Giacomuzzi S, Framarini M, Saragoni L, Mura G, Graziosi L, Marino E, Fumagalli Romario U, Baiocchi G, Moretti A, Rossi V, Verlatto G. Limited Usefulness of 18F-FDG PET/CT in Predicting Tumor Regression After Preoperative Chemotherapy for Noncardia Gastric Cancer: The Italian Research Group for Gastric Cancer (GIRCG) Experience. *Clin Nucl Med.* 2020 Mar;45(3):177-181. doi: 10.1097/RLU.0000000000002911. PMID: 31977470.
- <sup>37</sup> Vihervaara H, Ålgars A, Kemppainen J, Sundström J, Ristamäki R, Salminen P. Perioperative EOX treatment in operable locally advanced gastroesophageal adenocarcinoma: Prediction of tumor response by FDG -PET and histopathology. *Surg Oncol.* 2019 Mar;28:42-49. doi: 10.1016/j.suronc.2018.11.002. Epub 2018 Nov 7. PMID: 30851910.
- <sup>38</sup> Suttie S, McAteer D, Sheehan M, Nicolson M, Schweiger L, Hammonds S, Smith T, Welch A, Park K. F-18-FDG and C-11-Choline Positron Emission Tomography in Human Esophago-Gastric Cancer: Prediction of Response to Therapy. *World J Oncol.* 2010 Apr;1(2):66-67. doi: 10.4021/wjon2010.04.201w. Epub 2010 Apr 30. PMID: 29147183; PMCID: PMC5649907.
- <sup>39</sup> Fu J, Tang L, Li ZY, Li XT, Zhu HF, Sun YS, Ji JF. Diffusion kurtosis imaging in the prediction of poor responses of locally advanced gastric cancer to neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Radiol.* 2020 Jul;128:108974. doi: 10.1016/j.ejrad.2020.108974. Epub 2020 Apr 23. PMID: 32416553.

- 
- <sup>40</sup> De Cobelli F, Giganti F, Orsenigo E, Cellina M, Esposito A, Agostini G, Albarello L, Mazza E, Ambrosi A, Socci C, Staudacher C, Del Maschio A. Apparent diffusion coefficient modifications in assessing gastro-oesophageal cancer response to neoadjuvant treatment: comparison with tumour regression grade at histology. *Eur Radiol.* 2013 Aug;23(8):2165-74. doi: 10.1007/s00330-013-2807-0. Epub 2013 Apr 16. PMID: 23588582.
- <sup>41</sup> Chen YH, Xiao J, Chen XJ, Wang HS, Liu D, Xiang J, Peng JS. Nomogram for predicting pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2020 May 21;26(19):2427-2439. doi: 10.3748/wjg.v26.i19.2427. PMID: 32476803; PMCID: PMC7243641.
- <sup>42</sup> Virgilio E, Giarnieri E, Giovagnoli MR, Montagnini M, Proietti A, D'Urso R, Fegiz A, Mercantini P, Balducci G, Cavallini M. Gastric Lavage Malignant Cells (yGL) and Hypohemoglobinemia (yAnemia) as New Systems of Tumor Regression Grading and Prognostic Prediction for Gastric Cancer After Neoadjuvant Treatment. *Anticancer Res.* 2019 Feb;39(2):1019-1027. doi: 10.21873/anticancer.13208. PMID: 30711990.
- <sup>43</sup> Ohe Y, Fushida S, Yamaguchi T, Kinoshita J, Saito H, Okamoto K, Nakamura K, Tajima H, Ninomiya I, Ohta T. Peripheral Blood Platelet-Lymphocyte Ratio Is Good Predictor of Chemosensitivity and Prognosis in Gastric Cancer Patients. *Cancer Manag Res.* 2020 Feb 20;12:1303-1311. doi: 10.2147/CMAR.S241069. PMID: 32110104; PMCID: PMC7039245.
- <sup>44</sup> Fareed KR, Al-Attar A, Soomro IN, Kaye PV, Patel J, Lobo DN, Parsons SL, Madhusudan S. Tumour regression and ERCC1 nuclear protein expression predict clinical outcome in patients with gastro-oesophageal cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Br J Cancer.* 2010 May 25;102(11):1600-7. doi: 10.1038/sj.bjc.6605686. Epub 2010 May 11. PMID: 20461087; PMCID: PMC2883154.
- <sup>45</sup> Hirakawa M, Sato Y, Ohnuma H, Takayama T, Sagawa T, Nobuoka T, Harada K, Miyamoto H, Sato Y, Takahashi Y, Katsuki S, Hirayama M, Takahashi M, Ono M, Maeda M, Takada K, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Takimoto R, Kobune M, Hirata K, Kato J. A phase II study of neoadjuvant combination chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and S-1 for locally advanced resectable gastric cancer: nucleotide excision repair (NER) as potential chemoresistance marker. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013 Mar;71(3):789-97. doi: 10.1007/s00280-013-2073-5. Epub 2013 Jan 22. PMID: 23338051.

- 
- <sup>46</sup> Neves Filho EHC, Pires APB, de Sant'Ana RO, Rabenhorst SHB, Hirth CG, da Cunha MDPSS. The association among HER2, MET and FOXP3 expression and tumor regression grading in gastric adenocarcinoma. *APMIS*. 2018 May;126(5):389-395. doi: 10.1111/apm.12840. PMID: 29696715.
- <sup>47</sup> Oshima T, Yoshikawa T, Miyagi Y, Morita S, Yamamoto M, Tanabe K, Nishikawa K, Ito Y, Matsui T, Kimura Y, Yokose T, Hiroshima Y, Aoyama T, Hayashi T, Ogata T, Cho H, Rino Y, Masuda M, Tsuburaya A, Sakamoto J. Biomarker analysis to predict the pathological response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced gastric cancer: An exploratory biomarker study of COMPASS, a randomized phase II trial. *Oncotarget*. 2020 Jul 28;11(30):2906-2918. doi: 10.18632/oncotarget.27658. PMID: 32774771; PMCID: PMC7392622.
- <sup>48</sup> Cao Y, Chang Q, Cabanero M, Zhang W, Hafezi-Bakhtiari S, Hedley D, Darling G, Queresby F, Jang R, Elimova E, Knox J, Ornatsky O, Serra S, Chen E. Tumor Platinum Concentrations and Pathological Responses Following Cisplatin-Containing Chemotherapy in Gastric Cancer Patients. *J Gastrointest Cancer*. 2019 Dec;50(4):801-807. doi: 10.1007/s12029-018-0153-9. PMID: 30117091.
- <sup>49</sup> Jia Y, Dong B, Tang L, Liu Y, Du H, Yuan P, Wu A, Ji J. Apoptosis index correlates with chemotherapy efficacy and predicts the survival of patients with gastric cancer. *Tumour Biol*. 2012 Aug;33(4):1151-8. doi: 10.1007/s13277-012-0357-8. Epub 2012 Mar 1. PMID: 22383294.
- <sup>50</sup> Fareed KR, Soomro IN, Hameed K, Arora A, Lobo DN, Parsons SL, Madhusudan S. Caspase-cleaved cytokeratin-18 and tumour regression in gastro-oesophageal adenocarcinomas treated with neoadjuvant chemotherapy. *World J Gastroenterol*. 2012 Apr 28;18(16):1915-20. doi: 10.3748/wjg.v18.i16.1915. PMID: 22563171; PMCID: PMC3337566.
- <sup>51</sup> Budakoti M, Panwar AS, Molpa D, Singh RK, Büsselberg D, Mishra AP, Coutinho HDM, Nigam M. Micro-RNA: The darkhorse of cancer. *Cell Signal*. 2021 Jul;83:109995. doi: 10.1016/j.cellsig.2021.109995. Epub 2021 Mar 27. PMID: 33785398.
- <sup>52</sup> Zeng Y. Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene*. 2006 Oct 9;25(46):6156-62. doi: 10.1038/sj.onc.1209908. PMID: 17028594.
- <sup>53</sup> Hao NB, He YF, Li XQ, Wang K, Wang RL. The role of miRNA and lncRNA in gastric cancer. *Oncotarget*. 2017 Jul 12;8(46):81572-81582. doi: 10.18632/oncotarget.19197. PMID: 29113415; PMCID: PMC5655310.

- 
- <sup>54</sup> Ghafouri-Fard S, Vafaei R, Shoorei H, Taheri M. MicroRNAs in gastric cancer: Biomarkers and therapeutic targets. *Gene*. 2020 Oct 5;757:144937. doi: 10.1016/j.gene.2020.144937. Epub 2020 Jul 5. PMID: 32640300.
- <sup>55</sup> Dehghanzadeh R, Jadidi-Niaragh F, Gharibi T, Yousefi M. MicroRNA-induced drug resistance in gastric cancer. *Biomed Pharmacother*. 2015 Aug;74:191-9. doi: 10.1016/j.biopha.2015.08.009. Epub 2015 Aug 15. PMID: 26349984.
- <sup>56</sup> Poursheikhani A, Bahmanpour Z, Razmara E, Mashouri L, Taheri M, Morshedi Rad D, Yousefi H, Bitaraf A, Babashah S. Non-coding RNAs underlying chemoresistance in gastric cancer. *Cell Oncol (Dordr)*. 2020 Dec;43(6):961-988. doi: 10.1007/s13402-020-00528-2. Epub 2020 Jun 3. PMID: 32495294.
- <sup>57</sup> Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008 Oct;18(10):997-1006. doi: 10.1038/cr.2008.282. PMID: 18766170.
- <sup>58</sup> Montani F, Bianchi F. Circulating Cancer Biomarkers: The Macro-revolution of the Micro-RNA. *EBioMedicine*. 2016 Feb 28;5:4-6. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.02.038. PMID: 27077096; PMCID: PMC4816844.
- <sup>59</sup> Ruibal Morell A. CEA serum levels in non-neoplastic disease. *Int J Biol Markers*. 1992 Jul-Sep;7(3):160-6. doi: 10.1177/172460089200700307. PMID: 1431339.
- <sup>60</sup> Kim S, Park BK, Seo JH, Choi J, Choi JW, Lee CK, Chung JB, Park Y, Kim DW. Carbohydrate antigen 19-9 elevation without evidence of malignant or pancreaticobiliary diseases. *Sci Rep*. 2020 Jun 1;10(1):8820. doi: 10.1038/s41598-020-65720-8. PMID: 32483216; PMCID: PMC7264353.
- <sup>61</sup> Sekiguchi M, Matsuda T. Limited usefulness of serum carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 levels for gastrointestinal and whole-body cancer screening. *Sci Rep*. 2020 Oct 23;10(1):18202. doi: 10.1038/s41598-020-75319-8. PMID: 33097814; PMCID: PMC7585432.
- <sup>62</sup> Shimada H, Noie T, Ohashi M, Oba K, Takahashi Y. Clinical significance of serum tumor markers for gastric cancer: a systematic review of literature by the Task Force of the Japanese Gastric Cancer Association. *Gastric Cancer*. 2014 Jan;17(1):26-33. doi: 10.1007/s10120-013-0259-5. Epub 2013 Apr 10. PMID: 23572188.
- <sup>63</sup> Shibata C, Nakano T, Yasumoto A, Mitamura A, Sawada K, Ogawa H, Miura T, Ise I, Takami K, Yamamoto K, Katayose Y. Comparison of CEA and CA19-9 as a predictive

---

factor for recurrence after curative gastrectomy in gastric cancer. *BMC Surg.* 2022 Jun 3;22(1):213. doi: 10.1186/s12893-022-01667-z. PMID: 35655198; PMCID: PMC9164336.

<sup>64</sup> Liu X, Qiu H, Liu J, Chen S, Xu D, Li W, Zhan Y, Li Y, Chen Y, Zhou Z, Sun X. Combined preoperative concentrations of CEA, CA 19-9, and 72-4 for predicting outcomes in patients with gastric cancer after curative resection. *Oncotarget.* 2016 Jun 7;7(23):35446-53. doi: 10.18632/oncotarget.9060. PMID: 27147574; PMCID: PMC5085242.

<sup>65</sup> Sun Z, Zhang N. Clinical evaluation of CEA, CA19-9, CA72-4 and CA125 in gastric cancer patients with neoadjuvant chemotherapy. *World J Surg Oncol.* 2014 Dec 29;12:397. doi: 10.1186/1477-7819-12-397. PMID: 25543664; PMCID: PMC4320462.

<sup>66</sup> Li X, Teng C, Ma J, Fu N, Wang L, Wen J, Wang TY. miR-19 family: A promising biomarker and therapeutic target in heart, vessels and neurons. *Life Sci.* 2019 Sep 1;232:116651. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116651. Epub 2019 Jul 11. PMID: 31302195.

<sup>67</sup> Song X, Li W, Shen P, Bai B, Cao LL. miR-19 Is a Potential Clinical Biomarker for Gastrointestinal Malignancy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Biomed Res Int.* 2020 Sep 10;2020:2810150. doi: 10.1155/2020/2810150. PMID: 32964023; PMCID: PMC7501555.

<sup>68</sup> Qiao F, Gong P, Song Y, Shen X, Su X, Li Y, Wu H, Zhao Z, Fan H. Downregulated PITX1 Modulated by MiR-19a-3p Promotes Cell Malignancy and Predicts a Poor Prognosis of Gastric Cancer by Affecting Transcriptionally Activated PDCD5. *Cell Physiol Biochem.* 2018;46(6):2215-2231. doi: 10.1159/000489590. Epub 2018 May 3. PMID: 29734189.

<sup>69</sup> Cheng J, Yang A, Cheng S, Feng L, Wu X, Lu X, Zu M, Cui J, Yu H, Zou L. Circulating miR-19a-3p and miR-483-5p as Novel Diagnostic Biomarkers for the Early Diagnosis of Gastric Cancer. *Med Sci Monit.* 2020 Jun 3;26:e923444. doi: 10.12659/MSM.923444. PMID: 32487978; PMCID: PMC7297033.

<sup>70</sup> Li X, Yan X, Wang F, Yang Q, Luo X, Kong J, Ju S. Down-regulated lncRNA SLC25A5-AS1 facilitates cell growth and inhibits apoptosis via miR-19a-3p/PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in gastric cancer. *J Cell Mol Med.* 2019 Apr;23(4):2920-2932. doi: 10.1111/jcmm.14200. Epub 2019 Feb 22. PMID: 30793479; PMCID: PMC6433659.

<sup>71</sup> Ibarrola-Villava M, Llorca-Cardenosa MJ, Tarazona N, Mongort C, Fleitas T, Perez-Fidalgo JA, Roselló S, Navarro S, Ribas G, Cervantes A. Deregulation of ARID1A, CDH1, cMET and PIK3CA and target-related microRNA expression in gastric cancer.

---

Oncotarget. 2015 Sep 29;6(29):26935-45. doi: 10.18632/oncotarget.4775. PMID: 26334097; PMCID: PMC4694964.

<sup>72</sup> Xia T, Liao Q, Jiang X, Shao Y, Xiao B, Xi Y, Guo J. Long noncoding RNA associated-competing endogenous RNAs in gastric cancer. *Sci Rep*. 2014 Aug 15;4:6088. doi: 10.1038/srep06088. PMID: 25124853; PMCID: PMC4133709.

<sup>73</sup> Qian X, Xie F, Wei H, Cui D. Identification of Key Circulating Exosomal microRNAs in Gastric Cancer. *Front Oncol*. 2021 Jul 16;11:693360. doi: 10.3389/fonc.2021.693360. PMID: 34336682; PMCID: PMC8323470.

<sup>74</sup> Zhang Y, Meng W, Yue P, Li X. M2 macrophage-derived extracellular vesicles promote gastric cancer progression via a microRNA-130b-3p/MLL3/GRHL2 signaling cascade. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020 Jul 13;39(1):134. doi: 10.1186/s13046-020-01626-7. PMID: 32660626; PMCID: PMC7359233.

<sup>75</sup> Duan J, Zhang H, Qu Y, Deng T, Huang D, Liu R, Zhang L, Bai M, Zhou L, Ying G, Ba Y. Onco-miR-130 promotes cell proliferation and migration by targeting TGF $\beta$ R2 in gastric cancer. *Oncotarget*. 2016 Jul 12;7(28):44522-44533. doi: 10.18632/oncotarget.9936. PMID: 27304191; PMCID: PMC5190115.

<sup>76</sup> Yu MJ, Zhao N, Shen H, Wang H. Long Noncoding RNA MRPL39 Inhibits Gastric Cancer Proliferation and Progression by Directly Targeting miR-130. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2018 Nov;22(11):656-663. doi: 10.1089/gtmb.2018.0151. PMID: 30452299.

<sup>77</sup> Shou Y, Wang X, Liang Y, Liu X, Chen K. Exosomes-derived miR-154-5p attenuates esophageal squamous cell carcinoma progression and angiogenesis by targeting kinesin family member 14. *Bioengineered*. 2022 Feb;13(2):4610-4620. doi: 10.1080/21655979.2022.2037322. PMID: 35156510; PMCID: PMC8973613.

<sup>78</sup> Liu R, Zhang C, Hu Z, Li G, Wang C, Yang C, Huang D, Chen X, Zhang H, Zhuang R, Deng T, Liu H, Yin J, Wang S, Zen K, Ba Y, Zhang CY. A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis. *Eur J Cancer*. 2011 Mar;47(5):784-91. doi: 10.1016/j.ejca.2010.10.025. Epub 2010 Nov 26. PMID: 21112772.

<sup>79</sup> Liu J, Wang X, Yang X, Liu Y, Shi Y, Ren J, Guleng B. miRNA423-5p regulates cell proliferation and invasion by targeting trefoil factor 1 in gastric cancer cells. *Cancer Lett*. 2014 May 28;347(1):98-104. doi: 10.1016/j.canlet.2014.01.024. Epub 2014 Jan 31. PMID: 24486742.

<sup>80</sup> Dong L, Deng J, Sun ZM, Pan AP, Xiang XJ, Zhang L, Yu F, Chen J, Sun Z, Feng M, Xiong JP. Interference with the  $\beta$ -catenin gene in gastric cancer induces changes to

---

the miRNA expression profile. *Tumour Biol.* 2015 Sep;36(9):6973-83. doi: 10.1007/s13277-015-3415-1. Epub 2015 Apr 10. PMID: 25861021.

<sup>81</sup> Luo Y, Tan W, Jia W, Liu Z, Ye P, Fu Z, Lu F, Xiang W, Tang L, Yao L, Huang Q, Xiao J. The long non-coding RNA LINC01606 contributes to the metastasis and invasion of human gastric cancer and is associated with Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018 Oct;103:125-134. doi: 10.1016/j.biocel.2018.08.012. Epub 2018 Aug 22. PMID: 30142387.

<sup>82</sup> Yang H, Fu H, Wang B, Zhang X, Mao J, Li X, Wang M, Sun Z, Qian H, Xu W. Exosomal miR-423-5p targets SUFU to promote cancer growth and metastasis and serves as a novel marker for gastric cancer. *Mol Carcinog.* 2018 Sep;57(9):1223-1236. doi: 10.1002/mc.22838. Epub 2018 May 23. PMID: 29749061.