



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Aplicabilidad clínica de la caracterización molecular sobre biopsias endoscópicas de cáncer gástrico

Òlbia Serra Solé

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

PROGRAMA DE DOCTORADO EN
BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

**APLICABILIDAD CLÍNICA DE LA
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
SOBRE BIOPSIAS ENDOSCÓPICAS
DE CÁNCER GÁSTRICO**

Presentada por

Òlbia Serra Solé

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Directores: **Ramon Salazar Soler i Núria Sala Serra**

Tutor: **Ramon Salazar Soler**

Institut Català d'Oncologia. Hospitalet de Llobregat, año 2024

**A mis padres,
A Julen, Júlia y Pere,**

Agradecimientos

Esta tesis doctoral no hubiese sido posible sin la cooperación de todas y cada una de las personas que a continuación citaré, muchas de las cuales han sido un soporte vital en momentos difíciles.

Mi más sincero agradecimiento a los directores, Núria y Ramon, cuya orientación y sabiduría han sido incalculables en cada etapa de este proyecto.

También un profundo agradecimiento a Maica Galán. Sin ella este camino no hubiera empezado, su capacidad de trabajo y profesionalidad han sido un ejemplo a seguir para mi.

De igual manera agradecer:

A Mireia Morell, por su paciencia en la enseñanza de un mundo apasionante y previamente desconocido para mi, el de laboratorio. También por su implicación y trabajo realizado durante la realización del proyecto, especialmente en el análisis del panel mutacional.

A Maria José Paúles y a Nadia García, por su trabajo en el análisis de las muestras y al servicio de estadística Idibell por la paciencia en el análisis de los datos.

A Maria Santacana del laboratorio de anatomía patológica de Lleida por su apoyo y la celeridad en la gestión de las tareas que le pedíamos.

A todo el equipo de la Unidad Funcional de Tumores Esofagogástricos (UTEG) y del Oncología Médica del Hospital Moisés Broggi, su colaboración en la recogida de pacientes y muestras. Mi tiempo de trabajo con ellos ha sido un viaje de crecimiento y aprendizaje que nunca olvidaré.

Al equipo de oncología de Althaia, por su apoyo y comprensión especialmente en esta última fase del proyecto.

Y en especial, a mi familia, mis padres, mis tios, a Julen, Júlia y Pere, por sus valores transmitidos, su cariño y su apoyo incondicional que me ha ayudado a llegar hasta aquí.

Finalmente, sin olvidar el más sincero agradecimiento a todos los pacientes y familias que confían en nosotros, por ellos seguiremos luchando.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Preámbulo.....	1
1.2. Consideraciones	1
1.3. Epidemiología del cáncer gástrico.....	2
1.3.1. <i>Incidencia y Prevalencia</i>	2
1.3.2. <i>Mortalidad</i>	2
1.3.3. <i>Factores de riesgo</i>	2
1.3.4. <i>Variaciones geográficas</i>	3
1.3.5. <i>Predisposición genética</i>	3
1.3.6. <i>Prevención</i>	4
1.4. Clasificaciones en cáncer gástrico	4
1.4.1. <i>Clasificaciones “clásicas” o histopatológicas</i>	4
1.4.2. <i>Principales clasificaciones por subtipos moleculares</i>	5
1.4.3. <i>Otros grupos que han aplicado clasificación molecular</i>	14
1.5. Diagnóstico y estadificación del cáncer gástrico	18
1.6. Tratamiento y pronóstico (supervivencia) del cáncer gástrico en la actualidad	23
1.6.1. <i>Tratamiento de la enfermedad localizada y localmente avanzada</i>	23
1.6.2. <i>Tratamiento de la enfermedad avanzada o metastásica</i>	23
1.6.3. <i>Inmunoterapia en cáncer gástrico</i>	24
1.6.4. <i>Biomarcadores predictivos de respuesta en cáncer gástrico</i>	32
1.6.5. <i>Biomarcadores emergentes en cáncer gástrico</i>	36
1.6.6. <i>Pronóstico (supervivencia) del cáncer gástrico</i>	38
1.7. Valor pronóstico de las clasificaciones moleculares	39
1.8. Valor predictivo de las clasificaciones moleculares	40
1.8.1. <i>Potencial valor predictivo de respuesta a inmunoterapia de las clasificaciones moleculares</i>	40
1.8.2. <i>Potencial valor predictivo de respuesta a quimioterapia o a terapia anti-HER2 de las clasificaciones moleculares</i>	41

2. JUSTIFICACIÓN	45
3. HIPÓTESIS	47
4. OBJETIVOS	49
5. METODOLOGÍA	51
5.1. Tipo de estudio	51
5.2. Población del estudio	51
5.2.1. <i>Creación de la base de datos (BBDD) y Selección de la muestra</i>	51
5.2.2. <i>Criterios de inclusión/exclusión</i>	51
5.3. Fuente de obtención de muestra y recogida de datos	52
5.3.1. <i>Aclaración sobre las muestras</i>	52
5.4. Definición de variables clínico-patológicas y moleculares de la BBDD	53
5.4.1. <i>Criterios de beneficio evaluable y Definición de Beneficio del tratamiento</i>	57
5.5. Análisis molecular	59
5.5.1. <i>Procesado de las muestras</i>	60
5.5.2. <i>Panel de biomarcadores de expresión proteica y génica</i>	60
5.5.3. <i>Panel de mutaciones somáticas recurrentes en cáncer gástrico</i>	63
5.6. Análisis estadístico	66
5.6.1. <i>Consideraciones estadísticas generales</i>	66
5.6.2. <i>Variables clínicas y de los biomarcadores de expresión</i>	66
5.6.3. <i>Diferencias entre los resultados esperados y los observados al aplicar a nuestra cohorte el algoritmo descrito por el grupo de Setia</i>	66
5.6.4. <i>Variables de eficacia o dependientes</i>	66
5.6.5. <i>Asociación entre las variables clínicas/moleculares</i>	

<i>y las variables de eficacia o dependientes</i>	67
5.6.6. Propuesta de dos métodos de clasificación sugeridos a partir del análisis de resultados del panel de biomarcadores de expresión proteica y génica y su capacidad de predecir supervivencia global (SG) y beneficio del tratamiento	68
5.6.6.1. Algoritmo de Setia adaptado.....	68
5.6.6.2. Análisis clúster o de agrupamiento jerárquico	68
5.6.7. Identificación de mutaciones en los pacientes “all-negatives”	69
5.7. Aspectos éticos	69
 6. RESULTADOS	 71
6.1. Análisis descriptivo	71
6.1.1. <i>Cohorte final y subcohorte para el análisis de beneficio del tratamiento</i>	71
6.1.1.1. Cálculo de ratio <i>análisis completado / muestra disponible</i>	74
6.1.2. <i>Características clínicas de los pacientes</i>	75
6.1.3. <i>Resultados del análisis del panel de biomarcadores de expresión proteica y génica</i>	78
6.1.3.1. Propuesta de clasificación con <i>Algoritmo de Setia adaptado</i>	82
6.1.3.2. Propuesta de un nuevo sistema de clasificación: <i>Clustering o agrupamiento jerárquico no supervisado</i>	85
6.1.4. <i>Resultados del análisis del panel de mutaciones somáticas recurrentes en cáncer gástrico</i>	93
6.1.4.1. <i>Distribución de las mutaciones dentro de los clústeres</i>	97
6.1.4.2. <i>Distribución de las mutaciones dentro de los subgrupos del Algoritmo de Setia adaptado</i>	99
6.1.4.3. <i>Identificación mutaciones en los pacientes “all-negatives”</i>	101
6.1.4.3.1. Perfil mutacional de los pacientes “all-negatives”.....	101
6.1.5. <i>Concordancia entre el estado mutacional de los genes TP53 y CDH1 y sus proteínas</i>	105

6.1.6. <i>Integración de resultados: selección de tratamiento con los dos métodos de clasificación y perfil mutacional de los pacientes “all-negatives”</i>	106
6.2. Análisis de las variables de eficacia	111
6.2.1 <i>Asociación entre las variables clínicas, biomarcadores moleculares y las variables de eficacia</i>	115
6.2.2. <i>Beneficio del tratamiento y supervivencia global en función del clúster</i>	122
6.2.3. <i>Beneficio del tratamiento y supervivencia global según subtipo de Setia adaptado</i>	124
7. DISCUSIÓN	127
8. CONCLUSIONES	141
9. BIBLIOGRAFÍA	143
10. ANEXOS	153
10.1. Abreviaciones	153
10.2. Relación de Tablas y Figuras	157
10.3. Hojas de información al paciente y consentimiento Informado	162
10.4. ESMO-Magnitude of Clinical Benefit Scale	163
10.5. Escalas ESCAT	163

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. Preámbulo:

El cáncer gástrico (CG) es una enfermedad con una elevada heterogeneidad morfológica, biológica y genética que representa un problema global de salud. A pesar de la aplicación de estrategias multimodales y el avance en las terapias dirigidas, su diagnóstico continúa siendo en fases avanzadas de la enfermedad y no se han conseguido grandes mejoras en supervivencia. Ninguna de las clasificaciones “clásicas” o “tradicionales” utilizadas hasta el momento en CG ha demostrado tener utilidad en la selección del mejor tratamiento para el paciente. En los últimos 10 años diferentes grupos bien reconocidos, entre ellos el grupo del TCGA (del inglés: *The Cancer Genome Atlas*, Atlas del Genoma del Cáncer) han descrito clasificaciones moleculares del CG(1). Estas nuevas clasificaciones podrían tener un papel en la elección de la mejor estrategia terapéutica para nuestros pacientes. La necesidad de desarrollar estrategias con técnicas con una relación coste/beneficio asequible para la implementación de estas clasificaciones moleculares del CG en la práctica clínica habitual sigue siendo un reto de la oncología de hoy.

1.2. Consideraciones:

En esta tesis se utilizará el término CG para referirse a “cáncer gástrico” o “cáncer de estómago” así como aquellos casos de tumor que afectan a la unión esofagogástrica (UEG) especialmente a los subtipos Siewert II y III(2) que se corresponden con el tumor de cardias y subcardial, respectivamente. Estos tipos de tumores históricamente se han estudiado como parte del cáncer gástrico. Como se verá más adelante, la proximidad anatómica y su biología molecular indica que se trata de tipos de tumores que comparten suficientes similitudes para justificar su análisis conjunto. Además, para todas estas entidades nos referimos únicamente al subtipo histológico adenocarcinoma, que representa el 95% de los tumores que aparecen en estas localizaciones.

1.3. Epidemiología del cáncer gástrico:

1.3.1. *Incidencia y Prevalencia:*

El CG actualmente supone el quinto tipo de cáncer de más incidencia en el mundo(3). No obstante, la incidencia del CG presenta complejidad dinámica y variación geográfica y anatómica. Mientras su incidencia disminuye en algunas regiones como en el norte de América y oeste de Europa, continua muy alta en otras regiones como Asia, América Latina y este de Europa. Además, en los últimos años se ha observado un aumento de forma global en la incidencia de aquellos casos que afectan a la unión esofagogástrica, en paralelo al aumento de los adenocarcinomas de esófago, así como un aumento en la incidencia de casos entre pacientes jóvenes (de menos de 50 años), especialmente en países con baja incidencia de CG y baja prevalencia de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)(4). En la **Tabla 1** se muestran los datos de prevalencia por sexos en España.

Tabla 1. Estimación de la prevalencia total de CG por sexos en España para el año 2020.

Sexo	Prevalencia total
Mujeres	12.900
Varones	15.559

Fuente Cifras del Cáncer en España SEOM 2023.

1.3.2. *Mortalidad:*

El CG actualmente supone una de las causas de muerte por cáncer más frecuentes en el mundo, concretamente la cuarta causa detrás del cáncer de pulmón, colorrectal e hígado(3). A pesar de ello, y en algunos países de Europa, como en España, la mortalidad por CG se encuentra en descenso(5). La incidencia de CG es dos veces más alta en hombres que en mujeres.

1.3.3. *Factores de riesgo:*

Los factores de riesgo del CG, varían en función de la localización anatómica, de forma que, la infección por *H. pylori*, otros agentes infecciosos como virus de *Epstein-Barr* (*EBV*), el abuso de alcohol, el alto consumo de sal y el bajo consumo de frutas y vegetales en la dieta, se han asociado a casos que no afectan a la unión esofagogástrica, mientras que la obesidad y el reflujo gastroesofágico se han asociado a casos que afectan la unión esofagogástrica. Estudios recientes sugieren que el CG se desarrolla como resultado de la

interacción multifactorial entre varios factores como son agentes infecciosos (*H. pylori* y *EBV*), microbioma gástrico, factores ambientales y factores genéticos del huésped(6). El incremento de los trastornos autoinmunes asociado a la disbiosis del microbioma gástrico como consecuencia de nuevos estilos de vida podría ser la causa del aumento de casos no asociados a *H. pylori* en pacientes más jóvenes(4).

1.3.4. *Variaciones geográficas:*

Tradicionalmente se han reportado diferencias epidemiológicas, histopatológicas y relacionadas con la supervivencia entre pacientes con CG que viven en regiones asiáticas y no asiáticas. La interpretación de estas diferencias ha generado mucho debate. En cuanto a la supervivencia, las variaciones en el sistema de estadiaje, la calidad y la extensión de la cirugía y el diferente uso del tratamiento médico, sobre todo de quimioterapia, podrían explicar las diferencias observadas. No obstante trabajos muy interesantes han demostrado que la población asiática tiene mejor pronóstico incluso cuando se trata en países occidentales(7). Más recientemente se han identificado diferencias en el patrón mutacional y firmas inmunológicas, objetivándose diferencias en las características del infiltrado inflamatorio tumoral entre población asiática y no asiática(8,9).

1.3.5. *Predisposición genética:*

El CG demuestra una agregación familiar en aproximadamente el 10% de los casos, y en un 3% de los casos se identifica una predisposición genética hereditaria(10). En la **Tabla 2** se indican los genes asociados a CG hereditario y sus síndromes asociados. El principal síndrome asociado a CG hereditario es el cáncer gástrico difuso hereditario (CGDH), se trata de un síndrome con un patrón de herencia autosómico dominante, causado por una mutación germinal en el gen *CDH1* que codifica para la proteína de adhesión tisular cadherina-E. Las mutaciones en este gen tienen una alta penetrancia de tal forma que los individuos portadores tienen un alto riesgo vital de desarrollar CG y un riesgo elevado también de desarrollar cáncer de mama de tipo lobelar. El CG también puede ocurrir dentro del espectro de síndromes genéticos de riesgo tumoral, como el síndrome de Lynch, el más conocido y de mayor frecuencia, la poliposis adenomatosa familiar (PAF), el síndrome de Li-Fraumeni y Peutz-Jeghers. El síndrome de Lynch es un síndrome con un patrón de herencia autosómico dominante causado por mutaciones en los genes del sistema de reparación de mal apareamiento del ADN, conocido como sistema MMR (de sus siglas en inglés *mismatch repair*). Los principales genes del sistema MMR son 4:

MLH1, PMS2, MSH2 y MSH6. Los pacientes con síndrome de Lynch presentan una mayor predisposición a desarrollar cáncer colorrectal y cáncer de endometrio, pero también de ovario, gástrico y otros tumores. En el síndrome de Lynch habitualmente se afectan de forma predominante MLH1 y MSH2 y con menor frecuencia PMS2 y MSH6. Pacientes con mutaciones de MSH6 parecen estar particularmente en riesgo de cáncer gastrointestinal y endometrial. En cambio, en el CG esporádico, más del 50% de los casos de inestabilidad de microsatélites se asocian a la metilación del gen MLH1(11).

Tabla 2. Genes asociados a CG hereditario.

Gen mutado	Síndrome asociado
<i>APC</i>	PAF
<i>APC promotor 1B</i>	AGPPE
<i>CDH1, CTNNA1</i>	CGDH
<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2</i>	Síndrome Lynch
<i>SMAD4, BMPR1A</i>	Síndrome poliposis juvenil
<i>STK11</i>	Síndrome de Peutz-Jeghers
<i>TP53</i>	Síndrome de Li-Fraumeni

PAF Poliposis adenomatosa familiar; AGPPE Adenocarcinoma gástrico asociado a poliposis proximal en estómago; CGDH Cáncer gástrico difuso hereditario.

1.3.6. **Prevención:**

En nuestro país, a diferencia de lo establecido en zonas de alto riesgo de CG, no se han implementado los programas de cribado poblacional de individuos asintomáticos basados en la endoscopia. A pesar de ello si que se recomienda la derivación a unidad de Cáncer Hereditario en caso de sospecha de síndrome de cáncer familiar y el seguimiento endoscópico en aquellos pacientes con metaplasia intestinal como lesión precursora de CG(12).

1.4. **Clasificaciones en cáncer gástrico:**

1.4.1. **Clasificaciones “clásicas” o histopatológicas:**

Tradicionalmente el CG se ha clasificado según criterios histopatológicos. La clasificación histopatológica más antigua, la **clasificación de Lauren**(13), divide el CG en 2 subtipos: intestinal y difuso. El subtipo intestinal presenta fases evolutivas, se

desarrolla a partir de una actividad inflamatoria asociada a la infección por *Helicobacter pylori* que puede evolucionar a gastritis atrófica, metaplasia intestinal, displasia y finalmente a carcinoma. El subtipo difuso no presenta esta evolución en fases (de inflamación a carcinoma), es más agresivo y tiende a afectar a personas más jóvenes. Otra clasificación histopatológica un poco más moderna es la de la **OMS** (Organización Mundial de la Salud) o WHO del inglés *World Health Organization*(14), divide el CG en 4 subtipos principales en función del patrón histológico predominante: adenocarcinoma tubular, adenocarcinoma mucinoso, adenocarcinoma papilar, carcinoma pobremente cohesivo (que incluye el carcinoma de células en anillo de sello) y variantes histológicas menos frecuentes. En la **Tabla 3** se indican los subtipos según la clasificación de la OMS (WHO) así como su equivalencia con los subtipos de Lauren. Estas clasificaciones histopatológicas han sido ampliamente utilizadas en la clínica, pero su valor pronóstico no está claro y además no nos permiten seleccionar el mejor tratamiento médico para cada paciente.

Tabla 3. Subtipos de CG según la clasificación de la OMS (WHO) y su equivalencia con los subtipos de Lauren. De: Hu et al., «Gastric Cancer»(15)

WHO (2010)	Lauren (1965)
Adenocarcinoma palipar	Tipo intestinal
Adenocarcinoma tubular	
Adenocarcinoma mucinoso	
Carcinoma con células en nillo de sello	Tipo difuso
Otros carcinomas pobremente cohesivos	
Carcinoma mixto	Tipo intermedio
Otros subtipos menos frecuentes como: carcinoma adenoescamoso, carcinoma escamoso, carcinosarcoma...	----

1.4.2. *Principales clasificaciones por subtipos moleculares:*

Los primeros estudios que describen una clasificación molecular para el CG son los del grupo de Lei (Duke-National University, Singapur)(16,17). Estos estudios fueron seguidos por trabajos a mayor escala de dos grupos diferentes: *The Cancer Genome Atlas* (TCGA)(1) y *Asian Cancer Research Group* (ACRG)(18).

-Grupo de Lei (Duke-National University, Singapur): El grupo de Lei et al. utiliza perfiles de expresión génica para predecir la respuesta a tratamiento. Inicialmente reportan una primera clasificación en 2 subtipos diferentes: subtipo G-INT (del inglés *genomic – intestinal*) y subtipo DG-DIF (del inglés *genomic – diffuse*) nominados así por su parecido a los subtipos histológicos “clásicos” de Lauren. Estos subtipos demostraron tener valor pronóstico y presentaron en análisis “in vitro” diferentes respuestas a tratamientos, por ejemplo, el subtipo G-INT mostró más resistencia a cisplatino, pero a la vez más sensibilidad a 5-fluorouracilo y oxaliplatino en comparación con el subtipo G-DIF(16). Posteriormente el mismo grupo reporta una nueva clasificación que consta de 3 subtipos diferentes: proliferativo, metabólico y mesenquimal, nominados así en referencia a las vías oncogénicas activadas en cada uno de ellos. Realizaron este análisis sobre una muestra de 248 casos de CG primarios, combinando los datos del análisis del ARN (ácido ribonucleico) mensajero de 192 casos previamente reportados por el mismo grupo, y de otros 56 nuevos casos más. Se analizaron patrones de expresión génica mediante técnicas de agrupación jerárquica no supervisada, y posteriormente estos resultados se validaron en 70 tumores de otra población diferente (australiana)(17). El subtipo proliferativo que se encontró asociado con el subtipo intestinal de Lauren, presentó una alta actividad para varias vías oncogénicas y se caracterizaba por un aumento de mutaciones en *TP53* y variaciones en el número de copias (CNV, del inglés *copy number variations*). El subtipo mesenquimal se caracterizaba por la expresión de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima (EMT, del inglés *epithelial-mesenchymal transition*) y muchos tumores contenían células en anillo de sello o habían sido catalogados como subtipo difuso por la clasificación de Lauren. Mostraban alto grado de hipermetilación y un nivel más alto de células madre tumorales (CSC, del inglés *cancer stem cells*). No presentaban apenas mutaciones de *TP53* ni variaciones en el número de copias. La novedad más importante del estudio de Lei et al. es el hallazgo de un tercer subtipo (subtipo metabólico), que histológicamente no corresponde a ninguno de los dos grupos de la clasificación de Lauren. El subtipo metabólico no presentaba ninguna expresión génica característica, y en él, las mutaciones de *TP53* eran infrecuentes. Este subtipo mostró una marcada actividad en la vía relacionada con la metaplasia que expresa polipéptidos espasmolíticos (SPEM, del inglés *spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia*) con marcada sobreexpresión de genes expresados en mucosa gástrica normal(19). Finalmente los subtipos propuestos por Lei et al., también demostraron diferentes sensibilidades a tratamientos de manera que los tumores incluidos

en el subtipo metabólico eran más sensibles a la quimioterapia con 5-fluorouracilo (tenían niveles bajos de timidilato sintasa) y los incluidos en el subtipo mesenquimal eran particularmente sensibles a inhibidores de la fosfatidilinositol 3-quinasa vía (PI3K)-AKT-mTOR. La **Tabla 4** muestra las principales características de los 3 subtipos de CG descritos por Lei et al.

Tabla 4. Características principales de los 3 subtipos de CG según Lei et al. De: Lei et al., «Identification of Molecular Subtypes of Gastric Cancer With Different Responses to PI3-Kinase Inhibitors and 5-Fluorouracil»(17).

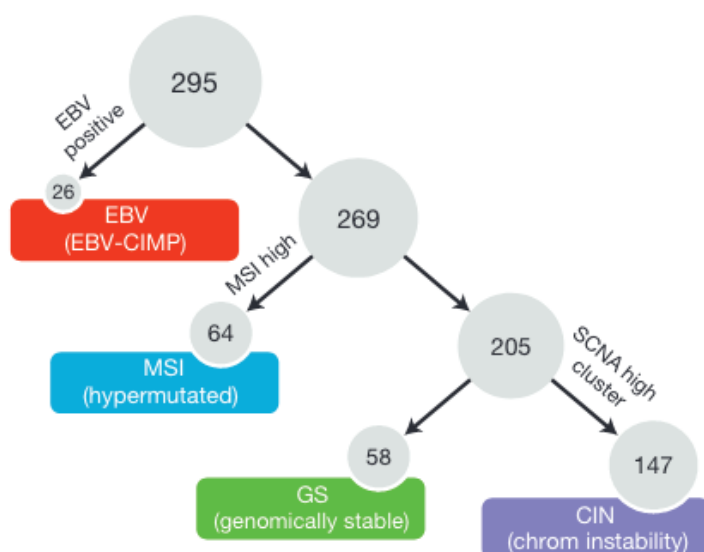
Characteristic	Mesenchymal	Proliferative	Metabolic
5-FU effect on patient survival	No effect in Singapore cohort; beneficial in Australian cohort	No effect	Beneficial
Chemosensitivity in cell lines	PI3K-AKT-mTOR inhibitors	-	5-FU
KEGG pathways associated with up-regulated genes	Focal adhesion, ECM-receptor interaction	Cell cycle, DNA replication	Metabolic processes
GO biological processes associated with up-regulated genes	Cell adhesion, vasculature development, cell motility, angiogenesis	M phase, mitotic cell cycle	Digestion, secretion
Pathway activation determined by BFRM	EMT, TGF- β , VEGF, NF- κ B, mTOR, SHH, and CSC	E2F, MYC, and RAS	SPEM (spasmolytic polypeptide-expressing-metaplasia)
Grade	High	Low	-
TNM stage	No significant difference among the 3 subtypes		
Tumor size	No significant differences among the 3 subtypes		
Tumor content	Tendency for mesenchymal < metabolic < proliferative (details in Supplementary Table 2)		
Age $\pm$ SD	62.51 $\pm$ 12.33	66.42 $\pm$ 11.78	63.28 $\pm$ 15.71
Lauren ²⁵ classification, %			
Diffuse	58.2	17.3	40.6
Intestinal	29.9	73.6	53.6
Mixed	11.9	9.1	5.8
Classification in reference, ⁷ %			
G-INT	7.5	71.2	84.3
G-DIF	92.5	28.8	15.7
Characteristic copy number alteration	Low CNA	High CNA	-
Amplified genes	-	CCNE1, MYC, ERBB2, KRAS	-
Aberrantly methylated CpGs, %			
Hypermethylated	84.6	57.8	76.1
Hypomethylated	15.4	42.2	23.9
Characteristic aberrant methylation	Hypermethylation	Hypomethylation	-
Frequency of TP53 mutation	Low	High	Low

ECM, extracellular matrix; EMT, epithelial-mesenchymal transition; G-DIF, genomic diffuse; G-INT, genomic intestinal; NF- B, nuclear factor -light-chain-enhancer of activated B cells; SHH, sonic hedgehog; TGF, transforming growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor.

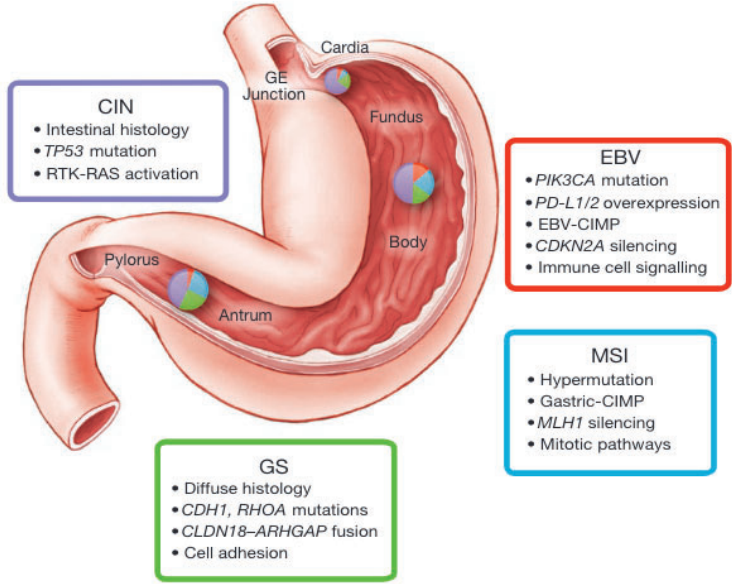
-The Cancer Genome Atlas (TCGA): El grupo de TCGA reporta los resultados de un análisis más amplio en cuanto a complejidad y en un total de 295 pacientes. Combinaron un total de 6 plataformas moleculares distintas: análisis del número de copias, secuenciación de todo el exoma, arrays de metilación de ADN, secuenciación de ARN mensajero (mARN), secuenciación de micro ARN (miARN), análisis de expresión de proteínas (RPPA). Además del test de inestabilidad de microsatélites (MSI). TCGA, basándose en el análisis integrado de esta combinación de plataformas, divide el CG en 4 subtipos moleculares: grupo con EBV (del inglés *Epstein Barr Virus*), que representan un 10% del total, grupo con inestabilidad de microsatélites (MSI del inglés *microsatellite instability*), que representan un 20% del total, grupo con estabilidad genómica (GS del inglés *genomically stable*), que representa un 20% del total y finalmente grupo con inestabilidad cromosómica (CIN del inglés *chromosomal instability*), que representa el

grupo más grande, un 50% del total(1). Una vez identificados los EBV y los MSI, los dos grupos restantes son diferenciados en función de si tienen o no una extensa alteración en el número de copias (SCNA, del inglés *somatic copy number aberrations*), de forma que el grupo CIN presenta una elevada alteración en el número de copias y el grupo GS no. La **Figura 1a** representa el diagrama de flujo de como divide TCGA el CG en 4 subtipos moleculares. El grupo MSI se caracteriza por presentar elevada tasa de mutaciones y hipermetilación (incluyendo hipermetilación del promotor del gen MLH1). El grupo EBV se caracteriza por presentar una extensa hipermetilación y frecuente sobreexpresión/amplificación de PD-L1. El grupo CIN frecuentes amplificaciones focales de receptores TK y mutaciones en *TP53*. Y el grupo GS está enriquecido en el subtipo histológico difuso de la clasificación de Lauren y presenta frecuentes mutaciones somáticas en *CDH1* y *ARID1A*. La **Figura 1b-c** muestra gráficamente las características clínicas y alteraciones moleculares más frecuentes de cada uno de los subtipos de CG según TCGA. El equipo de TCGA recoge y reporta de forma limitada datos clínicos y de seguimiento de sus casos. Es importante destacar que los cuatro subtipos moleculares se hallaron representados en todo el estómago, aunque algunos fueron más característicos de una zona determinada. No hubo diferencias entre pacientes asiáticos vs no-asiáticos, ni tampoco en supervivencia(1). El mismo equipo de TCGA, presenta unos años más tarde una propuesta de clasificación molecular de cáncer de esófago(20) Los adenocarcinomas de esófago distal y los tumores que afectan a la unión esofagogástrica presentan características moleculares similares al subtipo CIN del CG(20).

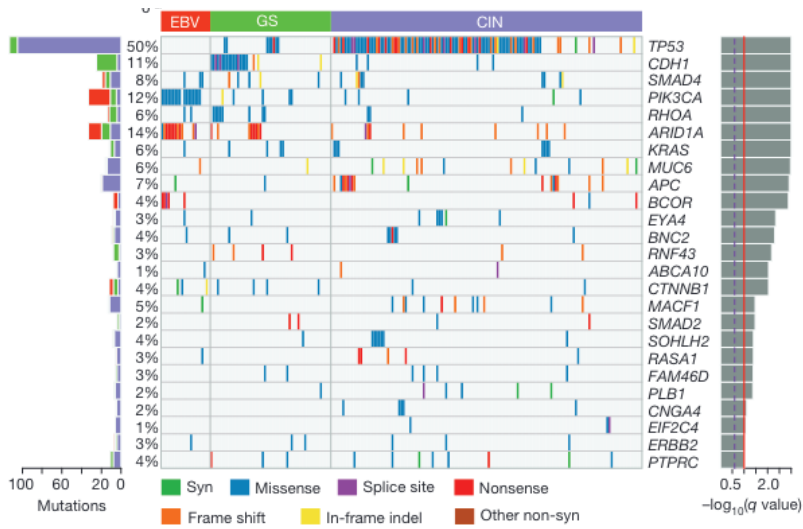
a.



b.



c.



d.

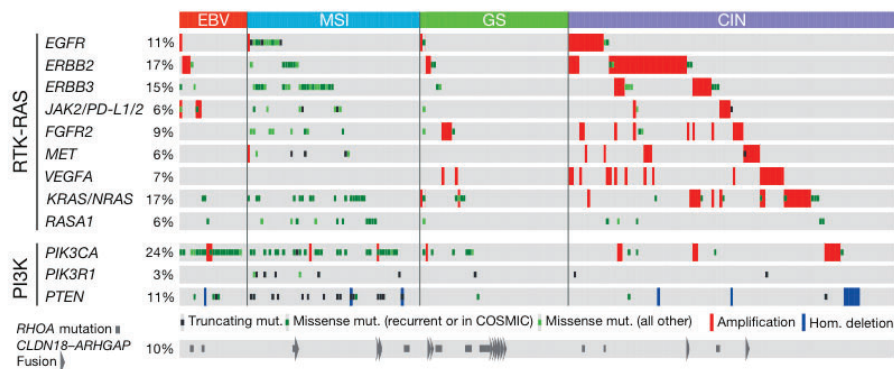
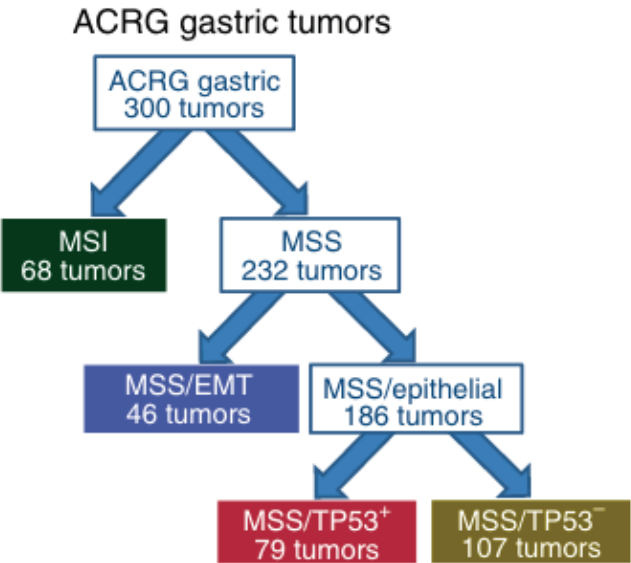


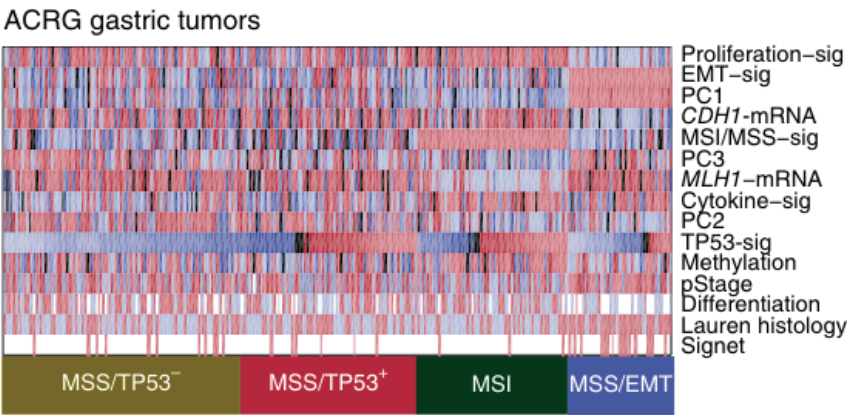
Figura 1. Clasificación molecular del CG propuesta por TCGA. De: The Cancer Genome Atlas Research Network, «Integrated Genomic Characterization of Oesophageal Carcinoma»(1). **a.** Diagrama de flujo de como divide TCGA el CG en 4 subtipos moleculares. **b.** Características principales de los 4 subtipos de CG según TCGA. *La distribución de subtipos en las distintas localizaciones anatómicas del estómago está representada en gráficos circulares.* **c.** Genes más frecuentemente mutados en los grupos no-hipermutados del TCGA (grupos EBV, GS y CIN). *El color de la mutación indica el tipo de mutación.* **d.** Mutaciones, variaciones en el número de copias y translocaciones más frecuentes y su distribución en los subtipos moleculares del TCGA. *La frecuencia de la alteración se expresa como porcentaje del global de los casos.*

-The Asian Cancer Research Group (ACRG): El grupo de ACRG reporta los resultados de un análisis un poco menos complejo que el de TCGA, pero con un número similar de pacientes, 300. Analizando la expresión de ARN mensajero, ACRG divide el CG en 4 subtipos moleculares: subtipo con inestabilidad de microsatélites (denominados MSI), subtipo con firma de transición epitelio-mesénquima (denominados EMT, del inglés *epithelial-mesenchymal transition*) y los no-MSI y no-EMT, los dividen en MSS/TP53-activo (TP53+) y en MSS/TP53-inactivo (TP53-) en función del resultado de una firma de actividad de p53 basada en dos genes, *CDKN1A* y *MDM2*; esta firma puntúa alto en tumores que tienen intacto *TP53* y bajo en tumores con pérdida funcional de *TP53*(18). La **Figura 2a** representa el diagrama de flujo de como divide ACRG el CG en 4 subtipos moleculares. El grupo MSI se caracteriza por presentar una alta tasa de mutaciones, suelen corresponder al subtipo intestinal en la clasificación intestinal de Lauren, presentan pérdida de *MLH1* y una puntuación elevada en firma de metilación del DNA. El grupo de EMT se caracteriza por presentar una baja tasa de mutaciones, típicamente corresponden a subtipo difuso en la clasificación de Lauren, incluyen una gran cantidad de carcinomas células en anillo de sello y muestran pérdida de expresión de *CDH1*. En cuanto el grupo de MSS/TP53-inactivo se caracteriza por presentar una alta prevalencia de mutaciones en *TP53*, variaciones en el número de copias y amplificaciones focales, siendo diferente el patrón de mutaciones en el grupo de MSS/TP53-activo. La **Figura 2b** muestra gráficamente las características clínicas y alteraciones moleculares más frecuentes de cada uno de los subtipos de CG según ACRG. ACRG reporta de forma extensa datos clínicos y de seguimiento y en el análisis de supervivencia evidencian diferencias en cuanto a supervivencia entre los subtipos. El grupo EMT, enriquecido en el subtipo histológico difuso de Lauren, es el que presenta peor pronóstico, seguido del grupo MSS/TP53-inactivo, MSS/TP53-activo y finalmente el grupo de MSI. Estos datos son representados en la **Figura 2c**.

a.



b.



c.

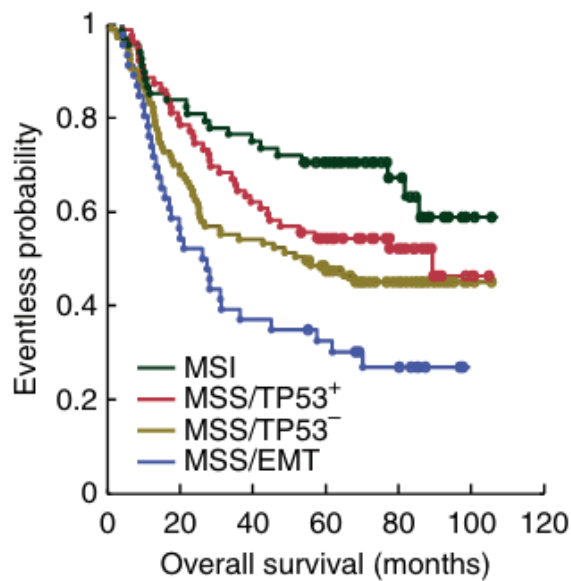


Figura 2. Clasificación molecular del CG propuesta por ACRG. De: Cristescu et al., «Molecular Analysis of Gastric Cancer Identifies Subtypes Associated with Distinct Clinical Outcomes»(18). **a.** Diagrama de flujo de como divide ACRG en 4 subtipos moleculares. **b.** Características principales de los 4 subtipos de CG según ACRG. *Los puntajes característicos están codificados por colores desde bajo (azul) hasta mediano (negro) y alto (rojo), y los puntajes más altos significan actividad en esa vía. Los códigos de color azul a rojo para los parámetros clínicos son los siguientes: Estadíaaje, temprana a tardía; Diferenciación, pobre a bien diferenciada; Histología de Lauren, intestinal a difusa. Las firmas de expresión genética definen cuatro subtipos moleculares de GC.* **c.** Subtipos moleculares de ACRG y supervivencia. *Los subtipos moleculares de ACRG se asocian con la supervivencia general en la cohorte de ACRG GC. La prueba de rangos logarítmicos mostró una $P_{\text{general}} = 4e-4$.*

La **Tabla 5** muestra las principales diferencias entre las clasificaciones de TCGA y ACRG en cuanto a tipo de pacientes analizados, muestra tumoral, análisis y recogida de datos.

Tabla 5. Principales características de los pacientes analizados, muestras tumorales y tipo de análisis realizados, entre los estudios TCGA(1) y ACRG(18).

	TCGA	ACRG
Población asiática	25%	100%
Histología difusa	23%	45%
Estadios III/IV (raros)	31%	57%
Unión esofagogástrica	19%	11%
Tipo de muestra	Tumor primario	Tumor primario
Análisis molecular	Integral	Más limitado (expresión ARNm)
Datos de supervivencia	No análisis	Datos seguimiento a largo plazo
Reclutamiento	Varios centros	Único centro

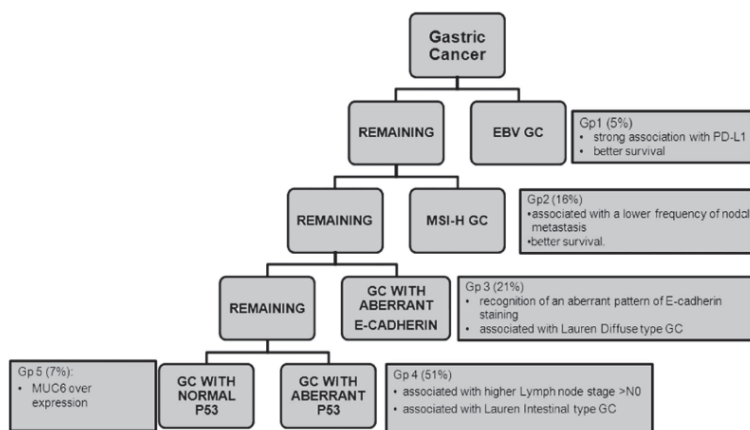
ARNm, ARN mensajero

1.4.3. *Otros grupos que han aplicado clasificación molecular:*

La aplicación de clasificaciones moleculares en CG como la realizada por TCGA resulta muy interesante y tiene un potencial en la decisión terapéutica de nuestros pacientes, pero su coste y complejidad técnica dificultan su aplicación en la práctica clínica. En este sentido el grupo de Setia et al.(21), del Massachusetts General Hospital de Boston, publicó una clasificación molecular en CG basada en el análisis, en un tissue-array, de la expresión por inmunohistoquímica (IHQ) e hibridación in situ (ISH), de un panel de 14 biomarcadores, 13 proteínas y el mRNA del virus de *Epstein-Barr* por ISH. En esta propuesta de clasificación, se evaluaba el estado del sistema de reparación de mal apareamiento del ADN, conocido como sistema MMR (del inglés *mismatch repair*), analizando las cuatro proteínas principales (MLH1, PMS2, MSH2 y MSH6), como evidencia indirecta de MSI. Así como, la expresión aberrante de E-cadherina (*CDH1*) y p53 (*TP53*) para identificar los tumores GS/EMT y CIN respectivamente. La **Figura 3a** representa el diagrama de flujo de como divide Setia et al. el CG en 5 subtipos moleculares(21). La E-cadherina es una proteína codificada por el gen *CDH1*, que es una proteína de adhesión celular, normalmente expresada en la membrana de las células epiteliales en el estómago y su pérdida es una expresión fenotípica de la alteración genética observada en el tipo difuso de Lauren y GS de TCGA. El gen supresor tumoral *TP53* se incluyó por ser el más frecuentemente mutado en el subtipo CIN del TCGA (71%). Setia et al. también testó CDX2, un marcador para adenocarcinoma de origen gastrointestinal y el fenotipo de distintas mucinas mediante la determinación de MUC2,

MUC5AC, MUC6 y CD10. Las mucinas son glicoproteínas y constituyen el componente principal de la capa de gel mucoso gastrointestinal. Algunas de ellas se expresan en la mucosa gástrica normal, como MUC6 o MUC5AC, mientras que otras, como CD10 o MUC2 se expresan normalmente en tejido intestinal(22). Y finalmente, el grupo de Setia también analiza los biomarcadores PD-L1 y HER2. El análisis de los resultados obtenidos con 146 tumores gástricos mediante análisis clúster o agrupamiento jerárquico no supervisado, permite generar un algoritmo que clasifica el CG en 5 subtipos moleculares, cuatro de los cuales (EBV, MSI, expresión aberrante de E-cadherina y expresión aberrante de p53) se parecen a los subtipos de EBV, MSI, GS y CIN, de la clasificación de TCGA. El quinto grupo lo constituyen el resto de tumores, que tienen expresión conservada de p53 y, de forma característica, una expresión aumentada de MUC6. Podríamos aventurar que este último subgrupo se correspondería con el subtipo metabólico de la clasificación de Lei et al. y con el subtipo MSS/*TP53*-activo (*TP53*+) de la ACRG. En el análisis de supervivencia observan una tendencia a mejor supervivencia en los subtipos EBV y MSI pero sin alcanzar la significación estadística. Los resultados del grupo de Setia et al, han sido validados en una cohorte asiática más grande, observando claras diferencias en supervivencia entre los 5 subtipos moleculares(23). La **figura 3b** muestra la gráfica de supervivencia de los diferentes subtipos moleculares de la clasificación de Ahn et al.

a.



b.

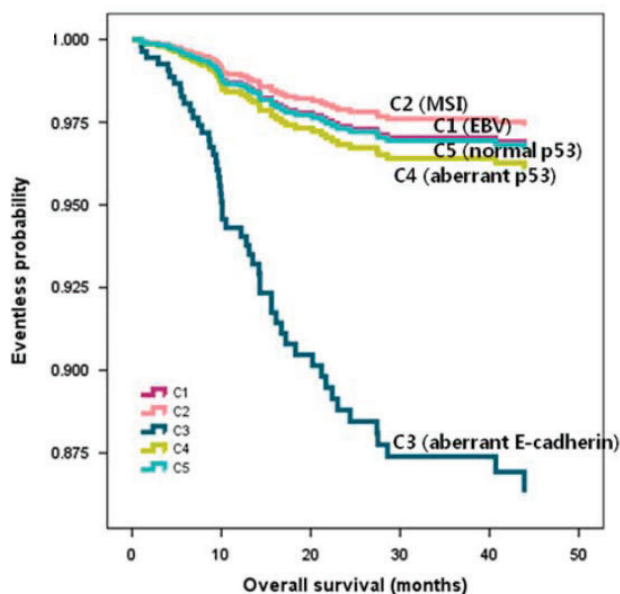


Figura 3. Clasificación molecular del CG propuesta por Setia y Ahn. **a.** Diagrama de flujo de como Setia et al. divide el CG en 5 subtipos moleculares. De: Setia et al., «A Protein and mRNA Expression-Based Classification of Gastric Cancer»(21). **b.** Subtipos moleculares de Ahn et al. y supervivencia. De: Ahn et al., «High-Throughput Protein and mRNA Expression-Based Classification of Gastric Cancers Can Identify Clinically Distinct Subtypes, Concordant With Recent Molecular Classifications»(23). *Los subtipos moleculares de clasificación de Ahn et al. se asocian a diferencias en supervivencia estadísticamente significativas (Cox $P < 0.001$).*

La **Tabla 6** representa las equivalencias entre las diferentes clasificaciones expuestas hasta ahora.

Tabla 6. Equivalencias entre las diferentes clasificaciones. Adaptado de Serra et al., «Comparison and Applicability of Molecular Classifications for Gastric Cancer»(24)

Tipo de clasificación	Nombre de clasificación	Equivalencias subtipos moleculares				
Histopatológicas “clásicas”	Lauren	Intestinal	Difuso	---	---	---
	WHO-OMS	Papilar/Tubular/Mucinoso	Pobremente cohesivo	---	---	---
Por subtipos moleculares	Lei et al.	Proliferativo	Mesenquimal	Metabólico		
	TCGA	CIN	GS	---	MSI	EBV
	ACRG	MSS/TP53- (inactivo)	MSSS/EMT	MSS/TP53+ (activo)	MSI	---
Por subtipos moleculares	Setia / Ahn*	TP53 Aberrante	E-cadherin Aberrante	TP53* Normal	dMMR	EBV

Sombreados en rosa corresponden a equivalencias aproximadas. *Métodos coste-efectivos

Estos métodos más asequibles o coste-efectivos como los descritos por los grupos de Setia y Ahn podrían complementarse con la detección de mutaciones y variaciones en el número de copias mediante técnicas de next generation sequencing (NGS). Grupos asiáticos, han reportado sus resultados en esta línea(25,26). Más recientemente, otros grupos han publicado resultados en cohortes de pacientes no asiáticas. Estos trabajos están recogidos en la **Tabla 7**. La mayoría de ellos no tienen representación de pacientes con enfermedad avanzada o metastásica, no complementan el análisis con NGS y hasta donde sabemos, en ninguno de ellos se realiza el análisis sobre biopsia gástrica endoscópica.

Tabla 7. Estudios más recientes que aplican clasificación molecular basada en inmunohistoquímica, en CG en cohortes no asiáticas.

Grupo (año publicación) y País	N pac.	Tipo muestra	Enferm. M1 (%)	Análisis NGS
Birkman EM, et al. (2018)(27). Finlandia	244	Pieza quirúrgica	Si (5%)	No
Yoon JY, et al. (2019)(28). Canada	107	Pieza quirúrgica	No	No
Di Pinto F, et al. (2020)(29). Italia	70	Pieza quirúrgica	No	No
Pinto M P, et al. (2020)(30). Chile	91	NR	Si (13%)	Si
Ramos et al. (2021)(31). Brasil	287	Pieza quirúrgica	No	No
Nshizitungu JP, et al. (2021)(32). Marruecos	97	NR	NR	No
Daun T, et al. (2021)(33). Suiza	115	Pieza quirúrgica	Si (10%)	Si

NR, dato no reportado en la publicación

Un paso más serían las clasificaciones que ponen el foco en el estroma del tumor. En esta línea se han publicado trabajos con modelos animales (ratones) que han permitido identificar varios fenotipos estromales y han explorado la relación de estos con los subtipos identificados por TCGA y ACRG. Estos trabajos serían especialmente interesantes para encontrar potenciales biomarcadores de respuesta a, por ejemplo, anti-angiogénicos y a inmunoterapia, pero su complejidad técnica los aleja de la aplicabilidad clínica(34).

1.5. Diagnóstico y estadificación del cáncer gástrico.

Los procedimientos utilizados para realizar un correcto diagnóstico del CG son:

1. Historia clínica
2. Exploración física
3. Analítica con hemograma, bioquímica y marcadores tumorales principalmente CEA y CA 19.9.
4. Radiografía de tórax
5. Tomografía computarizada abdomino-pélvica y torácica
6. Endoscopia digestiva alta.
7. Ecografía endoscópica (opcional)
8. Laparoscopia (LPS) exploradora con lavados peritoneales

La endoscopia digestiva alta es el procedimiento más importante para el **diagnóstico** del CG ya que permite la revisión de todo el estómago, la visualización directa del tumor y la toma de biopsias. La **Figura 4** representa de forma esquemática la visualización del estómago mediante una endoscopia diagnóstica y la **Figura 5** muestra la imagen característica de un adenocarcinoma gástrico tomada mediante este procedimiento. Una vez realizadas las biopsias mediante endoscopia, el patólogo nos ayuda a diferenciar el tipo histopatológico. Las **Figuras 6 y 7**, muestran ejemplos de imágenes de dos de los subtipos histológicos más frecuentes.

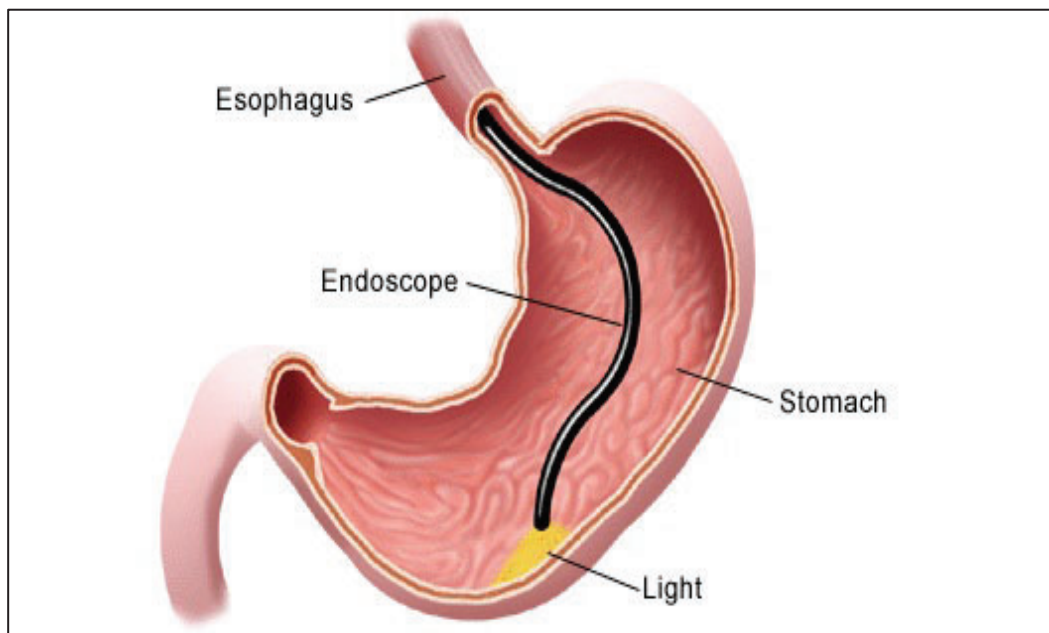


Figura 4. Imagen esquemática de endoscopia gástrica.

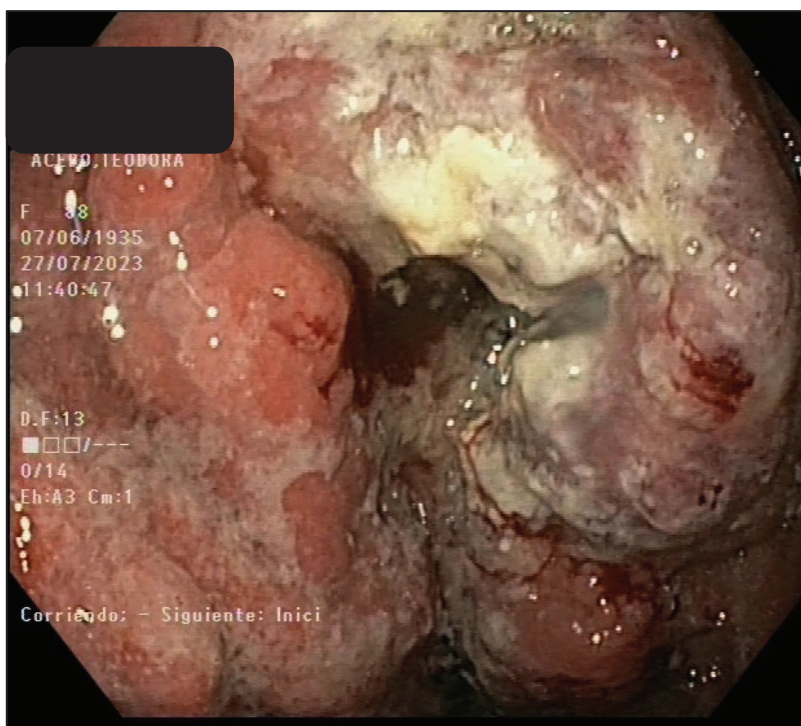


Figura 5. Imagen endoscópica de adenocarcinoma gástrico. *Imagen cedida por el Servicio Endoscopia Digestiva de Althaia, Manresa.*

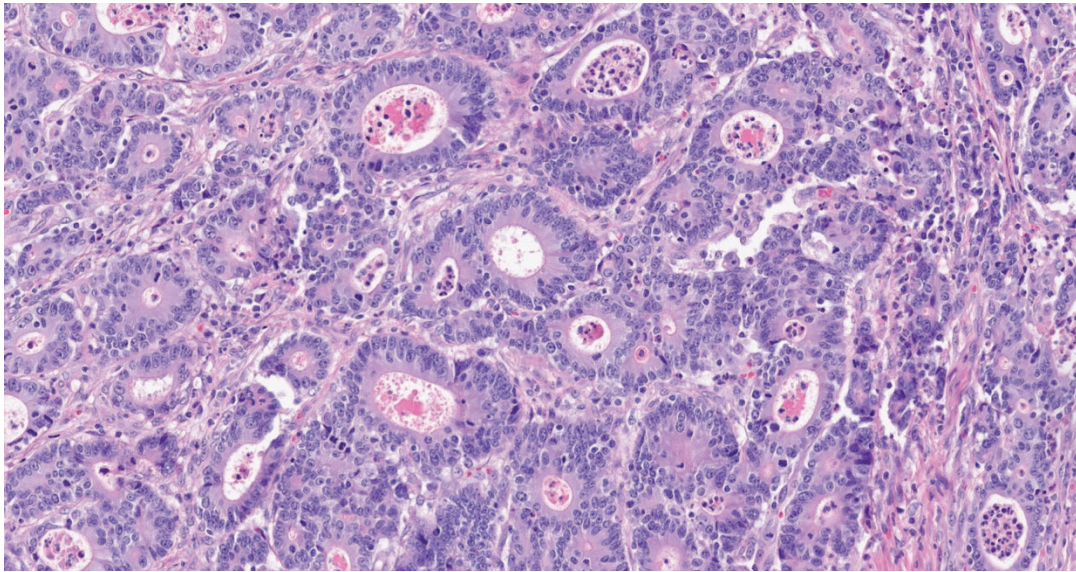


Figura 6. Imagen histopatológica correspondiente a adenocarcinoma gástrico tubular según clasificación de la OMS/WHO. *Imagen al microscopio (20x). Fuente: Imagen cedida por el Servicio de Anatomía Patológica de Althaia, Manresa.*

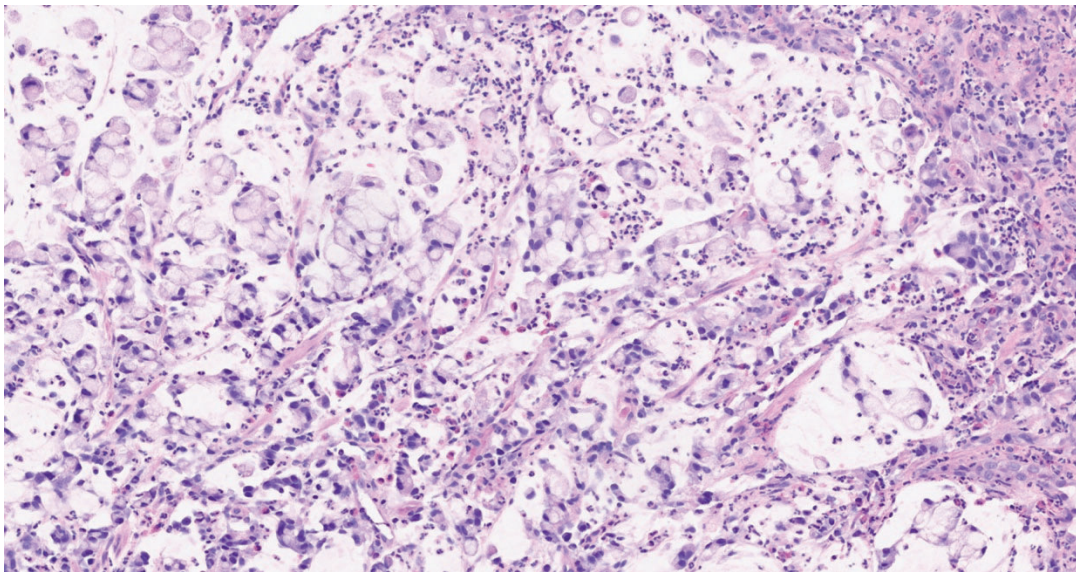


Figura 7. Imagen histopatológica correspondiente a carcinoma gástrico pobremente cohesivo con células en anillo de sello según clasificación de la OMS/WHO. *Imagen al microscopio (20x). Fuente: Imagen cedida por el Servicio de Anatomía Patológica de Althaia, Manresa.*

Una vez diagnosticado el CG, hay que realizar una buena **estadificación** de la enfermedad, que consiste en saber si hay afectación fuera del estómago. La prueba principal que evalúa este punto es la tomografía computarizada. Pero para una correcta estadificación, actualmente, la laparoscopia (LPS) exploradora con lavados peritoneales se considera un procedimiento necesario para detectar afectación peritoneal, membrana que recubre la pared abdominal y cubre la mayor parte de órganos en el abdomen y sitio de diseminación frecuente de este tipo tumoral. No es infrecuente que esta afectación en forma de carcinomatosis peritoneal pueda pasar desapercibida en las pruebas radiológicas(12). La **Figura 8**, muestra una imagen tomada mediante LPS donde se visualizan pequeños implantes de carcinomatosis peritoneal. El sistema de estadificación que se utiliza es el sistema TNM (del inglés *Tumor, Node, Metastasis*)(12,35). Tal y como se indica en la **Tabla 8** este sistema valora tres parámetros independientes: el grado de afectación tumoral de la pared gástrica (T), las metástasis ganglionares (N) y las metástasis a distancia (M). La combinación de estas tres variables permite clasificar a los enfermos en cuatro grupos de valor pronóstico representados en la **Tabla 9**, siendo el estadio 0 el de mejor pronóstico y el IV el de peor pronóstico.

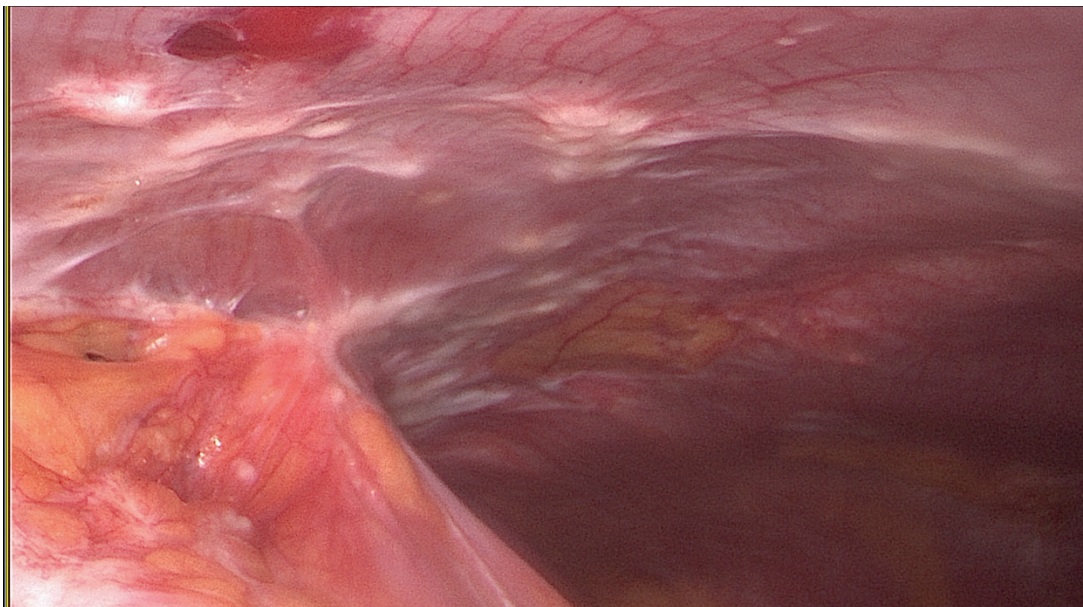


Figura 8. Imagen tomada en laparoscopia de estadiaje de paciente con CG con pequeños implantes de carcinomatosis peritoneal. *Imagen cedida por el Servicio Endoscopia Digestiva de Althaia, Manresa.*

Tabla 8. Estadiaje TNM según AJCC/UICC 8ª edición. De: Lordick et al., «Gastric Cancer»(12).

Primary tumour (T)		Regional lymph nodes (N)		Distant metastasis (M)	
TX	Primary tumour cannot be assessed	NX	Regional lymph node(s) cannot be assessed	M0	No distant metastasis
T0	No evidence of primary tumour	N0	No regional lymph node metastasis	M1	Distant metastasis ^d
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : intraepithelial tumour without invasion of the lamina propria, high grade dysplasia	N1	Metastasis in 1-2 regional lymph nodes		
T1	Tumour invades lamina propria, muscularis mucosae or submucosa	N2	Metastasis in 3-6 regional lymph nodes		
T1a	Tumour invades lamina propria or muscularis mucosae	N3	Metastasis in 7 or more regional lymph nodes		
T1b	Tumour invades submucosa	N3a	Metastasis in 7-15 regional lymph nodes		
T2	Tumour invades muscularis propria	N3b	Metastasis in 16 or more regional lymph nodes		
T3	Tumour invades subserosa				
T4	Tumour perforates serosa (visceral peritoneum) or invades adjacent structures ^{a,b,c}				
T4a	Tumour perforates serosa				
T4b	Tumour invades adjacent structures ^{a,b}				

AJCC, American Joint Committee on Cancer; TNM, tumour–node–metastasis; UICC, Union for International Cancer Control. a The adjacent structures of the stomach are the spleen, transverse colon, liver, diaphragm, pancreas, abdominal wall, adrenal gland, kidney, small intestine and retroperitoneum. b Intramural extension to the duodenum or oesophagus is classified by the depth of greatest invasion in any of these sites including stomach. c Tumour that extends into gastroduodenal or gastroduodenal ligaments or into greater or lesser omentum, without perforation of visceral peritoneum, is T3. d Distant metastasis includes peritoneal seeding, positive peritoneal cytology and omental tumour not part of continuous extension.

Tabla 9. Estadiaje anatómico/grupos pronósticos según AJCC / UICC 8ª edición. De: Lordick et al., «Gastric Cancer»(12).

Stage grouping	T stage	N stage	M stage
Stage 0	Tis	N0	M0
Stage IA	T1	N0	M0
Stage IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
Stage IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
Stage IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3a	M0
Stage IIIA	T4b	N0	M0
	T4a	N1-2	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3a	M0
Stage IIIB	T4b	N1-2	M0
	T3-4a	N3a	M0
	T1-2	N3b	M0
Stage IIIC	T4b	N3a-3b	M0
	T3-4a	N3b	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1

AJCC, American Joint Committee on Cancer; TNM, tumour–node–metastasis; UICC, Union for International Cancer Control.

1.6. Tratamiento y pronóstico (supervivencia) del cáncer gástrico en la actualidad:

El **tratamiento** del CG depende principalmente de la extensión de la enfermedad (estadio).

1.6.1. *Tratamiento de la enfermedad localizada y localmente avanzada:*

Para el estadio IA el tratamiento de elección es la resección endoscópica o la cirugía. Mientras que para los estadios IB – III la utilización de una estrategia multimodal con cirugía y quimioterapia (normalmente peri-operatoria) es el tratamiento de elección. En los últimos años ha habido un cambio en el esquema utilizado para la QT peri-operatoria pasando del triplete con antraciclina, cisplatino y 5-fluorouracilo (esquema ECF; epirrubicina, cisplatino y 5-fluorouracilo)(36) al triplete con taxotere, oxaliplatino y 5-fluorouracilo(37).

1.6.2. *Tratamiento de la enfermedad avanzada o metastásica:*

Para la enfermedad localmente avanzada irresecable (T4b) o el estadiaje IV, la quimioterapia con una intención paliativa es el tratamiento de elección. Tradicionalmente, en la primera línea normalmente se utiliza una combinación de platino y fluoropirimidina y en la segunda línea o posteriores taxanos o irinotecán. Tal y como ha ocurrido en enfermedad localmente avanzada o tratamiento peri-operatorio, en la primera línea en enfermedad avanzada se ha abandonado el uso de antraciclinas (esquema EOX; epirrubicina, oxaliplatino y 5-fluorouracilo)(38), siendo estos esquemas sustituidos por esquemas mejor tolerados como el FOLFOX (oxaliplatino, ácido folínico y 5-fluorouracilo). En los últimos años han sido varios los **agentes diana** evaluados en CG avanzado. La mayor parte de los ensayos clínicos que han evaluado añadir a la quimioterapia convencional una terapia dirigida han obtenido resultados negativos. Sólo se han obtenido mejoras en supervivencia estadísticamente significativas con trastuzumab (anticuerpo monoclonal dirigido a HER2) y en pacientes HER2 positivos(39), con ramucirumab (anticuerpo monoclonal dirigido a VEGFR2)(40,41) y con apatinib (inhibidor tirosina-quinasa (TKI) que inhibe selectivamente VEGFR2)(42). A pesar de ello, el porcentaje de pacientes que se pueden beneficiar de estos fármacos es pequeño. Apatinib sólo está aprobado en Asia. El uso de ramucirumab ha sido restringido

en Cataluña por las agencias reguladoras locales como fármaco de uso excepcional siguiendo criterios de eficiencia. Y por último, el porcentaje global de CG HER2 positivo, en el estudio pivotal de trastuzumab (estudio ToGA(39)) era del 22.1% (más frecuente en tumores de la unión esofagogástrica y en histología intestinal de Lauren que en estómago y en histología difusa), pero este porcentaje baja considerablemente en otros estudios o series así como en la práctica clínica asistencial, siendo un porcentaje de pacientes mucho más bajo el que se puede beneficiar del fármaco.

Más recientemente dos fármacos: trastuzumab deruxtecán, un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a HER2, en el que anticuerpo trastuzumab está unido a deruxtecán, un inhibidor de la topoisomerasa I y trifluridina/tipiracilo (TAS-102), un citotóxico compuesto por un análogo de la pirimidina, trifluridina, y un inhibidor de la timidina fosforilasa, tipiracilo hidroclicorido, han sido añadidos al arsenal terapéutico para el CG avanzado(43,44), estando en la actualidad pendientes de evaluación por parte de las agencias reguladoras locales.

Más abajo, en la **Tabla 10** se resumen los principales datos de los estudios que evaluaron los esquemas nombrados en los dos apartados anteriores.

1.6.3. *Inmunoterapia en cáncer gástrico:*

Des del año 2018 y como ha pasado en otros tipos de tumores, la inmunoterapia con inhibidores del punto de control inmunitario se ha ido introduciendo en la terapéutica del CG. Las proteínas de puntos de control, como PD-L1 (en las células tumorales) y PD-1 (en las células T), ayudan a mantener el control de las reacciones inmunitarias. Como representa la **Figura 9** la unión de PD-L1 a PD-1 impide que la célula T destruya las células tumorales del cuerpo y el bloqueo de la unión de PD-L1 con PD-1 mediante un inhibidor de punto de control inmunitario (anti-PD-L1 o anti-PD-1) permite que las células T destruyan las células tumorales.

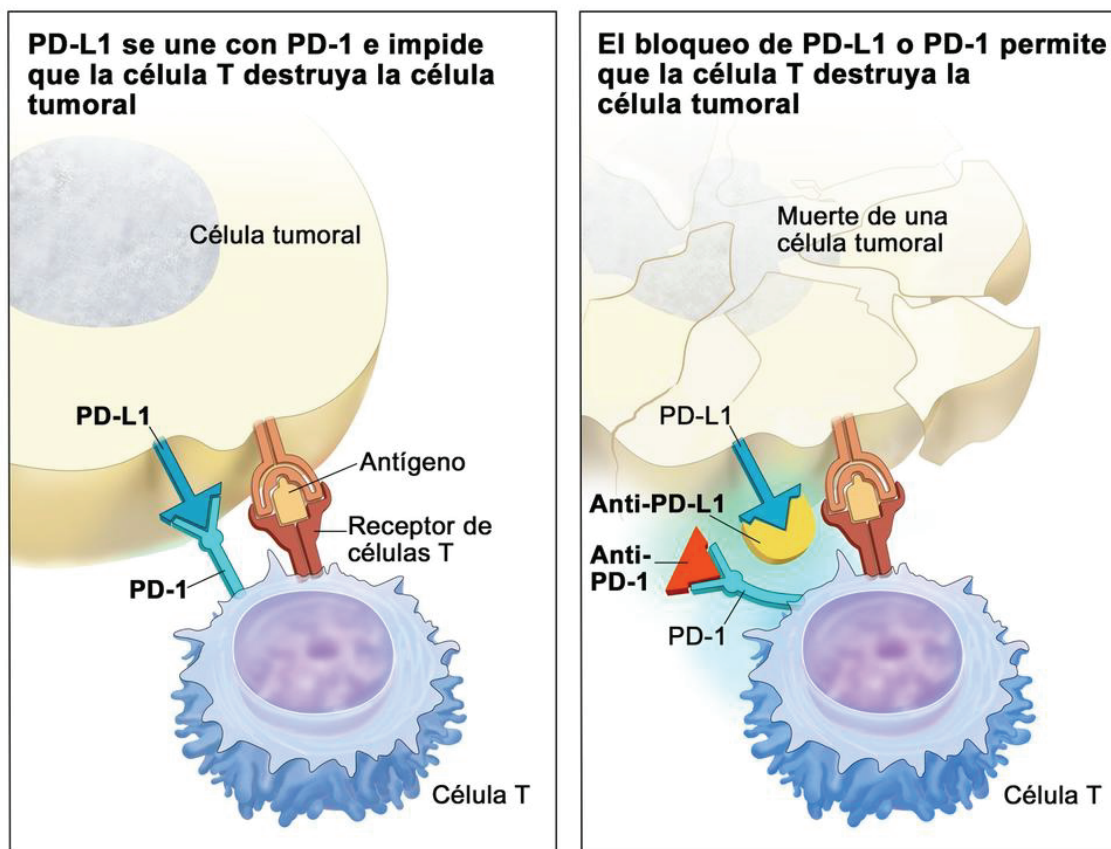


Figura 9. Funcionamiento de los inhibidores del punto de control inmunitario. De: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/inhibidores-de-puntos-de-control>

En el momento actual, tenemos **3 situaciones** donde la inmunoterapia ha demostrado beneficio en el CG.

1. La primera situación es en pacientes con enfermedad avanzada o metastásica HER2 negativa y PD-L1 positiva, donde añadir a la quimioterapia de primera línea (combinación de platino y fluoropirimidina), un anticuerpo monoclonal, anti-PD-1 como nivolumab o pembrolizumab, ha demostrado aumentar la supervivencia global(45,46) (estudios CheckMate 649 y KEYNOTE-859, respectivamente).
2. La segunda situación es en subgrupos muy específicos, a la vez poco frecuentes en CG avanzado, como son pacientes con tumores con inestabilidad de microsatélites (MSI-H, del inglés *microsatellite instability - high*) y/o alta carga mutacional (TMB-H, del inglés *tumor mutational burden - high*) que han presentado progresión a tratamiento de primera línea. En estos subgrupos, el anti-

PD-1 pembrolizumab en monoterapia, ha demostrado muy buenos resultados(47) (estudio KEYNOTE-158).

3. Y finalmente, la tercera situación es en pacientes con enfermedad avanzada o metastásica HER2 positiva, donde añadir a la quimioterapia de primera línea (combinación de platino, fluoropirimidina y trastuzumab), un anticuerpo monoclonal, anti-PD-1, en este caso pembrolizumab, ha demostrado aumentar la tasa objetiva de respuestas (ORR) y supervivencia libre de progresión (SLP) y está pendiente de datos finales de supervivencia global(48) (Estudio KEYNOTE-811).

Más abajo, en la **Tabla 10** se resumen los principales datos de los estudios que evaluaron los esquemas nombrados en este apartado.

No obstante, sabemos que no todos los pacientes con CG responderán a la inmunoterapia o lo harán con la misma intensidad. A lo largo de los últimos años, de la misma forma que ha pasado con la terapia dirigida, varios ensayos clínicos que evaluaban inmunoterapia en CG han tenido resultados negativos. Algunos de estos ensayos, fueron previos a los citados anteriormente y con resultados negativos (ver siguiente apartado, 1.6.5, para más detalles) y otros más recientes, en contexto de enfermedad enfermedad localizada y localmente avanzada. En enfermedad localizada y localmente avanzada, añadir la inmunoterapia a la QT peri-operatoria, ha demostrado aumentar la tasa de respuestas patológicas completas o casi completas(49) (Estudio DANTE) pero no ha conseguido demostrar beneficio en supervivencia(50) (Estudio KEYNOTE-585).

Tabla 10. Tabla resumen de esquemas de tratamiento que han sido utilizados y esquemas actualmente aprobados en CG tanto para el manejo peri-operatorio como enfermedad avanzada/metastásica.

Esquema	Localiz. y estadio enfermedad	Ensayo	Esquema brazo control	Beneficio absoluto en superv.	HR (95% CI)	QoL / tox	ESMO - MCBS score y criterios aprob. EMA
ESQUEMAS PARA ENFERMEDAD LOCALIZADA Y LOCALMENTE AVANZADA (TRATAMIENTO PERI-OPERATORIO)							
ECF*	CG o UEG Enfermedad resecable	MAGIC(36) Fase III NCT 00002615	Cirugía SG a 5 años: 23%	Incremento en SG a 5 años: 13%	SG 0.75 (0.60-0.93)		A (Form 1)
FLOT	CG o UEG Enfermedad resecable	FLOT(37) Fase II/III NCT 01216644	5-FU o capecitabina + cisplatino y epirrubicina mSG: 35 meses SG a 3 años: 48%	Incremento en mSG: 15 meses Incremento en SG a 3 años 9%	SG 0.77 (0.63-0.94)		A (Form 1)
ESQUEMAS PARA ENFERMEDAD AVANZADA O METASTÁSICA (PRIMERA LÍNEA)							
EOX*	CG o UEG Enfermedad avanzada o metastásica que no ha recibido tratamiento previo para enfermedad metastásica	REAL2(51) Fase III NCT	ECF mSG: 9.9 meses	Incremento en mSG: 1.3 meses	SG 0.80 (0.66-0.97)		

Esquema	Localiz. y estadio enfermedad	Ensayo	Esquema brazo control	Beneficio absoluto en superv.	HR (95% CI)	QoL / tox	ESMO - MCBS score y criterios aprob. EMA
Trastuzumab + cisplatino + capecitabina o 5-FU	CG o UEG Enfermedad avanzada o metastásica HER2 positiva que no ha recibido tratamiento previo para enfermedad metastásica	ToGA(39) Fase III NCT 01041404	Quimioterapia mSG: 11.1 meses	Incremento en mSG: 2.7 meses	SG 0.74 (0.60-0.90)		(Form 2a)
Pembrolizumab + trastuzumab, patino y fluoropirimidina ^c	CG o UEG Enfermedad localmente avanzada irresecable o metastásica HER2 positiva	KEYNOTE-811(48) Fase III NCT 03615326	Quimioterapia + trastuzumab + placebo ORR: 51.9% mSLP: 7.2 meses	Incremento en ORR: 22.5% Análisis supervivencia (en pacientes con PD-L1 CPS ≥ 1): Incremento en mSLP: 3.6 meses			2 (Form 2c) Aprob. EMA para enfermedad ad HER2 positiva y CPS ≥ 1
Pembrolizumab + cisplatino y 5-FU o capecitabina y oxaliplatino	CG o UEG Enfermedad avanzada o metastásica HER2 negativa	KEYNOTE-859(46) Fase III NCT 03675737	Quimioterapia + placebo mSG: 11.4 meses (PD-L1 ≥ 1) mSG: 11.8 meses (PD-L1 ≥ 10)	Incremento en mSG: 1.6 meses (PD-L1 ≥ 1) Incremento en mSG: 3.9 meses (PD-L1 ≥ 10)	SG 0.74 (0.65-0.84) SG 0.65 (0.53-0.79)		3 (Form 2a) Aprob. EMA para enfermedad ad HER2 negativa y CPS ≥ 1

Esquema	Localiz. y estadio enfermedad	Ensayo	Esquema brazo control	Beneficio absoluto en superv.	HR (95% CI)	QoL / tox	ESMO - MCBS score y criterios aprob. EMA
Nivolumab + patino y fluoropirimidina	ADC esofagagástric o (esófago distal, CG o UEG) Enfermedad avanzada o metastásica HER2 negativa	CheckMate 649(45) Fase III NCT 02872116	Quimioterapia: FOLFOX o CAPOX mSG: 11.1 meses (PD-L1 ≥5)	Incremento en mSG: 3.3 meses (PD-L1 ≥5)	SG 0.70 (0.61-0.81)		4 (Form 2a) Aprob. EMA para enfermedad ad HER2 negativa y CPS ≥ 5
ESQUEMAS PARA ENFERMEDAD AVANZADA O METASTÁSICA (SEGUNDA LÍNEA Y POSTERIORES)							
Pembrolizumab	CG Enfermedad localmente avanzada irresecable o metastásica MSI-H o dMMR que ha progresado a al menos 1 línea previa de tratamiento	KN 158 (47) Fase II NCT 02628067	Brazo único	ORR; 45.8% mSLP: 11 meses			3 (Form 3)

Esquema	Localiz. y estadio enfermedad	Ensayo	Esquema brazo control	Beneficio absoluto en superv.	HR (95% CI)	QoL / tox	ESMO - MCBS score y criterios aprob. EMA
Ramucirumab	GS o UEG Enfermedad avanzada o metastásica que ha progresado a quimioterapia con platino o fluoropirimidina, cuando no es posible el tratamiento en combinación con paclitaxel	REGARD (41) Fase III NCT 00917384	mSG: 3.8 meses	Incremento en SG: 1.4 meses	SG 0.78 (0.60-0.99)		1 (Form 2ª)
Ramucirumab-paclitaxel	GS o UEG Enfermedad avanzada o metastásica que ha progresado a quimioterapia con platino o fluoropirimidina	RAINBOW (40) Fase III NCT 01170663	Placebo + paclitaxel mSG: 7.4 meses	Incremento en SG: 2.2 meses	SG: 0.81 (0.68-0.96)	No beneficio o en calidad de vida	2 (Form 2a)
Trastuzumab deruxtecan	CG o UEG Enfermedad localmente avanzada o metastásica HER2 positiva en pacientes que han recibido previamente 1 régimen con trastuzumab	DESTINY-Gastric01 y Gastric02 (pacientes no asiáticos) (43) Fase II NCT 03329690 NCT 04014075	Quimioterapia (irinotecán o paclitaxel) ORR: 11.3% mSG: 8.4 meses	ORR: 40.5% Incremento en SG: 4.1 meses Gastric02: ORR: 41.8% mDoR: 8.1 meses	SG: 0.59 (0.39-0.88)		4 (Form 2a)

Esquema	Localiz. y estadio enfermedad	Ensayo	Esquema brazo control	Beneficio absoluto en superv.	HR (95% CI)	QoL / tox	ESMO - MCBS score y criterios aprob. EMA
Trifluridine-tipiracil (TAS-102)	CG o UEG Enfermedad avanzada o metastásica en pacientes que han recibido previamente al menos 2 regímenes para enfermedad avanzada	TAGS (44,52) Fase III NCT 02500043	Placebo mSG: 3.6 meses	Incremento en SG: 2.1 meses	SG: 0.69 (0.56-0.85)	No deterioro en calidad de vida	3 (Form 2a)

En la última columna están indicados los ESMO-MCBS v 1.1 score: escala de magnitud de beneficio clínico según la ESMO(53). NCT, national clinical trial number; UEG, unión esofagagástrica; ADC, adenocarcinoma; SG, supervivencia global; mSG, mediana supervivencia global; mSLP, mediana supervivencia libre de progresión; HR, hazard ratio; ORR, objective response rate (tasa de respuestas); mDoR, median duration of response (duración de respuesta); CI, interval de confianza; 5-FU, 5-fluorouracilo; ECF, epirubicina, cisplatino, 5-fluoruracilo; FLOT oxaliplatino, taxotere, 5-fluorouracilo; FOLFOX, oxaliplatino, leucovorin, 5-fluorouracilo; CAPOX, capecitabina-oxaliplatino; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; CPS, combined positive score; PD-L1, programmed death-ligand; MSI-H, inestabilidad de microsatélites; dMMR, deficient DNA mismatch repair; FDA, food and drug administration; EMA european medicines agency. QoL, análisis calidad de vida. Tox: toxicidad. *Sombreados en azul, esquemas con que se trataron la mayor parte de los pacientes del proyecto, no utilizados en la actualidad a expensas de FLOT en neoadyuvancia y FOLFOX en primera línea paliativa.

1.6.4. **Biomarcadores predictivos de respuesta en cáncer gástrico:**

- **HER2:** HER2 ha sido durante mucho tiempo el único biomarcador predictivo de respuesta a terapia diana en CG y continua siendo un marcador obligatorio en el estudio inicial del CG. La **Figura 10** muestra el algoritmo de evaluación de HER2 usado a nivel asistencial. La determinación de HER2 se realiza en primer lugar mediante inmunohistoquímica, considerándose HER2 positivos y por lo tanto candidatos a trastuzumab, aquellos pacientes con resultado de inmunohistoquímica de *score 3 cruces*. A aquellos pacientes con resultado de inmunohistoquímica de *score 2 cruces* se les realiza un test de hibridación in situ para valorar la amplificación del gen, los pacientes con amplificación positiva también se consideran HER2 positivos y por lo tanto candidatos a trastuzumab.

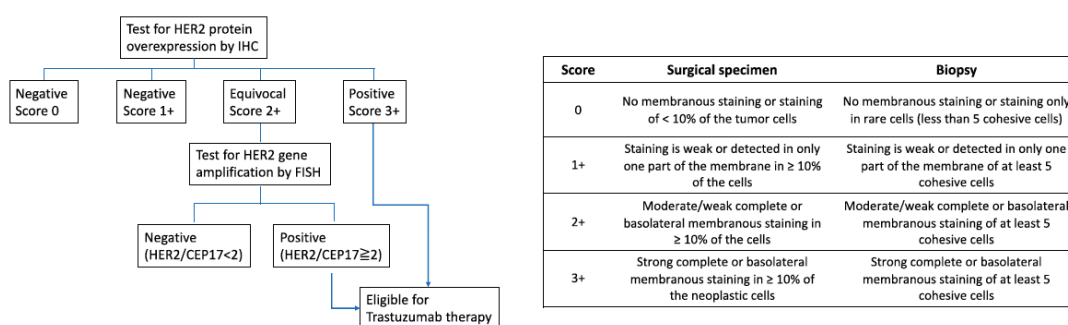


Figura 10. Algoritmo de test HER2 por inmunohistoquímica y hibridación in situ. De: Bang et al., «Trastuzumab in Combination with Chemotherapy versus Chemotherapy Alone for Treatment of HER2-Positive Advanced Gastric or Gastro-Oesophageal Junction Cancer (ToGA)»(39). *HER2*, human epidermal growth factor receptor 2; *IHC* (*IHQ*, inmunohistoquímica); *FISH*, fluorescence in situ hybridization; *CEP17*, sonda centromérica del cromosoma 17.

- **PD-L1:** La expresión de PD-L1, generalmente determinada por inmunohistoquímica se ha propuesto como un biomarcador predictivo de respuesta a la inmunoterapia en varios tumores. Para la valoración de la inmunotinción de PD-L1, tanto el CPS (del inglés *combined positive score*) como el TPS (del inglés *tumor positive score*) se consideran métodos válidos pero en CG se ha propuesto CPS como el método más útil(54). La

La **Figura 11** representa de forma gráfica la valoración de PD-L1 por TPS y CPS. Se considera el punto de corte de CPS superior o igual a 1 como expresión positiva de PD-L1.

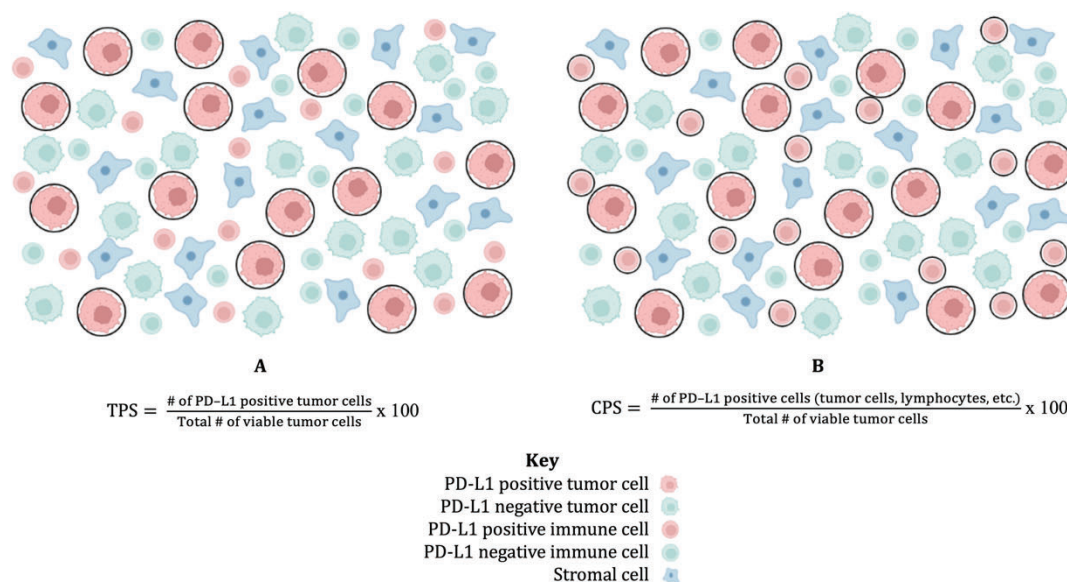


Figura 11. Cálculo de TPS y CPS para la inmunotinción de PD-L1. De: « Defining PD-L1 Expression in Gastric Cancer ». <https://dailynews.ascopubs.org/doi/10.1200/ADN.23.201472/full>. PD-L1, del inglés *programmed death-ligand*; TPS, del inglés *tumor positive score*; CPS, del inglés *combined positive score*.

En CG se han reportado prevalencias de expresión de PD-L1 ($CPS \geq 1$) de hasta un 40% a un 65%(12,55). En general, no sólo en CG sino también en otras patologías, se ha descrito más beneficio de la inmunoterapia como más alto es el nivel de expresión de PD-L1, pero en CG ha habido resultados dispares en las respuestas a inmunoterapia según el nivel de expresión de PD-L1. Un buen ejemplo de este fenómeno es cuando revisamos los ensayos que evalúan añadir inmunoterapia a la primera línea de tratamiento para la enfermedad avanzada o metastásica que se muestran resumidos en la **Tabla 11**. Mientras que en los ensayos CheckMate 649 y KEYNOTE-859 comentados anteriormente (**Tabla 10**), al añadir nivolumab o pembrolizumab a la quimioterapia, el grado de beneficio en

supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) en los CPS más altos ≥ 5 o ≥ 10 respectivamente, era mayor que en los CPS ≥ 1 y en toda la población, en otros ensayos como en el KEYNOTE-062, pembrolizumab combinado con quimioterapia no conseguía mejorar ni SLP ni SG respecto quimioterapia sola, en toda la población (en este caso, CPS ≥ 1) y la combinación tampoco era superior para el subgrupo de pacientes con CPS ≥ 10 . Si bien, específicamente en el ensayo KEYNOTE-062, los resultados negativos del estudio se puedan explicar en parte por dificultades/complejidad de su diseño estadístico y por la menor “n” de pacientes (500 en el brazo de la combinación vs 1500 en los nuevos ensayos clínicos CheckMate 649 y KEYNOTE-859), de forma general, el hecho de que en los ensayos clínicos con inmunoterapia en CG se hayan utilizado diferentes esquemas de quimioterapia (con oxaliplatino o sin oxaliplatino), varios anticuerpos frente a PD-L1, varios puntos de corte de CPS en los objetivos, dificulta la interpretación y la comparación de los datos cruzados entre estos ensayos. Además se ha descrito heterogeneidad en la tinción de PD-L1 debido a la heterogeneidad intra-tumoral y intra-paciente (diferencias entre el tumor primario y las metástasis), la expresión de PD-L1 transitoria en varios tipos celulares del microambiente tumoral, así como la alteración de la expresión de PD-L1 tras interacción con células inmunitarias efectoras o como respuesta a tratamientos anteriores(56–60).

Tabla 11. Ensayos que evalúan añadir inmunoterapia a la primera línea de tratamiento para CG con enfermedad avanzada o metastásica HER2 negativa (excluidos ensayos dirigidos principalmente a esófago y enfermedad HER2 positiva) y sus características en cuanto al biomarcador PD-L1.

	Tipo población	Nº pac	Régimen de QT usada	Selección PD-L1	Estratifica por PD-L1	Ab PD-L1 (IHQ)	Cohortes objetivo primario (nivel de expresión de PD-L1)*
					TPS o CPS		
KEYNOTE-062(61) QT + Pembrolizumab *(estudio con 2 brazos experimentales también pembro monoterapia)	Varias regiones geográficas	763 (507 brazo combinación)	cisplatino + 5-FU o capecitabina	SI	No aplica	22C3 pharmDx	SG y SLP en toda la población (CPS ≥ 1) SG (PD-L1 CPS ≥ 10) SLP (PD-L1 CPS ≥ 10)
ATTRACTION-4(62) QT + Nivolumab	Asiática	724	S-1 + oxaliplatino o capecitabina + oxaliplatino	NO	Si	----	SG* SLP*
CheckMate 649(45) QT + Nivolumab	Varias regiones geográficas	1581	capecitabina + oxaliplatino o FOLFOX	NO	Si TPS	28-8 pharmDx	SG (PD-L1 CPS ≥ 5) SLP (PD-L1 CPS ≥ 5)
KEYNOTE-859(46) QT + Pembrolizumab	Varias regiones geográficas	1579	cisplatino + 5-FU o capecitabina + oxaliplatino	NO	Si CPS	22C3 pharmDx	SG (ITT, CPS 1, CPS 10)

En negrita se muestran los objetivos primario con beneficio estadísticamente significativo a favor de la combinación.

*En toda la población incluida.

- Otros biomarcadores bien conocidos para inmunoterapia en CG son una elevada inestabilidad de microsatélites (**MSI-H**) o deficiencia en el sistema de reparación del ADN (dMMR), que representa aproximadamente un 8-25% de los pacientes con CG y una elevada carga mutacional (**TMB-H**) (≥10 mutaciones/mega base), observada en 13-17% de los pacientes con CG. Estos dos biomarcadores se han asociado a alta tasa de respuestas a inmunoterapia(47,63).

La **Tabla 12** (más abajo), resume los biomarcadores tratados en este apartado.

1.6.5. *Biomarcadores emergentes en cáncer gástrico:*

A parte de los biomarcadores bien establecidos ya comentados anteriormente, recientemente en CG se están posicionando otras dos proteínas, FGFR2 (Fibroblast Growth Factor Receptor 2) y CLDN 18.2 (Claudina 18.2), como biomarcadores importantes en este tipo de cáncer.

-FGFR2: El receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos, es un receptor tirosina-quinasa transmembrana que pertenece a una familia de proteínas que regulan muchas vías “dowstream”, incluyendo la vías de MAPK y AKT, que son esenciales para el crecimiento, la supervivencia y la migración celular. La activación de la señal de FGFR puede ser causada por la amplificación del gen, mutaciones activadoras, y translocaciones o fusiones cromosómicas. Específicamente la amplificación del gen *FGFR2* ha demostrado ser un factor de mal pronóstico en pacientes con CG avanzado y un alto número de copias del mismo gen (igual o más de 30) se ha asociado con SLP y SG más cortas tras quimioterapia(64). La prevalencia de amplificación de FGFR2 es poco frecuente en CG, aproximadamente entre 4-7.4%, y se ha descrito un nivel no despreciable de heterogeneidad intra-tumoral y también intra-paciente (diferencias entre el tumor primario y las metástasis)(65,66). La detección de amplificación de FGFR2 a nivel molecular usando técnicas de ISH o NGS es compleja por su baja frecuencia por lo que se acepta la detección de la sobreexpresión de FGFR2 isoforma IIb (FGFR2b) por IHQ como método de screening para detectar los pacientes que podrían beneficiarse de la terapia dirigida a FGFR2. Un nuevo inhibidor de FGFR2, bemarituzumab, es el primer anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado de su clase que se une selectivamente a FGFR2b. El ensayo clínico FIGHT(67), un estudio fase II aleatorizado, ha demostrado que añadir bemarituzumab a la quimioterapia de primera línea aumenta la SLP, SG y ORR. En este estudio, que incluía pacientes con sobreexpresión de FGFR2b y también con amplificación de *FGFR2* (detectado por análisis de ctDNA), aproximadamente un 30% de los pacientes sobreexpresaron FGFR2b. De forma interesante, el análisis de biomarcadores indicó que a mayor sobreexpresión de FGFR2b, mayor era el beneficio del fármaco y que el beneficio de bemarituzumab era independiente del estado de amplificación del gen. A partir de los resultados positivos del estudio FIGHT, el fase III de validación en FGFR2b sobreexpresados está en marcha(68).

-CLDN18.2: Las claudinas son una familia de proteínas transmembrana que constituyen uno de los componentes principales del complejo de la estrecha unión intercelular epitelio-endotelio. La Claudina 18.2 es un miembro de la familia de las claudinas que está presente en la mucosa gástrica normal. Esta proteína queda más expuesta y accesible tras la transformación maligna del tejido dado que las estrechas uniones intercelulares se rompen. La positividad (sobreexpresión) de CLDN18.2, ha sido reportada en 24-33% de los pacientes con CG(69). Zolbetuximab, es un anticuerpo monoclonal IgG1 quimérico contra CLDN18.2, que se une a la superficie de la célula tumoral y actúa activando dos vías diferentes del sistema inmunitario: la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la citotoxicidad dependiente del complemento. Recientemente se han reportado los resultados de los ensayos clínicos fase III(70,71), que demuestran beneficio en supervivencia de añadir zolbetuximab a la quimioterapia de primera línea en pacientes que presentan una alta expresión de CLDN18.2, definida como una tinción en membrana de moderada a fuerte (2+/3+) en al menos el 75% de las células tumorales. De forma interesante, inicialmente la sobreexpresión de CLDN18.2 se describió asociada al subtipo difuso de Lauren y a EBV(69). Trabajos más recientes, han descrito la sobreexpresión de CLDN18.2 con una distribución similar en MSI, EBV, HER2 y en los “todo negativos”(72).

En la **Tabla 12**, se indican los principales biomarcadores predictivos de respuesta en CG, tanto los bien establecidos como los emergentes.

Tabla 12. Tabla resumen de biomarcadores en CG.

Biomarcadores establecidos	Técnica de análisis (método valoración)	Porcentaje en CG	Fármaco
HER2 positivo(39,73)	IHQ y ISH	5-25%	Trastuzumab / Trastuzumab deruxtecan
PD-L1 positivo(55)	IHQ (CPS)	40-65%	inhibidores del punto de control inmunitario
MSI-H/dMMR(1,63)	PCR o CGP	8-25%	inhibidores del punto de control inmunitario
TMB-H(47)	PCR o CGP	13-17%	inhibidores del punto de control inmunitario
Biomarcadores emergentes	Evaluación	Porcentaje	Fármaco
FGFR2 amp(64–66)	IHQ FGFR2b*	4-7.4%	Bemarituzumab
FGFR2b positivo	IHQ FGFR2b	30%	Bemarituzumab (67,68)
CLDN18.2 high(69,72)	IHQ	24-33%	Zolbetuximab (70,71,74)

HER2, *human epidermal growth factor receptor 2*; PD-L1, *programmed death-ligand*; MSI-H, inestabilidad de microsatélites; dMMR, *deficient DNA mismatch repair*; TMB-H, *tumor mutation burden – high*; FGFR2b, fibroblast growth factor receptor 2b (isoform lib); CLN18.2, claudina 18.2; IHQ, inmunohistoquímica; ISH, hibridación in situ; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; CGP, del inglés comprehensive genomic profiling; CPS, combined positive score.

*La detección de amplificación de FGFR2 a nivel molecular usando técnicas de ISH o NGS sería más compleja por su baja frecuencia por lo que se acepta la detección de la sobreexpresión de FGFR2 isoforma IIb (FGFR2b) por IHQ como método de screening para detectar los pacientes que podrían beneficiarse de la terapia dirigida a FGFR2.

1.6.6. *Pronóstico (supervivencia) del cáncer gástrico:*

El pronóstico del CG depende principalmente de la extensión de la enfermedad, recogida con la estadificación TNM del tumor. En la **Tabla 13** se muestran las tasas relativas de supervivencia según la extensión de la enfermedad. Actualmente hasta un 80-90% de los casos diagnosticados de CG tienen afectación ganglionar o metástasis, con una tasa relativa de supervivencia a 5 años del 33%, si afectación ganglionar y 6%, si presencia de metástasis(75). Estos datos confirman el especial mal pronóstico de este tipo de tumores. Otros factores pronósticos propuestos han sido el status de HER2, la edad, la población asiática o no, la localización del tumor (unión esofagogástrica o estómago distal) y factores relacionados con la cirugía como la extensión de la resección/linfadenectomía o si queda enfermedad residual (cirugía R0, R1 o R2) o la presencia de infiltración vascular en la pieza quirúrgica(12,35). Para el CG no metastásico, a pesar de la aplicación de estrategias multimodales descritas anteriormente, la tasa de supervivencia global (SG) a 5 años no supera el 50% en los estudios más recientes que incluyen enfermedad localizada y regional candidata a cirugía y quimioterapia perioperatoria(37). Para el CG avanzado o

metastásico, a pesar de los esfuerzos en los últimos años para aumentar la supervivencia de los pacientes y las recientes incorporaciones y combinaciones de fármacos, la mediana de supervivencia global (mSG) de los pacientes con CG avanzado o metastásico con enfermedad HER2 negativa (la población más frecuente) en nuestro medio, sigue siendo de alrededor de 1 año de vida(45). Solamente subgrupos pequeños y muy seleccionados de pacientes superan estas cifras, ya sea con terapia dirigida (algunos pacientes con enfermedad HER2 positiva que reciben tratamiento anti-HER2) o con inmunoterapia (MSI o TMB-H).

Tabla 13. Tabla que muestra las tasas relativas de supervivencia a 5 años del CG según extensión enfermedad. Base de datos de SEER*

Etapas SEER	Tasa relativa de supervivencia a 5 años
Localizado	72%
Regional	33%
Distante	6%
Todas las etapas SEER combinadas	33%

Cifras basadas en personas diagnosticadas con cáncer de estómago entre 2012 y 2018. *SEER = Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales, del inglés *Surveillance, Epidemiology, and End Results*. Definiciones etapas: CG localizado: no hay signos de que el cáncer se haya propagado fuera del estómago. CG regional: el cáncer se ha propagado fuera del estómago hacia estructuras o ganglios linfáticos cercanos. CG distante: el cáncer se ha propagado a partes distantes del cuerpo, como al hígado.

1.7. Valor pronóstico de las clasificaciones moleculares

Ya hemos comentado que TCGA, en su análisis inicial de los datos clínicos/”outcomes”, no encuentra diferencias estadísticamente significativas en supervivencia entre los 4 subtipos(1). Posteriormente se describen trabajos que muestran los subtipos EBV y MSI como subtipos de mejor pronóstico(76–78). En el análisis de supervivencia de ACRG, el subtipo EMT es el que tiene peor pronóstico, seguido del subtipo con expresión normal de p53, el subtipo con expresión p53 aberrante y finalmente el subtipo MSI(18). Setia y Ahn. et al. también analizan la supervivencia de sus pacientes, Setia et al. observa una tendencia a una mejor supervivencia de los subtipos EBV y MSI pero sin alcanzar la significación estadística(21) y Ahn et al. ve claras diferencias entre subtipos siendo el subtipo MSI el que presenta mejor pronóstico, seguido de EBV, del grupo con expresión normal de p53, del grupo con expresión aberrante de p53 y finalmente del subtipo de EMT que es el que muestra peor pronóstico(23).

1.8. Valor predictivo de las clasificaciones moleculares

Ni TCGA ni ACRG correlacionaban los subtipos moleculares de CG con la respuesta a tratamientos. Posteriormente, en la literatura se han descrito algunas diferencias en la respuesta a inmunoterapia y quimioterapia según o en función de los subtipos moleculares, las cuales se describen a continuación.

1.8.1. *Potencial valor predictivo de respuesta a inmunoterapia de las clasificaciones moleculares.*

Teniendo en cuenta la información aportada por los distintos estudios que realizan clasificaciones moleculares podemos anticipar que al menos dos subtipos, los **EBV** y los **MSI**, son grupos “más inmunogénicos” y serán/son buenos candidatos a inmunoterapia basada en inhibidores del punto de control inmunitario(47,79). En cuanto el subtipo **CIN**, grupo más frecuente del TCGA, es un subtipo que se caracteriza por presentar una alta aneuploidía o extensa variación en el número de copias (CNV); esta característica molecular se ha relacionado con una expresión reducida de marcadores de células inmunes infiltrantes citotóxicas, especialmente de células T CD8+ y una expresión aumentada de marcadores de proliferación celular. Además los pacientes con alta CNV presentan un microambiente tumoral más pro-tumorigénico e inmunosupresor, así como una ratio de expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IFN- γ , IL-1A, IL-1B, and IL-2) versus moléculas inmunosupresoras (IL-4, IL-10, IL-11, and TGFB1) menor a la de los pacientes con baja CNV(80). Estas características sugieren una peor respuesta a inmunoterapia basada en inhibidores del punto de control inmunitario, al menos en monoterapia. Estrategias de combinación de inhibidores de punto de control inmunitario con otros fármacos que puedan cambiar el microambiente tumoral “adverso” a uno “más favorable” a la inmunoterapia podrían ser una buena estrategia para revertir esta “resistencia natural” a la inmunoterapia de este subtipo. Esta “resistencia natural” del grupo CIN, grupo mayoritario, podría explicar que en los ensayos clínicos fase III que han evaluado la adición de inmunoterapia a la primera línea de quimioterapia en CG HER2 negativo, hayan tenido resultados más modestos que la misma estrategia en otros tipos de tumores(45,61). Esta situación cambia en los **CIN-HER2 positivos**, sabemos

que la activación del oncogén HER2 produce cambios en el microambiente tumoral que pueden favorecer la respuesta a inmunoterapia y que el tratamiento con trastuzumab aumenta la expresión de PD-L1(81). En esta línea recientemente, en CG, se han publicado los primeros resultados, positivos, de la combinación de quimioterapia + trastuzumab (anti-HER2) + pembrolizumab (anti-PD-1)(48). Y finalmente, el subtipo **GS**, presenta menos proporción de PD-L1 positivos(82), característica que irá en contra de la respuesta a inhibidores del punto de control inmunitario.

1.8.2. Potencial valor predictivo de respuesta a quimioterapia o a terapia anti-HER2 de las clasificaciones moleculares.

Varios estudios que han reportado la falta de beneficio de la quimioterapia perioperatoria o adyuvante en CG en el subtipo **MSI**(83). No obstante, estos resultados no se han confirmado en estudios de quimioterapia de primera línea como en el estudio KEYNOTE-062 en el cual los pacientes MSI tratados con quimioterapia sola, conseguían una tasa global de respuestas, del inglés overall response rate (ORR), similar que la población no-MSI(61). Los datos en el subtipo **EBV** han sido más controvertidos; mientras que en los primeros estudios estos pacientes parecían tener mejores respuestas a la quimioterapia, estudios más recientes y retrospectivos, muestran que los EBV podrían comportarse de la misma manera que el subtipo MSI, y obtener menos beneficio de la quimioterapia. Estos estudios reportan peores resultados tanto en quimioterapia neoadyuvante como en quimioterapia de primera línea en los pacientes EBV en comparación a los que no son EBV(84,85). En cuanto a la respuesta a quimioterapia del subtipo **CIN**, se han reportado trabajos que sugieren que este subtipo es el que más se beneficia de la quimioterapia adyuvante(78). En cuanto los **CIN-HER2 positivos** y la respuesta a terapia anti-HER2, cuando analizamos más profundamente los datos del estudio ToGA (trastuzumab, anti-HER2 añadido a la quimioterapia de primera línea) vemos que sólo un 50% de los pacientes del grupo tratado con trastuzumab se beneficiaban en términos de respuesta y que en la mayoría de los pacientes la enfermedad acababa progresando en pocos meses, siendo la mediana de duración de respuesta de 6.9 meses en el grupo tratado con trastuzumab(39). Los mecanismos de resistencia a terapias anti-HER2 han sido ampliamente estudiados en cáncer de mama y los podemos clasificar en 3 tipos: a) mutaciones en HER2, b) aumento de expresión o amplificación de otros receptores tirosina-quinasa (HER3, EGFR, IGF y c-MET por ejemplo) y c) alteración en rutas de

señalización intracelular como la vía PIK3/Akt/mTOR. En patología esofagogástrica, los trabajos publicados al respecto no son tantos, pero se han descrito similares mecanismos de resistencia(86). Además, como otros mecanismos de resistencia a terapia anti-HER2 en CG se ha descrito una alta tasa de heterogeneidad basal intra-tumoral y intra-paciente (diferencias entre el tumor primario y las metástasis) en cuanto a la sobreexpresión o amplificación de HER2(87) y la pérdida de HER2 tras recibir tratamiento con trastuzumab, descrita hasta en un 30% de los casos(88). El subtipo **GS**, que es un subgrupo enriquecido en histología difusa de Lauren, disponemos de evidencia respecto a que el tipo intestinal de Lauren y el tipo difuso de Lauren responden diferente a la quimioterapia, siendo el subtipo difuso el que menos responde(89). Además, en el trabajo ya comentado anteriormente de Sohn et al. se muestra que el subtipo GS es el que menos se beneficia de la quimioterapia adyuvante(78). En cuanto a **PD-L1** y respuesta a la quimioterapia, la infiltración del tumor por células inmunitarias y la expresión de PD-L1 en el tumor y en el estroma se han relacionado con mejor respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en otros tumores(90). En CG, los datos de respuesta a la quimioterapia en función de PD-L1 son escasos y las diferencias no tan claras. Si nos fijamos en el análisis por subgrupos del estudio CheckMate 649(45) en contexto de enfermedad avanzada, la ORR de los pacientes con PD-L1 negativo (CPS < 1) que reciben quimioterapia sola es de 41% mientras que la ORR de los pacientes PD-L1 positivos es de 46% y 45% (pacientes con CPS > 1 y > 5%, respectivamente).

Y finalmente, y en relación con las clasificaciones moleculares que combinan la inmunohistoquímica con la detección de mutaciones y variaciones en el número de copias mediante técnicas de next generation sequencing (NGS), se han descrito algunas alteraciones moleculares en genes que se encuentran mutados en CG, como predictoras de respuesta a algunas de las quimioterapias usadas de forma habitual en CG. Como ya se ha comentado anteriormente la quimioterapia utilizada actualmente en CG, independientemente del contexto de enfermedad (localmente avanzada o metastásica), es normalmente la combinación de un platino y una fluoropirimidina. Se ha descrito mayor sensibilidad a componentes platinados en tumores que presentan deficiencias en el mecanismo de reparación del ADN mediante recombinación homóloga (HRD de las siglas en inglés, Homologous Recombination Deficiency)(91). Este subgrupo de tumores con estas alteraciones, lo podemos definir como tumores con “fenotipo BRCAness” que es un término adoptado y descrito inicialmente en cáncer de ovario(92) y que describía

aquellos tumores esporádicos de ovario con características fenotípicas similares a los tumores con mutaciones germinales de BRCA. Y por último, sobre el valor predictivo de respuesta a inmunoterapia y quimioterapia de las mutaciones de *ARID1A*, se han publicado resultados contradictorios, siendo los estudios más recientes los más favorables a su falta de valor predictivo(93).

2. JUSTIFICACIÓN

Ninguna de las clasificaciones para CG “clásicas”, histopatológicas, utilizadas hasta el momento ha demostrado tener utilidad en la selección del mejor tratamiento para el paciente. La propuesta de clasificación molecular del TCGA en 4 subtipos: EBV, MSI, CIN y GS resulta muy interesante pero no es aplicable a la práctica clínica habitual por su complejidad técnica y sus costes. Las clasificaciones moleculares “más pragmáticas” reportadas posteriormente han utilizado técnicas disponibles en la práctica clínica rutinaria pero la mayoría de estudios se han realizado en población asiática o en cohortes con poca representación de enfermedad avanzada o metastásica, no reportan de forma extensa datos clínicos ni de respuesta/beneficio del tratamiento y en su mayoría realizan el análisis sobre pieza quirúrgica de gastrectomía y no sobre biopsia gástrica endoscópica que es la muestra que recibimos en primer lugar en nuestro día a día, durante el proceso diagnóstico asistencial.

Teniendo en cuenta la situación expuesta anteriormente, nos hacemos dos preguntas:

1. *Podemos aplicar a nuestros pacientes diagnosticados de Cáncer Gástrico una buena clasificación basada en las características moleculares del tumor y realizando el análisis en biopsia endoscópica diagnóstica?*
2. *Esta clasificación puede ayudarnos a seleccionar la mejor opción de tratamiento para un determinado paciente?*

3. HIPÓTESIS

Se proponen dos hipótesis.

Primera hipótesis, está hipótesis consta de dos partes:

- A.** Es factible aplicar a nuestros pacientes con cáncer gástrico una clasificación en subtipos basada en las características moleculares del tumor, usando un método sencillo de análisis de marcadores de expresión proteica por inmunohistoquímica, coste-efectivo y realizado sobre la biopsia gástrica endoscópica del diagnóstico.
- B.** El conocimiento de los subtipos y las alteraciones moleculares del tumor permitirá estratificar pronóstico, beneficio clínico de la quimioterapia y seleccionar mejor los tratamientos dirigidos para nuestros pacientes, identificando a los casos candidatos a recibir los tratamientos específicos de qué disponemos, y pensar en alternativas terapéuticas para los pacientes potencialmente resistentes.

Segunda hipótesis:

Nuestra clasificación molecular del cáncer gástrico basada en **análisis clúster o agrupamiento jerárquico no supervisado**, a partir de los resultados de los biomarcadores de expresión seleccionados, puede ser más informativa que las propuestas de clasificaciones anteriores.

4. OBJETIVOS

Esta tesis doctoral tiene los siguientes objetivos principales:

1. **Demostrar la factibilidad** de aplicar una clasificación molecular para el cáncer gástrico basada en el análisis de las características moleculares del tumor en la **biopsia gástrica endoscópica** del diagnóstico
2. Proponer nuevas estrategias de clasificación, que sean sencillas y coste-efectivas: adaptando el algoritmo de Setia et al.(21) al conocimiento actual en cáncer gástrico, creando un **algoritmo de Setia adaptado** y **clasificar** nuestra serie de tumores gástricos con este algoritmo adaptado, así como mediante el **análisis clúster o agrupamiento jerárquico no supervisado**, a partir del análisis de los perfiles de expresión proteica (IHK) o génica (ISH) de una serie de biomarcadores seleccionados.
3. **Evaluar la utilidad** de estas dos clasificaciones moleculares para informar de la biología tumoral y seleccionar cual es la mejor estrategia de tratamiento para nuestros pacientes.

Y los siguientes objetivos secundarios:

1. Analizar y comparar la supervivencia y el beneficio de la quimioterapia en los diferentes subgrupos resultantes en las dos clasificaciones moleculares basadas en perfiles de expresión por IHQ.
2. Analizar el **perfil mutacional** de nuestra serie de tumores gástricos con un panel de mutaciones somáticas recurrentes en cáncer gástrico.
3. Analizar la asociación entre las variables clínicas y moleculares analizadas individualmente, y nuestras variables de eficacia o dependientes.

5. METODOLOGÍA

5.1. Tipo de estudio

Estudio observacional, transversal, no intervencionista, unicentro

5.2. Población del estudio

El presente estudio recoge pacientes diagnosticados de CG, incluyendo cáncer gástrico y unión esofagogástrica, especialmente subtipos Siewert II y III, valorados en la unidad funcional de tumores esofagogástricos de HUB - ICO Hospitalet.

5.2.1. *Creación de la base de datos (BBDD) y Selección de la muestra:*

En primer lugar se crea una BBDD con variables clínico-patológicas y moleculares, donde se incluyen de forma consecutiva y prospectiva un total de 162 pacientes diagnosticados de CG, valorados en la unidad funcional de tumores esofagogástricos de HUB - ICO Hospitalet entre de mayo 2016 y noviembre 2019. De los 162 pacientes incluidos en la serie inicial, el análisis final sólo incorpora 109. Las principales causas de pérdida fueron no poder disponer finalmente del bloque parafinado y material insuficiente en la muestra para el análisis. Estos números se detallarán más ampliamente en el apartado de resultados. El cierre del seguimiento de los pacientes, fue en septiembre 2022.

5.2.2. *Criterios de inclusión/exclusión:*

Criterios de inclusión:

- Tener diagnostico histológico confirmatorio de carcinoma.
- Poder disponer de muestra en bloque parafinado.
- Poder comprender y firmar consentimiento informado por parte del paciente.
- Poder tener acceso a información clínica y de seguimiento.

Criterios de exclusión:

- Tipo histológico diferente al adenocarcinoma, como por ejemplo: linfoma, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), tumor neuroendocrino o melanoma.
- Material insuficiente en la muestra.

- Tener otro tumor primario concomitante

Para el análisis de beneficio del tratamiento fueron excluidos los pacientes que no habían recibido tratamiento con quimioterapia.

5.3. Fuente de obtención de muestra y recogida de datos

Las muestras de tumor para los análisis son muestras obtenidas a partir de la biopsia gástrica endoscópica del diagnóstico, cedidas con autorización por el Biobanc IDIBELL y el Servicio de anatomía patológica de HUB-ICO-IDIBELL. Son muestras fijadas con formalina y embebidas en parafina (FFPE, *formalin fixed paraffin embeded*). De los pacientes operados teníamos disponible también la pieza quirúrgica, material que sólo se utilizó en caso de necesidad si faltaba material para completar los análisis y siempre en aquellos casos que no habían recibido quimioterapia previa a la cirugía. Los datos clínicos y de seguimiento de los pacientes se han obtenido de la historia clínica.

5.3.1. Aclaración sobre las muestras:

Las muestras tumorales analizadas son restantes o remanentes derivados de las biopsias que en su momento se obtuvieron con finalidad asistencial (diagnóstico de la enfermedad oncológica). Toda aquella parte sobrante y no utilizada en este estudio se ha devuelto y depositado en el servicio de origen.

5.4. Definición de las variables clínico-patológicas y moleculares de la BBDD.

Los datos clínico-patológicos y moleculares recogidos en la BBDD del estudio se muestran en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Datos clínico-patológicos y moleculares recogidos en la BBDD del estudio.

Datos clínico-patológicos y moleculares	Abreviatura	Nombre y definición	Escala y gradación
Identificación	ID	Número asignado al participante en la BBDD	Números enteros desde 1
Identificación_1	ID_MolGas	Número asignado al participante en el laboratorio	MolGas-Números enteros desde 001
IHQ informativa	IHQ	IHQ informativa o no	1= si 2= no
Panel mutacional informativa	Panel	Panel mutacional informativo o no	1= si 2= no
Edad	Edad	Edad en años en el momento del diagnóstico	Números enteros
Sexo	Sexo	Sexo del paciente	0= mujer 1= varón
Diagnóstico	Fecha dx	Fecha del diagnóstico	dd/mm/aa
ECOG	ECOG	Escala de estado funcional	1= 0-1 2= 2 o más 3= no reportado (NR)
Localización enfermedad	Localización	Localización enfermedad	1= UEG 2= CG 3= NR
Tipo Lauren o WHO	Lauren/WHO	Tipo histopatológico de Lauren o WHO equivalente	1= intestinal o papilar/tubular/mucinoso 2= difuso o pobremente cohesivo 3= mixto

Datos clínico-patológicos y moleculares	Abreviatura	Nombre y definición	Escala y gradación
			4= indiferenciado o pobremente indiferenciado 5= NR
Situación enfermedad	Setting	Situación enfermedad en el diagnóstico	1= enfermedad no metastásica 2= enfermedad avanzada o metastásica
Primer tratamiento	Tratamiento_1	Recibe tratamiento para el cáncer	1= si 2= no
Tipo de tratamiento	Tipo tratamiento_1	Cual es el primer tratamiento que recibe el paciente	0= no tratamiento 1= cirugía 2= quimioterapia neoadyuvante 3= quimioterapia paliativa 4= quimioterapia neoadyuvante antes de CRS +/- HIPEC
Cirugía	IQ	Recibe cirugía curativa?	1= si 2= no
Fecha Cirugía	Fecha IQ	Fecha de la cirugía	dd/mm/aa
cTNM	cTNM	TNM clínico en pacientes candidatos a cirugía radical tratados con neoadyuvancia	1= T3-T4N0 2= T1-T3N+ 3= T4N+ 4= anyT anyN cyt+ o mol+
pTNM	pTNM	TNM patológico en pacientes candidatos a cirugía radical sin neoadyuvancia.	1= T1N0 2= T2N0 3= T3N0 4= T4N0 5= anyTN1 6= anyTN2 7= anyTN3 8= cyt+ o mol+ o M1
Grado de Regresión	GR	Grado de regresión anatomopatológico tras tratamiento neoadyuvante peri-operatorio según Becker(94)	1= TRG1a (0% de tumor residual) 2= TRG1b (menos del 10% de tumor residual) 3= TRG2 (10-50% de tumor residual)

Datos clínico-patológicos y moleculares	Abreviatura	Nombre y definición	Escala y gradación
			4= TRG3 (más de 50% de tumor residual)
Recidiva	Recidiva	Presenta recidiva? Solo aplica si cirugía	1= si 2= no
Fecha de recidiva	Fecha R	Fecha de la recidiva	dd/mm/aa
Tipo quimioterapia	QT_1	Esquema de QT que recibe el paciente en primer tratamiento	QT peri-operatoria 1= ECF o variantes 2= platino y 5-fluorouracilo (o capecitabina) 3= QT-RT neoadyuvante QT adyuvante 1= ECF o variantes 2= xelox 3= platino y 5-fluorouracilo (o capecitabina) 4= QT-RT adyuvante (Macdonald) QT paliativa 1= EOX o variantes 2= platino y 5-fluorouracilo (o capecitabina) 3= platino y 5-fluorouracilo (o capecitabina) y trastuzumab
Adyuvancia	Ady	Recibe adyuvancia? Solo aplica si cirugía	1= si 2= no
Fecha inicio quimioterapia paliativa primera línea	Fecha inicio QT pal	Fecha inicio quimioterapia paliativa primera línea	dd/mm/aa
Fecha progresión a primera línea	Fecha progresión	Fecha progresión a primera línea	dd/mm/aa
Beneficio del tratamiento	Beneficio	Cumple criterios de beneficio del tratamiento?	1= si 2= no 3= NV 4= NA

Datos clínico-patológicos y moleculares	Abreviatura	Nombre y definición	Escala y gradación
Fecha de muerte	Muerte	Fecha de muerte	dd/mm/aa
Estado último seguimiento	Estado	Estado último seguimiento	1= vivo con enfermedad 2= vivo sin enfermedad 3= muerto 4= perdido en seguimiento
Fecha último seguimiento	Último seguim.	Fecha último seguimiento	dd/mm/aa
Datos moleculares	Abreviatura	Nombre y definición	Escala y gradación
HER2	HER2	Expresión de la proteína o Amplificación del gen	1= positivo 2= negativo 3= NV 4= NR
EBV	EBV	Detección del ARN codificado por el virus	1= positivo 2= negativo 3= NV 4= NR
MMR	MMR	Estado de MMR	1= deficiente 2= eficiente 3= NV 4= NR
E-cadherina	E-cad	Expresión de E-cadherina	1= aberrante 2= normal 3= NV 4= NR
p53	p53	Expresión de p53	1= aberrante 2= normal 3= NV 4= NR
MUC6	MUC6	Expresión de MUC6	1= aberrante 2= normal 3= NV 4= NR

Datos clínico-patológicos y moleculares	Abreviatura	Nombre y definición	Escala y gradación
PD-L1	PD-L1	Expresión de PD-L1 (por CPS) CPS $\geq$ 1 (positivo) y CPS<1 (negativo)	1= positivo 2= negativo 3= NV 4= NR

BBDD, base de datos; IHQ, inmunohistoquímica; ECOG, escala de estado funcional (Eastern Cooperative Oncology Group); TNM, tumour-node-metastasis según AJCC/UICC 8ª edición; UEG, unión esofagagástrica; CRS +/- HIPEC, cirugía citorrreductora +/- quimioterapia intraperitoneal con hipertermia; cyt+, resultado citología peritoneal positiva; mol+, resultado molecular peritoneal positiva; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; EBV, del inglés *Epstein-Barr* virus; MMR, DNA mismatch repair system; MUC6, Mucina 6; PD-L1, programmed death-ligand; CPS, del inglés combined positive score; NR, no reportado; NA, no aplica; NV: no valorable.

5.4.1. Criterios de beneficio evaluable y Definición de beneficio del tratamiento:

Siendo muy conscientes de que la evaluación de si hay o no beneficio clínico tras realizar un tratamiento no es una tarea sencilla sino que encierra una gran complejidad, para la cual además no tenemos una medida universal, los criterios de beneficio evaluable, es decir aquellos pacientes que serían candidatos al análisis de beneficio, así como los criterios de beneficio del tratamiento, fueron descritos de forma detallada y pre-especificados en el diseño inicial del proyecto.

Criterios de *beneficio evaluable*:

Consideramos paciente con *beneficio evaluable* aquel paciente que había recibido quimioterapia peri-operatoria o paliativa, y para el cual disponíamos de suficiente información clínica o radiológica de respuesta o progresión. Quedaban excluidos de este análisis los pacientes que solo habían recibido cirugía o aquellos que iniciaban quimioterapia pero no la completaban por toxicidad inaceptable. La quimioterapia peri-operatoria y la quimioterapia con intención paliativa consistía en todos los casos en 6-8 ciclos de quimioterapia basada en platino y fluoropirimidina. En los casos de HER2 positivos con enfermedad avanzada o metastásica, la quimioterapia se acompañaba de trastuzumab que se mantenía hasta la progresión. Por fechas de inclusión no se usaron tripletes con taxano ni inmunoterapia. La decisión de tratar a los pacientes con quimioterapia fue basada en la consideración por parte del clínico de múltiples factores como estado general de salud del paciente, estadiaje de la enfermedad, potencial toxicidad del tratamiento, y preferencia del paciente.

Definición de *beneficio del tratamiento*:

Buscando la máxima objetividad posible se definieron los siguientes criterios de beneficio para las dos situaciones de enfermedad.

Escenario 1

En enfermedad localizada o localmente avanzada, cuando el paciente había recibido tratamiento con quimioterapia peri-operatoria, con intención curativa, considerábamos que había *beneficio del tratamiento* en aquellos casos en que se cumpliera uno de los siguientes criterios:

- A. Paciente sin recidiva a lo largo de su plan de seguimiento
- B. En caso de presentar recidiva; paciente con **Supervivencia Libre de Recidiva (SLR) superior a 20 meses***

En todos los casos, el plan de seguimiento consistía en visitas cada 3-4 meses durante los dos primeros años y cada 6 meses hasta completar los 5 años. En estas visitas se realizaba periódicamente evaluación clínica, analítica y TAC así como estudio endoscópico en determinados casos (gastrectomías subtotales o clínica/sospecha de recidiva).

**Justificación de este valor/parámetro: Herramientas como las guías ESMO-MCBS (guías de la European Society for Medical Oncology, ESMO-Magnitude of Clinical Benefit Scale(53)), creadas para evaluar la magnitud de beneficio clínico de los nuevos tratamientos o estrategias, utilizan en los formularios que evalúan tratamientos con intención curativa la SLE para su valoración. En nuestro caso se seleccionó un intervalo libre de recidiva de 20 meses como valor a partir del cual consideramos beneficio por corresponder a la mediana de supervivencia libre de enfermedad o recidiva (mSLE) conseguida en los ensayos clínicos MAGIC y FLOT4 (36,37) con el esquema de quimioterapia que se estaba utilizando en el momento de la inclusión de los pacientes en el proyecto.*

Escenario 2

En enfermedad avanzada o metastásica, cuando el paciente había recibido tratamiento con quimioterapia con intención paliativa, considerábamos *beneficio del tratamiento* en la siguiente situación:

A. El paciente presentaba una **Supervivencia Libre de Progresión (SLP)** a la primera línea de quimioterapia **superior a 6 meses***. El momento de “progresión” se definía cuando se cumplía uno de los siguientes supuestos a lo largo del plan de seguimiento del paciente

- Cuando había una valoración radiológica de progresión por criterios RECIST v 1.1(95).
- Cuando había una valoración de progresión por parte del investigador, teniendo en cuenta síntomas/clínica con o sin elevación de marcador tumoral que a su criterio fueran compatibles con progresión inequívoca.

En todos los casos, el plan de seguimiento consistía en visitas cada 3 semanas para evaluar la toxicidad del tratamiento, así como la clínica o síntomas de enfermedad. En caso de seguir con el tratamiento de quimioterapia, la evaluación radiológica se realizaba a los 3 meses aproximadamente y al final del tratamiento. En los pacientes que presentaban toxicidad importante o inaceptable se paraba el tratamiento de quimioterapia y, tal y como se ha indicado anteriormente, estos pacientes quedaban excluidos del análisis de beneficio del tratamiento.

**Justificación de este valor/parámetro: Herramientas como las guías ESMO-MCBS (guías de la European Society for Medical Oncology, ESMO-Magnitude of Clinical Benefit Scale (53)), creadas para evaluar la magnitud de beneficio clínico de los nuevos tratamientos o estrategias, en los formularios que evalúan tratamientos con intención paliativa utilizan la supervivencia libre de progresión (SLP) para su valoración. En nuestro caso se seleccionó un tiempo a la progresión tras primera línea de 6 meses, como valor a partir del cual consideramos beneficio, por corresponder a la mediana de supervivencia libre de progresión descrita en los ensayos REAL 2 y ML17032(51,96), que corresponden a ensayos que validaron los esquemas de quimioterapia con intención paliativa que estábamos utilizando en el momento de la inclusión de los pacientes en el proyecto.*

5.5. Análisis molecular

Sobre las biopsias tumorales se realizaron dos tipos de análisis con dos paneles diferentes:

1. Panel de biomarcadores de expresión proteica o génica usando técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) y de hibridación in situ (ISH).
2. Panel de mutaciones somáticas recurrentes en cáncer gástrico.

5.5.1. *Procesado de las muestras:*

De cada bloque de parafina (FFPE) en el que se ha incluido una biopsia tumoral gástrica endoscópica se obtiene un primer portaobjetos con un corte de 3-5µm de grosor que se utiliza para una primera tinción con hematoxilina y eosina (H-E); luego se realizan 12 cortes adicionales de 3-5µm para el análisis de biomarcadores de expresión proteica o génica y, finalmente, se realiza un último corte para una segunda tinción con H-E que nos permite confirmar, o descartar, la presencia de material tumoral en los cortes anteriores. En esta última laminilla la patóloga seleccionaba y marcaba las mejores áreas tumorales para obtener un “punch” de 0.6 mm de diámetro de tejido tumoral para realizar la extracción del ADN y ARN que servirá para el análisis de mutaciones somáticas y otros análisis moleculares que se precisen. En todos los casos en los que era posible, se realizaba un segundo o tercer “punch”, para recoger la heterogeneidad intratumoral. Para poder sacar el máximo rendimiento de las muestras se utilizó el kit RecoverAll (ThermoFisher) que permite la extracción de ADN y el ARN al mismo tiempo. El primer paso fue una desparafinización con xilol, rehidratación con alcoholes y digestión con proteinasa K toda la noche a 56°C. Siguiendo los pasos del protocolo del kit se extrae primero el ARN guardando la parte de la muestra que contiene el ADN para un segundo paso. Una vez finalizada la extracción evaluamos la calidad y cantidad utilizando el espectrofotómetro NanoDrop que nos da la concentración de ácidos nucleicos y las ratios 260/280 y 230/260 que nos informan de la calidad de estos ácidos nucleicos y el fluorímetro Qubit que nos informa de la cantidad de una forma más precisa, principalmente con el ADN ya que nos permite conocer la concentración de ADN de doble cadena y por tanto nos informa de la integridad del ADN que hemos extraído.

5.5.2. *Panel de biomarcadores de expresión proteica y génica:*

Panel de 10 biomarcadores representados en la **Tabla 15** (ver en el mismo apartado, más abajo), que se analizaron usando técnicas de inmunohistoquímica (IHQ), en su mayoría, y de hibridación in situ (ISH). Para todos los análisis se siguió un protocolo base de inmunohistoquímica adaptando las concentraciones de anticuerpo en cada caso. Todas la laminillas se desparafinaron y se rehidrataron las muestras con una batería de xilol y alcohol. Se inhibieron las peroxidasas endógenas mediante la incubación con una solución de peróxido de oxígeno al 3% y un desenmascaramiento del antígeno mediante calor aplicado con un tratamiento en la olla a presión con tampón citrato de pH6, de 15 minutos a 110°C durante 10 minutos. Una vez enfriadas las preparaciones para evitar

uniones inespecíficas se llevó a cabo una incubación a temperatura ambiente con suero de cabra durante una hora. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C y el día siguiente, después de dejar que las laminillas se atemperaran, se procedió a realizar lavados y la incubación con el anticuerpo secundario que reconoce los anticuerpos del animal en que se han fabricado los anticuerpos primarios. Se utilizaron anticuerpos secundarios marcados con una estructura de dextrano marcada con HRP (horseradish peroxidase peroxidase). El revelado se realizó mediante Diaminobenzida que, con la acción de la peroxidasa, da un precipitado marrón que es el que observamos en las laminillas. Para poder ver correctamente las estructuras celulares se realizó una tinción suave con Hematoxilina de Harris. Los criterios, la puntuación, así como la interpretación de los resultados de las IHQ e ISH se muestran en la **Tabla 15**. Referente al PD-L1, en cáncer gástrico la forma más aceptada actualmente de presentar los resultados de la cuantificación de PD-L1 es mediante el *score* CPS (del inglés Combined Positive Score) que tiene en cuenta el marcaje de PD-L1 en células tumorales y en células del sistema inmune: Total de células positivas para PD-L1 (tumorales, linfocitos, macrófagos) / total de células tumorales (marcadas y no marcadas) y la ratio multiplicada por 100. En este estudio hemos considerado un valor positivo de PD-L1 cuando el valor de CPS es igual o mayor que 1 ($CPS \geq 1$).

Todos los datos patológicos han sido revisados por un segundo patólogo especializado en patología gastrointestinal y todas las tinciones se han realizado utilizando los controles positivos y negativos apropiados en cada caso.

Dado que el porcentaje de expresión positiva de PD-L1 ($CPS \geq 1$) en nuestra serie fue más bajo que los datos reportados en la literatura(12,55), se decidió repetir el análisis usando el anticuerpo de Dako 22C3, anticuerpo validado actualmente en contexto clínico. Este segundo análisis o análisis de validación, se pudo realizar en un total de 58 muestras remanentes que, además, se caracterizaban por ser negativas para el CPS con el anticuerpo de Cell Signaling y también eran funcionales para el MMR (pMMR), y eran HER2 y EBV negativos.

Tabla 15. Biomarcadores analizados y anticuerpos (IHQ) o sondas (ISH) utilizadas.

Biomarcador	Análisis	Técnica	Origen anticuerpo, clon y dilución. En caso de ISH, sonda	Criterio y puntuación	Interpretación
PMS2	Expresión de la proteína	IHQ	Dako (M3647, 1:50)	Tinción nuclear: A. Intacta B. Pérdida	Si pérdida: dMMR
MLH1	Expresión de la proteína	IHQ	Dako (M3640, 1:50)	Tinción nuclear: A. Intacta B. Pérdida	Si pérdida: dMMR
MSH6	Expresión de la proteína	IHQ	Dako (M3646, 1:50)	Tinción nuclear: A. Intacta B. Pérdida	Si pérdida: dMMR
MSH2	Expresión de la proteína	IHQ	Dako (M3639, 1:50)	Tinción nuclear: A. Intacta B. Pérdida	Si pérdida: dMMR
E-cadherina	Expresión de la proteína	IHQ	Dako (M3612, 1:50)	Tinción membrana: Fuerte (normal) o pérdida Patrón tinción citoplasmática	Si pérdida de tinción en membrana o patrón tinción citoplasmática: Aberrante
p53	Expresión de la proteína	IHQ	Dako (M7001, 1:50)	Tinción nuclear: Pérdida completa, débil/parcheada o difusa/fuerte (acumulada)	Si pérdida completa o tinción fuerte: Aberrante
MUC6	Expresión de la proteína	IHQ	Abcam (ab216017, 1:100)	Tinción citoplasmática: <10%, 10-25% o > 25% positividad celular	Si 10-25% o > 25%: Aberrante
EBV	Detección del ARN codificado por el virus	ISH	Kit del Ebers cod. Roche 5278511001 Sonda Ebers cod. Roche 05278660001	Ausente o Presente	Si presente: EBV positivo
HER2	Expresión de la proteína Amplificación del gen	IHQ ISH	HercepTest Dako (SK001) Kit del SISH DNP cód. Roche 5907136001 Kit del SISH DIG cód. Roche 5907128001 Sonda cocktail HER2/CR17 cód.5899826001	Ver Figura 10 (algoritmo test HER2)	Ver figura X (algoritmo test HER2)

Biomarcador	Análisis	Técnica	Origen anticuerpo, clon y dilución. En caso de ISH, sonda	Criterio y puntuación	Interpretación
PD-L1	Expresión de la proteína	IHQ (CPS)	2 anticuerpos: -Primer análisis: Cell Signaling (E1L3N) -Segundo análisis: Análisis de validación Dako (22C3)	Ver Figura 11 (cálculo CPS)	Ver figura X Si CPS $\geq$ 1: PD-L1 positivo

PMS2, PMS1 homolog2; MLH1, MutL protein homolog 1; MSH6, MutS homolog 6; MSH2, MutS homolog 2; MUC6, mucina 6; EBV, del inglés *Epstein-Barr* virus; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; PD-L1, programmed death-ligand; IHQ, inmunohistoquímica; ISH, hibridación in situ; CPS, del inglés combined positive score; dMMR, deficient DNA mismatch repair.

5.5.3. *Panel de mutaciones somáticas recurrentes en cáncer gástrico:*

Para analizar las mutaciones somáticas en las biopsias endoscópicas diseñamos un panel de 786 amplicones (PGD493) que evalúan 404 mutaciones puntuales, recurrentes en CG. Estas mutaciones se encuentran en regiones funcionales (esencialmente exones) de 75 genes (representados en la **Tabla 16**) y fueron descargadas del cBioPortal_STAD_TCGA_panatlas, reference genome: hg19/GRCh37 y seleccionadas por tratarse de mutaciones confirmadas como “tumor drivers” en el *Cancer Genome Interpreter* (CGI, all mutation análisis, STAD&GEJA) e identificadas en un mínimo del 0,46% de las muestras de CG analizadas en los estudios incluidos en cBioPortal. Además, analizamos toda la región codificante (CDS, del inglés Coding Sequence) de los 10 genes más frecuentemente mutados en CG en el momento del diseño del panel (**Tabla 16**, coloreados en rojo).

El panel diseñado es un ClenPlex Custom NGS Panel de Paragon Genomics (Hayward, CA 94545 USA) que utiliza su tecnología ClenPlex Technology. El panel consta de tres pasos, cada uno de los cuales consiste en una PCR o incubación seguida de una purificación de la librería mediante el uso de bolas magnéticas. Utilizamos índices de Illumina que nos permitieron mezclar varias muestras y secuenciar con un MiSeq de Illumina utilizando el kit de secuenciación v2 de lecturas pareadas de 150 pb. Las métricas de control de calidad consideradas óptimas fueron: densidad de clústeres de 900 a 1200

k/mm2, más del 90% de los clústeres pasasen el control de calidad interno y el rendimiento total fuera mayor de 4Gb. Secuenciamos a una profundidad de 1000x.

El análisis de los resultados crudos de secuenciación y la identificación y filtrado de variantes se realizó en el servicio de bioinformática IDIBELL, tal y como se detalla a continuación.

Tabla 16. Listado de genes del panel mutacional

Genes - Panel PGD493 (n=75)		
APC	BRCA2	KMT2C
ARID1A	CASP8	KMT2D
CDH1	CDK12	LRP1B
KRAS	CDKN2A	LRRK2
PIK3CA	CEP290	MEN1
PTEN	CIC	MLH1
RHOA	CNOT1	MLL3
RNF43	CREBBP	MRE11A
SMAD4	CTCF	MSH2
TP53	CTNNB1	MTOR
ACVR1B	CTNND1	NBN
ACVR2A	ECT2L	PALB2
ARFGAP3	EGFR	PBRM1
ARID4B	EPHA2	PCLO
ARID5B	ERBB2	PLCG1
ASXL1	ERBB3	PPM1D
ATM	FAT2	RASA1
ATR	FAT4	ROCK2
AXIN1	FBXW7	RRAS2
AXIN2	FXR1	STAG1
B2M	GATA3	STAT5B
BARD1	GNAS	TBL1XR1
BCOR	HLA-B	UBR5
BMPR2	KANSL1	ZFXH3
BRAF	KMT2B	ZFP36L1

En color rojo genes con secuenciación completa de la región codificante (CDS, del inglés Coding Sequence)

Identificación de las variantes somáticas y metodología de filtrado.

Las lecturas pareadas de los archivos FASTQ se alinearon con el genoma de referencia Hg19 utilizando el algoritmo BWA-mem, obteniendo archivos BAM con las lecturas mapeadas. Se realizó una recalibración de las puntuaciones de calidad de las bases (BQSR de GATK), en las regiones seleccionadas y excluyendo polimorfismos conocidos (1000G, dbSNP), para corregir posibles errores del equipo de secuenciación. Se utilizó la herramienta BAMClipper (versión 1.1.1)(97) para eliminar las secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación. El formato de los archivos BAM se validó con ValidateSamFile de la herramienta Picard (versión 2.25.0). La identificación de variantes somáticas se realizó con la herramienta Mutect2 de GATK, utilizando la versión de “sólo tumor” ya que no se disponía de muestra normal pareada. La identificación de variantes se restringió exclusivamente a las regiones diana para las cuáles se había diseñado el panel. Para filtrar posibles artefactos y variantes germinales, se incluyó en el análisis de Mutect2 un panel de normales (PoN, somatic-b37_Mutect2-exome-panel.vcf) y las frecuencias alélicas de las variantes de gnomAD como recurso de línea germinal poblacional (archivo af-only-gnomad.hg38.vcf.gz) del repositorio de GATK. Mutect2 utiliza estas frecuencias para calcular la probabilidad de que una variante sea somática. Se obtuvo un archivo VCF por muestra que incluía todas las variantes sin filtros adicionales. El primer filtrado de variantes se realizó con FilterMutectCalls de GATK, con los parámetros por defecto. Este filtrado se ejecuta automáticamente y tiene en cuenta parámetros como la calidad de la base secuenciada del alelo alternativo para cada variante, entre otros. La anotación de las variantes filtradas se realizó con la herramienta Funcotator de GATK. Para seleccionar el transcrito a reportar, se utilizó el parámetro de BEST_EFFECT, en el que se prioriza el transcrito en el que la variante tiene mayor impacto. Una vez aplicados los filtros duros y probabilísticos aplicamos filtros manuales. Se seleccionaron las variantes con un número de lecturas mayor que 150, con una frecuencia alélica mayor a 0.04, las descritas en el GenomAD con una frecuencia poblacional de 0.001 o inferior, las clasificadas como driver en la base de datos Cancer Genome Interpreter y aquellas que se encontraban en menos del 20% de las muestras.

5.6. Análisis estadístico

5.6.1. *Consideraciones estadísticas generales:*

Todos los análisis han sido realizados con el paquete estadístico R versión 4.1.0 para Windows. En todos los análisis realizados se considera un riesgo bilateral, o nivel de significación, $\alpha = 0.05$. El análisis de supervivencia global y tiempo de progresión se realiza mediante las curvas de Kaplan-Meier.

El análisis estadístico consta de varias partes que se detallan a continuación:

5.6.2. *Variables clínicas y de los biomarcadores de expresión:*

Las variables clínicas y los biomarcadores de expresión del estudio se describen en las correspondientes Tablas expuestas en el apartado de resultados, donde se presenta el número de pacientes total analizados y los conteos y porcentajes para variables categóricas o cualitativas y la media con la desviación estándar o la mediana con el primer y último cuartil, para variables numéricas o cuantitativas.

5.6.3. *Diferencias entre los resultados esperados y los observados al aplicar a nuestra cohorte el algoritmo descrito por el grupo de Setia(21)*

El análisis de la significación de las diferencias entre el resultado observado en nuestra cohorte y el esperado según los resultados del grupo de Setia, se realizó mediante el test de Chi-cuadrado.

5.6.4. *Variables de eficacia o dependientes:*

En el estudio se consideran un total de 4 variables de eficacia o dependientes:

1. Variable **Supervivencia Libre de Recidiva (SLR)**, que aplicará a pacientes intervenidos con intención radical (cirugía curativa). La SLR se entiende como el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la recidiva.
2. Variable **Supervivencia Libre de Progresión (SLP)** a la primera línea de quimioterapia, que aplicará a pacientes que reciben quimioterapia con intención paliativa de primera línea. La SLP a la primera línea de quimioterapia se entiende como el tiempo transcurrido entre la fecha de inicio de quimioterapia primera línea y la fecha de progresión a esta.

3. Variable **Supervivencia Global (SG)**, que aplicará a todos los pacientes. La SG se entiende como el tiempo transcurrido entre la fecha del diagnóstico y la muerte.
4. Variable **Beneficio del tratamiento**, que aplicará a pacientes que tengan “beneficio evaluable” (criterios de beneficio evaluable descritos anteriormente en el apartado 5.4.1). La definición de beneficio del tratamiento es la descrita anteriormente en el apartado 5.4.1.

Para estudiar el tiempo hasta recidiva, progresión y muerte se representó la probabilidad de cada una de las variables de eficacia (1-3) en función del mes mediante la curva de Kaplan-Meier. Para cada una de estas variables de eficacia, se reportó los pacientes a riesgo, el número de eventos y la mediana de supervivencia.

Para estudiar el beneficio del tratamiento se calculó los pacientes a riesgo y la incidencia total.

5.6.5. Asociación entre las variables clínicas/moleculares y las variables de eficacia o dependientes:

Para explorar la asociación de las características clínicas y los biomarcadores de expresión, con el tiempo hasta la recaída y la muerte, se realizan **modelos de Cox univariantes** para cada característica clínica y biomarcador, los modelos se repetirán ajustados por las variables más relevantes con efecto pronóstico publicadas en la literatura. Los resultados se presentarán mediante HR (hazard ratios) y su intervalo de confianza al 95%. Y para explorar la asociación de los mismos factores de riesgo con el beneficio, se realizan **modelos logísticos univariantes para cada factor de riesgo**, los modelos se repetirán ajustados por las variables más relevantes con efecto predictivo publicadas en la literatura. Los resultados se presentarán mediante OR (odds ratios) y su intervalo de confianza al 95%.

En el caso del tiempo hasta progresión, todos los sujetos experimentaron el evento de interés (progresión). Esta falta de variabilidad en el estado del evento no nos permite realizar la estimación de los modelos de riesgos proporcionales de Cox, ya que el modelo requiere de la presencia de sujetos censurados para estimar adecuadamente los efectos de las covariables sobre el tiempo hasta el evento. Sin sujetos censurados, el modelo no puede diferenciar entre los tiempos de supervivencia de diferentes individuos, lo que impide la estimación de los parámetros.

5.6.6. Propuesta de dos métodos de clasificación sugeridos a partir del análisis de resultados del panel de biomarcadores de expresión proteica y génica y su capacidad de predecir SG y beneficio del tratamiento:

5.6.6.1. Algoritmo de Setia adaptado

Partiendo del algoritmo descrito por Setia et al(21). se adapta este algoritmo al conocimiento actual en CG. La distribución de las variables clínicas y la proporción de beneficio del tratamiento en los diferentes subgrupos de Setia adaptado se representan en forma de Tablas y Figuras. Finalmente, la probabilidad de muerte por subgrupo de Setia adaptado se representa gráficamente mediante curvas de Kaplan-Meier.

5.6.6.2. Análisis clúster o agrupamiento jerárquico

Se realiza un análisis exploratorio de agrupamiento jerárquico no supervisado con el objetivo de agrupar en clústeres o grupos a los individuos de la forma más homogénea posible en función de los resultados de los biomarcadores de expresión. Para este análisis exploratorio se ha utilizado la distancia de Gower(98). La distancia de Gower es un coeficiente de similitud que se basa en diferentes tipos de información de n variables para medir las semejanzas entre dos individuos. Como la similitud no es algo que pueda medirse directamente, es necesario transformarla en distancias para así, construir una matriz de similitud. El índice de Gower, combina diferentes tipos de descriptores y los procesa de acuerdo con su tipo matemático propio. Generalmente, para calcular esa distancia, se utilizan índices binarios así: dos individuos son comparados en una de las variables y se le asigna una puntuación, 0 cuando ellos son considerados como diferentes y 1 cuando tienen algún grado de similitud. Se evaluaron aproximaciones del método de agrupamiento jerárquico divisivo y aglomerativo, así como el método del codo (elbow) y la silueta (silhouette) para seleccionar el número de clústeres, en función de los resultados de los biomarcadores de expresión analizados y descritos en la sección 5.5.2 (Tabla 15). La distribución de las variables clínicas y la proporción de beneficio del tratamiento en los diferentes clústeres se representa en forma de Tablas y Figuras. Finalmente, la probabilidad de muerte por clúster se representa gráficamente mediante curvas de Kaplan-Meier.

5.6.7. Identificación de mutaciones en los pacientes “all-negatives”:

Para realizar éste análisis, se ha utilizado la escala ESCAT (ESMO Scale for Clinical Actionability for molecular Targets)(99,100). Estas escalas se adjuntan en anexos.

5.7. Aspectos éticos

Con el fin de garantizar la confidencialidad de los datos de los pacientes, la identidad y los bloques tumorales de cada paciente se asociaron a un código específico para este proyecto.

Este proyecto fue aprobado por Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario de Bellvitge (ref.PR142/16). Posteriormente, en 2019, los modelos de las hojas de información al paciente y de consentimiento informado del ICOBiobanc fueron revisadas para ser adaptadas a la nueva versión de la ley general de protección de datos LGPD (Ley Orgánica 3/2018) y aprobadas por el CEI/CEIm del HUB (ref.2019/1640). Para aquellos pacientes fallecidos en el momento de la inclusión en el estudio, el CIEC autorizó el uso de sus muestras tumorales así como su información clínica, eximiéndose la obtención de consentimiento informado, de acuerdo con el artículo 24 del RD 1716/2011.

6. RESULTADOS

6.1. Análisis descriptivo

6.1.1. *Cohorte final y subcohorte para el análisis de beneficio del tratamiento:*

Tal y como muestra el diagrama de flujo en la **Figura 12**, de los 162 pacientes valorados en la Unidad Funcional de Tumores Esofagogástricos e incluidos en la BBDD, en un total de 32 pacientes no se pudo obtener el material de la biopsia gástrica endoscópica. El motivo por el que no se llegó a obtener el bloque de parafina de estos pacientes fue porque eran pacientes de hospitales lejanos para los cuales la participación en el estudio suponía algún tipo de dificultad. De los 130 restantes, en un total de 15 pacientes, el material remanente o sobrante de la biopsia gástrica endoscópica tras el procedimiento asistencial del diagnóstico de la enfermedad oncológica, no era suficiente para iniciar los análisis. Por lo que el número final de bloques de parafina disponibles para el estudio molecular fue de 115.

Como también muestra la **Figura 12**, para el **panel de biomarcadores de expresión**, en 9 de los 115 bloques disponibles y con material suficiente para iniciar los análisis, el material se agotó antes de completar el análisis para la mayoría de biomarcadores. Por lo que el número final de pacientes con resultados para la mayoría (9 sobre 10) de biomarcadores del panel indicado en la **Tabla 15** del apartado 5.5.2. de metodología, era de 106. Es de indicar que cuatro de estos 106 pacientes carecían de resultado para PD-L1 y uno carecía de resultado para HER2, por lo que el número de pacientes con resultado para todos los biomarcadores analizados fue de 101. En cuanto al tipo de muestras utilizadas para este análisis, en los 106 pacientes con resultado final para panel de biomarcadores de expresión, en el 100% de los casos, se utilizó muestra tumoral obtenida de la biopsia gástrica endoscópica del diagnóstico y sólo en 12 pacientes se necesitó completar el estudio con material obtenido de la pieza quirúrgica (gastrectomía) para finalizar los análisis. Como ya se ha comentado anteriormente, estas piezas quirúrgicas eran de pacientes que no habían recibido quimioterapia.

Como muestra la **Figura 12**, para el **panel de mutaciones**, en 39 de los 115 bloques disponibles y con material suficiente para iniciar los análisis, no se pudo realizar el análisis, porque tenían cantidad de DNA insuficiente para generar una librería o bien

porque la librería generada no tenía la calidad mínima para secuenciar, por lo que el número final de pacientes con resultado de panel de mutaciones fue de 76.

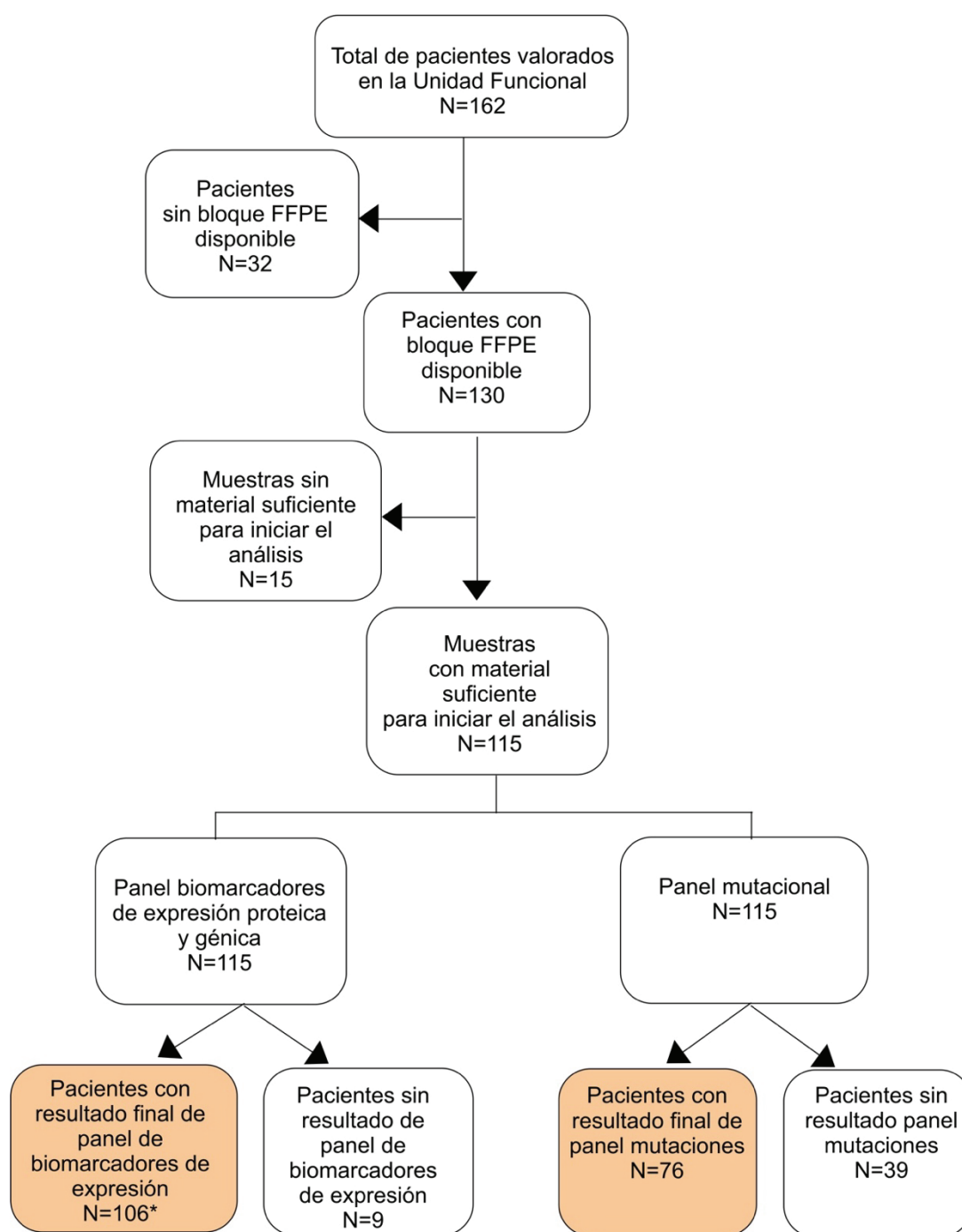


Figura 12. Diagrama de flujo de las muestras (bloques FFPE) disponibles para el análisis molecular (análisis IHQ/ISH y panel mutacional) y de las muestras analizadas finalmente con éxito para cada panel. *Sólo en 12 pacientes se utilizó pieza quirúrgica para completar el análisis.

Consideramos pacientes aptos para nuestra cohorte final aquellos de los cuales disponemos de resultados de **por lo menos un panel**. El diagrama de flujo en la **Figura 13** muestra la composición de la **cohorte final** del estudio **formada por 109 pacientes**. De 73 de estos 109 pacientes (67%) se dispone de datos del panel de biomarcadores de expresión y del panel mutacional, de 33 (30%) se dispone solamente de datos del panel de biomarcadores y de 3 (3%) solamente se dispone de datos del panel mutacional.

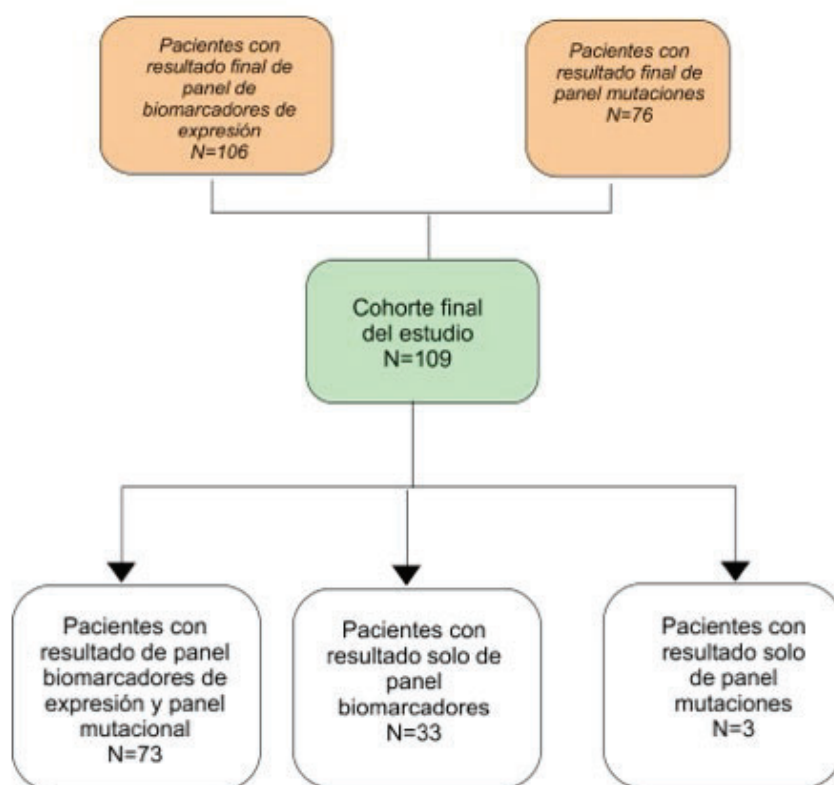


Figura 13. Diagrama de flujo descriptivo de la composición de la cohorte final del estudio (con los pacientes de los cuales disponemos de por lo menos un panel).

6.1.1.1. *Cálculo de ratio de análisis completado / muestra disponible:*

Si tenemos en cuenta que el número final de pacientes con bloques de parafina disponibles era de 130 (**Figura 12**, anteriormente expuesta), podemos calcular la **ratio de análisis completado/muestra disponible** como medida “indirecta” de la factibilidad de aplicar una caracterización molecular sobre nuestras muestras:

- Ratio para el panel biomarcadores de expresión (muestras con análisis completado/número total de muestras parafinadas disponibles): $106^*/130$ (82%).

*Como ya hemos comentado anteriormente, a pesar de usar en el 100% de los casos muestra gástrica endoscópica del diagnóstico, en 12 de los 106 pacientes se necesitó completar el estudio con material obtenido de la pieza quirúrgica (gastrectomía) para finalizar los análisis.

- Ratio para el panel de mutaciones (muestras con análisis completado/número total de muestras parafinadas disponibles): ratio éxito: $76/130$ (59%).

Y finalmente, la **Figura 14** representa el diagrama de flujo de la subcohorte para el análisis de beneficio del tratamiento. El análisis de beneficio del tratamiento se pudo realizar en 68 pacientes. La causa más frecuente de beneficio no evaluable fue no haber recibido tratamiento de quimioterapia ($n=32$). De estos, 24 eran pacientes tratados con cirugía de entrada que después no recibieron quimioterapia porque su estado general de salud se había deteriorado y contraindicaba este tipo de tratamiento y 10 eran pacientes que no recibieron ni cirugía ni quimioterapia. Otros siete pacientes no fueron evaluables por que a pesar de haber iniciado la quimioterapia no se pudo obtener suficiente información clínica o radiológica de respuesta o progresión, cinco de ellos por finalización prematura de la quimioterapia por toxicidad inaceptable y dos por pérdida de seguimiento (quimioterapia realizada en otro hospital).

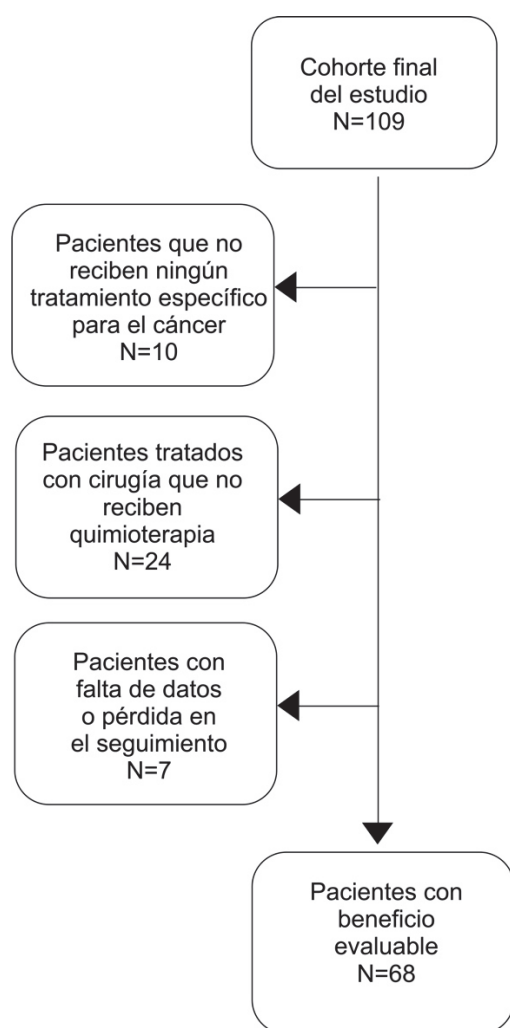


Figura 14. Diagrama de flujo de la subcohorte para el análisis de beneficio del tratamiento

6.1.2. *Características clínicas de los pacientes:*

Las características clínicas basales de nuestra cohorte de pacientes se muestran en la **Tabla 17**. Brevemente, la edad media de diagnóstico era de 64 años, el 64% de los pacientes eran de sexo masculino y la gran mayoría tenían buen estado general (ECOG 0 o 1). En cuanto a la localización y el subtipo histológico, hay un 23% con tumores en la unión esofagogástrica. Los CG con histología intestinal (clasificación de Lauren) o tipo papilar/tubular/mucinoso (clasificación de OMS/WHO) representaban un 44% del total y los difusos o pobremente cohesivos representaban un 32% del total, siendo los indiferenciados o pobremente diferenciados un 15%.

Tabla 17. Tabla descriptiva de las características clínicas basales de la cohorte final de pacientes incluidos en el estudio (N=109).

Características clínicas basales	N (109)
Edad	
- Media (DE)	64.82 (10.94)
- Mediana (IQR)	65.00 (58.00, 73.00)
Sexo	
Mujer (%)	39 (35.78)
Varón (%)	70 (64.22)
ECOG	
0-1 (%)	94 (86.24)
2 o más (%)	10 (9.17)
NR	5 (4.59)
Localización enfermedad	
UEG (%)	25 (22.94)
CG (%)	83 (76.15)
NR	1 (0.92)
Tipo Lauren o WHO equivalente	
Intestinal/papilar/tubular/mucinoso (%)	48 (44.04)
Difuso/pobremente cohesivo (%)	35 (32.11)
Mixto (%)	7 (6.42)
Indiferenciado/pobremente indiferenciado (%)	16 (14.68)
NR	3 (2.75)
HER2	
Negativo	98 (89.90)
Positivo	10 (9.17)
NR	1 (0.92)

SD, desviación estándar; IQR, rango intercuartílico; ECOG, escala de estado funcional (Eastern Cooperative Oncology Group); CG, cáncer gástrico; UEG, unión esofagogástrica; WHO, clasificación de la OMS – organización mundial de la salud; HER2, human epidermal growth factor receptor; NR, no reportado.

En cuanto al estadio de la enfermedad, la **Figura 15** muestra la distribución de porcentajes de enfermedad localizada o localmente avanzada (estadios I-III) que representaban un 52% de los casos y la enfermedad avanzada o metastásica (estadio IV) que correspondía a un 48% de los casos.

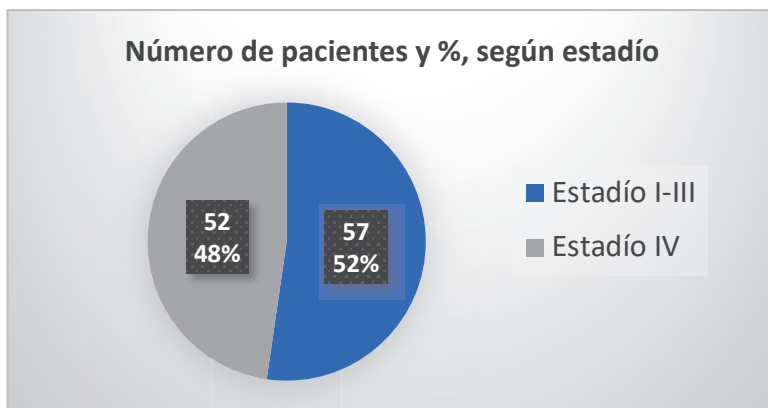


Figura 15. Gráfico circular que describe la distribución del estadio de la enfermedad basal de los pacientes

Respecto a los tratamientos recibidos en función de la extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico, la **Tabla 18** detalla los tratamientos recibidos en cada caso. En enfermedad localizada o localmente avanzada, el porcentaje de pacientes que van a cirugía como primer tratamiento es del 51% (29/57 pacientes), y un 44% (25/57 pacientes) reciben como primer tratamiento quimioterapia antes de la cirugía. En general los pacientes con estadio más inicial, estadios IA o T2N0, se trataban con cirugía de entrada y el resto se trataban con quimioterapia neoadyuvante. Los motivos de no recibir quimioterapia como primer tratamiento fueron edad, co-morbilidad limitante o debut con oclusión intestinal. En enfermedad avanzada o metastásica, la mayor parte de los pacientes reciben quimioterapia paliativa, mientras que un subgrupo pequeño de pacientes (6/52) recibe quimioterapia con intención de controlar enfermedad y poder ofrecer posteriormente cirugía citoreductora (CRS) más quimioterapia intraperitoneal con hipertermia (HIPEC). De los 10 pacientes con HER2 positivo, sólo 6 recibieron antiHER2 (trastuzumab) en combinación con la quimioterapia, los 4 restantes eran pacientes con enfermedad localizada o localmente avanzada donde no está aprobado este tratamiento. Por fechas de inclusión no se usaron tripletes con taxano ni inmunoterapia. Los motivos de no recibir ningún tratamiento específico para el cáncer fueron rechazo del paciente en los dos casos con enfermedad localmente avanzada y deterioro del estado general en cinco de los seis casos con enfermedad avanzada o metastásica; en el sexto caso fue por rechazo del paciente.

Tabla 18. Tabla descriptiva de los tratamientos recibidos según la situación de enfermedad basal

Tipo de tratamiento recibido	Enfermedad localizada o localmente avanzada (n = 57)			Enfermedad avanzada o metastásica (n = 52)		
	Quimioterapia neoadyuvante	Cirugía o cirugía + quimioterapia adyuvante	No tratamiento específico para el cáncer o otros ¹	Quimioterapia paliativa	Quimioterapia neoadyuvante ²	No tratamiento específico para el cáncer o otros ³
Número de pacientes	25	24 (sólo cirugía) 5 (cirugía + quimio adyuvante)	3	39	6	7

¹ Ningún tratamiento: 2 pacientes. Quimioterapia paliativa: 1 paciente. ² Quimioterapia neoadyuvante antes CRS + HIPEC.

³ Ningún tratamiento: 6 pacientes. Cirugía paliativa: 1 paciente. CRS + HIPEC, cirugía citoreductora + quimioterapia intraperitoneal con hipertermia

6.1.3. Resultados del análisis del panel de biomarcadores de expresión proteica y génica:

De los 106 pacientes con resultado para los biomarcadores de este panel, 6 fueron EBV positivos (6%), 10 pacientes (9%) tenían pérdida de expresión de alguna de las proteínas implicadas en el MMR, es decir, eran deficientes para MMR (dMMR). De los 10 pacientes con dMMR, en 9 la pérdida implicaba la pareja PMS2/MLH1 y en sólo 1 de ellos se perdía la pareja MSH6/MSH2. 19 pacientes presentaban expresión aberrante de E-cadherina (18%), 73 pacientes presentaban expresión aberrante de p53 (69%) y 25 pacientes tenían expresión aberrante de MUC6 (24%). En cuanto al biomarcador PD-L1, en un primer análisis, de los 106 pacientes con resultado del resto de biomarcadores de este panel, 4 no fueron valorables, por no tener el número mínimo de 100 células tumorales viables indispensable para el cálculo del CPS (Ver **Figura 11** en el apartado 1.6.2.2, apartado de introducción) y 15 pacientes resultaron ser PD-L1 positivos (15%). Para el análisis del biomarcador HER2, dado que es un biomarcador que se utiliza en práctica clínica asistencial, disponíamos de resultado de este biomarcador en 108 pacientes, de los cuales 10 fueron HER2 positivos (9%). Los resultados del análisis del panel de biomarcadores de expresión se muestran en la **Tabla 19**. El porcentaje se ha calculado considerando el 100% el total de pacientes con resultado positivo o negativo para cada biomarcador, se excluyen los NV/NR.

Tabla 19. Resultados del análisis de los biomarcadores de expresión (IHQ/ISH) en la cohorte final de 109 pacientes

Biomarcador	Número de pacientes (%) *
HER2	
negativo	98 (90.74)
positivo	10 (9.26)
NV/NR	1
EBV	
negativo	100 (94.34)
positivo	6 (5.66)
NV/NR	3
MMR	
Eficiente	96 (90.57)
Deficiente	10 (9.43)
NV/NR	3
E-cadherina	
Normal	87 (82.08)
Aberrante	19 (17.92)
NV/NR	3
p53	
Normal	33 (31.13)
Aberrante	73 (68.87)
NV/NR	3
MUC6	
Normal	81 (76.42)
Aberrante	25 (23.58)
NV/NR	3
PD-L1 CPS **	
Negativo	86 (84.31)
Positivo (CPS $\geq$ 1)	16 (15.69)
NV/NR	7

IHQ, inmunohistoquímica; ISH, hibridación in situ; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; EBV, *Epstein-Barr* virus; MMR, DNA mismatch repair system; MUC6, mucina 6; PD-L1, programmed death-ligand; CPS, del inglés combined positive score; NV/NR, no valorable, no reportado. (*)El porcentaje se ha calculado considerando el 100% el total de pacientes con resultado positivo o negativo en el análisis de cada biomarcador (se excluyen los NV/NR). (**)Resultado del segundo análisis o análisis de validación (ver abajo).

Dado que el porcentaje de expresión positiva de PD-L1 ($\text{CPS} \geq 1$) en nuestra serie es más bajo que en los datos reportados en la literatura(12,55), se decidió repetir el análisis usando el anticuerpo de Dako 22C3, anticuerpo validado actualmente en contexto clínico. Este segundo análisis o análisis de validación, se pudo realizar en un total de 58 muestras remanentes que, además, se caracterizaban por ser negativas para el CPS con el anticuerpo de Cell Signaling y a la vez, funcionales para el sistema de reparación del ADN, MMR (pMMR), HER2 negativas y EBV negativas. Los resultados comparativos de los dos análisis del biomarcador PD-L1, utilizando el anticuerpo inicial (Cell Signaling) y el anticuerpo de Dako 22C3, mostraron sólo 1 diferencia en cuanto a resultado, un paciente que era PD-L1 negativo con el anticuerpo inicial fue PD-L1 positivo con el de Dako. Así pues, el total de pacientes positivos para PD-L1 ($\text{CPS} \geq 1$) era 16 de 102 pacientes con resultado valorable para este biomarcador (15.69%). Los resultados de estas diferencias se muestran en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Análisis de validación de PD-L1 (n=58 pacientes)

Validación PD-L1	Resultado con el anticuerpo Cell Signaling (E1L3N) N pacientes (%)	Resultado con el anticuerpo con Dako (22C3) N pacientes (%)
Resultado Negativo	58 (100)	57 (98.27)
Resultado Positivo ($\text{CPS} \geq 1$)	0 (0)	1* (1.72)

*El paciente con resultado positivo tiene CPS bajo, menor a 5.

Aplicando el algoritmo de Setia et al.(21) en nuestra cohorte, se observaba que de los 106 pacientes con resultados del panel de biomarcadores, 6 eran EBV positivos (5.7%), entre los 100 pacientes EBV negativos, 10 pacientes presentaban inestabilidad de microsatélites (MSI) (9.4% del total); seguidamente de los 90 pacientes negativos para EBV y MSI, 16 (15.1% del total) tenían expresión aberrante de E-cadherina. Estos 3 subtipos (EBV positivos, MSI y E-cadherina aberrante) muestran poca superposición ya que sólo 3 pacientes son MSI y E-cadherina aberrante. Finalmente, los casos restantes (EBV y MSI negativos y E-cadherina normal) son divididos en dos subgrupos en función de la expresión de p53: 57 pacientes (53.8% del total) con expresión aberrante de p53 y 17 pacientes (16%) con expresión normal (**Tabla 21**). El análisis de la significación de las diferencias, mediante el test de Chi-cuadrado, entre el resultado observado en nuestra cohorte y el esperado según los resultados del grupo de Setia, indicó que solamente es

significativa la diferencia en el grupo “p53 normal”, con un valor de $p=0.034$ (**Tabla 21**). Cabe tener en cuenta que Setia et al. clasificaba en 5 subtipos: EBV, MSI, E-cadherina, p53 aberrante y p53 normal y no tenia en cuenta los resultados de MUC6, HER2 ni PD-L1 para su clasificación.

Tabla 21. Distribución de los pacientes de nuestra cohorte en subtipos según el algoritmo descrito por Setia et al.(21) y análisis de las diferencias entre los resultados esperados y observados

Grupo de Setia	Cohorte setia N= 146	Nuestra cohorte N= 106	P valor (Chi-cuadrado)
EBV	7 (5%)	6 (6%)	0.985
dMMR o MSI	24 (16%)	10 (9%)	0.156
E-cadherina aberrante	30 (21%)	16 (15%)**	0.347
p53 aberrante	75 (51%)	57 (54%)	0.497
p53 normal	10 (7%)*	17 (16%)	0.034

*Grupo con frecuente sobreexpresión de MUC6.

**Superposición o overlap: 3 pacientes en el grupo de MSI son también E-cadherina aberrante.

La **Tabla 22** muestra la distribución de los casos HER2 positivos, PD-L1 positivos y MUC6 aberrantes, en los subtipos del algoritmo de Setia aplicados a nuestra cohorte. La distribución de HER2 era la esperable, 8 de los 10 casos se encontraban en el subgrupo de p53 aberrante, que corresponde al subtipo CIN del TCGA(1). En cuanto a PD-L1 es interesante destacar que sólo 4 de los 16 casos positivos correspondían a los subtipos EBV y MSI, repartiéndose el resto por los otros subtipos. La distribución esperable de este biomarcador sería que los grupos EBV y MSI estuvieran más enriquecidos en PD-L1(1). Y finalmente se observó que los casos positivos de MUC6 se encontraban repartidos en todos los subtipos excepto en EBV, sin “concentrarse” en el subgrupo de p53 normal como se observa en el estudio de Setia et al.(21). Finalmente en la **Tabla 23**, se describe la distribución de las diferentes características clínicas en los diferentes biomarcadores de expresión (IHQ/ISH).

Tabla 22. Distribución de los casos HER2 positivos, PD-L1 positivos y MUC6 aberrante de los pacientes de nuestra cohorte, en los subtipos descritos en la clasificación de Setia et al.(21)

	EBV positivo	dMMR o MSI	E-cadherina aberrante	p53 aberrante	p53 normal
HER2 positivo n = 10 (100%)	0	0	1 (10%)	8 (80%)	1 (10%)
PD-L1 positivo n = 16 (100%)	3 (18.75%)	1 (6.25%)	2 (12.5%)	7 (43.75%)	3 (18.75%)
MUC6 aberrante n = 25 (100%)	0	4 (16%)	1 (4%)	12 (48%)	8 (32%)

Tabla 23. Tabla descriptiva de las características clínicas basales en los diferentes biomarcadores de expresión (IHQ/ISH)

Características clínicas basales	HER2 Positivo N=10	EBV positivo N=6	dMMR o MSI N=10	E-cadherina aberrante N=19	p53 aberrante N=73	MUC6 aberrante N=25	PD-L1 positivo N=16
Edad	60 (53-77)	66 (63-69)	74 (64-78)	62 (57-74)	66 (58-74)	65 (60-76)	65 (57-70)
Sexo							
Mujer	1 (10.00%)	1 (16.67%)	5 (50.00%)	10 (52.63%)	26 (35.62%)	11 (44.00%)	4 (25.00%)
Varón	9 (90.00%)	5 (83.33%)	5 (50.00%)	9 (47.37%)	47 (64.38%)	14 (56.00%)	12(75.00%)
Localización enfermedad							
UEG	4 (40.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (5.26%)	17 (23.29%)	4 (16.00%)	4 (25.00%)
CG	6 (60.00%)	6 (100.00%)	10(100.00%)	18 (94.74%)	56 (76.71%)	21 (84.00%)	12(75.00%)
Tipo Lauren o WHO equivalente							
Intestinal	5 (50.00%)	3 (50.00%)	4 (40.00%)	3 (15.79%)	32 (43.84%)	15 (60.00%)	7 (43.75%)
Difuso	2 (20.00%)	1 (16.67%)	4 (40.00%)	12 (63.16%)	24 (32.88%)	6 (24.00%)	5 (31.25%)
Otros	3 (30.00%)	2 (33.33%)	2 (20.00%)	4 (21.05%)	17 (23.28%)	4 (16.00%)	4 (25.00%)

6.1.3.1. Propuesta de clasificación con el Algoritmo de Setia adaptado

Teniendo en cuenta que tanto HER2 como PD-L1 son biomarcadores bien establecidos en CG, proponemos una adaptación del algoritmo de Setia y añadir esta información. Esta propuesta de algoritmo adaptado, clasifica el CG en 7 subtipos siguiendo un orden jerárquico pre-establecido basado en la clasificación original y la posibilidad de tratamiento dirigido frente a los nuevos biomarcadores. De forma que el orden final de nuestro algoritmo adaptado fue: HER2 positivos, PD-L1 positivos, EBV, MSI, E-cadherina aberrante, p53 aberrante y finalmente p53 normal (**Figura 16**). Además, en esta

figura se muestran, identificadas por colores, las equivalencias con las categorías de la clasificación del CG del TCGA(1). De los 7 subtipos resultantes con este nuevo algoritmo ya hemos comentado en el apartado de introducción, que los PD-L1 positivos, EBV y MSI son grupos que deberían responder bien a la inmunoterapia y que los HER2 positivos los podremos tratar con terapia antiHER2 más inmunoterapia. Nos quedarían los tres últimos subtipos, que denominamos E-cadherina aberrante, p53 aberrante y p53 normal como grupos a los que no se les puede dirigir a un tratamiento concreto. A los pacientes de estos subtipos los llamamos “*all-negatives*” y representan 69 pacientes (69/106, que corresponden a un 65% del total). De este subgrupo de pacientes hablaremos más adelante.

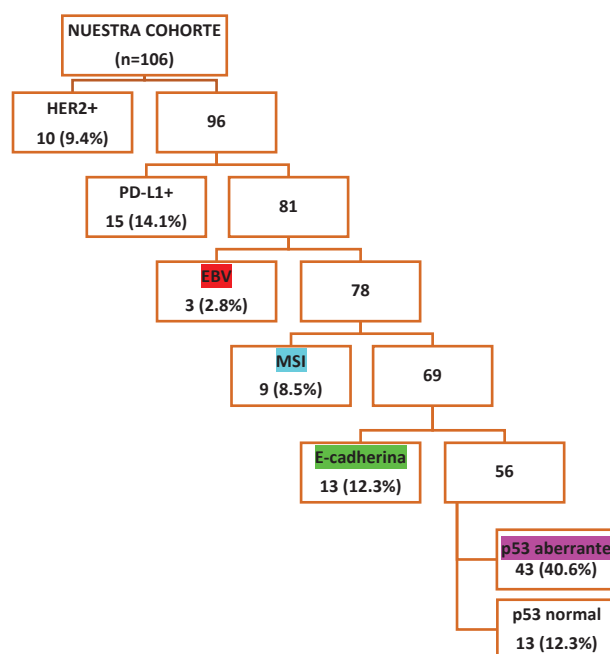


Figura 16. Distribución de los pacientes de nuestra cohorte en subtipos según el algoritmo de Setia modificado para incluir los resultados de HER2 y PD-L1 (se especifica la equivalencia con categorías TCGA). *Categorías Setia original: EBV; MSI; E-cadherina aberrante; p53 aberrante; p53 normal. Equivalencia con Categorías TCGA: EBV (en rojo); MSI (en azul); GS = estabilidad genómica, genomically stable (en verde); CIN = inestabilidad cromosómica, chromosomal instability (en violeta).*

La **Figura 17** representa la propuesta de selección de tratamientos en función de la clasificación de los pacientes según el algoritmo modificado de Setia. De forma interesante, observamos que en cada uno de los subtipos, hay casos de superposición. De los 10 pacientes del subtipo HER2 positivo, 1 también es PD-L1, 1 es E-cadherina aberrante y 8 son p53 aberrantes. De los 15 pacientes del subtipo PD-L1 positivo, 3 también son EBV, 1 es MSI, 2 son E-cadherina aberrante y 8 son p53 aberrantes. De los 3 pacientes del subtipo EBV positivo, 2 son también p53 aberrantes. Y finalmente, de los 9 pacientes del subtipo MSI, 3 también son E-cadherina aberrante y 7 son p53 aberrante. Es importante tener en cuenta que ninguna de estas superposiciones nos haría cambiar nuestra selección inicial de tratamiento.

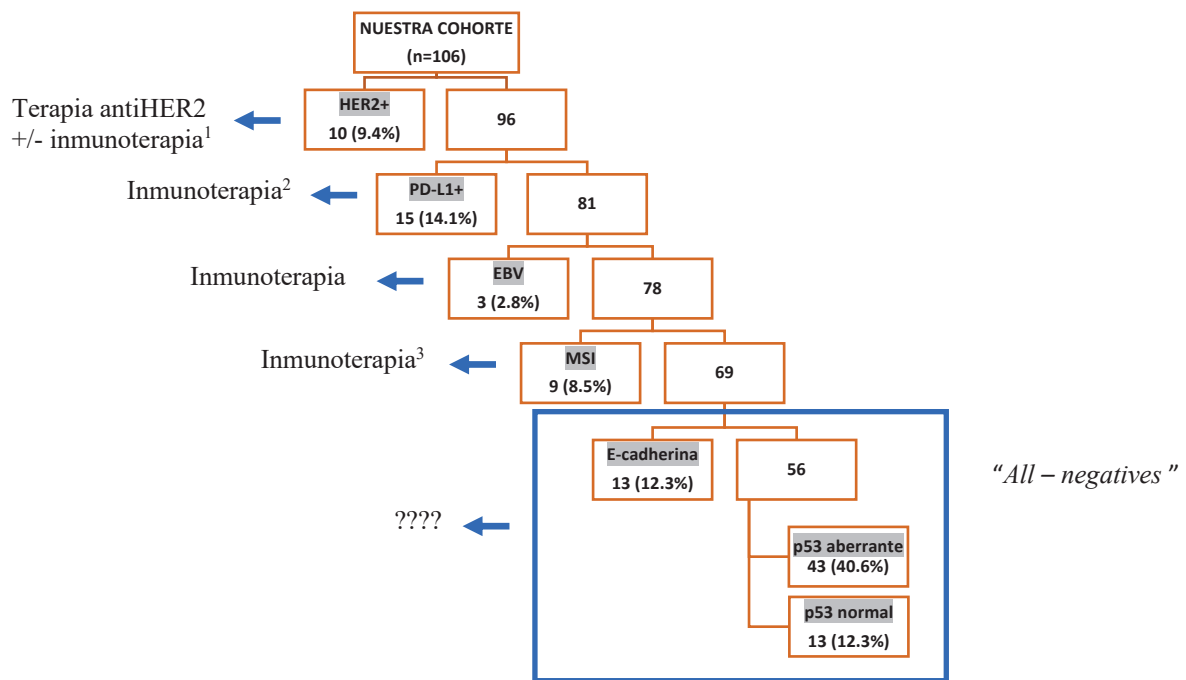


Figura 17. Selección de tratamiento por subtipos según el algoritmo de Setia adaptado.

¹Inmunoterapia en caso de PD-L1 positivo, CPS > 1. ²Si enfermedad avanzada o metastásica y PD-L1 positivo CPS > 5: quimioterapia + inmunoterapia. ³En contexto de enfermedad localizada: no beneficio quimioterapia adyuvante y en contexto de enfermedad avanzada o metastásica: valorar inmunoterapia en segunda línea.

6.1.3.2. Propuesta de un nuevo sistema de clasificación: Clustering o agrupamiento jerárquico:

Del análisis exploratorio para clasificar el CG a partir de un agrupamiento jerárquico basado en los resultados del análisis de los biomarcadores de expresión, por el método aglomerativo se escogieron 5 grupos o clústeres. La elección del número de grupos se basó en la opción que mejor maximizaba la homogeneidad y minimizaba la interviriabilidad de los pacientes de un mismo grupo, representadas por las *elbow plot* y *silhouette plot*. Entre el método divisivo y el aglomerativo se eligió finalmente el aglomerativo por ser el método que exponía con más claridad la separación entre clústeres. En la **Tabla 24** se visualizan los 5 clústeres en los que se dividía nuestra cohorte. Un total de 8 pacientes no tenían clúster asignado por falta de algún biomarcador, por lo que el total de muestras para este análisis es de 101. El clúster 1 es el que tenía más pacientes con un total de 52, el clúster 2 tenía un total de 18 pacientes, el clúster 3 tenía un total de 12 pacientes, mientras que los clústeres 4 y 5 eran los más pequeños con 9 y 10 pacientes, respectivamente.

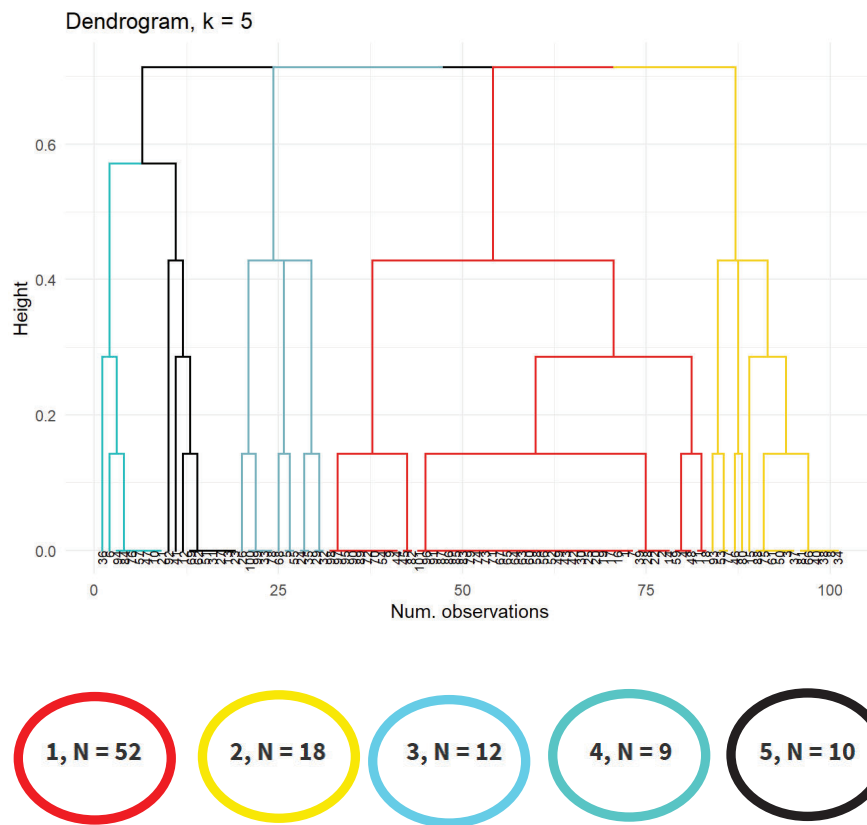
Tabla 24. Tabla que muestra número y % de pacientes en cada clúster.

Clúster	N pacientes (%)
1	52 (51.49%)
2	18 (17.82%)
3	12 (11.88%)
4	9 (8.91%)
5	10 (9.90%)

El número de pacientes incluidos en el análisis es de 101 (número de pacientes con resultados para todo el panel de biomarcadores).

La **Figura 18** muestrta los resultados del *clustering* o agrupamiento jerárquico, representados en forma de dendograma y de gráfico radial.

A.



B.

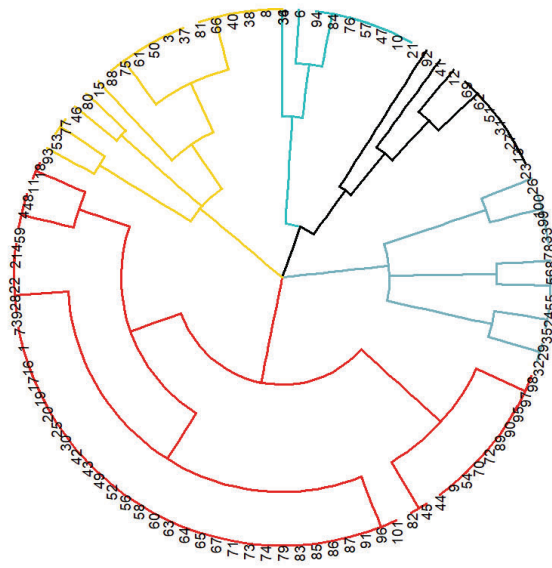


Figura 18. Resultados del *clustering* o agrupamiento jerárquico con el método aglomerativo, representados en forma de dendrograma (A) y de gráfico radial (B).

La distribución de las características clínicas y de los biomarcadores de los pacientes incluidos en cada clúster se indican en las **Tablas 25 y 26**. En cuanto a las características clínicas (**Tabla 25**), la edad se encontraba distribuida de forma bastante homogénea entre todos los clústeres y aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre clústeres para las distintas variables analizadas, el clúster 4 era el que tenía una mayor proporción de varones. El clúster más enriquecido en histología difusa o WHO equivalente fue el clúster 5. Finalmente, los clústeres donde se agrupaban la mayor proporción de pacientes con enfermedad avanzada o metastásica (alrededor de un 80% del total de pacientes) eran el clúster 4 y 5, de ellos el clúster 4 era el que también tenía la mayor proporción de pacientes con localización de enfermedad en unión esofagagástrica.

Tabla 25. Tabla descriptiva de las características clínicas de los pacientes incluidos en cada clúster.

Características clínicas	Clúster 1, N= 52	Clúster 2, N= 18	Clúster 3, N= 12	Clúster 4, N= 9	Clúster 5, N= 10	Valor p*
Edad						
- Media (SD)	66.37 (10.72)	62.50 (9.88)	63.67 (11.7)	65.11 (12.4)	62.50 (12.03)	0.66
Sexo						0.13
Mujer	21 (40.38%)	6 (33.33%)	2 (16.67%)	1 (11.11%)	6 (60.00%)	
Varón	31 (59.62%)	12 (66.67%)	10 (83.33%)	8 (88.89%)	4 (40.00%)	
ECOG						
0-1	46 (88.46%)	16 (88.89%)	10 (83.33%)	9 (100.00%)	8 (80.00%)	
2 o más	5 (9.62%)	2 (11.11%)	2 (16.67%)	0 (0.00%)	1 (10.00%)	
Localización enfermedad						
UEG	12 (23.08%)	4 (22.22%)	3 (25.00%)	4 (44.44%)	0 (0.00%)	
CG	40 (76.92%)	14 (77.78%)	9 (75.00%)	5 (55.56%)	10 (100.00%)	
Tipo Lauren o WHO equ.						
Intestinal/pap/tub/muci	23 (44.23%)	9 (50.00%)	5 (41.67%)	5 (55.56%)	3 (30.00%)	
Difuso/pobrementemente cohesivo	18 (34.62%)	5 (27.78%)	4 (33.33%)	1 (11.11%)	5 (50.00%)	
Mixto	1 (1.92%)	2 (11.11%)	1 (8.33%)	1 (11.11%)	1 (10.00%)	
Indif/pobrement.dif.	9 (17.31%)	1 (5.56%)	2 (16.67%)	2 (22.22%)	1 (10.00%)	
Situación enfermedad al diagnóstico						0.085
Enfermedad no metastásica	29 (55.77%)	11 (61.11%)	7 (58.33%)	2 (22.22%)	2 (20.00%)	
Enfermedad avanzada	23 (44.23%)	7 (38.89%)	5 (41.67%)	7 (77.78%)	8 (80.00%)	

SD, desviación estándar; IQR, rango intercuartílico; ECOG, escala de estado funcional (Eastern Cooperative Oncology Group); CG, cáncer gástrico; UEG, unión esofagagástrica; WHO, clasificación de la OMS – organización mundial de la salud; N, número de pacientes a los que aplica el análisis. El número de pacientes incluidos en el análisis es de 101 (número de pacientes con resultados para todo el panel de biomarcadores). *One-way ANOVA; Fisher's exact test.

Referente a los biomarcadores (**Tabla 26**), en el clúster 1 todas las muestras tenían una expresión aberrante de p53 y eran negativas para HER2 y EBV. El clúster 2 era el clúster con mayor proporción de muestras con expresión aberrante de MUC6 y junto con el clúster 4 eran los grupos que contenían mayor proporción de p53 normal. El clúster 3 contenía todas las muestras positivas para EBV y el 62% del total de las muestras positivas para PD-L1. En el clúster 4, con el 90% del total de muestras positivas para HER2, todas las muestras eran positivas para este marcador y ninguna era positiva para EBV y PD-L1, ni dMMR, ni MUC6 aberrante. En el clúster 5, el 100% de las muestras eran E-cadherina aberrante. Los pacientes con dMMR se repartían de forma homogénea entre los clústeres 1, 2 y 5. El biomarcador PD-L1 se repartía entre los clústeres 2 y 5 (clústeres que contenían un 20% de muestras PD-L1 positivas) y el clúster 3 (que contenía un 83% de muestras positivas para PD-L1 y un 62,5% del total de los PD-L1 positivos).

Tabla 26. Tabla descriptiva de la distribución en cada clúster de los biomarcadores analizados.

Biomarcador	Clúster 1, N= 52	Clúster 2, N= 18	Clúster 3, N= 12	Clúster 4, N= 9	Clúster 5, N= 10
HER2, n (%)					
negativo	52 (100.00%)	18 (100.00%)	11 (91.67%)	0 (0.00%)	10 (100.00%)
positivo	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (8.33%)	9 (100.00%)	0 (0.00%)
EBV, n (%)					
negativo	52 (100.00%)	18 (100.00%)	7 (58.33%)	9 (100.00%)	10 (100.00%)
positivo	0 (0.00%)	0 (0.00%)	5 (41.67%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
MMR, n (%)					
Eficiente	45 (86.54%)	16 (88.89%)	12 (100.00%)	9 (100.00%)	9 (90.00%)
Deficiente	7 (13.46%)	2 (11.11%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (10.00%)
E-cadherina, n (%)					
Normal	45 (86.54%)	17 (94.44%)	12 (100.00%)	8 (88.89%)	0 (0.00%)
Aberrante	7 (13.46%)	1 (5.56%)	0 (0.00%)	1 (11.11%)	10 (100.00%)
TP53, n (%)					
Normal	0 (0.00%)	16 (88.89%)	4 (33.33%)	2 (22.22%)	9 (90.00%)
Aberrante	52 (100.00%)	2 (11.11%)	8 (66.67%)	7 (77.78%)	1 (10.00%)
MUC6, n (%)					
Normal	40 (76.92%)	6 (33.33%)	12 (100.00%)	9 (100.00%)	10 (100.00%)
Aberrante	12 (23.08%)	12 (66.67%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
PD-L1 CPS, n (%)					
Negativo	52 (100.00%)	14 (77.78%)	2 (16.67%)	9 (100.00%)	8 (80.00%)
Positivo	0 (0.00%)	4 (22.22%)	10 (83.33%)	0 (0.00%)	2 (20.00%)

HER2, human epidermal growth factor receptor 2; EBV, del inglés *Epstein-Barr* virus; MMR, DNA mismatch repair system; MUC6, mucina 6; PD-L1, programmed death-ligand; N, número de pacientes a los que aplica el análisis. El número de pacientes incluidos en el análisis es de 105 (número de pacientes con resultados para todo el panel de biomarcadores).

Tal y como se representa en la **Figura 19**, de los 69 pacientes considerados “*all-negatives*” (negativos para HER2/PD-L1/EBV/MSI), 45 se distribuían en el clúster 1 (65% de los casos), 13 en el clúster 2 (19%) y 7 en el clúster 5 (10%); el resto de pacientes, 4 en total, no tenían asignado clúster por falta de algún biomarcador.

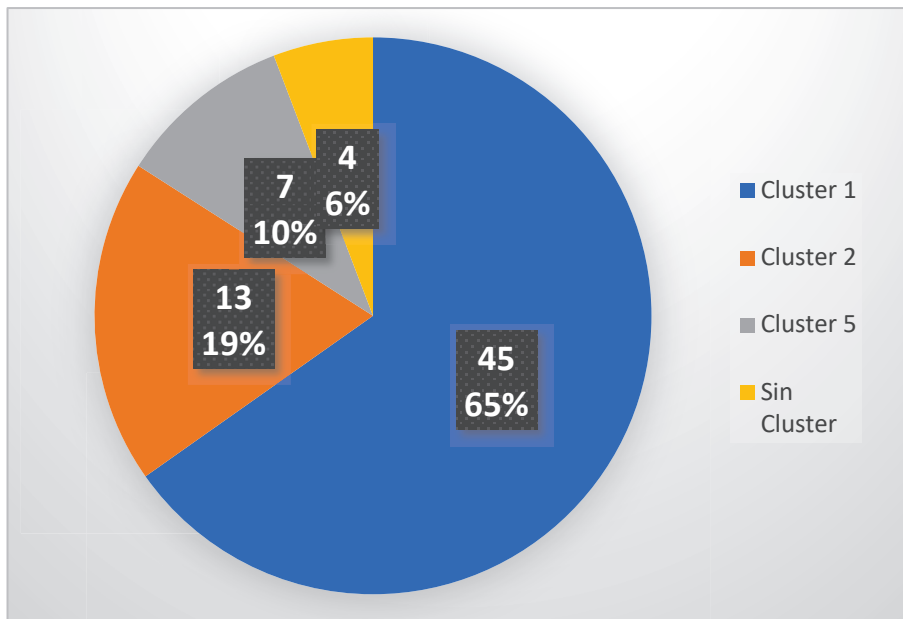
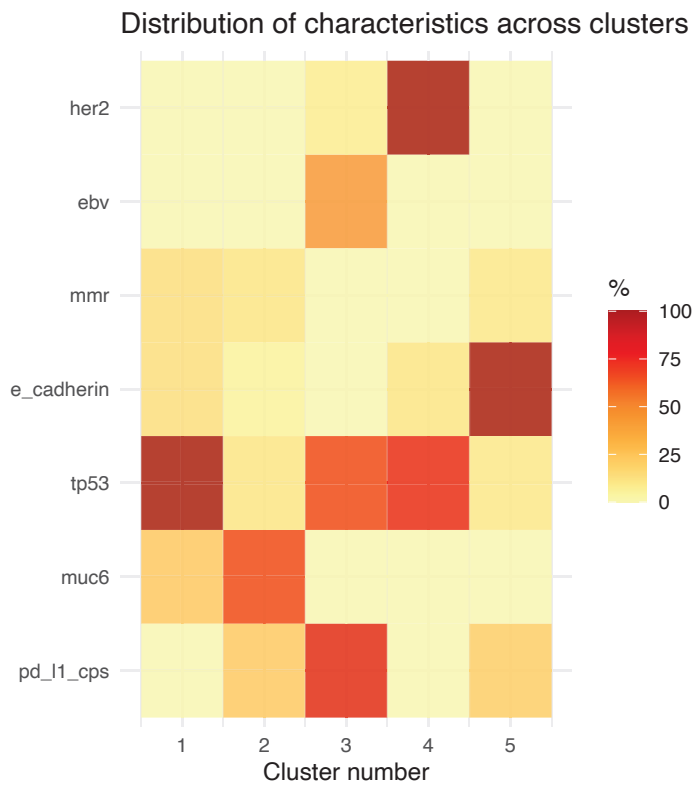


Figura 19. Distribución de 69 pacientes ‘all-negatives’ (no-HER2/PD-L1/EBV/MSI) en distintos clústeres.

El heatmap (o mapa de calor) y el spider plot (o gráfica de araña), respectivamente en la **Figura 20 (parte a y b)** muestran de forma más visual la distribución de los biomarcadores en cada clúster. En ellas se ve más claramente que el **clúster 1** se caracterizaba por la presencia de p53 aberrante sin tener HER2 positivos y lo denominaríamos **p53 aberrante - HER2 negativo**; el **clúster 2** se caracterizaba por la presencia de MUC6 aberrantes y donde prácticamente todos tenían p53 normal y lo denominaríamos **MUC6 - p53 normal *enriched***; el **clúster 3** se caracterizaba por la presencia de EBV positivos y PD-L1 positivos y lo denominaríamos **EBV and PD-L1 *enriched***; el **clúster 4** se caracterizaba por la presencia de HER2 positivos y donde prácticamente todos tenían p53 aberrante y lo denominaríamos **HER2 positivo - p53 aberrante** y finalmente, el **clúster 5** se caracterizaba por la presencia de E-cadherina aberrante y lo denominaríamos **E-cadherina aberrante**.

A.



B.

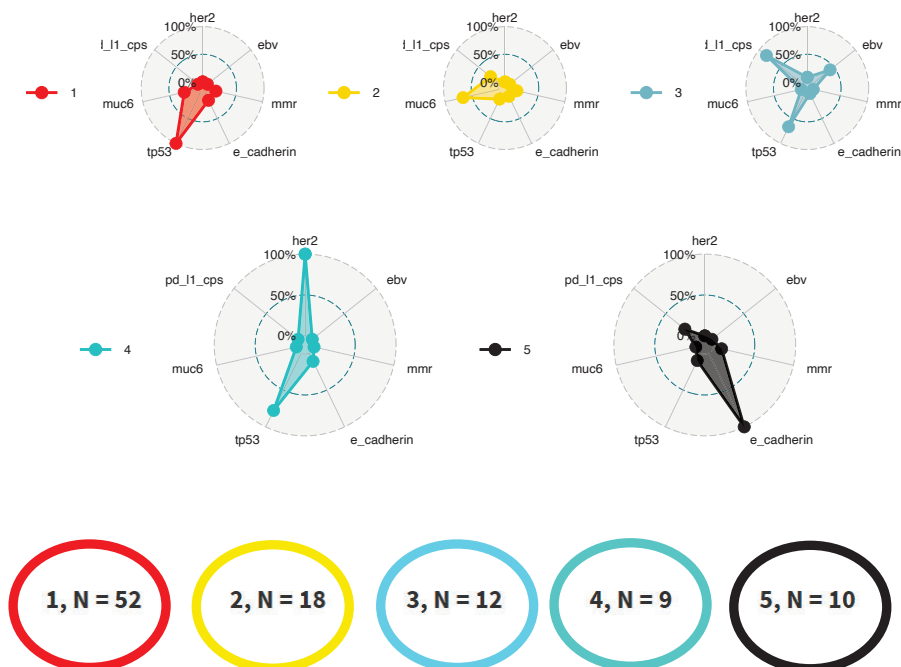


Figura 20. Heatmap (o mapa de calor) de los biomarcadores en cada clúster resultante (parte A) y Spider plot (o gráfica de araña) de los biomarcadores en cada clúster resultante (parte B).

En la **Figura 21**, presentamos nuestra propuesta de algoritmo a partir de los resultados del *clustering* o agrupamiento jerárquico, así como la nomenclatura de cada clúster.

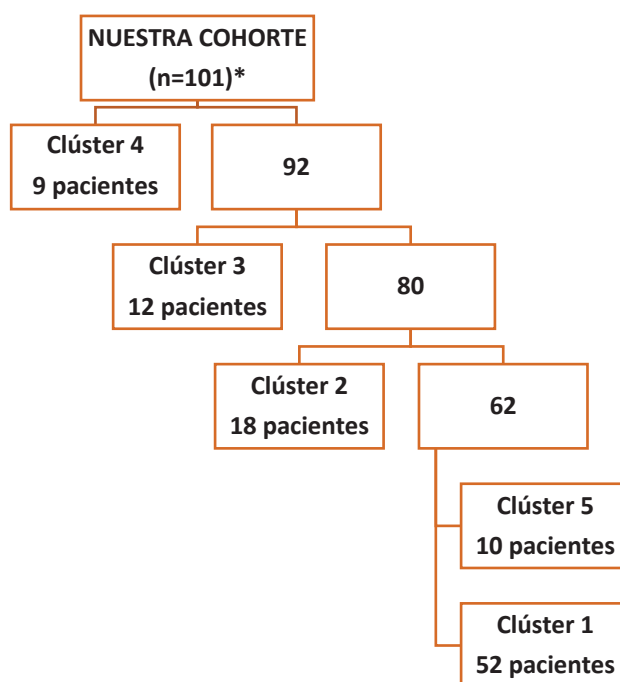


Figura 21. Propuesta de algoritmo a partir de los resultados del *clustering* o agrupamiento jerárquico. *Clúster 1: p53 aberrante - HER2 negativo, Clúster 2: MUC6 – p53 normal, Clúster 3: EBV y PD-L1 enriched, Clúster 4: HER2 positivo - p53 aberrante, Clúster 5: E-cadherina aberrante.*

Y finalmente, una vez expuestos los dos métodos de clasificación a partir de los resultados del panel de biomarcadores de expresión proteica y génica: el algoritmo de Setia adaptado y el clustering o agrupamiento jerárquico (apartados 6.1.3.1 y 6.1.3.2), en la **Taula 27** se representa la distribución en cada clúster de los grupos de Setia adaptado. En ella se observa que los dos métodos de clasificación presentan una razonable equivalencia o correspondencia. Todos los clústeres, excepto el clúster 2, tienen una correspondencia del 70% o más con un grupo determinado de Setia adaptado (marcado en gris). En el caso del clúster 2, definido por MUC6 que es un biomarcador no utilizado en el algoritmo de Setia

original ni en el adaptado, encontramos que contiene el 100% de los pacientes del grupo de p53 de Setia adaptado. Y el 100% de los pacientes del grupo de EBV de Setia adaptado están incluidos en el clúster 3. De forma diferencial el grupo de MSI de Setia adaptado no presenta una buena correspondencia con ningún clúster determinado.

Tabla 27. Tabla descriptiva de la distribución en cada clúster de los grupos de Setia adaptado.

	Clúster 1, N= 52	Clúster 2, N= 18	Clúster 3, N=12	Clúster 4, N= 9	Clúster 5, N= 10
	p53 aberrante – HER2 negativo	MUC6 – p53 normal <i>enriched</i>	EBV and PD- L1 <i>enriched</i>	HER2 positivo – p53 aberrante	E-cadherina aberrante
Grupo Setia adaptado					
HER2 positivo	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (8.33%)	9 (100%)	0 (0.00%)
PD-L1 positivo	0 (0.00%)	4 (22.2%)	9 (75.0%)	0 (0.00%)	2 (20.0%)
EBV positivo	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (16.7%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
MSI	7 (13.5%)	1 (5.56%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (10.0%)
E-cadherina aberrante	5 (9.62%)	1 (5.56%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	7 (70.0%)
p53 aberrante	40 (76.9%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
p53 normal	0 (0.00%)	12 (66.7%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)

Grupos de Setia adaptado que representa más del 70% dentro del clúster (en gris). Grupos de Setia adaptado que está el 100% representado en este clúster (en negrita).

6.1.4. Resultados del panel de mutaciones somáticas recurrentes en cáncer gástrico:

Nuestro panel de mutaciones fue diseñado para encontrar mutaciones puntuales distribuidas en un total de 75 genes frecuentemente mutados en CG (Tabla 16, expuesta en el apartado 5.5.3 de metodología). De 10 de estos genes, los más frecuentemente mutados descritos en la literatura (*APC* / *ARID1A* / *CDH1* / *KRAS* / *PIK3CA* / *PTEN* / *RHOA* / *RNF43* / *SMAD4* / *TP53*), se secuenció toda la región codificante (CDS, del inglés Coding Sequence). Del resto (65 genes) se secuenciaron amplicones que cubrían mutaciones puntuales previamente asociadas a CG. Los amplicones de dos de estos 65 genes, *ASXL1* (representado por 1 amplicón) y *KANSL1* (representado por dos amplicones), no se amplificaron correctamente y, en consecuencia, no disponemos de resultados. Como ya se ha explicado anteriormente, obtuvimos resultados del análisis del panel mutacional de un total de 76 muestras (Figura 12, apartado 6.1. de resultados). En

14 casos (18%) no se identificó ninguna mutación, en 24 (32%) se identificó una sola mutación y en el resto de las muestras, 38 (50%), se identificaron 2 o más mutaciones que se encontraban en un mismo gen o en genes distintos (**Tabla 28**).

Tabla 28. Tabla descriptiva del número de mutaciones por muestra.

Número de mutaciones	Nº de muestras (%)
0	14 (18.42%)
1	24 (31.57%)
2	15 (19.73%)
3	4 (5.26%)
4	8 (10.52%)
5	2 (2.63%)
6	1 (1.31%)
7	2 (2.63%)
8	2 (2.63%)
9	2 (2.63%)
10	1 (1.31%)
14	1 (1.31%)

Las mutaciones identificadas pueden ser en un mismo gen o en un gen diferente.

Analizando más en detalle el número de mutaciones vemos que en 15 muestras se observaron 2 mutaciones (20%), en 4 (5%) 3 mutaciones, en 8 (11%) 4 mutaciones y en 11 (14.3%) 5 o más mutaciones. En total se identificaron 186 mutaciones puntuales, en 37 de los genes analizados y listados en la **Tabla 29**, 163 de las cuales son distintas. Dichas mutaciones no se distribuían homogéneamente por los genes analizados, habiendo unos genes que presentan un número más alto de mutaciones que otros. El gen con el mayor número de mutaciones fue *TP53*, en el que se identificaron 31 mutaciones (17% del total de mutaciones), seguido de *ARID1A*, con 24 mutaciones (13% del total de mutaciones), y de *PIK3CA*, con 16 mutaciones (9% del total de mutaciones, el número de mutaciones en los otros genes fue menor y más homogéneo. El gen más frecuentemente mutado en nuestra cohorte de pacientes con resultado de panel mutacional fue *TP53* que estaba mutado en 29 de los 76 pacientes (38.16%) incluidos en el análisis, seguido de *ARID1A* con mutaciones en 22 pacientes (28.94%) y *PIK3CA* en 11 (14.47%). Estos son genes en los que se ha analizado toda la región codificante y que en la literatura ya se describen como genes más frecuentemente mutados en CG (**Tabla 30**).

Tabla 29. Tabla descriptiva del número de mutaciones identificadas en cada gen analizado y su porcentaje respecto al total de mutaciones identificadas (n=186).

Gen	n (%)
<i>TP53</i>	31 (16.67%)
<i>ARID1A</i>	24 (12.90%)
<i>PIK3CA</i>	16 (8.60%)
<i>APC</i>	11 (5.91%)
<i>KMT2D</i>	9 (4.84%)
<i>CDH1</i>	8 (4.30%)
<i>RNF43</i>	7 (3.76%)
<i>PTEN</i>	6 (3.23%)
<i>KMT2C</i>	6 (3.23%)
<i>KRAS</i>	6 (3.23%)
<i>RHOA</i>	6 (3.23%)
<i>SMAD4</i>	6 (3.23%)
<i>CIC</i>	5 (2.69%)
<i>AXIN2</i>	5 (2.69%)
<i>BCOR</i>	4 (2.15%)
<i>ERBB2</i>	3 (1.61%)
<i>CDKN2A</i>	3 (1.61%)
<i>EPAH2</i>	2 (1.08%)
<i>ARID4B</i>	2 (1.08%)
<i>UBR5</i>	2 (1.08%)
<i>ATM</i>	2 (1.08%)
<i>BRAF</i>	2 (1.08%)
<i>CTCF</i>	2 (1.08%)
<i>ERBB3</i>	2 (1.08%)
<i>FAT4</i>	2 (1.08%)
<i>FBXW7</i>	2 (1.08%)
<i>TBL1XR1</i>	2 (1.08%)
<i>ATR</i>	1 (0.54%)
<i>B2M</i>	1 (0.54%)
<i>ECT2L</i>	1 (0.54%)
<i>FAT2</i>	1 (0.54%)
<i>FXR1</i>	1 (0.54%)
<i>LRP1B</i>	1 (0.54%)
<i>PBRM1</i>	1 (0.54%)
<i>PCLO</i>	1 (0.54%)
<i>PPM1D</i>	1 (0.54%)
<i>RASA1</i>	1 (0.54%)

Pueden ser por la misma muestra o por muestras diferentes.

Tabla 30. Tabla descriptiva del número de muestras con mutación de cada gen respecto al total de muestras analizadas (n=76).

Gen	n (%)
<i>TP53</i>	29 (38.16%)
<i>ARID1A</i>	22 (28.95%)
<i>PIK3CA</i>	11 (14.47%)
<i>APC</i>	10 (13.16%)
<i>KMT2D</i>	8 (10.53%)
<i>CDH1</i>	8 (10.53%)
<i>RNF43</i>	6 (7.89%)
<i>KMT2C</i>	6 (7.89%)
<i>KRAS</i>	6 (7.89%)
<i>RHOA</i>	6 (7.89%)
<i>SMAD4</i>	6 (7.89%)
<i>PTEN</i>	5 (6.58%)
<i>AXIN2</i>	5 (6.58%)
<i>BCOR</i>	3 (3.95%)
<i>CDKN2A</i>	3 (3.95%)
<i>ERBB2</i>	2 (2.63%)
<i>EPAH2</i>	2 (2.63%)
<i>ATM</i>	2 (2.63%)
<i>CIC</i>	2 (2.63%)
<i>BRAF</i>	2 (2.63%)
<i>CTCF</i>	2 (2.63%)
<i>ERBB3</i>	2 (2.63%)
<i>FAT4</i>	2 (2.63%)
<i>FBXW7</i>	2 (2.63%)
<i>TBL1XR1</i>	2 (2.63%)
<i>ATR</i>	1 (1.32%)
<i>ARID4B</i>	1 (1.32%)
<i>UBR5</i>	1 (1.32%)
<i>B2M</i>	1 (1.32%)
<i>ECT2L</i>	1 (1.32%)
<i>FAT2</i>	1 (1.32%)
<i>FXR1</i>	1 (1.32%)
<i>LRP1B</i>	1 (1.32%)
<i>PBRM1</i>	1 (1.32%)
<i>PCLO</i>	1 (1.32%)
<i>PPM1D</i>	1 (1.32%)
<i>RASA1</i>	1 (1.32%)

6.1.4.1. *Distribución de las mutaciones dentro de los clústeres:*

Los 76 pacientes con resultados del panel mutacional se agrupaban en los siguientes clústeres: 38 en el clúster 1, 12 en el clúster 2, 9 en el clúster 3, 6 en el clúster 4, 5 en el clúster 5 y 6 sin clúster por falta de uno o más biomarcadores. Los resultados del panel de mutaciones se representan de forma más visual en la **Figura 22**, en la cual los genes se han ordenado según el número de muestras mutadas y las muestras se han ordenado y coloreado según el clúster al que pertenecen de acuerdo con los resultados del panel de biomarcadores de expresión proteica y génica. Los de color gris claro son los pacientes no incluidos en ningún clúster. Para cada muestra se indica si el gen analizado está mutado (punto rojo) o no (en blanco). No hemos observado diferencias significativas entre clústeres relacionadas con el número de mutaciones por muestra o por mayor presencia de mutaciones en algunos genes determinados. Sólo podemos destacar que 6 (67%) de las 9 muestras con 5 o más mutaciones estaban en el clúster 1.

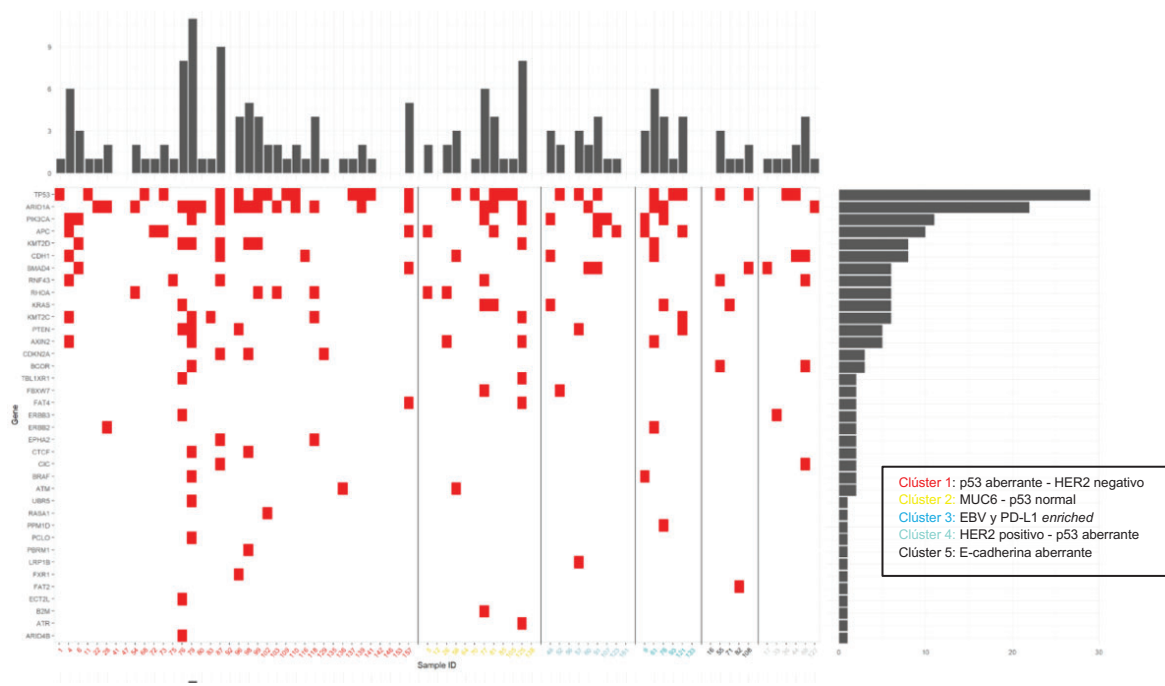


Figura 22. Resultados del panel de mutaciones somáticas recurrentes en CG y su distribución en los distintos clústeres en los que se agrupaban los pacientes. *Para cada muestra se representa en rojo si el gen analizado presenta al menos una mutación y en blanco si no la presenta. Para cada muestra se representa en rojo si el gen analizado presenta al menos una mutación y en blanco si no la presenta. Los IDs de las muestras se han ordenado y coloreado por número de clúster al que corresponden. Los de color gris son los pacientes no incluidos en ningún clúster. Las barras superiores representan el total de mutaciones de los individuos y las barras laterales derechas corresponden al total de muestras con mutaciones de los genes.*

6.1.4.2. *Distribución de las mutaciones en los subgrupos del Algoritmo de Setia adaptado*

Los 76 pacientes con resultados del panel mutacional se agrupaban en los siguientes subgrupos del algoritmo de Setia adaptado: 7 en el grupo de HER2 positivo, 11 en el grupo de PD-L1 positivo, 2 en el grupo de EBV, 6 en el grupo de MSI, 8 en el grupo de E-cadherina aberrante, 30 en el grupo de p53 aberrante y finalmente, 9 en el grupo de p53 normal. Los resultados del panel de mutaciones se representan de forma más visual en la **Figura 23**, en la cual los genes se han ordenado según el número de muestras mutadas y las muestras se han ordenado y coloreado según el subgrupo de Setia adaptado al que pertenecen de acuerdo con los resultados del panel de biomarcadores de expresión proteica y génica. Los de color gris claro son los pacientes no incluidos en ningún subgrupo (3 pacientes). Para cada muestra se indica si el gen analizado está mutado (punto rojo) o no (en blanco). No hemos observado diferencias significativas entre los subgrupos relacionadas con el número de mutaciones por muestra o por mayor presencia de mutaciones en algunos genes determinados. Sólo podemos destacar que 4 (45%) de las 9 muestras con 5 o más mutaciones estaban en el grupo de MSI.

6.1.4.3. Identificación de las mutaciones en los pacientes “all-negatives”:

Definimos paciente “all-negative” como aquel que no queda incluido en ninguno de los 4 primeros grupos del algoritmo que hemos propuesto con los marcadores de expresión proteica y génica (*Setia* adaptado), es decir, el paciente que es negativo para HER2, negativo para PD-L1, negativo para EBV y que tampoco presenta MSI. Ya hemos visto que aplicando nuestra propuesta de algoritmo de *Setia* adaptado, los pacientes “all-negative” eran un total de 69 pacientes y que pertenecían a los subgrupos que denominamos E-cadherina aberrante, p53 aberrante y p53 normal, es decir subgrupos que no podemos dirigir a un tratamiento concreto (ver **Figura 17**, apartado 6.1.3.1. de resultados). Nuestra cohorte final tenía 3 pacientes sin resultado de panel de biomarcadores de expresión, pero con resultado de panel de mutaciones, estos pacientes se han añadido al grupo de “all-negatives” que serían así un total de 72 pacientes.

6.1.4.3.1. Perfil mutacional de los pacientes “all-negatives”

En este apartado se realiza un análisis descriptivo de los resultados del panel de mutaciones en estos pacientes “all-negatives” con el objetivo de identificar información que nos permita dirigirlos a tratamientos concretos. La **Tabla 31** muestra que de los 72 pacientes “all-negatives”, 50 de ellos tenían resultado de panel mutacional y de éstos, 40 pacientes presentaban al menos 1 mutación. En la **Tabla 32** se especifican los genes mutados de cada uno de los pacientes “all-negatives”. De estos genes consideramos que son “informativos” aquellos con mutaciones que nos puedan ayudar a identificar potenciales tratamientos para los pacientes. Se consideran mutaciones “informativas” aquellas que tengan niveles de I a III en la escala de accionabilidad clínica ESCAT (ESMO Scale for Clinical Actionability for molecular Targets, ver apartado de anexos)(53), aquellas que identifican el subtipo o fenotipo GS (*Genomically Stable*) de la clasificación de TCGA(1) y otros genes que consideramos con potencial para tratamiento dirigido. De las mutaciones identificadas en nuestra cohorte de pacientes “all-negatives”, en la **Tabla 32** se muestra si el gen mutado es informativo (casilla de color) o no informativo (casilla blanca). Encontramos 39 genes con mutaciones informativas en 23 pacientes. En la **Tabla 33** se representan los diferentes niveles según ESCAT. En CG no disponemos de mutaciones de genes con niveles I y II. Sólo disponemos de un nivel I en esta escala, que no corresponde a una mutación sino a una amplificación, la del gen *ERBB2* o *HER2*(39). Encontramos 39 genes con mutaciones informativas en 23 pacientes.

Tabla 31. Resultado de panel mutacional en los pacientes considerados “*all-negatives*”.

All negatives	72
All negatives con panel mutacional	50
No mutaciones	10
Al menos 1 mutación	40
All negatives sin panel mutacional	22

Tabla 32. Genes mutados identificados en los 50 pacientes considerados ‘*all-negatives*’ con resultado de panel mutacional y tipo alteración informativa o no informativa, así como su correspondencia con el clúster.

ID											Clúster
1	TP53										1
4	RNF43	APC	APC	AXIN2	KMT2C	PIK3CA	CDH1				1
5	APC	RHOA									2
11	TP53										1
17	SMAD4										No clúster
22	ARID1A										1
26	RHOA	AXIN2									2
28	ERBB2	ARID1A									1
33	ERBB3										No clúster
36	TP53	TP53									No clúster
44	TP53	CDH1									No clúster
54	RHOA	ARID1A									1
55	TP53	RNF43	BCOR								5
58	ATM	TP53	CDH1								2
68	TP53										1
70	TP53	TP53									2
72	APC										1
73	APC	TP53									1
75	RNF43										5
80	ARID1A										1
81	APC	KRAS	TP53	ARID1A							2
82	FAT2										5
83	KMT2C										1
87	TP53	CDH1	RNF43	ARID1A	CDKN2A	RNF43	EPHA2	PIK3CA	KMT2D	CIC	1
96	ARID1A	FXR1	TP53	PTEN							1
99	ARID1A	RHOA	KMT2D	TP53							1
102	TP53	RASA1									1
103	RHOA	ARID1A									1
105	TP53										2
108	TP53	SMAD4									5
109	TP53										1
110	TP53	ARID1A									1
116	CDH1										1
118	EPHA2	ARID1A	KMT2C	RHOA							1
127	ARID1A										No clúster
136	ATM										1
137	TP53										1
139	TP53	ARID1A									1
141	TP53										1
157	SMAD4	APC	ARID1A	TP53	FAT4						1

Los ID subrayados son los pacientes sin resultados del panel de biomarcadores de expresión por IHQ/ISH, sólo del panel mutacional. En color blanco mutaciones consideradas no informativas. En color amarillo alteraciones con diferentes niveles de I a III en escala ESCAT. Ver Tabla abajo. En color verde mutaciones en genes de la familia KMT(101–103). En color rosa alteraciones identificadoras de fenotipo GS (estabilidad genómica) de TCGA(1)

Tabla 33. Tabla que muestra genes con alteraciones (sólo mutaciones) y los diferentes niveles según ESCAT, así como su prevalencia descrita en CG.

Gen y Prevalencia en CG(104)	Nivel de alteración según ESCAT(99,100)
<i>ARID1A</i> , 14%	IIIB(105)
<i>ATM</i> , 3%	IIIA(106)
<i>CDKN2A</i> , 12%	IIIB(107)
<i>ERBB2</i> , 3%	IIIA(108)
<i>ERBB3</i> , 3%	IIIB(108)
<i>KRAS</i> , 8-9%	IIIB(109)
<i>PIK3CA</i> , 7%	IIIA(110)
<i>PTEN</i> , 3.4%	IIIB(111)

La **Figura 24** representa de forma más visual la distribución de estos resultados en los pacientes “*all-negatives*” con panel de mutaciones; se observa que de los de los 50 pacientes “*all-negatives*”, a 23 (46%) se les ha identificado al menos 1 mutación informativa, a 17 (34%) se les ha identificado alguna mutación no informativa y a 10 pacientes (20% del total) no se les ha identificado ninguna mutación.

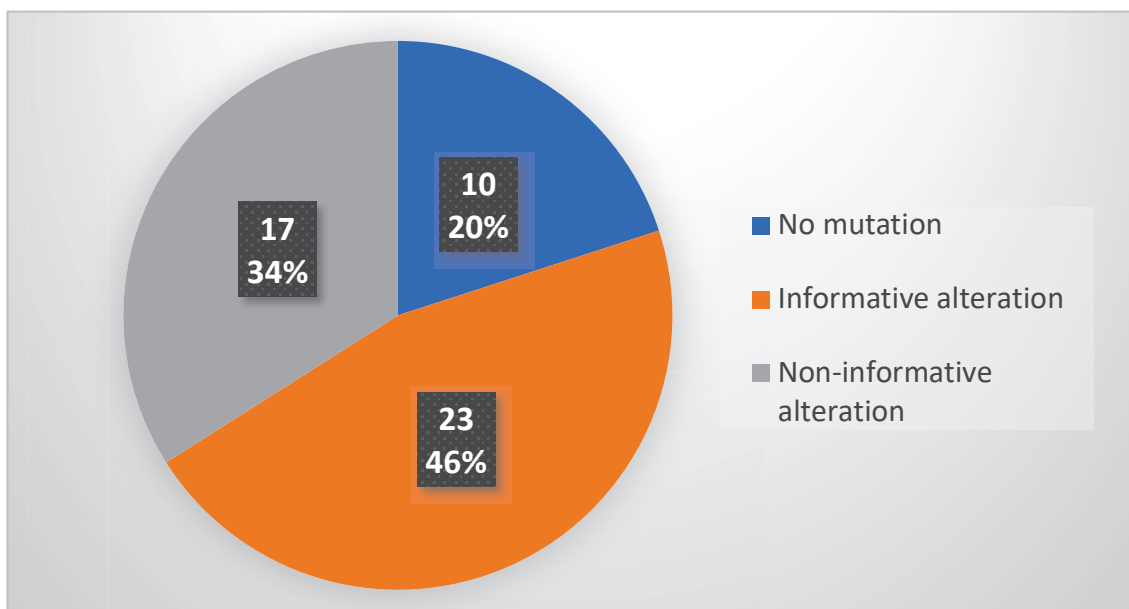


Figura 24. Perfil mutacional de los pacientes ‘*all-negatives*’ con resultado del panel de mutaciones (N= 50).

6.1.5. Concordancia entre el estado mutacional de los genes *TP53* y *CDH1* y sus proteínas

Al analizar la relación entre la presencia de mutaciones puntuales en los genes *TP53* y *CDH1* y su expresión proteica, se observa que mientras el número de pacientes con expresión de p53 aberrante eran 51, el número de pacientes con mutaciones puntuales en *TP53* eran 28, de los cuales 20 (20/51, 39.22%) a su vez mostraban una expresión aberrante de p53 y 8 mostraban una expresión normal. Del mismo modo, mientras el número de pacientes con expresión aberrante de E-cadherina eran 11, el número de pacientes con mutaciones puntuales en *CDH1* era de 7, de los cuales 2 (2/11, 18.18%) a su vez mostraban una expresión aberrante de E-cadherina y 5 mostraban una expresión normal. Estos datos se muestran en la **Tabla 34**.

Tabla 34. Relación entre la presencia de mutaciones en los genes *TP53* y *CDH1* y su expresión proteica, analizada por IHQ.

p53 / TP53		
	Expresión proteína normal (IHQ), N = 22	Expresión proteína aberrante (IHQ), N = 51
Mutación del gen, n (%)		
No	14 (63.64%)	31 (60.78%)
Si	8 (36.36%)	20 (39.22%)

E-cadherina / CDH1		
	Expresión proteína normal (IHQ), N = 62	Expresión proteína aberrante (IHQ), N = 11
Mutación del gen, n (%)		
No	57 (91.94%)	9 (81.82%)
Si	5 (8.06%)	2 (18.18%)

6.1.6. *Integración de resultados: selección de tratamiento tras aplicar los dos métodos de clasificación y el perfil mutacional de los pacientes “all-negatives”*

Parte A. Selección de tratamiento tras aplicar el algoritmo de *Setia* adaptado y el perfil mutacional de los pacientes “all-negatives”

Como ya se ha comentado anteriormente, aplicando nuestra propuesta de algoritmo de *Setia* adaptado, los pacientes “all-negative” eran un total de 69 pacientes y pertenecían a los subgrupos que denominamos E-cadherina aberrante, p53 aberrante y p53 normal. Si añadimos la información obtenida del panel de mutaciones para estos pacientes vemos que 3 de los 13 pacientes del grupo de E-cadherina, 14 de los 43 pacientes con p53 aberrante, y finalmente 4 de los 13 pacientes con p53 normal, tendrían al menos una mutación “informativa” que nos permitiría pensar en un tratamiento dirigido. El total de pacientes “rescatados” con la integración de los resultados del panel de biomarcadores de expresión proteica y génica y el panel de mutaciones es de 21 (**Figura 25**). Y esta situación ocurriría también en 2 de los 3 pacientes sin resultado de panel de biomarcadores de expresión, pero con resultado de panel de mutaciones.

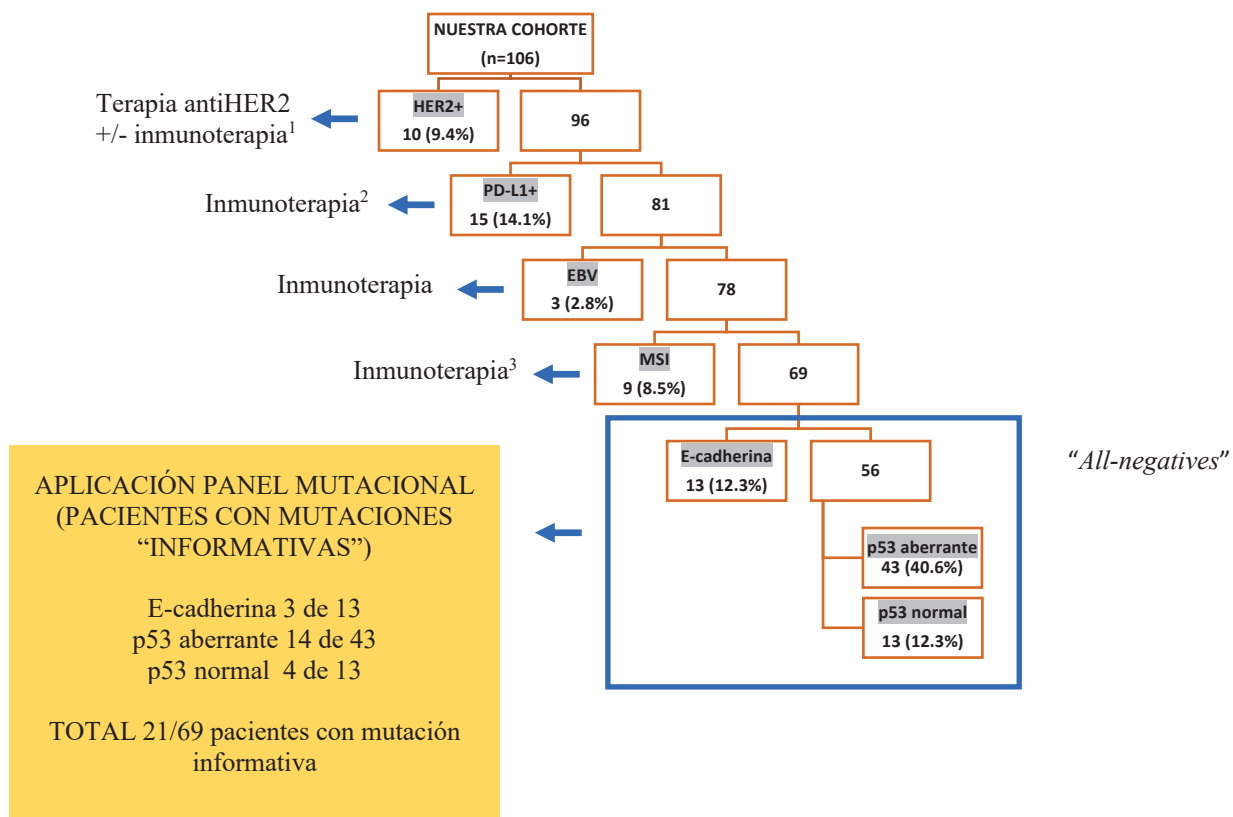


Figura 25. Selección de tratamiento tras aplicar el algoritmo de Setia adaptado, analizando el perfil mutacional de los pacientes “all-negatives”. ¹Inmunoterapia en caso de PD-L1 positivo, CPS > 1. ²Si enfermedad avanzada o metastásica y PD-L1 positivo CPS > 5: quimioterapia + inmunoterapia. ³En contexto de enfermedad localizada: no beneficio quimioterapia adyuvante y en contexto de enfermedad avanzada: valorar inmunoterapia en segunda línea.

Parte B. Selección de tratamiento tras aplicar el *clustering* o agrupamiento jerárquico y el perfil mutacional de los pacientes “*all-negatives*”

De los 5 subgrupos resultantes con la clasificación por clústeres, pensando en potenciales tratamientos dirigidos, como ya hemos comentado en el apartado de introducción, el **clúster 4** (HER2 positivo – p53 aberrante) debería responder bien a terapia antiHER2 y inmunoterapia, el **clúster 3** (EBV y PD-L1 enriched) debería responder bien a inmunoterapia y el **clúster 2** (MUC6 aberrante – p53 normal) que correspondería al subtipo metabólico descrito por Lei et al.(17), debería presentar buena respuesta a quimioterapia convencional (basada en 5-fluorouracilo)(112). Nos quedarían los dos últimos clústeres (**clúster 5 y 1**), que denominamos E-cadherina aberrante y p53 aberrante – HER2 negativo, respectivamente.

La **Figura 26** representa la propuesta de selección de tratamientos en función de la clasificación de los pacientes según propuesta de algoritmo a partir del *clustering* o agrupación jerárquica.

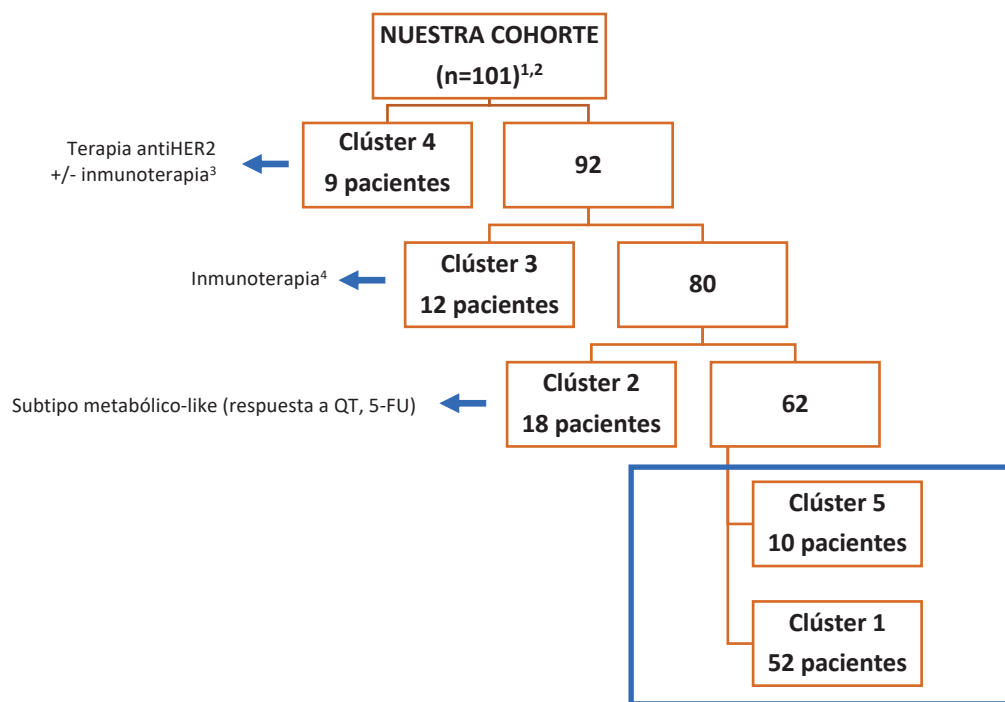


Figura 26. Selección de tratamiento tras aplicar nuestro algoritmo a partir de los resultados del *clustering* o agrupamiento jerárquico. *Clúster 1: p53 aberrante – HER2 negativo. Clúster 2: MUC6 – p53 normal. Clúster 3: EBV y PD-L1 enriched. Clúster 4: p53 aberrante – HER2 positivo. Clúster 5: E-cadherina aberrante.* ¹Un total de 8 pacientes no tenían *clúster* asignado por falta de algún biomarcador, por lo que el total de muestras para este análisis es de 101. ²En cualquier *clúster*, en caso de MSI en contexto de enfermedad localizada: no beneficio quimioterapia adyuvante y en caso de MSI en contexto de enfermedad avanzada: valorar inmunoterapia en segunda línea. ³Inmunoterapia en caso de PD-L1 positivo, CPS > 1. ⁴Si enfermedad avanzada o metastásica y PD-L1 positivo CPS > 5: quimioterapia + inmunoterapia. Señalados en cuadrado de color azul, *clústeres* sin tratamiento.

Como muestra la **Figura 27**, si añadimos la información obtenida del panel de mutaciones a nuestra clasificación a partir del *clustering* o agrupamiento jerárquico, para estos pacientes vemos que 16 de los 52 pacientes del *clúster* 1 y 0 pacientes de los 10 pacientes del *clúster* 5, tendrían al menos una mutación “informativa” que nos permitiría pensar en

un tratamiento dirigido. El total de pacientes “rescatados” con la integración de los resultados del panel biomarcadores de expresión proteica y génica y el panel de mutaciones es de 16.

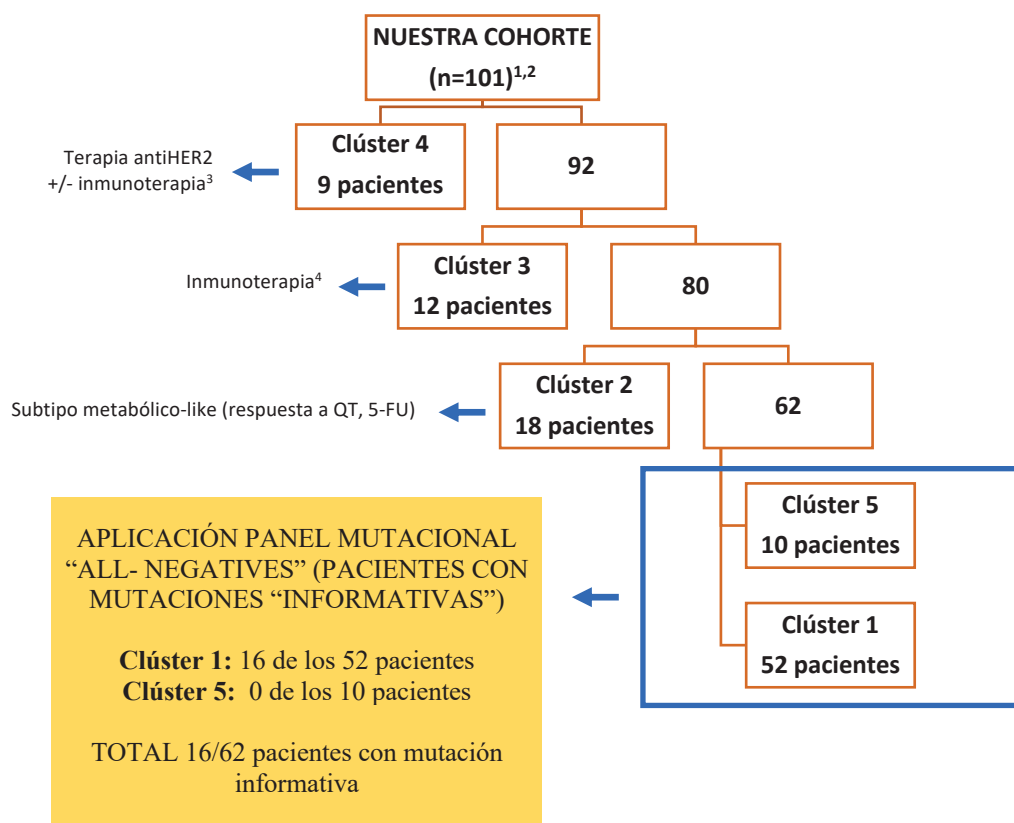


Figura 27. Selección de tratamiento tras aplicar nuestro el algoritmo a partir de los resultados del *clustering* o agrupamiento jerárquico, analizando el perfil mutacional de los pacientes “all-negatives”. *Clúster 1: p53 aberrante - HER2 negativo. Clúster 2: MUC6 – p53 normal. Clúster 3: EBV y PD-L1 enriched. Clúster 4: HER2 positivo - p53 aberrante. Clúster 5: E-cadherina aberrante.* ¹Un total de 8 pacientes no tenían clúster asignado por falta de algún biomarcador, por lo que el total de muestras para este análisis es de 101. ²En cualquier clúster, en caso de MSI en contexto de enfermedad localizada: no beneficio quimioterapia adyuvante y en caso de MSI en contexto de enfermedad avanzada: valorar inmunoterapia en segunda línea. ³Inmunoterapia en caso de PD-L1 positivo, CPS > 1. ⁴Si enfermedad avanzada o metastásica y PD-L1 positivo CPS > 5: quimioterapia + inmunoterapia.

6.2. Análisis de las variables de eficacia

Las variables de eficacia de nuestro estudio son la Supervivencia Libre de Recidiva (SLR), la Supervivencia Libre de Progresión (SLP) a la primera línea de quimioterapia, la Supervivencia Global (SG) y finalmente el beneficio del tratamiento según definición propia (apartado 5.4.1). La N final de pacientes que podían presentar el evento recidiva, era de 55 pacientes, es decir pacientes que habían sido intervenidos quirúrgicamente con intención radical. La N final de pacientes que podían presentar el evento muerte era de 109, todos los pacientes de nuestra cohorte final. La N final de pacientes que podían presentar progresión a la primera línea de tratamiento de quimioterapia (TP), era de 40 pacientes, total de pacientes que habían recibido quimioterapia de primera línea. Y finalmente, la N final de pacientes que podían presentar beneficio al tratamiento fue de 68 que eran el total de pacientes que cumplían criterios de beneficio evaluable (criterios de beneficio evaluable descritos anteriormente en el apartado 5.4.1). El listado de las variables de eficacia y su N de pacientes a los que se puede aplicar el análisis (pacientes “en riesgo”) correspondiente, se representa en la **Tabla 35**. Un total de 69 pacientes (63%) de los 109 de la cohorte final, fueron éxitos y un total de 21 pacientes (38%) de los 55 en los que se realizó intervención quirúrgica con intención radical, presentaron recidiva (**Tabla 36**).

Tabla 35. Listado de las variables de eficacia del estudio, eventos y N de pacientes a los que se puede aplicar el análisis

Variable eficacia	Evento	N
SLR	Recidiva	55 pacientes
SG	Muerte	109 pacientes
SLP 1aL	Progresión a la primera línea	40 pacientes
Beneficio del tratamiento	Beneficio	68 pacientes

SLR Supervivencia Libre de Recidiva; SLP 1aL Supervivencia Libre de Progresión a la primera línea de quimioterapia; SG Supervivencia Global; N número de pacientes a los que se puede aplicar el análisis

Tabla 36. Tabla descriptiva de los eventos recidiva y muerte

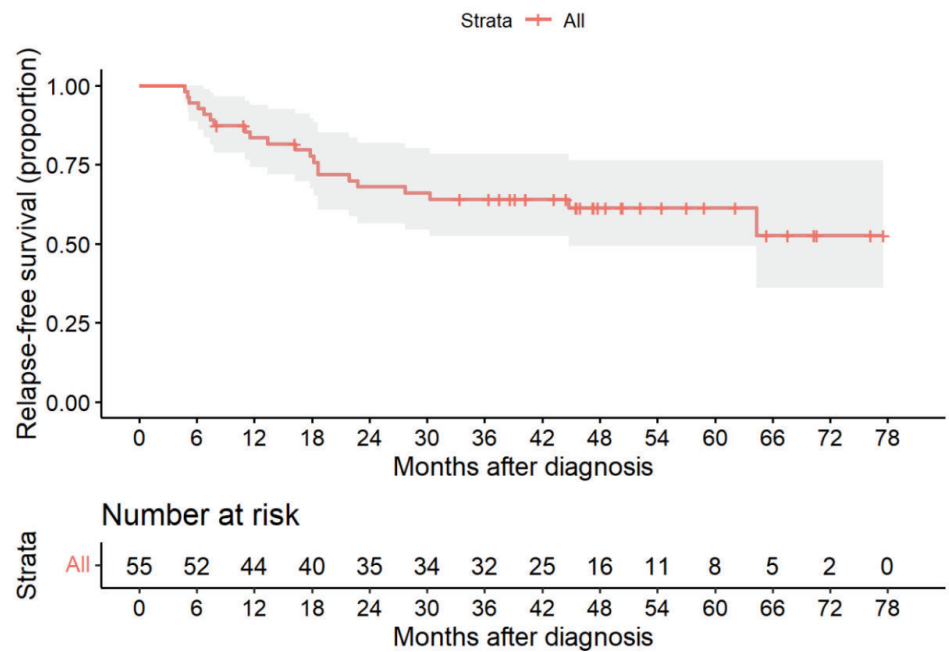
Evento	N	n	% (CI 95%)
Recidiva	55	21	38.18 (25.41, 52.27)
Muerte	109	69	63.3 (53.53, 72.33)

N, número de pacientes a los que se puede aplicar el análisis; n, número de eventos

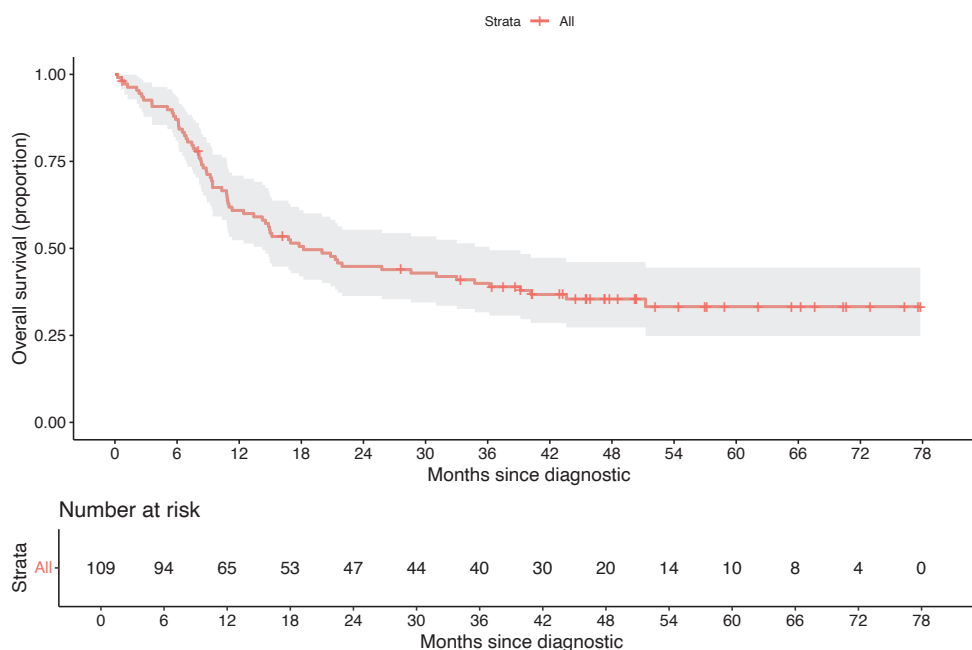
Las **Figuras 28a y 28b (1 i 2)**, muestran las curvas de Kaplan-Meier para la Supervivencia Libre de Recidiva (SLR) y la Supervivencia Global (SG). La mediana de SG fue de 18 meses (IC 95%: 14 a 36). De los pacientes con enfermedad avanzada o metastásica, la mediana de SG fue de 8.8 meses (IC 95%: 7.4 a 13).

Con respecto a el riesgo de recidiva se apreciaba un mayor número de recidivas durante los primeros dos años (**Figura 28a**). De igual manera y con respecto al riesgo de muerte se apreciaba un mayor número de muertes durante los primeros dos años (**Figura 28b**).

a.



b1.



b2.

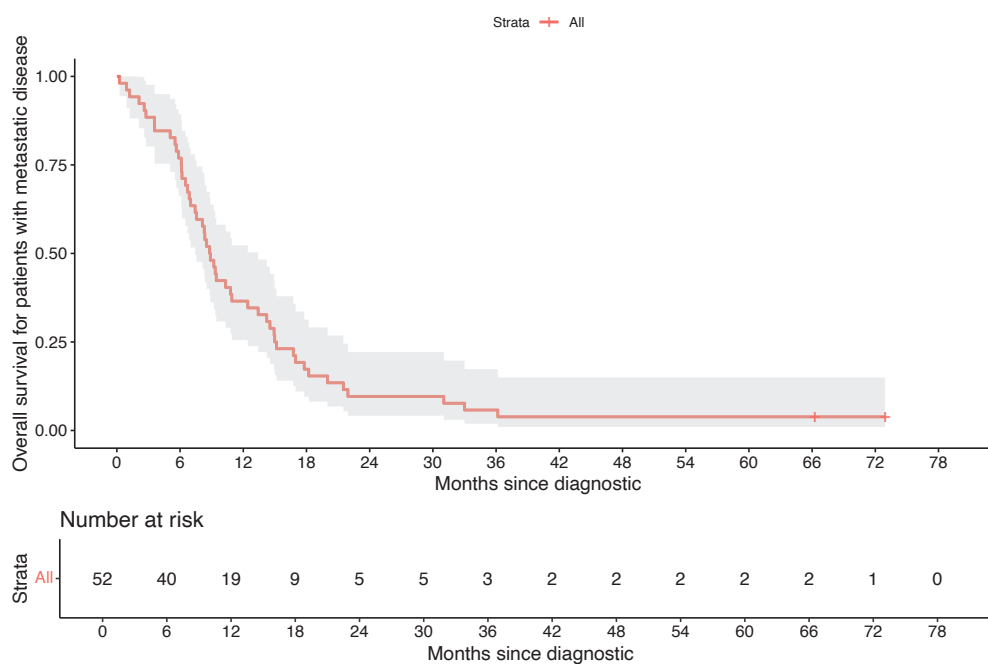


Figura 28. Curva de Kaplan-Meier para la Supervivencia Libre de Recidiva (SLR) (**a**) y la Supervivencia Global (**b1 y b2**). **a.** Curva de Kaplan-Meier para la Supervivencia Libre de Recidiva (SLR). **b1.** Curva de Kaplan-Meier para la Supervivencia Global (SG) para todos los pacientes. **b2.** Curva de Kaplan-Meier para la Supervivencia Global (SG) para pacientes con enfermedad avanzada.

La **Figura 29**, muestra la curva de Kaplan-Meier para la Supervivencia Libre de Progresión (SLP) a la primera línea de quimioterapia. La mediana de SLP fue de 5 meses (IC 95%: 4.5 - 7.6).

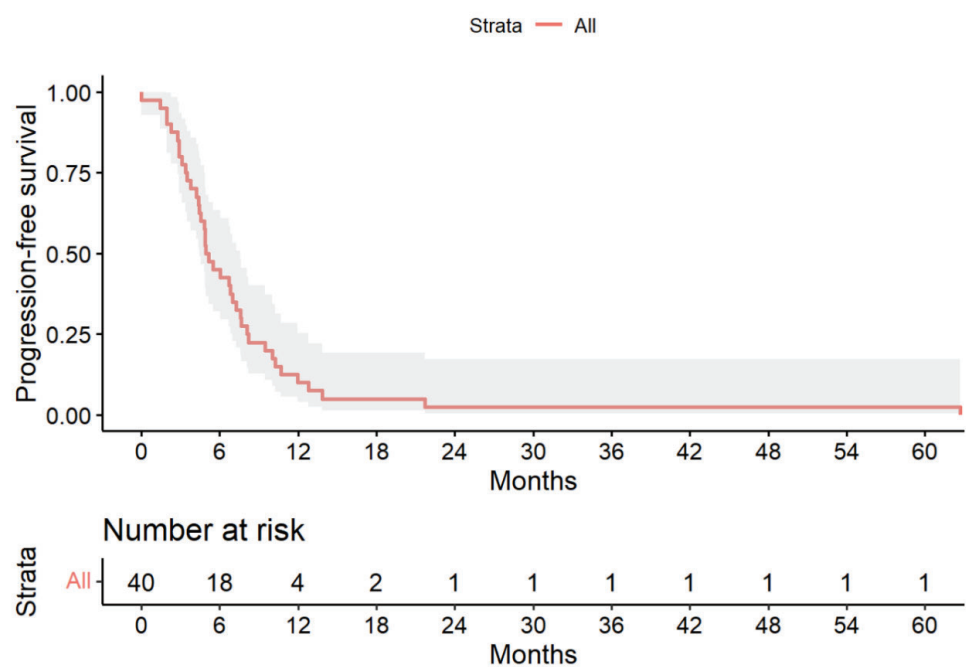


Figura 29. Curva de Kaplan-Meier para la Supervivencia Libre de Progresión (SLP) a la primera línea de quimioterapia

Y finalmente, en cuanto al beneficio del tratamiento, de los 68 pacientes evaluables para este evento, 33 cumplieron criterios para beneficio del tratamiento, por lo que podemos decir que uno de cada dos pacientes presentaba beneficio del tratamiento (**Tabla 37**).

Tabla 37 Tabla descriptiva del evento beneficio del tratamiento.

Evento	N	n	% (CI 95%)
Beneficio del tratamiento	68	33	48.53 (36.22, 60.97)

N, número de pacientes a los que se puede aplicar el análisis (beneficio evaluable); n, número de pacientes con beneficio del tratamiento

6.2.1. Asociación entre las variables clínicas, biomarcadores moleculares y las variables de eficacia:

Este análisis tiene como objetivo determinar la asociación entre las variables clínicas y moleculares estudiadas y las variables de eficacia, a efectos de evaluarlas como factores pronósticos o predictivos de respuesta. Los resultados se expresan en las **Tablas 38 a 40** y en las **Figuras 30 a 32**. En ellas se observa que la mayoría de las asociaciones no son significativas, por lo que aquí solamente se comentan las asociaciones estadísticamente significativas.

En cuanto a las asociaciones entre las características clínicas o los biomarcadores de expresión proteica y génica y la variable de eficacia Supervivencia Libre de Recidiva (SLR), se observó un aumento estadísticamente significativo del riesgo de recidiva en los tumores de localización en unión esofagogástrica (UEG) respecto a la localización gástrica, HR [IC95%]: 3.66 [1.44 - 9.29] (Tabla 38 y Figura 30).

Tabla 38. Asociación entre Supervivencia Libre de Recidiva (SLR) y variables clínicas y biomarcadores moleculares

Característica clínica o biomarcador		No event N(%)	Event N(%)	HR ¹	HR ²	N
		N=34	N=20			
Sex	Female	19 (55.9%)	6 (30.0%)	Ref.		54
	Male	15 (44.1%)	14 (70.0%)	2.33 [0.89;6.06]		
Location	GC	32 (94.1%)	13 (65.0%)	Ref.		54
	GEJ	2 (5.88%)	7 (35.0%)	3.66 [1.44;9.29]		
Histology	Intestinal	20 (58.8%)	6 (31.6%)	Ref.		53
	Diffuse and Undif	14 (41.2%)	13 (68.4%)	2.21 [0.83;5.83]		
E-cadherina	normal	30 (88.2%)	18 (90.0%)	Ref.		54
	aberrant	4 (11.8%)	2 (10.0%)	0.77 [0.18;3.34]		
HER2	negative	32 (97.0%)	20 (100%)			53
	positive	1 (3.03%)	0 (0.00%)			
EBV	negative	32 (94.1%)	17 (85.0%)	Ref.		54
	positive	2 (5.88%)	3 (15.0%)	2.39 [0.69;8.31]		
MMR	proficient	30 (88.2%)	19 (95.0%)	Ref.	Ref.	54
	deficient	4 (11.8%)	1 (5.00%)	0.61 [0.08;4.58]	0.96 [0.12;7.82]	
TP53	normal	10 (29.4%)	8 (40.0%)	Ref.	Ref.	54
	aberrant	24 (70.6%)	12 (60.0%)	0.71 [0.29;1.73]	0.57 [0.2;1.63]	
MUC6	normal	23 (67.6%)	15 (75.0%)	Ref.	Ref.	54
	aberrant	11 (32.4%)	5 (25.0%)	0.79 [0.29;2.17]	1.41 [0.42;4.76]	
PD-L1 CPS	Negative	28 (87.5%)	17 (89.5%)	Ref.	Ref.	51
	Positive	4 (12.5%)	2 (10.5%)	1.12 [0.26;4.87]	0.5 [0.09;2.64]	
Age	Media	66.8 (10.7)	63.5 (10.2)	0.97 [0.93;1.02]	0.99 [0.94;1.04]	54
ECOG	0-1	32 (97.0%)	19 (95.0%)	Ref.	Ref.	53
	2 or more	1 (3.03%)	1 (5.00%)	1.60 [0.21;12.0]	1.37 [0.15;12.6]	

¹No ajustado. ² Ajustado por sexo, localización, histología, e-cadherina y EBV.

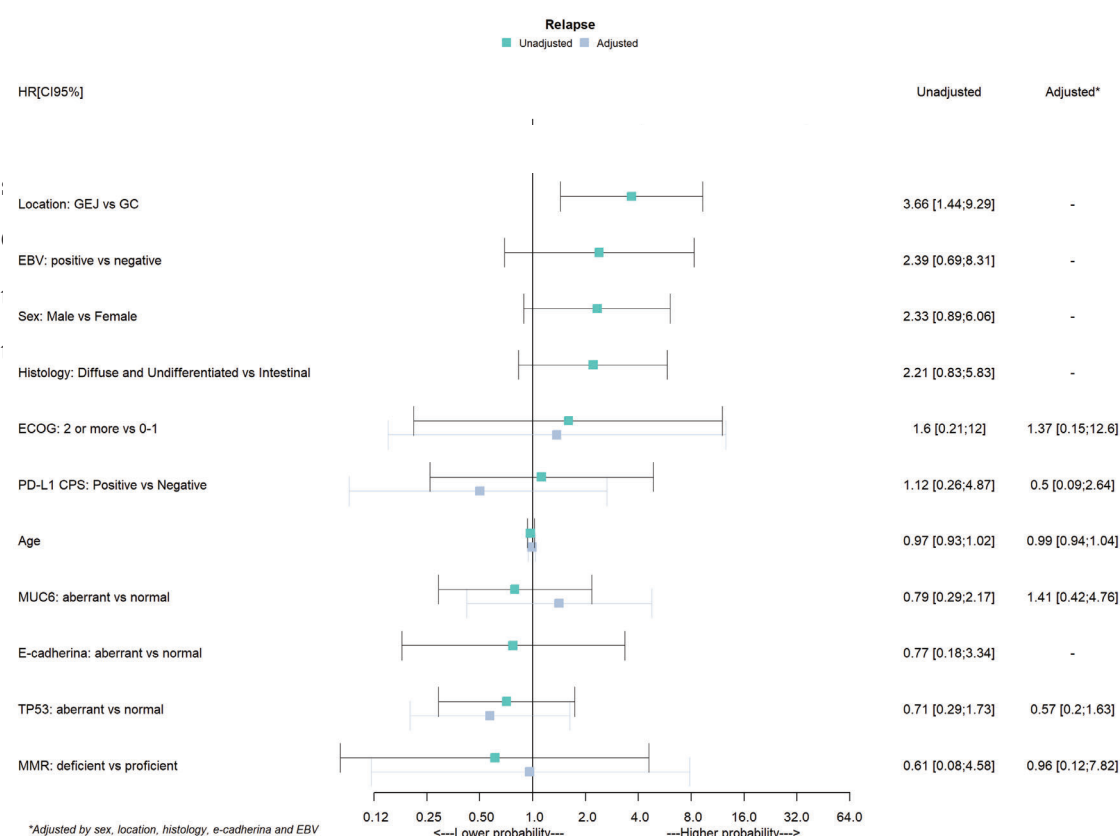


Figura 30. Hazard Ratio (HR) univariados y Hazard Ratio (HR) ajustados para la Supervivencia Libre de Recidiva (SLR). Se representa el valor estimado de los Hazard Ratio de cada factor (cuadrados) y su intervalo de confianza al 95% (líneas). Los cuadrados de color verdes representan los Hazard Ratio univariados (sin ajustar) para cada factor, mientras que los cuadrados grises representan los Hazard Ratio ajustados por las variables más relevantes con efecto pronóstico publicadas en la literatura, indicadas en el pie de la Figura. Los factores fueron ordenados de mayor a menor riesgo según la HR univariada.

En cuanto a las asociaciones entre características clínicas o biomarcadores de expresión proteica y génica y la variable de eficacia Supervivencia Global (SG), se observó una aumento estadísticamente significativo del riesgo de muerte en el sexo varón respecto a la mujer, HR [IC95%]: 1.99 [1.13 - 3.50], en los tumores de histología difusa respecto a la histología intestinal, HR [IC95%]: 1.77 [1.06 - 2.97], en los E-cadherina

aberrantes respecto a los E-cadherina normales, HR ajustado [IC95%]: 2.07 [1.16 - 3.69], en la enfermedad metastásica respecto a la no metastásica, HR [IC95%]: 8.64 [4.79 - 15.6], en los tumores con PD-L1 positivo respecto a los PD-L1 negativo, HR ajustado [IC95%]: 2.36 [1.17 - 4.76] y en los pacientes con ECOG 2 o más respecto a los ECOG 0-1, HR ajustado [IC95%]: 3.58 [1.33 - 9.65] (**Tabla 39** y **Figura 31**).

Tabla 39. Asociación entre Supervivencia Global (SG) y variables clínicas y biomarcadores moleculares

Característica clínica o biomarcador		No event N(%)	Event N(%)	HR ¹	HR ²	N
		N=40	N=66			
Sex	Female	21 (52.5%)	16 (24.2%)	Ref.		106
	Male	19 (47.5%)	50 (75.8%)	1.99 [1.13;3.50]		
Location	GC	36 (90.0%)	46 (69.7%)	Ref.		106
	GEJ	4 (10.0%)	20 (30.3%)	1.60 [0.94;2.71]		
Histology	Intestinal	23 (57.5%)	23 (36.5%)	Ref.		103
	Diffuse and Undif	17 (42.5%)	40 (63.5%)	1.77 [1.06;2.97]		
E-cadherina	normal	36 (90.0%)	51 (77.3%)	Ref.		106
	aberrant	4 (10.0%)	15 (22.7%)	2.07 [1.16;3.69]		
HER2	negative	36 (92.3%)	59 (89.4%)	Ref.		105
	positive	3 (7.69%)	7 (10.6%)	1.44 [0.66;3.15]		
EBV	negative	38 (95.0%)	62 (93.9%)	Ref.		106
	positive	2 (5.00%)	4 (6.06%)	0.82 [0.30;2.24]		
MMR	proficient	36 (90.0%)	60 (90.9%)	Ref.		106
	deficient	4 (10.0%)	6 (9.09%)	1.17 [0.50;2.71]		
Setting	no metastatic disease	38 (95.0%)	17 (25.8%)	Ref.		106
	metastatic disease	2 (5.00%)	49 (74.2%)	8.64 [4.79;15.6]		
TP53	normal	9 (22.5%)	24 (36.4%)	Ref.	Ref.	106
	aberrant	31 (77.5%)	42 (63.6%)	0.79 [0.48;1.30]	1.04 [0.58;1.88]	
MUC6	normal	28 (70.0%)	53 (80.3%)	Ref.	Ref.	106
	aberrant	12 (30.0%)	13 (19.7%)	0.69 [0.38;1.27]	0.9 [0.43;1.91]	
PD-L1 CPS	Negative	34 (89.5%)	52 (81.2%)	Ref.	Ref.	102
	Positive	4 (10.5%)	12 (18.8%)	1.93 [1.03;3.62]	2.36 [1.17;4.76]	
Age	Media	65.9 (10.5)	64.3 (11.0)	0.99 [0.97;1.02]	1.02 [0.99;1.05]	106
ECOG	0-1	38 (97.4%)	56 (86.2%)	Ref.	Ref.	104
	2 or more	1 (2.56%)	9 (13.8%)	2.56 [1.25;5.22]	3.58 [1.33;9.65]	

¹No ajustado. ²Ajustado por sexo, localización, histología, e-cadherina, HER2, EBV, MMR y setting.

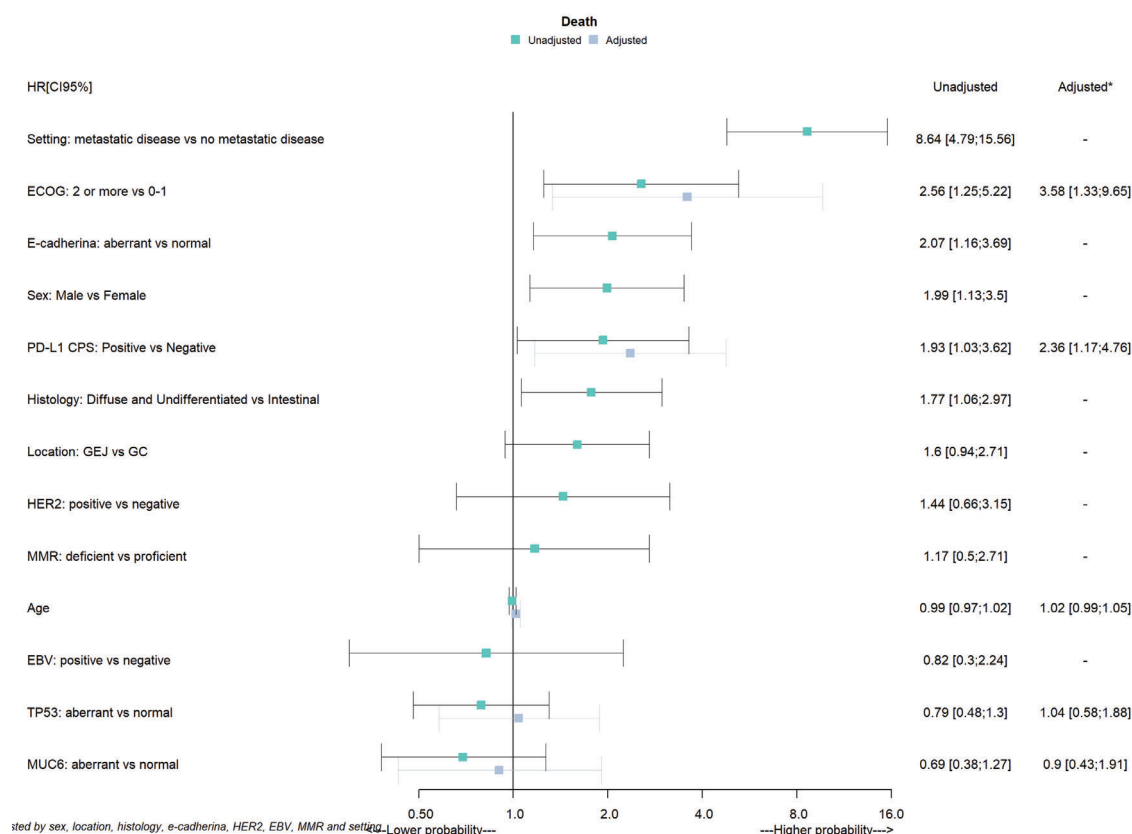


Figura 31. Hazard Ratio (HR) univariados y Hazard Ratio (HR) ajustados para la Supervivencia Global (SG). Se representa el valor estimado de los Hazard Ratio de cada factor (cuadrados) y su intervalo de confianza al 95% (líneas). Los cuadrados de color verdes representan los Hazard Ratio univariados (sin ajustar) para cada factor, mientras que los cuadrados grises representan los Hazard Ratio ajustados por las variables más relevantes con efecto pronóstico publicadas en la literatura, indicadas en el pie de la Figura. Los factores fueron ordenados de mayor a menor riesgo según la HR univariada.

Finalmente, **para la variable de eficacia beneficio del tratamiento**, se observó una menor beneficio del tratamiento estadísticamente significativo en los pacientes con enfermedad metastásica respecto a los que presentaban enfermedad no metastásica, OR [IC95%]: 0.24 [0.08 – 0.66] (Tabla 40 y Figura 32).

Tabla 40. Asociación entre el beneficio del tratamiento y variables clínicas y biomarcadores moleculares

Característica clínica o biomarcador		No N(%)	Yes N(%)	OR ¹	OR ²	N
		N=33	N=33			
Sex	Female	11 (57.9%)	8 (42.1%)	Ref.	Ref.	66
	Male	22 (46.8%)	25 (53.2%)	1.56 [0.54;4.71]	1.15 [0.3;4.33]	
Location	GC	26 (54.2%)	22 (45.8%)	Ref.	Ref.	66
	GEJ	7 (38.9%)	11 (61.1%)	1.86 [0.62;5.83]	2.4 [0.67;9.47]	
Histology	Intestinal	10 (37.0%)	17 (63.0%)	Ref.		63
	Diffuse and Undif	21 (58.3%)	15 (41.7%)	0.42 [0.15;1.15]		
E-cadherina	normal	25 (46.3%)	29 (53.7%)	Ref.		66
	aberrant	8 (66.7%)	4 (33.3%)	0.43 [0.1;1.54]		
HER2	negative	30 (50.0%)	30 (50.0%)	Ref.		65
	positive	3 (60.0%)	2 (40.0%)	0.67 [0.08;4.3]		
EBV	negative	31 (50.8%)	30 (49.2%)	Ref.	Ref.	66
	positive	2 (40.0%)	3 (60.0%)	1.55 [0.24;12.4]	0.54 [0.05;5.28]	
MMR	proficient	29 (46.8%)	33 (53.2%)			66
	deficient	4 (100%)	0 (0.00%)			
Setting	no metastatic disease	8 (29.6%)	19 (70.4%)	Ref.		66
	metastatic disease	25 (64.1%)	14 (35.9%)	0.24 [0.08;0.66]		
TP53	normal	13 (59.1%)	9 (40.9%)	Ref.	Ref.	66
	aberrant	20 (45.5%)	24 (54.5%)	1.73 [0.62;5.01]	2.48 [0.73;9.23]	
MUC6	normal	27 (51.9%)	25 (48.1%)	Ref.	Ref.	66
	aberrant	6 (42.9%)	8 (57.1%)	1.44 [0.44;4.93]	1.65 [0.39;7.76]	
PD-L1 CPS	Negative	26 (47.3%)	29 (52.7%)	Ref.	Ref.	65
	Positive	7 (70.0%)	3 (30.0%)	0.38 [0.08;1.54]	0.32 [0.06;1.44]	
Age	Media	61.0 [58.0;70.0]	62.0 [55.0;68.0]	0.99 [0.94;1.04]	0.99 [0.94;1.05]	66
ECOG	0-1	26 (44.1%)	33 (55.9%)			65
	2 or more	6 (100%)	0 (0.00%)			

¹No ajustado. ²Ajustado por histología, e-cadherina, HER2 y setting.

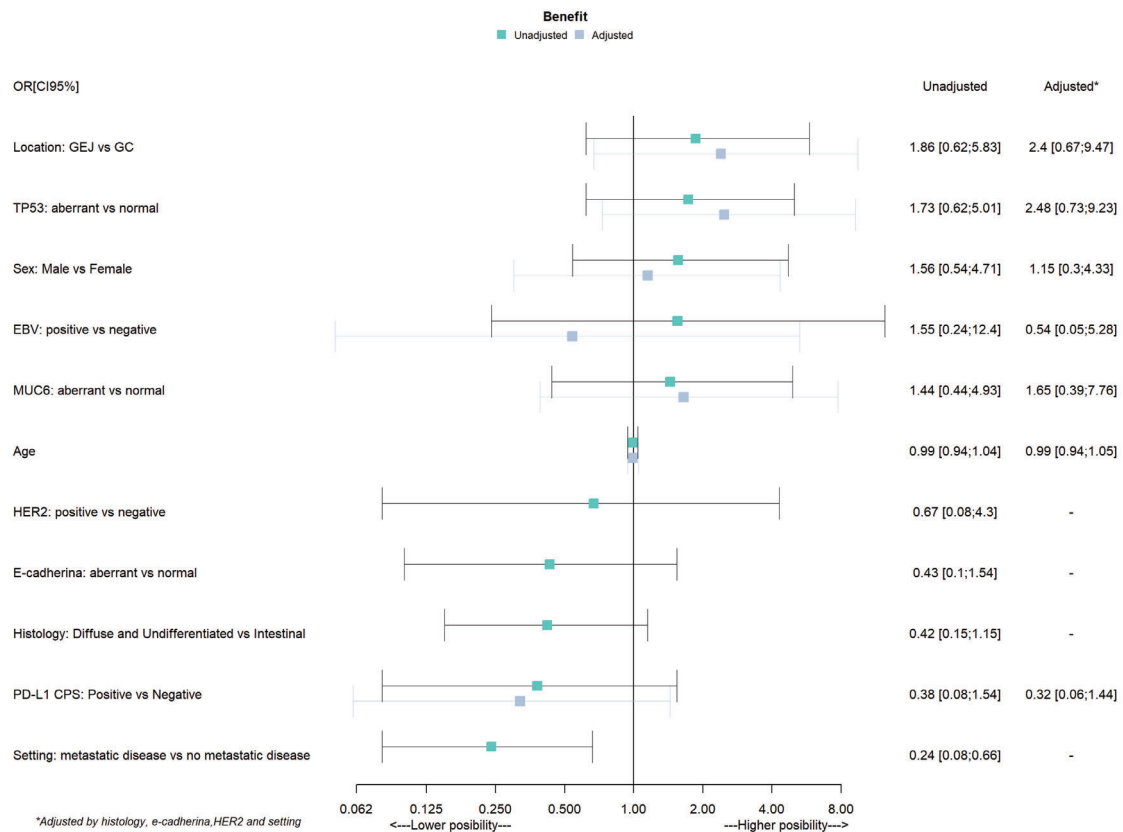


Figura 32. Odds Ratio (OR) univariados y Odds Ratio (OR) ajustados para el beneficio de tratamiento. Se representa el valor estimado de los Odds Ratio de cada factor (cuadrados) y su intervalo de confianza al 95% (líneas). Los cuadrados de color verdes representan los Odds Ratio univariados (sin ajustar) para cada factor, mientras que los cuadrados grises representan los Odds Ratio ajustados por las variables más relevantes con efecto predictivo publicadas en la literatura, indicadas en el pie de la Figura. Los factores fueron ordenados de mayor a menor riesgo según la OR univariada.

6.2.2. *Beneficio del tratamiento y supervivencia global en función del clúster:*

En la **Tabla 41** se expone la distribución del beneficio del tratamiento en cada clúster, de forma que vemos que el clúster 3 (**EBV and PD-L1 enriched**) y el clúster 5 (**E-cadherin**) muestran menor proporción de beneficio que el resto de grupos, así como que el clúster 1 (**p53 aberrante - HER2 negativo**) muestra una mayor proporción de beneficio que el resto de grupos, todo sin llegar a la significación estadística.

Tabla 41. Tabla descriptiva del beneficio del tratamiento por clúster.

	Clúster 1, N= 52	Clúster 2, N= 18	Clúster 3, N=12	Clúster 4, N= 9	Clúster 5, N= 10	Valor p*
	p53 aberrante - HER2 negativo	MUC6 - p53 normal <i>enriched</i>	EBV and PD- L1 <i>enriched</i>	HER2 positivo - p53 aberrante	E-cadherina aberrante	
Beneficio, n (%)	19 (57.58%)	6 (42.86%)	2 (33.33%)	2 (50.00%)	2 (28.57%)	0.59
No evaluables para beneficio	19	4	6	5	3	

N, número de pacientes a los que aplica el análisis. * Fisher's exact test

Las curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia global en cada clúster están representadas en la **Figura 33**. En ellas se observa que el clúster 5 (**E-cadherin**) y el clúster 4 (**HER2 positivo - p53 aberrante**) presentaban peor supervivencia, el clúster 3 (**EBV and PD-L1 enriched**) presentaba pronóstico intermedio, y el clúster 1 (**p53 aberrante - HER2 negativo**) y el clúster 2 (**MUC 6 and p53 normal**) eran los que presentaban mejor pronóstico.

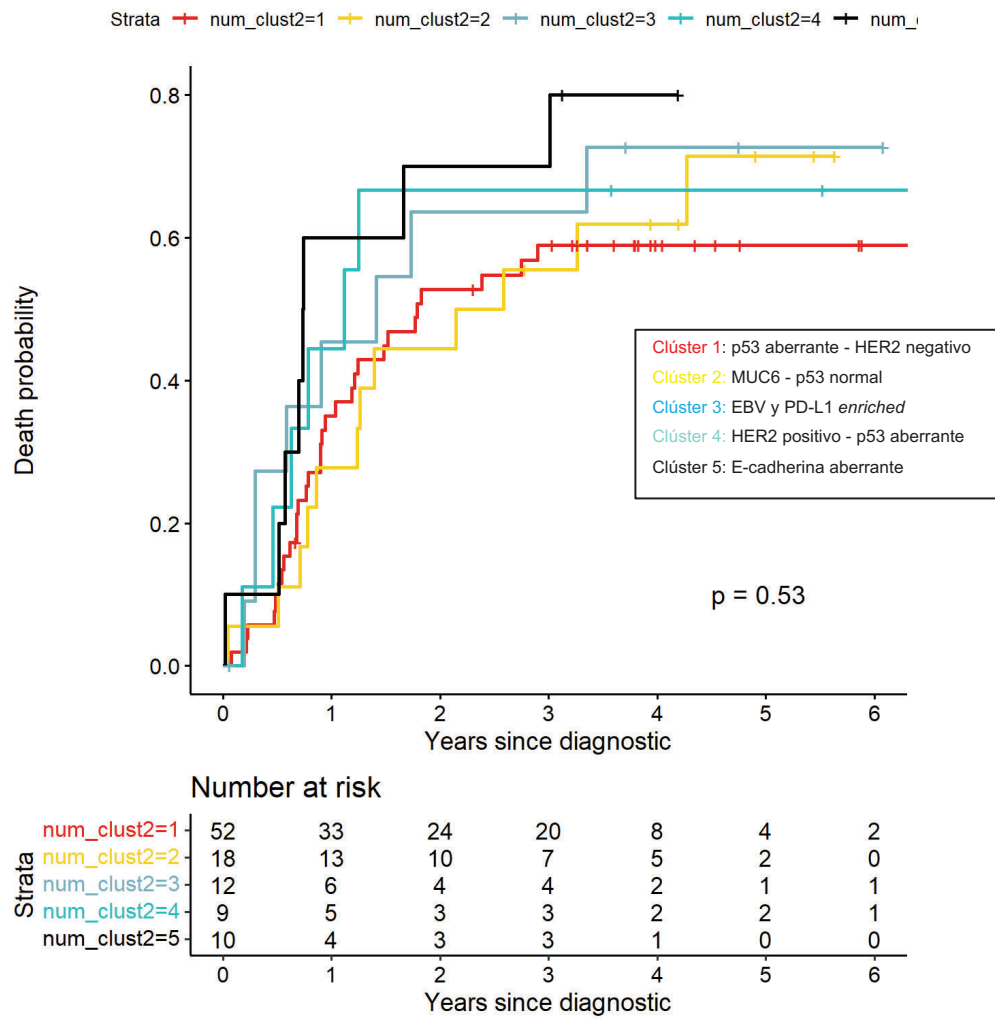


Figura 33. Curvas de Kaplan-Meier para Supervivencia global en función de clúster

6.2.3. *Beneficio del tratamiento y supervivencia global según subtipo de Setia adaptado*

En la **Tabla 42** se exponen la distribución del beneficio del tratamiento en cada grupo del algoritmo de Setia adaptado, de forma que vemos que los subgrupos MSI y PD-L1 mostraban menor proporción de beneficio del tratamiento que el resto de grupos, y el subgrupo p53 aberrante mostraba mayor proporción de beneficio del tratamiento que el resto de grupos, todo sin llegar a la significación estadística.

Tabla 42. Tabla descriptiva del beneficio del tratamiento por subgrupo de Setia adaptado.

	HER2 positivo N= 10	PD-L1 positivo N= 15	EBV positivo N= 3	MSI N= 9	E-cadherina aberrante N= 13	p53 aberrante N= 43	p53 normal N= 13	Valor p*
Beneficio, n (%)	2 (40.00%)	3 (33.33%)	1 (50.00%)	0 (0.00%)	4 (44.44%)	18 (66.67%)	5 (45.45%)	0.28
No evaluables para beneficio	5	6	1	6	4	16	2	

N, número de pacientes a los que aplica el análisis.* Fisher's exact test

Las curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia global en cada clúster están representadas en la **Figura 34**. En ellas se observa que los grupos de EBV y p53 normal son los que presentaban mejor pronóstico, los grupos de p53 aberrante y MSI, pronóstico intermedio y los grupos de E-cadherina aberrante, HER2 positivo y PD-L1 positivo son los que presentaban peor pronóstico, aunque estas diferencias no llegaban a alcanzar la significación estadística.

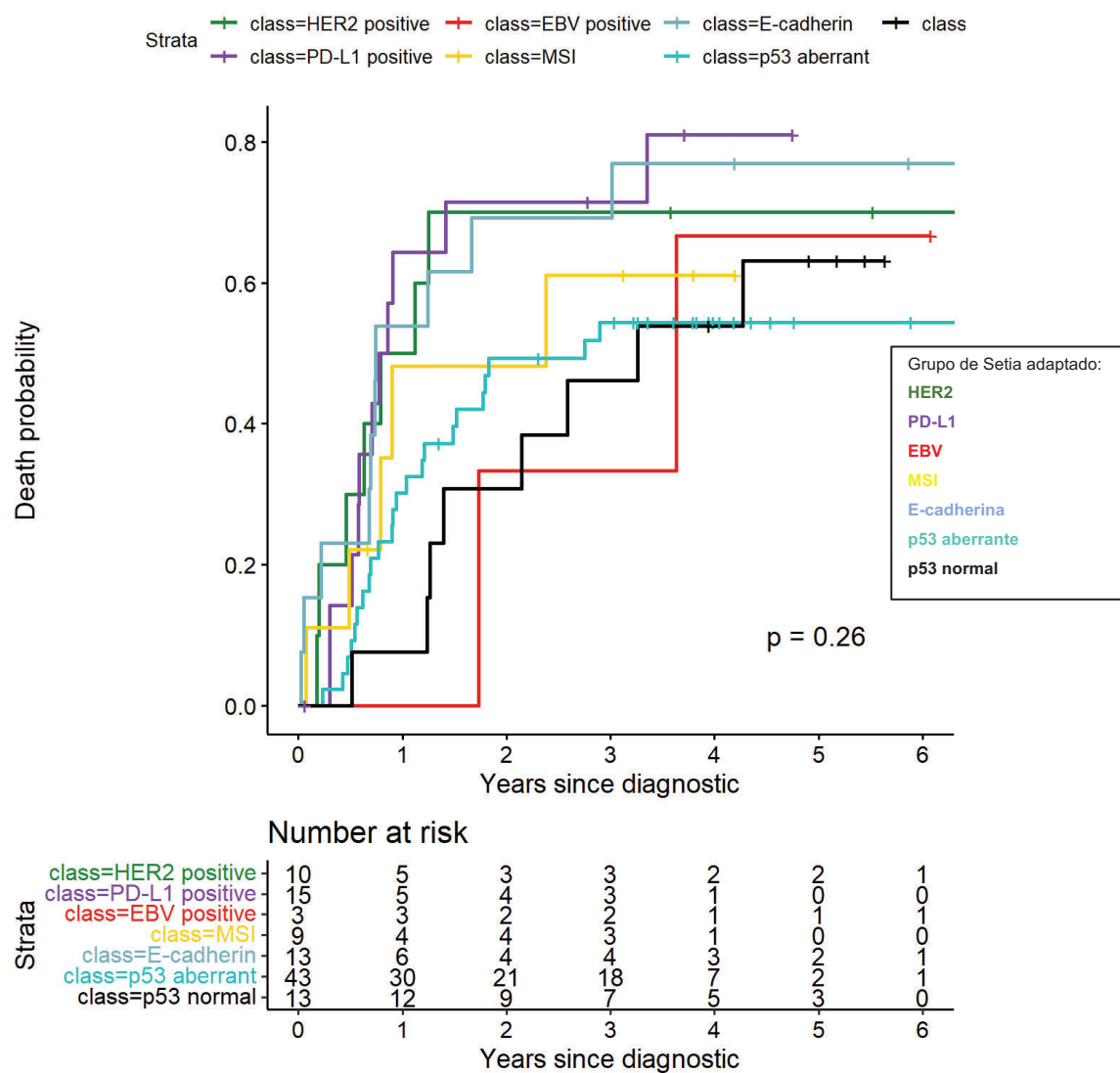


Figura 34. Curvas de Kaplan-Meier para Supervivencia global en función de subgrupo de Setia adaptado.

7. DISCUSIÓN

El cáncer gástrico (CG) es una enfermedad agresiva y con una gran heterogeneidad morfológica, biológica y genética, para la cual y a pesar de la aplicación de estrategias multimodales su pronóstico continúa siendo muy desfavorable. Ninguna de las clasificaciones “clásicas” o “histopatológicas” utilizadas hasta el momento en CG ha demostrado tener utilidad en la selección del mejor tratamiento para el paciente y tampoco, hasta el momento, las nuevas clasificaciones moleculares han conseguido poder generalizarse por su complejidad técnica y su elevado coste económico.

El cáncer gástrico, es, a su vez, una entidad poco frecuente en comparación con otros tipos tumorales como son el cáncer de colon o mama y esta menor frecuencia hace más complicado el reclutamiento de pacientes en este tipo de estudios. Respecto al tamaño muestral de nuestra cohorte final, y en comparación con otros trabajos, vemos que con excepción de los proyectos globales del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA), del Asian Cancer Research Group (ACRG) y algún caso puntual de serie asiática que tenían un número más amplio de pacientes, el resto de grupos que han publicado resultados de clasificación molecular en CG son de series que tienen entre 50 y 150 pacientes. Consideramos entonces que el **tamaño final de nuestra cohorte final** de 109 pacientes, es un tamaño adecuado especialmente si tenemos en cuenta la incidencia de CG en nuestro entorno. El diagnóstico en edades avanzadas y las co-morbilidades habituales en los pacientes diagnosticados de CG, junto con el rápido deterioro del estado general que normalmente presentan estos pacientes, son la causa de que el **porcentaje de pacientes evaluable para el análisis de beneficio del tratamiento** fuese bajo, sólo un 62% (68/109 pacientes).

Nuestro estudio tiene como **objetivos principales**, (1) demostrar la factibilidad de aplicar una clasificación molecular para el CG basada en el análisis de las características moleculares del tumor en la biopsia gástrica endoscópica del diagnóstico, (2) Proponer nuevas estrategias de clasificación, que sean sencillas y coste-efectivas: adaptando el algoritmo de Setia et al.(21) al conocimiento actual en cáncer gástrico, creando un algoritmo de Setia adaptado y clasificar nuestra serie de tumores gástricos con este algoritmo adaptado, así como mediante el análisis clúster o agrupamiento jerárquico no supervisado, a partir del análisis de los perfiles de expresión proteica (IHQ) o génica (ISH) de una serie de biomarcadores seleccionados y (3) evaluar la utilidad de estas

nuevas clasificaciones para seleccionar cual es la mejor estrategia de tratamiento para nuestros pacientes. Para conseguir estos objetivos, se diseña un **panel de biomarcadores de expresión proteica y génica** con 10 biomarcadores que se analiza usando técnicas de inmunohistoquímica (IHQ), en su mayoría, y de hibridación in situ (ISH) y un **panel de mutaciones somáticas recurrentes** en CG.

Para cumplir con el **objetivo primario de demostrar la factibilidad de aplicar una clasificación molecular** a nuestros pacientes diagnosticados de CG en la biopsia endoscópica diagnóstica, se calculan las ratios de análisis completado/muestra disponible de los dos paneles y se realiza el análisis descriptivo de los motivos de las pérdidas, es decir, pacientes no evaluables finalmente para el análisis molecular.

Resaltar la importancia de que nuestro estudio utiliza en el 100% de los casos, **muestra obtenida de la biopsia endoscópica** del diagnóstico. Este es un punto diferencial respecto a la mayoría de estudios publicados hasta la actualidad que realizan una caracterización molecular del CG, los cuales han utilizado muestra procedente de pieza quirúrgica. El uso de biopsia endoscópica es más correcto, a la vez que se adapta mejor a la rutina o práctica asistencial actual, porque la biopsia endoscópica es normalmente la primera muestra que recibimos de todos los pacientes, ya tengan enfermedad localizada, localmente avanzada o enfermedad avanzada/metastásica y porque cada vez se realizan más tratamientos de quimioterapia neoadyuvante (antes de la cirugía), por lo que la biopsia endoscópica será la muestra que no habrá recibido ningún tratamiento. Actualmente sabemos que la quimioterapia neoadyuvante puede modificar los biomarcadores hallados en las muestras que han recibido dicho tratamiento(87).

La **ratio entre muestra con análisis completado y bloque de parafina disponible para el panel de biomarcadores de expresión proteica y génica**, es alta, del 82% y consideramos que podría ser más alta con la protocolización del número de biopsias en la endoscopia y como se discutirá más adelante utilizando bloque de parafina reciente y no de archivo. Nuestro estudio recibe pacientes de varios centros y no en todos ellos se realizaba el mismo número de biopsias en el procedimiento de la endoscopia digestiva diagnóstica. Actualmente se recomienda la toma de entre 5 y 8 biopsias para tener suficiente material para el examen histológico y molecular de este tipo de tumores(12). Para este panel, se decide utilizar material de pieza quirúrgica de 12 pacientes para completar el análisis del panel y llegar a tener el número máximo de pacientes con panel completado. Seguramente con la protocolización del número de biopsias y la utilización

de bloques de parafina recientes y no de archivo, ya no hubiera sido necesario este material “extra”.

En cuanto a la **ratio entre muestra con análisis completado y bloque de parafina disponible para el panel de mutaciones**, es más baja, del 59%, probablemente por varios motivos. En primer lugar, la extracción de ADN y ARN se realiza sobre la última laminilla cortada del bloque (ver procesado de las muestras, apartado 5.5.1 de Metodología), priorizándose las anteriores para el análisis de biomarcadores por IHQ/ISH. Este orden tuvo como consecuencia que de algunos pacientes ya no quedara suficiente muestra de tumor para la extracción de ácidos nucleicos y la secuenciación. Elegimos este orden porque consideramos el análisis del panel mutaciones como complementario al análisis de biomarcadores por IHC/ISH, considerado como prioritario. En segundo lugar, la calidad de ADN extraído de la muestra y, aunque en menor proporción, el proceso y la calidad de las secuencias obtenidas, también determinaban el éxito del panel mutacional.

Para el cálculo de las ratios, no consideramos pérdidas “reales” relacionadas con la factibilidad de aplicar la caracterización molecular, la pérdida inicial de los 32 pacientes sin bloque de parafina (ver **Figura 12**, apartado 6.1.1.). La unidad funcional de tumores esofagogástricos de HUB - ICO Hospitalet funciona como unidad de referencia de una amplia zona de Cataluña en la que una parte importante de los pacientes visitados proceden de hospitales lejanos. De forma que en la primera visita del paciente con el oncólogo, si el hecho de incluirlo en el estudio suponía más complejidad para el paciente y su familia o el investigador pensaba que podría suponer una dificultad en la obtención de la información clínica y de seguimiento, no ofrecíamos esta posibilidad.

Para cumplir con el **objetivo primario de propuesta de nuevas estrategias** de clasificación, sencillas y coste-efectivas que mejoren las anteriores clasificaciones disponibles, en nuestra cohorte se analiza con un panel de 10 biomarcadores de expresión proteica o génica y con un panel de mutaciones somáticas recurrentes en CG. Se crea una BBDD con variables clínico-patológicas y moleculares, donde se incluyen de forma consecutiva y prospectiva los pacientes.

En cuanto a las **características clínicas** de estos pacientes, la enfermedad avanzada o metastásica suele estar poco representada en los estudios que reportan resultados en clasificación molecular de CG; los pacientes estadio IV representaban un 5 y un 25% en las cohortes de TCGA y ACRG, respectivamente(1,18). En este sentido nuestra serie, con

un 48% de pacientes en estadio IV, es más representativa de la situación real de nuestro día a día donde el debut de la enfermedad en estadio avanzado es actualmente el más frecuente, representando aproximadamente un 60% de los casos(113). Por lo que respeta al resto de características clínicas basales y tratamientos recibidos de nuestra cohorte son los esperables. A tener en cuenta que los pacientes que reciben cirugía con intención curativa en contexto de enfermedad avanzada o metastásica con cirugía citoreductora (CRS) +/- quimioterapia intraperitoneal con hipertermia (HIPEC), son pocos (6 en total) y que este tipo de tratamiento sólo se ofrece a pacientes que presentaban enfermedad peritoneal limitada (bajo índice carcinomatosis peritoneal, PCI, del inglés *Peritoneal Carcinomatosis Index*) y el papel adicional de la hipertermia (HIPEC) es controvertido(12).

En relación al **panel de biomarcadores de expresión proteica y génica**, nuestro panel tiene menos biomarcadores que el que utiliza Setia et al.(21), siendo más parecido al que usan otros grupos como Ahn et al.(23) Comparativamente con el de Setia, en nuestro panel se eliminan un total de 4 biomarcadores, MUC2, MUC5AC, CDX2 y CD10 que son marcadores de expresión de mucinas y displasia que en el trabajo de Setia subclassificaban el subgrupo de p53 aberrante en subclusters, sin grandes diferencias clínicas ni tampoco diferencias estadísticamente significativas en cuanto a supervivencia. Consideramos que eliminando estos 4 biomarcadores hacemos más sencillo y pragmático el análisis y a la vez no restamos solidez, es decir, no clasificamos mal, basándonos en que estos 4 biomarcadores no servían en la clasificación de Setia para diferenciar ningún subtipo en su algoritmo final. La decisión de mantener MUC6, un biomarcador que Setia no utilizaba en su algoritmo pero sí que veía una sobreexpresión aberrante más representada en el subgrupo con expresión normal de p53 (p53 normal) es porque estos pacientes podrían estar relacionados con el subtipo metabólico descrito por Lei et al.(17). Respecto a la **frecuencia en nuestra cohorte de cada uno de los biomarcadores del panel de Setia original**, vemos que nuestra cohorte tiene menos pacientes dMMR y E-cadherina aberrante y más pacientes con p53 normal que la de Setia original. De estas diferencias, sólo es estadísticamente significativa la diferencia entre los grupos p53 normales (**Tabla 21**, apartado 6.1.3.). Nuestra proporción de pacientes con dMMR e inestabilidad de microsatélites (MSI) (9%) es más baja que la descrita en la literatura. En TCGA el subtipo MSI representaba un 22% y en el estudio de Setia et al. un 16%. De forma similar pasa con la frecuencia de pacientes con EBV, 6% en nuestra cohorte versus 10% en TCGA. Estas diferencias, pueden ser debidas a que nuestra serie tiene más

representación de población con enfermedad avanzada o metastásica donde los subtipos MSI y EBV han demostrado tener menos prevalencia(114). La frecuencia observada del subtipo p53 normal cuando aplicamos el algoritmo de Setia a nuestra cohorte, 16%, es significativamente superior a la esperada según los resultados de Setia et al. pero se encuentra dentro del rango publicado en la literatura (del 7% de Setia et al. (21) hasta un 52% de Birkman et al. (27)). Este rango es muy variable dado que la evaluación de p53 por IHQ se ha realizado de forma muy distinta en los diferentes estudios. Algunos trabajos han evaluado la sobreexpresión utilizando diferentes puntos de corte y no todos han incluido la pérdida completa de tinción como expresión aberrante (115). En la línea de los resultados publicados por TCGA y otros grupos, la pérdida de MLH1, es también en nuestro estudio la causa más frecuente de MSI en CG esporádico. Finalmente, la mayor proporción de sobreexpresión aberrante del biomarcador MUC6 en el subgrupo de p53 normal de la clasificación de Setia no se observa en nuestra serie (ver **Tabla 22**, ver apartado 6.1.3.); estas diferencias podrían ser debidas al tamaño menor de nuestra serie. De los resultados del panel de biomarcadores de expresión surgen las **2 propuestas de clasificación** para nuestra cohorte:

- La primera es el **algoritmo de Setia adaptado**. Creemos que añadir HER2 y PD-L1 era imprescindible, ya que se trata de dos biomarcadores bien establecidos en CG que son predictivos de respuesta a terapia antiHER2 e inmunoterapia, respectivamente. Este algoritmo de Setia adaptado divide nuestra cohorte en 7 subgrupos; HER2 positivos, PD-L1 positivos, EBV, MSI y los llamados “all-negatives”, es decir los pacientes que no son los grupos anteriores: E-cadherina aberrante, p53 aberrante y p53 normale. Respecto a la frecuencia de sobreexpresión/amplificación del biomarcador HER2 en nuestra serie (9.26%), es más baja que la descrita en el estudio ToGa que era del 22.1% pero se encuentra dentro del rango descrito en la literatura(116). Referente a la menor frecuencia de la expresión del biomarcador PD-L1 en nuestra serie (15%), respecto a la publicada en la bibliografía (de hasta un 40% a un 65%(12,55)), el segundo análisis o análisis de validación de PD-L1 con un segundo anticuerpo, realizado en muestras del grupo de pacientes “all-negatives”, indica que no hay discrepancias relevantes (solamente una muestra, de las 58 analizadas, cambió a positiva para PD-L1), dando solidez a nuestro primer resultado. En esta validación, se decide repetir los casos negativos para PD-L1 y a la vez también negativos para los otros biomarcadores por considerar que un cambio de negativo a positivo del PD-L1 en estos pacientes supondría poder pensar en un tratamiento concreto para el paciente en lugar de no poder seleccionar ningún tratamiento.

Recordar que en nuestro estudio, todas las valoraciones de las IHQ/ISH son revisadas por un segundo patólogo especializado en patología gastrointestinal y todas las tinciones se realizan utilizando los controles positivos y negativos apropiados en cada caso. Una causa que puede explicar la menor frecuencia de positividad para PD-L1 en nuestra serie respecto a lo reportado en la bibliografía es que, en nuestro estudio el análisis de los biomarcadores se realiza posteriormente al reclutamiento de los pacientes y se utilizan muestras de archivo que habían recogidas mínimo 3 años antes, algunas hasta 7 años, y en ellas puede haber menor antigenicidad por la degradación de determinadas partes de la proteína PD-L1 y, consecuentemente, tener menos positivos(117).

- La segunda propuesta de clasificación, es el **agrupamiento jerárquico en clústeres**. Con este método, se realiza un análisis exploratorio de agrupamiento jerárquico no supervisado con el objetivo de agrupar en clústeres o grupos a los individuos de nuestra serie, de la forma más homogénea posible en función de los resultados de los biomarcadores de expresión. Con este sistema, se divide nuestra serie en 5 grupos o clústeres. El **clúster 1** se caracteriza por la presencia de p53 aberrante sin tener HER2 positivos (denominado **p53 aberrante - HER2 negativo**); el **clúster 2** se caracteriza por la presencia de MUC6 aberrantes y donde prácticamente todos tienen p53 normal (denominado **MUC6 - p53 normal enriched**); el **clúster 3** se caracteriza por la presencia de EBV positivos y PD-L1 positivos (denominado **EBV and PD-L1 enriched**); el **clúster 4** se caracteriza por la presencia de HER2 positivos y donde prácticamente todos tienen p53 aberrante (denominado **HER2 positivo - p53 aberrante**) y finalmente, el **clúster 5** se caracteriza por la presencia de E-cadherina aberrante (denominado **E-cadherina aberrante**). Con este método, los pacientes con dMMR quedan repartidos de forma bastante homogénea entre el clúster 1, 2 y 5 y los pacientes con PD-L1 positivo, quedan repartidos entre los clústeres 2 y 5 (clústeres que contenían 20% del total de los PD-L1 positivos) y el clúster 3 (clúster que contenía un 60% del total de los PD-L1 positivos). En cuanto al objetivo principal de **evaluar la utilidad** de estas dos propuestas de clasificación molecular para informar de la biología tumoral y seleccionar cual es la mejor estrategia de tratamiento para nuestros pacientes. El método de clasificación por el algoritmo de *Setia* adaptado, identifica 4 subgrupos en los cuales podríamos pensar en un tratamiento dirigido, estos grupos son PD-L1, EBV y MSI, dirigibles a inmunoterapia y HER2 positivos, para terapia antiHER2 añadiendo inmunoterapia a aquellos pacientes con PD-L1 positivos. No obstante quedan tres subgrupos, E-cadherina aberrante, p53 aberrante y p53 normal como grupos a los que no se les puede dirigir a un tratamiento

concreto. Estos tres grupos suponen una parte importante de pacientes, ya que corresponden a un 65% del total. Por otro lado, el algoritmo creado a partir del clustering o agrupamiento jerárquico, identifica dos subgrupos en los cuales podríamos pensar en un tratamiento dirigido, estos grupos son el clúster 3, EBV and PD-L1 *enriched*, para inmunoterapia y el clúster 4, HER2 positivo - p53 aberrante, para terapia antiHER2 añadiendo inmunoterapia a aquellos pacientes con PD-L1 positivos y de forma interesante resurge un subgrupo, el clúster 2, MUC6 - p53 normal *enriched*, que es un grupo que recuerda al subtipo metabólico de la clasificación de Lei et al.(17). En la literatura encontramos trabajos que relacionan la sobreexpresión de mucinas habituales en CG, como MUC6, con niveles bajos de timidilato sintasa y alta respuesta a 5-fluorouracilo(112). A tener en cuenta, que la clasificación en clústeres, respecto al algoritmo de Setia original, agrupa igualmente bien los pacientes con E-cadherina aberrante en el clúster 5 y separa mejor los grupos p53 aberrante en p53 aberrante y HER2 negativos en el clúster 1 y p53 aberrante y HER2 positivos en el clúster 4.

De la clasificación de nuestra cohorte utilizando el algoritmo de Setia adaptado y el algoritmo resultante del *clustering* o agrupamiento jerárquico surgen un total de siete y cinco subgrupos respectivamente. Nuestro estudio tiene como objetivo secundario **analizar y comparar la supervivencia y el beneficio de la quimioterapia en los diferentes subgrupos resultantes** de estas dos clasificaciones. Referente al análisis de la supervivencia, ambas propuestas observan una tendencia a una peor supervivencia de los grupos E-cadherina aberrante y una mejor supervivencia de los grupos con EBV positivos, tal y como se reporta en la literatura(23), en nuestro caso sin alcanzar la significación estadística. De forma interesante, en el caso del *clustering* o agrupamiento jerárquico, el grupo MUC6 aberrante y p53 normal (clúster 2) es el que presenta mejor supervivencia. Y en cuanto al análisis del beneficio del tratamiento, tanto el algoritmo de Setia modificado, como el *clustering* o agrupamiento jerárquico, sugieren un mayor beneficio del tratamiento de quimioterapia en los grupos p53 aberrantes (correspondientes a CIN del TCGA), y el *clustering* sugiere menor beneficio del grupo de E-cadherina aberrante (clúster 5, correspondiente a GS del TCGA); estas dos observaciones están en la misma línea de lo descrito en la literatura(78). En nuestra cohorte, no observamos el mayor beneficio “teórico” o “esperable” del grupo MUC6 aberrante y p53 normal (clúster 2)(112). No obstante, hay que tener en cuenta que, para este tipo de ejercicio, el número de subgrupos resultantes en los dos métodos de clasificación (siete y cinco,

respectivamente) hace que los grupos tengan una “n” muy pequeña y este hecho limita el valor de este análisis. Por este motivo, el valor pronóstico y predictivo del clúster 2 (grupo MUC6 aberrante y p53 normal, potencial equivalente al subtipo metabólico de Lei et al.(17)), debería ser evaluado en estudios más grandes y prospectivos.

Otro de los objetivos secundarios de nuestro estudio es el **análisis del perfil mutacional** de nuestra serie de pacientes. Dada la dificultad y coste económico de secuenciar el exoma completo de todas las muestras del estudio en el momento en que se realiza el estudio, se opta por diseñar un panel que cubre los genes y mutaciones puntuales más frecuentes descritas como mutaciones “driver” en CG en aquel momento y que utiliza la secuenciación de amplicones que se adapta más al tipo de muestra de la que disponíamos (muestra parafinada) y frecuentemente con escaso material. Una limitación de nuestro panel es que solo detecta mutaciones puntuales y no detecta variaciones en el número de copias (CNV) ni fusiones. Las CNV son frecuentes en el subtipo CIN del TCGA (correspondería a p53 aberrante en las clasificaciones por IHQ) y dentro de estas se han descrito como más prevalentes en pacientes HER2 positivos e histología mucinosa(118). Las fusiones son eventos infrecuentes pero descritos en CG, algunas de ellas con terapias dirigidas(119). Nuestro panel de mutaciones se diseña para analizar mutaciones distribuidas en 75 genes diferentes obteniendo información final de 73 genes, de los cuales 37 presentaban una o más mutaciones. Los dos genes de los cuales no disponemos de información son ASXL1 y KANSL1, para los cuales se han diseñado 3 amplicones que cubren tres mutaciones relativamente poco frecuentes (entre un 0.46 y un 1-2% de las muestras analizadas en el cBioportal). Estos son genes con una frecuencia de mutaciones muy baja en la base de datos COSMIC. Teniendo en cuenta la baja frecuencia global descrita de las mutaciones de nuestro panel en grandes bases de datos, es normal que del total de muestras analizadas con el panel de mutaciones (76 muestras), sólo hayamos detectado mutaciones en 37 de los 73 genes de los cuales disponemos de información. La proporción del número de muestras sin ninguna mutación en nuestro trabajo, 18.4% (14 de las 76 muestras analizadas), es globalmente baja y en la línea del elevado índice mutacional asociado a CG(120), pero un poco más alta en comparación a trabajos como el de Cai et al.(121), probablemente porque nuestro panel es un panel más pequeño. La mayoría de las mutaciones detectadas en nuestro panel se identifican en los genes de los que se secuenciar toda la región codificante; este hallazgo era de esperar ya que estos genes fueron elegidos por ser los más frecuentemente mutados descritos en la

literatura. El gen más frecuentemente mutado en nuestra cohorte es *TP53*, que también es el más mutado de forma global en todos los trabajos publicados que incluyen análisis de mutaciones en CG. En cuanto a la frecuencia de mutación de *TP53* en nuestro estudio, 38.16%, está en la línea de lo que se observa en grandes bases de datos como COSMIC (37%). Del resto de genes más frecuentemente mutados en nuestra cohorte: *ARID1A*, *PIK3CA*, *APC*, *KMT2D*, *CDH1*, *SMAD4*, *RNF43*, *RHOA*, *KRAS* y *KMT2C*, todos excepto *RHOA*, *RNF43*, *SMAD4* se encuentran en el TOP20 de los genes más mutados en cáncer gástrico, en COSMIC. *PTEN*, seleccionado en nuestro diseño de panel mutacional como uno de los genes más frecuentemente mutados, queda finalmente fuera del TOP 10 de nuestro estudio, con una frecuencia de mutación del 6.58%, frecuencia similar a la reportada en COSMIC (4.5%). De forma esperada, los 9 pacientes que son portadores de 5 o más mutaciones se concentran en los subgrupos con más dMMR o MSI (grupo hipermutado en el TCGA(1)).

En relación a la **concordancia entre el estado mutacional de los genes *TP53* y *CDH1* y sus proteínas**, de forma histórica, la IHQ de p53 y de E-cadherina ha sido ampliamente utilizada y aceptada como marcador subrogado para los grupos CIN y GS de TCGA, respectivamente. En nuestro estudio, sólo en un 39% y en un 18% de los casos con mutación puntual en el gen *TP53* y *CDH1*, respectivamente, el estado de sus proteínas es aberrante. Estas discordancias están descritas en la literatura y son debidas a qué la IHQ da información sobre la expresión de la proteína sin dar información de su funcionalidad, algunas mutaciones pueden afectar la funcionalidad de la proteína sin afectar su expresión, y también pueden ser debidas a alteraciones de la expresión de la proteína por mecanismos diferentes a una mutación, como son fenómenos epigenéticos como la hipermetilación del promotor del gen(33,122). En esta línea ya existen trabajos publicados que concluyen que la IHQ de p53 no es un buen método en CG para predecir mutaciones en el gen *TP53*(123). Por todo lo expuesto, consideramos importante disponer de la información del estado de la proteína aportada por la IHQ y del estado del gen aportado por el panel de mutaciones.

Creemos que una de las principales utilidades de nuestro panel mutacional es poder analizar el perfil mutacional de los pacientes considerados “*all-negatives*”, es decir, pacientes negativos para HER2, PD-L1, EBV, MSI. Un ejemplo de ello, son los resultados expuestos en el apartado 6.1.6 (ver **Figuras 25 y 27**). En este apartado, vemos que tanto en el algoritmo de *Setia* adaptado como en el algoritmo a partir del *clustering* o

agrupamiento jerárquico, si añadimos o utilizando la información resultante del perfil mutacional de los pacientes “*all-negatives*”, habría entre un 25-30% de pacientes estos pacientes, que podrían ser “rescatados”. Es decir, que serían pacientes, que a priori no tendrían una opción clara de tratamiento dirigido, y que para los cuales, por ser portadores de una mutación considerada “informativa”, dispondríamos de más información para pensar en un tratamiento dirigido concreto.

Para la definición de mutación “informativa” consideramos aquellas alteraciones con niveles I a III en la escala ESCAT(99,100). ESCAT propone una clasificación de las alteraciones moleculares basada en su relevancia como marcadores para la elección de un determinado tratamiento. La diferencia principal entre la escala ESCAT y otras escalas con el mismo objetivo como OncoKB(124) por ejemplo, es que la de ESCAT tiene en cuenta el tipo de tumor donde se ha reportado la evidencia científica, dando menos puntuación si se trata de la misma alteración pero en un tipo de tumor diferente. A parte de las alteraciones con nivel I-III por ESCAT, también hemos considerado alteraciones “informativas” aquellas que identifican el subtipo o fenotipo GS (*Genomically Stable*) de la clasificación de TCGA. El grupo GS de TCGA, se ha considerado históricamente como un grupo con mal pronóstico y no respondedor a tratamiento estándar, y también de ser un subtipo caracterizado por la falta de alteraciones que podían ser diana de tratamiento. Estos motivos lo convierten en un grupo especialmente interesante a tener identificado. Además, a diferencia de lo que se había pensado inicialmente, actualmente sabemos que algunos de los biomarcadores emergentes en CG como FGFR2 (Fibroblast Growth Factor Receptor 2) y CLDN 18.2 (Claudina 18.2) pueden estar presentes en este subtipo. También, ya ha sido comentado anteriormente que el estado de la proteína E-cadherina, que fué un método utilizado por algunas clasificaciones moleculares previas para detectar los GS, no refleja siempre el estado del gen *CDH1*. Por todos estos motivos en nuestro trabajo, valoramos las mutaciones en *CDH1* como “informativas”. Y finalmente, también hemos considerado alteraciones “informativas” aquellas mutaciones en genes descritos en la literatura como biomarcadores predictivos de respuesta como es el caso de familia KMT. Los genes *KMT2D* y *KMT2C* codifican enzimas que modifican la función de las histonas. La tasa de mutaciones de los genes de la familia KMT2 en CG se ha descrito entre 12-15% en COSMIC mientras que en nuestra cohorte esta frecuencia fue un poco más baja 8-11%. La mutación en *KMT2D* y/o en *KMT2C* ha sido relacionada con peor supervivencia y se ha descrito asociada a determinadas características clínicas y moleculares como TMB-H, MSI, positividad de PD-L1, bajo número de CNV y subtipo

difuso de Lauren, así como que las mutaciones en *ARID1A* y *KMT* son mutuamente excluyentes(82,101). En nuestra serie, encontramos MSI, positividad para PD-L1 e histología difusa dentro de los pacientes con mutaciones *KMT*, pero parece no cumplirse que *KMT* y *ARID1A* sean mutuamente excluyentes, ya que distintos pacientes tienen mutaciones en ambos genes. Sería interesante poder corroborar estos hallazgos de forma prospectiva en futuras investigaciones que analizaran cohortes de mayor tamaño. En la literatura encontramos descrita la presencia de mutación en genes de la familia KMT2, como prometedor biomarcador predictivo de respuesta a varias terapias como la inmunoterapia con inhibidores del punto de control inmunitario o otros tratamientos dirigidos contra DDR, MAPK/PIK3 o vías metabólicas y ciclo celular(102), así como, su posible rol en un complejo mecanismo de resistencia adaptativa a inhibidores PI3K(103).

Respecto a la mediana de supervivencia global (SG) de nuestra cohorte de pacientes con enfermedad avanzada o metastásica, que fue de 8.8 meses y la mediana de Supervivencia Libre de Progresión a la primera línea (SLP), que fue de 5 meses, destacar que son inferiores a las medianas del estudio REAL 2(38), siendo los datos de nuestra serie más comparables con los resultados de otros estudios contemporáneos como el estudio ML 17032(96) y de real word data (RWD) de registros nacionales como Agamenon(125). Estas diferencias pueden explicarse por ser nuestra serie una población no seleccionada como es el caso de la población incluida en ensayos clínicos. De los ensayos clínicos quedan fuera los pacientes con estado general regular, más morbilidad o mayor edad.

Y finalmente, en cuanto al objetivo secundario de la **asociación entre variables clínicas y moleculares analizadas individualmente y las variables de eficacia**, se obtienen algunos resultados similares a los reportados en la literatura, como por ejemplo la peor supervivencia asociada al ECOG 2 y a la enfermedad metastásica, también a la localización del tumor en unión esofagogástrica, al sexo varón, a la histología difusa y a la expresión aberrante de E-cadherina (89,126). No obstante, otras asociaciones descritas en la literatura, como el mejor pronóstico de los EBV y MSI o MMR deficientes(23), o la asociación entre la histología difusa y un menor beneficio al tratamiento(89) no se reflejan en nuestra cohorte. El tamaño de nuestra cohorte limita este análisis y la “n” resultante en algunos subgrupos es demasiado pequeña para tener suficiente potencia estadística para obtener resultados estadísticamente significativos.

En relación con la asociación entre los biomarcadores HER2 y PD-L1, biomarcadores añadidos respecto al algoritmo de Setia original, y la supervivencia o el beneficio del

tratamiento, en nuestra serie la expresión de HER2 y PD-L1 se asocia a peor supervivencia, en el caso de PD-L1 además de forma estadísticamente significativa. Estos hallazgos van en la línea de lo publicado en la literatura donde la mayoría de trabajos reportan peor pronóstico en los pacientes HER2 positivos(127) y PD-L1 positivos(128,129). En cuanto al beneficio del tratamiento, en el caso de HER2, donde está bien reportado que HER2 es un factor predictivo de respuesta a trastuzumab(39), debemos tener en cuenta que en nuestro estudio no todos los pacientes HER2 positivos tenían enfermedad avanzada o metastásica por lo que sólo pudieron recibir el fármaco dirigido antiHER2 (trastuzumab) una parte de ellos. Este motivo limita la interpretación de nuestros resultados. Y en el caso de PD-L1 y la respuesta a la quimioterapia, a diferencia de lo que pasa con la inmunoterapia donde PD-L1 tiene un claro valor predictivo de respuesta a este tipo de tratamiento, como se ha comentado anteriormente en el apartado de la introducción y específicamente en cáncer gástrico, no está claro su valor predictivo de respuesta a la quimioterapia.

Aportaciones y Limitaciones de nuestro estudio

Un tamaño muestral relativamente pequeño (n=109) y el carácter retrospectivo del análisis de las muestras, son las principales limitaciones de nuestro estudio. Consideramos que el tamaño muestral puede ser la razón de la falta de significación estadística de algunos de nuestros análisis. El CG es una entidad poco frecuente en comparación con otros tipos tumorales como son el cáncer de colon o mama y esta menor frecuencia hace más complicado el reclutamiento de pacientes en este tipo de estudios. Es en dicho contexto donde hemos querido demostrar la aplicabilidad “real” en práctica clínica asistencial realizando los análisis sobre muestra de biopsia endoscópica, lo que convierte nuestro trabajo en una de las series sobre clasificación molecular en CG con una “n” mayor utilizando biopsia endoscópica y no pieza quirúrgica. La poca evidencia o experiencia reportada previamente en la literatura en cuanto a la factibilidad de realizar caracterización molecular en cáncer gástrico sobre la biopsia endoscópica justificaría el carácter retrospectivo de los análisis antes de realizar estudios prospectivos.

Otra aportación importante de nuestro trabajo es que nuestra cohorte tiene una buena representación de pacientes con enfermedad avanzada o metastásica, esta es una población que ha sido históricamente poco representada en los estudios que evalúan clasificación molecular en CG.

Futuras Líneas de investigación

Como ya se ha comentado anteriormente, el CG es una enfermedad con una gran heterogeneidad. Se ha descrito heterogeneidad “basal” tanto en diferentes regiones del tumor primario (intratumoral) como entre el tumor primario y las metástasis(130), así como la adquisición de eventos mutacionales adicionales y la pérdida de amplificaciones bajo la presión selectiva del tratamiento(87). En esta línea y para futuros estudios, sería interesante plantear trabajos que comparasen la expresión de los biomarcadores en la biopsia endoscópica y en la pieza quirúrgica. También sería interesante confirmar algunos de nuestros hallazgos y complementar el estudio de las características moleculares de los tumores mediante estudios de expresión génica a partir del análisis del RNA (se conserva RNA tumoral de las muestras analizadas) y el análisis del DNA tumoral circulante (ctDNA) en muestras de sangre (biopsia líquida). Igualmente se podría combinar el análisis del tumor con estrategias que valoren el microambiente o estroma tumoral, especialmente importante para valorar tratamiento anti-angiogénico e inmunoterapia.

De igual manera, sería de interés añadir a nuestro panel propuesto de biomarcadores de expresión, biomarcadores emergentes como CLDN18.2 y FGFR2b, y analizar la distribución de estos biomarcadores en los diferentes subtipos de nuestro panel de *Setia* adaptado y realizar con ellos de nuevo el clustering. Estudios recientes sugieren que estos biomarcadores emergentes, al contrario de lo que parecía inicialmente, pueden estar presentes en varios subtipos, también en los pacientes negativos para HER2, PD-L1, EBV, MSI, aquí denominados “all-negatives”, lo cual resultaría muy interesante para buscar potenciales tratamientos para este subgrupo de pacientes. También la utilización de un panel mixto, de mutaciones más frecuentes en CG, focalizando en aquellas que sean dianas de terapias dirigidas, y añadiendo la posibilidad de detección de amplificaciones más recurrentes en esta patología, como por ejemplo EGFR o MET, o de alguna fusión por ejemplo de NTRK, ROS1 o RET, especialmente si son dianas de terapias dirigidas(99). Y la utilización de una firma de recombinación homóloga deficiente (HRD) para testar la sensibilidad a platinos.

8. CONCLUSIONES

- En la práctica clínica habitual es posible realizar una clasificación molecular del cáncer gástrico utilizando muestras de biopsia endoscópica obtenidas al diagnóstico y técnicas coste-efectivas disponibles en la mayoría de los laboratorios clínicos.
- A partir del análisis de los resultados del panel de biomarcadores de expresión proteica y génica, se han generado dos métodos de clasificación: la agrupación jerárquica en clústeres y el algoritmo de *Setia* adaptado a la presencia de nuevos biomarcadores en cáncer gástrico. De ambas clasificaciones, se ha evaluado la capacidad de predecir supervivencia y respuesta a la quimioterapia.
- Ambas clasificaciones permiten definir subgrupos de pacientes que van a beneficiarse de determinados tipos de tratamientos.
- Tanto la clasificación en clústeres como el algoritmo de *Setia* adaptado mejoran los resultados de las clasificaciones “clásicas” o histopatológicas de Lauren y WHO, así como los de la clasificación de *Setia* original, ya que permiten una mejor caracterización molecular de los tumores, facilitando la elección de tratamientos.
- Serán necesarios más estudios para determinar cual de los dos métodos, clústeres o algoritmo de *Setia* adaptado, permite optimizar mejor la selección de tratamiento.
- De acuerdo con lo reportado en la literatura, también en nuestra cohorte los genes más comúnmente mutados en cáncer gástrico son *TP53*, *ARID1A*, *PIK3CA*, *APC*, *KMT2D*, *CDH1*, *SMAD4*, *RNF43*, *RHOA*, *KRAS* y *KMT2C*.
- Complementar el método de clasificación en clústeres o el algoritmo de *Setia* adaptado con los resultados del panel mutacional, permite ampliar el número de pacientes potencialmente candidatos a un tratamiento concreto o dirigido.

- En nuestra serie se confirma la peor supervivencia libre de recidiva asociada a la localización tumoral en unión esofagogástrica. De la misma manera, también se comprueba la peor supervivencia global asociada al ECOG 2, al sexo varón, a la histología difusa y a la expresión aberrante de E-cadherina.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517):202-9.
2. Siewert JR, Stein HJ, Feith M. Adenocarcinoma of the Esophago-Gastric Junction. *Scand J Surg*. 2006;95(4):260-9.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
4. Rumgay H, Arnold M, Laversanne M, Whiteman DC, Thrift AP, Wei W, et al. International Trends in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma Incidence. *Am J Gastroenterol*. 2021;116(5):1072-6.
5. Las cifras del Cancer en Espana 2023 [Internet]. SEOM; Disponible en: www.seom.org
6. Palrasu M, Zaika E, El-Rifai W, Que J, Zaika AI. Role of Bacterial and Viral Pathogens in Gastric Carcinogenesis. *Cancers*. 2021;13(8):1878.
7. Kim J, Sun CL, Mailey B, Prendergast C, Artinyan A, Bhatia S, et al. Race and ethnicity correlate with survival in patients with gastric adenocarcinoma. *Ann Oncol*. 2010;21(1):152-60.
8. Jia F, Teer JK, Knepper TC, Lee JK, Zhou HH, He YJ, et al. Discordance of Somatic Mutations Between Asian and Caucasian Patient Populations with Gastric Cancer. *Mol Diagn Ther*. 2017;21(2):179-85.
9. Lin SJ, Gagnon-Bartsch JA, Tan IB, Earle S, Ruff L, Pettinger K, et al. Signatures of tumour immunity distinguish Asian and non-Asian gastric adenocarcinomas. *Gut*. 2015;64(11):1721-31.
10. Rustgi SD, Ching CK, Kastrinos F. Inherited Predisposition to Gastric Cancer. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2021;31(3):467-87.
11. Ratti M, Lampis A, Hahne JC, Passalacqua R, Valeri N. Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(22):4151-62.
12. Lordick F, Carneiro F, Cascinu S, Fleitas T, Haustermans K, Piessen G, et al. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2022;33(10):1005-20.
13. Laurén P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and so-Called Intestinal-Type Carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64(1):31-49.
14. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. WHO classification of tumours of the digestive system. *WHO Classif Tumours Dig Syst*. 2010;(Ed. 4).
15. Hu B, Hajj NE, Sittler S, Lammert N, Barnes R, Meloni-Ehrig A. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(3).
16. Tan IB, Ivanova T, Lim KH, Ong CW, Deng N, Lee J, et al. Intrinsic Subtypes of Gastric Cancer, Based on Gene Expression Pattern, Predict Survival and Respond Differently to Chemotherapy. *Gastroenterology*. 2011;141(2):476-485.e11.
17. Lei Z, Tan IB, Das K, Deng N, Zouridis H, Pattison S, et al. Identification of Molecular Subtypes of Gastric Cancer With Different Responses to PI3-Kinase Inhibitors and 5-Fluorouracil. *Gastroenterology*. 2013;145(3):554-65.
18. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, Kim KM, Ting JC, Wong SS, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med*. 2015;21(5):449-56.

19. Weis VG, Goldenring JR. Current understanding of SPEM and its standing in the preneoplastic process. *Gastric Cancer Off J Int Gastric Cancer Assoc Jpn Gastric Cancer Assoc.* 2009;12(4):189-97.
20. The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma. *Nature.* 2017;541(7636):169-75.
21. Setia N, Agoston AT, Han HS, Mullen JT, Duda DG, Clark JW, et al. A protein and mRNA expression-based classification of gastric cancer. *Mod Pathol.* 2016;29(7):772-84.
22. Song K, Yang Q, Yan Y, Yu X, Xu K, Xu J. Gastric mucin phenotype indicates aggressive biological behaviour in early differentiated gastric adenocarcinomas following endoscopic treatment. *Diagn Pathol.* 2021;16(1):62.
23. Ahn S, Lee SJ, Kim Y, Kim A, Shin N, Choi KU, et al. High-throughput Protein and mRNA Expression-based Classification of Gastric Cancers Can Identify Clinically Distinct Subtypes, Concordant With Recent Molecular Classifications. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(1):106-15.
24. Serra O, Galán M, Ginesta MM, Calvo M, Sala N, Salazar R. Comparison and applicability of molecular classifications for gastric cancer. *Cancer Treat Rev.* 2019;77:29-34.
25. Kuboki Y, Yamashita S, Niwa T, Ushijima T, Nagatsuma A, Kuwata T, et al. Comprehensive analyses using next-generation sequencing and immunohistochemistry enable precise treatment in advanced gastric cancer. *Ann Oncol.* 2016;27(1):127-33.
26. Kim HS, Lee H, Shin SJ, Beom SH, Jung M, Bae S, et al. Complementary utility of targeted next-generation sequencing and immunohistochemistry panels as a screening platform to select targeted therapy for advanced gastric cancer. *Oncotarget.* 2017;8(24):38389-98.
27. Birkman EM, Mansuri N, Kurki S, Ålgars A, Lintunen M, Ristamäki R, et al. Gastric cancer: immunohistochemical classification of molecular subtypes and their association with clinicopathological characteristics. *Virchows Arch.* 2018;472(3):369-82.
28. Yoon JY, Sy K, Brezden-Masley C, Streutker CJ. Histo- and immunohistochemistry-based estimation of the TCGA and ACRG molecular subtypes for gastric carcinoma and their prognostic significance: A single-institution study. *PloS One.* 2019;14(12):e0224812.
29. Di Pinto F, Armentano R, Arborea G, Schena N, Donghia R, Valentini AM. Are Immunohistochemical Markers Useful in Phenotypic Gastric Cancer Classification? *Oncology.* 2020;98(8):566-74.
30. Pinto MP, Córdova-Delgado M, Retamal IN, Muñoz-Medel M, Bravo ML, Durán D, et al. A Molecular Stratification of Chilean Gastric Cancer Patients with Potential Clinical Applicability. *Cancers.* 2020;12(7):1863.
31. Ramos MFKP, Pereira MA, de Mello ES, Cirqueira C dos S, Zilberstein B, Alves VAF, et al. Gastric cancer molecular classification based on immunohistochemistry and in situ hybridization: Analysis in western patients after curative-intent surgery. *World J Clin Oncol.* 2021;12(8):688-701.
32. Nshizirungu JP, Bennis S, Mellouki I, Sekal M, Benajah DA, Lahmidani N, et al. Reproduction of the Cancer Genome Atlas (TCGA) and Asian Cancer Research Group (ACRG) Gastric Cancer Molecular Classifications and Their Association with Clinicopathological Characteristics and Overall Survival in Moroccan Patients. *Dis Markers.* 2021;
33. Daun T, Nienhold R, Paasinen-Sohns A, Frank A, Sachs M, Zlobec I, et al. Combined Simplified Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma, Enhanced by Lymph Node Status: An Integrative Approach. *Cancers.* 2021;13(15):3722.

34. Uhlik MT, Liu J, Falcon BL, Iyer S, Stewart J, Celikkaya H, et al. Stromal-Based Signatures for the Classification of Gastric Cancer. *Cancer Res.* 2016;76(9):2573-86.
35. Brierley et al., editor. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 8th Edition | Wiley.
36. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJH, Nicolson M, et al. Perioperative Chemotherapy versus Surgery Alone for Resectable Gastroesophageal Cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(1):11-20.
37. Al-Batran SE, Homann N, Pauligk C, Goetze TO, Meiler J, Kasper S, et al. Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial. *The Lancet.* 2019;393(10184):1948-57.
38. Cunningham D, Starling N, Rao S, Iveson T, Nicolson M, Coxon F, et al. Capecitabine and Oxaliplatin for Advanced Esophagogastric Cancer. *N Engl J Med.* 2008;358(1):36-46.
39. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet.* 2010;376(9742):687-97.
40. Wilke H, Muro K, Cutsem EV, Oh SC, Bodoky G, Shimada Y, et al. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(11):1224-35.
41. Fuchs CS, Tomasek J, Yong CJ, Dumitru F, Passalacqua R, Goswami C, et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet.* 2014;383(9911):31-9.
42. Li J, Qin S, Xu J, Xiong J, Wu C, Bai Y, et al. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Trial of Apatinib in Patients With Chemotherapy-Refractory Advanced or Metastatic Adenocarcinoma of the Stomach or Gastroesophageal Junction. *J Clin Oncol.* 2016;
43. Ku GY, Bartolomeo MD, Smyth E, Chau I, Park H, Siena S, et al. 1205MO Updated analysis of DESTINY-Gastric02: A phase II single-arm trial of trastuzumab deruxtecan (T-DXd) in western patients (Pts) with HER2-positive (HER2+) unresectable/metastatic gastric/gastroesophageal junction (GEJ) cancer who progressed on or after trastuzumab-containing regimen. *Ann Oncol.* 2022;33:S1100.
44. Shitara K, Doi T, Dvorkin M, Mansoor W, Arkenau HT, Prokharau A, et al. 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;19(11):1437-48.
45. Janjigian YY, Shitara K, Moehler M, Garrido M, Salman P, Shen L, et al. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (CheckMate 649): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet.* 2021;398(10294):27-40.
46. Rha SY, Oh DY, Yañez P, Bai Y, Ryu MH, Lee J, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for HER2-negative advanced gastric cancer (KEYNOTE-859): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2023;24(11):1181-95.
47. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, Di Giacomo AM, De Jesus-Acosta A, Delord

- JP, et al. Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2020;38(1):1-10.
48. Janjigian YY, Kawazoe A, Bai Y, Xu J, Lonardi S, Metges JP, et al. Pembrolizumab plus trastuzumab and chemotherapy for HER2-positive gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma: interim analyses from the phase 3 KEYNOTE-811 randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2023;0(0).
 49. Al-Batran SE, Lorenzen S, Thuss-Patience PC, Homann N, Schenk M, Lindig U, et al. A randomized, open-label, phase II/III efficacy and safety study of atezolizumab in combination with FLOT versus FLOT alone in patients with gastric cancer and adenocarcinoma of the oesophagogastric junction and high immune responsiveness: The IKF-S633/DANTE trial, a trial of AIO in collaboration with SAKK. *J Clin Oncol*. junio de 2023;41(16_suppl):TPS4177-TPS4177.
 50. Shitara K, Rha SY, Wyrwicz LS, Oshima T, Karaseva N, Osipov M, et al. Neoadjuvant and adjuvant pembrolizumab plus chemotherapy in locally advanced gastric or gastro-oesophageal cancer (KEYNOTE-585): an interim analysis of the multicentre, double-blind, randomised phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2024;25(2):212-24.
 51. Cunningham D, Rao S, Starling N, Iveson T, Nicolson M, Coxon F, et al. Randomised multicentre phase III study comparing capecitabine with fluorouracil and oxaliplatin with cisplatin in patients with advanced oesophagogastric (OG) cancer: The REAL 2 trial. *J Clin Oncol*. 2006;24(18_suppl):LBA4017-LBA4017.
 52. Tabernero J, Alsina M, Shitara K, Doi T, Dvorkin M, Mansoor W, et al. Health-related quality of life associated with trifluridine/tipiracil in heavily pretreated metastatic gastric cancer: results from TAGS. *Gastric Cancer Off J Int Gastric Cancer Assoc Jpn Gastric Cancer Assoc*. 2020;23(4):689-98.
 53. Cherny NI, Dafni U, Bogaerts J, Latino NJ, Pentheroudakis G, Douillard JY, et al. ESMO-Magnitude of Clinical Benefit Scale version 1.1. *Ann Oncol*. 2017;28(10):2340-66.
 54. Yamashita K, Iwatsuki M, Harada K, Eto K, Hiyoshi Y, Ishimoto T, et al. Prognostic impacts of the combined positive score and the tumor proportion score for programmed death ligand-1 expression by double immunohistochemical staining in patients with advanced gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2020;23(1):95-104.
 55. Kulangara K, Zhang N, Corigliano E, Guerrero L, Waldroup S, Jaiswal D, et al. Clinical Utility of the Combined Positive Score for Programmed Death Ligand-1 Expression and the Approval of Pembrolizumab for Treatment of Gastric Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;143(3):330-7.
 56. Kelly RJ, Zaidi AH, Smith MA, Omstead AN, Kosovec JE, Matsui D, et al. The Dynamic and Transient Immune Microenvironment in Locally Advanced Esophageal Adenocarcinoma Post Chemoradiation. *Ann Surg*. 2018;268(6):992.
 57. Ilie M, Long-Mira E, Bence C, Butori C, Lassalle S, Bouhlef L, et al. Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies. *Ann Oncol*. 2016;27(1):147-53.
 58. Kim S, Koh J, Kwon D, Keam B, Go H, Kim YA, et al. Comparative analysis of PD-L1 expression between primary and metastatic pulmonary adenocarcinomas. *Eur J Cancer*. 2017;75:141-9.
 59. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, et al. Association of PD-1, PD-1 Ligands, and Other Features of the Tumor Immune Microenvironment with Response to Anti-PD-1 Therapy. *Clin Cancer Res*. 2014;20(19):5064-74.
 60. Shin J, Chung JH, Kim SH, Lee KS, Suh KJ, Lee JY, et al. Effect of Platinum-

Based Chemotherapy on PD-L1 Expression on Tumor Cells in Non-small Cell Lung Cancer. *Cancer Res Treat.* 2019;51(3):1086-97.

61. Shitara K, Van Cutsem E, Bang YJ, Fuchs C, Wyrwicz L, Lee KW, et al. Efficacy and Safety of Pembrolizumab or Pembrolizumab Plus Chemotherapy vs Chemotherapy Alone for Patients With First-line, Advanced Gastric Cancer: The KEYNOTE-062 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 1 de octubre de 2020;6(10):1571.

62. Kang YK, Boku N, Satoh T, Ryu MH, Chao Y, Kato K, et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet.* 2017;390(10111):2461-71.

63. Pietrantonio F, Randon G, Bartolomeo MD, Luciani A, Chao J, Smyth EC, et al. Predictive role of microsatellite instability for PD-1 blockade in patients with advanced gastric cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials. *ESMO Open.* 2021;6(1).

64. Hur JY, Chao J, Kim K, Kim ST, Kim KM, Klempner SJ, et al. High-level FGFR2 amplification is associated with poor prognosis and Lower response to chemotherapy in gastric cancers. *Pathol - Res Pract.* 2020;216(4):152878.

65. Su X, Zhan P, Gavine PR, Morgan S, Womack C, Ni X, et al. FGFR2 amplification has prognostic significance in gastric cancer: results from a large international multicentre study. *Br J Cancer.* 2014;110(4):967-75.

66. Ahn S, Lee J, Hong M, Kim ST, Park SH, Choi MG, et al. FGFR2 in gastric cancer: protein overexpression predicts gene amplification and high H-index predicts poor survival. *Mod Pathol.* septiembre de 2016;29(9):1095-103.

67. Wainberg ZA, Enzinger PC, Kang YK, Qin S, Yamaguchi K, Kim IH, et al. Bemarituzumab in patients with FGFR2b-selected gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FIGHT): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2022;23(11):1430-40.

68. Smyth EC, Chao J, Muro K, Yen P, Yanes RE, Zahlten-Kumeli A, et al. Trial in progress: Phase 3 study of bemarituzumab + mFOLFOX6 versus placebo + mFOLFOX6 in previously untreated advanced gastric or gastroesophageal junction (GEJ) cancer with FGFR2b overexpression (FORTITUDE-101). *J Clin Oncol.* 2022;40(16_suppl):TPS4164-TPS4164.

69. Pellino A, Brignola S, Riello E, Niero M, Murgioni S, Guido M, et al. Association of CLDN18 Protein Expression with Clinicopathological Features and Prognosis in Advanced Gastric and Gastroesophageal Junction Adenocarcinomas. *J Pers Med.* 2021;11(11):1095.

70. Shitara K, Lordick F, Bang YJ, Enzinger P, Ilson D, Shah MA, et al. Zolbetuximab plus mFOLFOX6 in patients with CLDN18.2-positive, HER2-negative, untreated, locally advanced unresectable or metastatic gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (SPOTLIGHT): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet.* 2023;401(10389):1655-68.

71. Shah MA, Shitara K, Ajani JA, Bang YJ, Enzinger P, Ilson D, et al. Zolbetuximab plus CAPOX in CLDN18.2-positive gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma: the randomized, phase 3 GLOW trial. *Nat Med.* 2023;1-9.

72. Kubota Y, Kawazoe A, Mishima S, Nakamura Y, Kotani D, Kuboki Y, et al. Comprehensive clinical and molecular characterization of claudin 18.2 expression in advanced gastric or gastroesophageal junction cancer. *ESMO Open.* 2023;8(1).

73. Shitara K, Bang YJ, Iwasa S, Sugimoto N, Ryu MH, Sakai D, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Gastric Cancer. *N Engl J Med.* 2020;382(25):2419-30.

74. Sahin U, Türeci Ö, Manikhas G, Lordick F, Rusyn A, Vynnychenko I, et al. FAST: a randomised phase II study of zolbetuximab (IMAB362) plus EOX versus EOX alone for first-line treatment of advanced CLDN18.2-positive gastric and gastro-oesophageal adenocarcinoma. *Ann Oncol*. 2021;32(5):609-19.
75. Tasas de supervivencia del cáncer de estómago según la etapa.
76. Camargo MC, Kim WH, Chiaravalli AM, Kim KM, Corvalan AH, Matsuo K, et al. Improved survival of gastric cancer with tumour Epstein-Barr virus positivity: an international pooled analysis. *Gut*. febrero de 2014;63(2):236-43.
77. ZHU L, LI Z, WANG Y, ZHANG C, LIU Y, QU X. Microsatellite instability and survival in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Mol Clin Oncol*. 2015;3(3):699-705.
78. Sohn BH, Hwang JE, Jang HJ, Lee HS, Oh SC, Shim JJ, et al. Clinical significance of four molecular subtypes of gastric cancer identified by The Cancer Genome Atlas project. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017;23(15):4441-9.
79. Xie T, Liu Y, Zhang Z, Zhang X, Gong J, Qi C, et al. Positive Status of Epstein-Barr Virus as a Biomarker for Gastric Cancer Immunotherapy: A Prospective Observational Study. *J Immunother Hagerstown Md 1997*. 2020;43(4):139-44.
80. Davoli T, Uno H, Wooten E, Elledge S. Tumor aneuploidy correlates with markers of immune evasion and with reduced response to immunotherapy. *Science*. 2017;355:8399.
81. Chaganty BKR, Qiu S, Gest A, Lu Y, Ivan C, Calin GA, et al. Trastuzumab upregulates PD-L1 as a potential mechanism of trastuzumab resistance through engagement of immune effector cells and stimulation of IFN γ secretion. *Cancer Lett*. 2018;430:47-56.
82. Wang Q, Liu G, Hu C. Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma. *Gastroenterol Res*. 2019;12(6):275-82.
83. Pietrantonio F, Miceli R, Raimondi A, Kim YW, Kang WK, Langley RE, et al. Individual Patient Data Meta-Analysis of the Value of Microsatellite Instability As a Biomarker in Gastric Cancer. *J Clin Oncol*. 2019;37(35):3392-400.
84. Xie T, Peng Z, Liu Y, Zhang Z, Zhang X, Li J, et al. Clinicopathological Characteristics and Response to Chemotherapy in Treatment-Naive Epstein-Barr Virus Associated Gastric Cancer: A Retrospective Study. *Front Oncol*. 2021;11:611676.
85. Qiu MZ, He CY, Yang DJ, Zhou DL, Zhao BW, Wang XJ, et al. Observational cohort study of clinical outcome in Epstein-Barr virus associated gastric cancer patients. *Ther Adv Med Oncol*. 2020;12:1758835920937434.
86. Pietrantonio F, Fucà G, Morano F, Gloghini A, Corso S, Aprile G, et al. Biomarkers of Primary Resistance to Trastuzumab in HER2-Positive Metastatic Gastric Cancer Patients: the AMNESIA Case-Control Study. *Clin Cancer Res*. 2018;24(5):1082-9.
87. Janjigian YY, Sanchez-Vega F, Jonsson P, Chatila WK, Hechtman JF, Ku GY, et al. Genetic Predictors of Response to Systemic Therapy in Esophagogastric Cancer. *Cancer Discov*. 2018;8(1):49-58.
88. Pietrantonio F, Caporale M, Morano F, Scartozzi M, Gloghini A, De Vita F, et al. HER2 loss in HER2-positive gastric or gastroesophageal cancer after trastuzumab therapy: Implication for further clinical research: HER2 loss in HER2-positive gastric or gastroesophageal cancer after trastuzumab therapy. *Int J Cancer*. 2016;139(12):2859-64.
89. Jiménez Fonseca P, Carmona-Bayonas A, Hernández R, Custodio A, Cano JM, Lacalle A, et al. Lauren subtypes of advanced gastric cancer influence survival and response to chemotherapy: real-world data from the AGAMENON National Cancer Registry. *Br J Cancer*. 2017;117(6):775-82.

90. Wimberly H, Brown JR, Schalper K, Haack H, Silver MR, Nixon C, et al. PD-L1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(4):326-32.
91. Telli ML, Timms KM, Reid J, Hennessy B, Mills GB, Jensen KC, et al. Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2016;22(15):3764-73.
92. Rigakos G, Razis E. BRCAness: Finding the Achilles Heel in Ovarian Cancer. *The Oncologist.* 2012;17(7):956-62.
93. Ampanattu SD, Ahmed G, Thapa B, Janardan A, Vallejos A, Taylor B, et al. Predictive impact of ARID1A status in solid tumors. *Eur J Cancer.* 2022;174:S96.
94. Becker K, Mueller JD, Schulmacher C, Ott K, Fink U, Busch R, et al. Histomorphology and grading of regression in gastric carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy: Response of Gastric Carcinoma to Chemotherapy. *Cancer.* 1 de octubre de 2003;98(7):1521-30.
95. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009;45(2):228-47.
96. Kang YK, Kang WK, Shin DB, Chen J, Xiong J, Wang J, et al. Capecitabine/cisplatin versus 5-fluorouracil/cisplatin as first-line therapy in patients with advanced gastric cancer: a randomised phase III noninferiority trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2009;20(4):666-73.
97. Au CH, Ho DN, Kwong A, Chan TL, Ma ESK. BAMClipper: removing primers from alignments to minimize false-negative mutations in amplicon next-generation sequencing. *Sci Rep.* 8 de mayo de 2017;7(1):1-7.
98. Gower JC. A General Coefficient of Similarity and Some of Its Properties. *Biometrics.* 1971;27(4):857-71.
99. Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, Lolkema MP, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol.* 2020;31(11):1491-505.
100. Mateo J, Chakravarty D, Dienstmann R, Jezdic S, Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N, et al. A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). *Ann Oncol.* 2018;29(9):1895-902.
101. Cho SJ, Yoon C, Lee JH, Chang KK, Lin J xian, Kim YH, et al. KMT2C mutations in diffuse type gastric adenocarcinoma promote epithelial-to-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2018;24(24):6556-69.
102. Wang J, Xiu J, Baca Y, Battaglin F, Arai H, Kawanishi N, et al. Large-scale analysis of KMT2 mutations defines a distinctive molecular subset with treatment implication in gastric cancer. *Oncogene.* 2021;40(30):4894-905.
103. Toska E, Osmanbeyoglu HU, Castel P, Chan C, Hendrickson RC, Elkabets M, et al. PI3K pathway regulates ER-dependent transcription in breast cancer through the epigenetic regulator KMT2D. *Science.* 2017;355(6331):1324-30.
104. Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR, et al. Mutational Landscape of Metastatic Cancer Revealed from Prospective Clinical Sequencing of 10,000 Patients. *Nat Med.* 2017;23(6):703-13.
105. Aggarwal R, Umetsu S, Dhawan M, Grabowsky J, Carnevale J, Howell M, et al. 512O Interim results from a phase II study of the ATR inhibitor ceralasertib in ARID1A-deficient and ARID1A-intact advanced solid tumor malignancies. *Ann Oncol.* 1 de

septiembre de 2021;32:S583.

106. Bang YJ, Xu RH, Chin K, Lee KW, Park SH, Rha SY, et al. Olaparib in combination with paclitaxel in patients with advanced gastric cancer who have progressed following first-line therapy (GOLD): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* diciembre de 2017;18(12):1637-51.

107. Elvin JA, Gay LM, Ort R, Shuluk J, Long J, Shelley L, et al. Clinical Benefit in Response to Palbociclib Treatment in Refractory Uterine Leiomyosarcomas with a Common CDKN2A Alteration. *The Oncologist.* 2017;22(4):416-21.

108. Hyman DM, Piha-Paul SA, Won H, Rodon J, Saura C, Shapiro GI, et al. HER kinase inhibition in patients with HER2- and HER3-mutant cancers. *Nature.* 1 de febrero de 2018;554(7691):189-94.

109. Zeitouni D, Pylayeva-Gupta Y, Der CJ, Bryant KL. KRAS Mutant Pancreatic Cancer: No Lone Path to an Effective Treatment. *Cancers.* 2016;8(4):45.

110. Juric D, Rodon J, Tabernero J, Janku F, Burris HA, Schellens JHM, et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase α -Selective Inhibition With Alpelisib (BYL719) in PIK3CA-Altered Solid Tumors: Results From the First-in-Human Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2018;36(13):1291-9.

111. de Bono JS, De Giorgi U, Rodrigues DN, Massard C, Bracarda S, Font A, et al. Randomized Phase II Study Evaluating Akt Blockade with Ipatasertib, in Combination with Abiraterone, in Patients with Metastatic Prostate Cancer with and without PTEN Loss. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2019;25(3):928-36.

112. Tajima Y, Shimoda T, Nakanishi Y, Yokoyama N, Tanaka T, Shimizu K, et al. Association of gastric and intestinal phenotypic marker expression of gastric carcinomas with tumor thymidylate synthase expression and response to postoperative chemotherapy with 5-fluorouracil. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003;129(12):683-90.

113. Allum W, Lordick F, Alsina M, Andritsch E, Ba-Ssalamah A, Beishon M, et al. ECCO essential requirements for quality cancer care: Oesophageal and gastric cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018;122:179-93.

114. Janjigian YY, Cecchini M, Shitara K, Enzinger PC, Wainberg ZA, Catenacci DV, et al. 1416P Genomic landscape of late-stage gastric cancer. *Ann Oncol.* 2021;32:S1062-3.

115. Hwang HJ, Nam SK, Park H, Park Y, Koh J, Na HY, et al. Prediction of TP53 mutations by p53 immunohistochemistry and their prognostic significance in gastric cancer. *J Pathol Transl Med.* 1 de julio de 2020;54(5):378-86.

116. Pous A, Notario L, Hierro C, Layos L, Bugés C. HER2-Positive Gastric Cancer: The Role of Immunotherapy and Novel Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci.* 2023;24(14):11403.

117. Combs SE, Han G, Mani N, Beruti S, Nerenberg M, Rimm DL. Loss of antigenicity with tissue age in breast cancer. *Lab Invest.* 2016;96(3):264-9.

118. Zhang R, Liu Z, Chang X, Gao Y, Han H, Liu X, et al. Clinical significance of chromosomal integrity in gastric cancers. *Int J Biol Markers.* 2022;37(3):296-305.

119. Liu ZH, Zhu BW, Shi M, Qu YR, He XJ, Yuan HL, et al. Profiling of gene fusion involving targetable genes in Chinese gastric cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2022;14(8):1528-39.

120. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature.* 2013;499(7457):214-8.

121. Cai H, Jing C, Chang X, Ding D, Han T, Yang J, et al. Mutational landscape of gastric cancer and clinical application of genomic profiling based on target next-generation sequencing. *J Transl Med.* 2019;17(1):189.

122. Liu X, Chu KM. E-cadherin and gastric cancer: cause, consequence, and applications. *BioMed Res Int*. 2014;2014:637308.
123. Schoop I, Maleki SS, Behrens HM, Krüger S, Haag J, Röcken C. p53 immunostaining cannot be used to predict TP53 mutations in gastric cancer: results from a large Central European cohort. *Hum Pathol*. 2020;105:53-66.
124. OncoKB™ [Internet]. [citado 16 de abril de 2024]. OncoKB™ - MSK's Precision Oncology Knowledge Base. Disponible en: <https://www.oncokb.org/>
125. Declara IM, Mihic L, Calvo A, Hernandez R, Unanua NC, Cacho D, et al. 1410P Gastric cancer: Data from the AGAMENON-SEOM study. *Ann Oncol*. 2021;32:S1060.
126. Vizoso Piñeiro FJ, Corte Torres MD, García Muñiz JL. Factores pronósticos y nuevos aspectos de la biología molecular en el cáncer de estómago resecable. *Oncol Barc*. 2004;27(4).
127. Stomach-fact-sheet. The Global Cancer Observatory. [Internet]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/7-Stomach-fact-sheet.pdf>
128. Wu P, Wu D, Li L, Chai Y, Huang J. PD-L1 and Survival in Solid Tumors: A Meta-Analysis. *PLOS ONE*. 2015;10(6):e0131403.
129. Xiang X, Yu PC, Long D, Liao XL, Zhang S, You XM, et al. Prognostic value of PD –L1 expression in patients with primary solid tumors. *Oncotarget*. 2017;9(4):5058-72.
130. Pectasides E, Stachler MD, Derks S, Liu Y, Maron S, Islam M, et al. Genomic Heterogeneity as a Barrier to Precision Medicine in Gastroesophageal Adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 2018;8(1):37-48.

10. ANEXOS

10.1. Abreviaciones

ACRG	Asian Cancer Research Group
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGPPE	Adenocarcinoma gástrico asociado a poliposis proximal en estómago
AJCC	American Joint Committee on Cancer
<i>ARID1A</i>	Gen del dominio de interacción rico en AT de la proteína A1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BBDD	Base de datos
<i>CDH1</i>	Gen de la proteína E-cadherina
<i>CDKN1A</i>	Gen de cyclin-dependent kinase inhibitor 1 ^a
CDS	Coding Sequence
CEIC	Comité ético de investigación clínica
CG	Cáncer gástrico
CGDH	Cáncer gástrico difuso hereditario.
CGDH	Cáncer gástrico difuso hereditario
CIN	inestabilidad cromosómica, del inglés chromosomal instability
CLDN18.2	Claudin 18.2
CNV	Del inglés copy number variations
COSMIC	Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer
CPS	Combined Positive Score
CRS	cirugía citoreductora
CSC	Del inglés cancer stem cells
ctDNA	ADN tumoral circulante, del inglés circulating tumor DNA
DDR	DNA damage response
dMMR	Deficiencia en el sistema de reparación del ADN, del inglés deficient mismatch repair system
dMMR	Deficient DNA mismatch repair system
EBV	Del inglés <i>Epstein-Barr</i> virus

ECF	Epirubicina, cisplatino, 5-fluoruracilo
ECOG	escala de estado funcional (Eastern Cooperative Oncology Group)
EE	Enfermedad estable
EMA	European Medicines Agency
EMT	Del inglés epithelial-mesenchymal transition
EOX	Epirubicina, oxaliplatino, 5-fluorouracilo
ESCAT	ESMO Scale for Clinical Actionability for molecular Targets
ESMO	European Society for Medical Oncology
ESMO-MCBS	ESMO-Magnitude of Clinical Benefit Scale
FDA	Food and Drug Administration
FFPE	Formalin fixed paraffin embedded
FGFR2	Fibroblast Growth Factor Receptor 2
FLOT	Oxaliplatino, taxotere, 5-fluorouracilo
FOLFOX	Oxaliplatino, ácido folínico, 5-fluorouracilo
GR	Grado de regresión
GS	estabilidad genómica, del inglés genomically stable
H-E	Hematoxilina – eosina
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HIPEC	quimioterapia intraperitoneal con hipertermia
HR	Hazard ratio
HRD	Homologous recombination deficiency
HUB	Hospital Universitari de Bellvitge
ICO	Institut Català Oncologia
IHQ	Inmunohistoquímica
ILR	Intervalo libre de recidiva
IQR	rango intercuartílico
ISH	Hibridación in situ
LPS	Laparoscopia
mARN	ARN mensajero
<i>MDM2</i>	Gen de murine double minute 2
miARN	micro ARN
MMR	Sistema de reparación del ADN, del inglés DNA mismatch repair system

MSI	Inestabilidad de microsatélites, del inglés microsatellite instability
MSI-H	Del inglés microsatellite instability – high
MUC6	Glicoproteína secretora de mucina 6
NA	No aplica
NGS	Next generation sequencing
NR	No reportado
NV	No valorable
OMS / WHO	Organización mundial de la Salud (del inglés: World Health Organization)
OR	Odds ratio
ORR	Tasa global de respuestas, del inglés overall response rate
PAF	Poliposis adenomatosa familiar
PCI	Índice carcinomatosis peritoneal
PD-1	Proteína/receptor muerte celular programada 1
PD-L1	Ligando de muerte celular programada 1
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
pMMR	Proficient DNA mismatch repair system
RC	Respuesta completa
RD	Real Decreto
RECIST	Response evaluation criteria in solid tumors
RP	Respuesta parcial
RPPA	Del inglés reverse phase protein array
SCNA	Del inglés somatic copy number aberrations
SD	desviación estándar
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results
SG	Supervivencia global
SLP	Supervivencia libre de progresión
SPEM	Del inglés spasmodic polypeptide-expressing metaplasia
TCGA	Atlas del Genoma del Cáncer (del inglés: The Cancer Genome Atlas)
TK	Tirosina-quinasa
TKI	Tyrosine kinase Inhibitor
TMB-H	Alta carga tumoral, del inglés <i>tumor mutational burden – high</i>
TNM	Del inglés <i>Tumor, Node, Metastasis</i>
TP	Tiempo a la progresión a la primera línea

<i>TP53</i>	Gen de la proteína p53
TPS	Tumor Proportion Score
UEG	Unión esofagogástrica
UICC	Union for International Cancer Control.
UTEG	Unidad funcional de tumores esofagogástricos
VEGFR2	Vascular endotelial growth factor receptor 2

10.2.Relación de Tablas y Figuras

Relación de Tablas

*Apartado 1.3.1. **Tabla 1.** Estimación de la prevalencia total de CG por sexos en España para el año 2020.*

*Apartado 1.3.5. **Tabla 2.** Genes asociados a CG hereditario.*

*Apartado 1.4.1. **Tabla 3.** Subtipos de CG según la clasificación de la OMS (WHO) y su equivalencia con los subtipos de Lauren.*

*Apartado 1.4.2. **Tabla 4.** Características principales de los 3 subtipos de CG según Lei et al.*

*Apartado 1.4.2. **Tabla 5.** Principales características de los pacientes analizados, muestras tumorales y tipo de análisis realizados, entre los estudios TCGA y ACRG.*

*Apartado 1.4.3. **Tabla 6.** Equivalencias entre las diferentes clasificaciones.*

*Apartado 1.4.3. **Tabla 7.** Estudios más recientes que aplican clasificación molecular basada en inmunohistoquímica, en CG en cohortes no asiáticas.*

*Apartado 1.5. **Tabla 8.** Estadíaje TNM según AJCC/UICC 8ª edición.*

*Apartado 1.5. **Tabla 9.** Estadíaje anatómico/grupos pronósticos según AJCC/UICC 8ª edición.*

*Apartado 1.6.3. **Tabla 10.** Tabla resumen de esquemas de tratamiento que han sido utilizados y esquemas actualmente aprobados en CG tanto para el manejo peri-operatorio como enfermedad avanzada/metastásica.*

*Apartado 1.6.4. **Tabla 11.** Ensayos que evalúan añadir inmunoterapia a la primera línea de tratamiento para CG con enfermedad avanzada o metastásica HER2 negativa (excluidos ensayos dirigidos principalmente a esófago y enfermedad HER2 positiva) y sus características en cuanto al biomarcador PD-L1.*

*Apartado 1.6.5. **Tabla 12.** Tabla resumen de biomarcadores en CG.*

*Apartado 1.6.6. **Tabla 13.** Tabla que muestra las tasas relativas de supervivencia a 5 años del CG según extensión enfermedad. Base de datos de SEER*.*

*Apartado 5.4. **Tabla 14.** Datos clínico-patológicos y moleculares recogidos en la BBDD del estudio.*

*Apartado 5.5.2. **Tabla 15.** Biomarcadores analizados y anticuerpos (IHQ) o sondas (ISH) utilizadas.*

*Apartado 5.5.3. **Tabla 16.** Listado de genes del panel mutacional.*

*Apartado 6.1.2. **Tabla 17.** Tabla descriptiva de las características clínicas basales de la cohorte final de pacientes incluidos en el estudio (N=109).*

*Apartado 6.1.2. **Tabla 18.** Tabla descriptiva de los tratamientos recibidos según la situación de enfermedad basal.*

*Apartado 6.1.3. **Tabla 19.** Resultados del análisis de los biomarcadores de expresión (IHC/ISH) en la cohorte final de 109 pacientes.*

*Apartado 6.1.3. **Tabla 20.** Análisis de validación de PD-L1 (n=58 pacientes).*

*Apartado 6.1.3. **Tabla 21.** Distribución de los pacientes de nuestra cohorte en subtipos según el algoritmo descrito por Setia et al. y análisis de las diferencias entre los resultados esperados y observados.*

*Apartado 6.1.3. **Tabla 22.** Distribución de los casos HER2 positivos, PD-L1 positivos y MUC6 aberrante de los pacientes de nuestra cohorte, en los subtipos descritos en la clasificación de Setia et al.*

*Apartado 6.1.3. **Tabla 23.** Tabla descriptiva de las características clínicas basales en los diferentes biomarcadores de expresión (IHC/ISH).*

*Apartado 6.1.3.2. **Tabla 24.** Tabla que muestra número y % de pacientes en cada clúster.*

*Apartado 6.1.3.2. **Tabla 25.** Tabla descriptiva de las características clínicas de los pacientes incluidos en cada clúster.*

*Apartado 6.1.3.2. **Tabla 26.** Tabla descriptiva de la distribución en cada clúster de los biomarcadores analizados.*

*Apartado 6.1.3.2. **Tabla 27.** Tabla descriptiva de la distribución en cada clúster de los grupos de Setia adaptado.*

*Apartado 6.1.4. **Tabla 28.** Tabla descriptiva del número de mutaciones por muestra.*

*Apartado 6.1.4. **Tabla 29.** Tabla descriptiva del número de mutaciones identificadas en cada gen analizado y su porcentaje respecto al total de mutaciones identificadas (n=186).*

*Apartado 6.1.4. **Tabla 30.** Tabla descriptiva del número de muestras con mutación de cada gen respecto al total de muestras analizadas (n=76).*

*Apartado 6.1.4.3.1. **Tabla 31.** Resultado de panel mutacional en los pacientes considerados “all-negatives”.*

*Apartado 6.1.4.3.1. **Tabla 32.** Genes mutados identificados en los 50 pacientes considerados ‘all-negatives’ con resultado de panel mutacional y tipo alteración informativa o no informativa, así como su correspondencia con el clúster.*

*Apartado 6.1.4.3.1. **Tabla 33.** Tabla que muestra genes con alteraciones (sólo mutaciones) con los diferentes niveles según ESCAT, así como su prevalencia descrita en CG.*

*Apartado 6.1.5. **Tabla 34.** Relación entre la presencia de mutaciones en los genes *TP53* y *CDH1* y su expresión proteica, analizada por IHQ.*

*Apartado 6.2. **Tabla 35.** Listado de las variables de eficacia del estudio, eventos y N de pacientes a los que se puede aplicar el análisis.*

*Apartado 6.2. **Tabla 36.** Tabla descriptiva de los eventos recidiva y muerte.*

*Apartado 6.2. **Tabla 37.** Tabla descriptiva del evento beneficio del tratamiento.*

*Apartado 6.2.1. **Tabla 38.** Asociación entre Supervivencia Libre de Recidiva (SLR) y variables clínicas y biomarcadores moleculares*

*Apartado 6.2.1. **Tabla 39.** Asociación entre Supervivencia Global (SG) y variables clínicas y biomarcadores moleculares*

*Apartado 6.2.1. **Tabla 40.** Asociación entre el beneficio del tratamiento y variables clínicas y biomarcadores moleculares*

*Apartado 6.2.2. **Tabla 41.** Tabla descriptiva del beneficio del tratamiento por clúster.*

*Apartado 6.2.3. **Tabla 42.** Tabla descriptiva del beneficio del tratamiento por subgrupo de Setia adaptado.*

Relación de Figuras

*Apartado 1.4.2. **Figura 1.** Clasificación molecular del CG propuesta por TCGA.*

*Apartado 1.4.2. **Figura 2.** Clasificación molecular del CG propuesta por ACRG.*

*Apartado 1.4.3. **Figura 3.** Clasificación molecular del CG propuesta por Setia y Ahn.*

*Apartado 1.5. **Figura 4.** Imagen esquemática de endoscopia gástrica.*

*Apartado 1.5. **Figura 5.** Imagen endoscópica de adenocarcinoma gástrico.*

*Apartado 1.5. **Figura 6.** Imagen histopatológica correspondiente a adenocarcinoma gástrico tubular según clasificación de la OMS/WHO.*

*Apartado 1.5. **Figura 7.** Imagen histopatológica correspondiente a carcinoma gástrico pobremente cohesivo con células en anillo de sello según clasificación de la OMS/WHO.*

*Apartado 1.5. **Figura 8.** Imagen tomada en laparoscopia de estadiaje de paciente con CG con pequeños implantes de carcinomatosis peritoneal.*

*Apartado 1.6.3. **Figura 9.** Funcionamiento de los inhibidores del punto de control inmunitario.*

Apartado 1.6.4. Figura 10. Algoritmo de test HER2 por inmunohistoquímica y hibridación in situ.

Apartado 1.6.4. Figura 11. Cálculo de TPS y CPS para la inmunotinción de PD-L1.

Apartado 6.1.1. Figura 12. Diagrama de flujo de las muestras (bloques FFPE) disponibles para el análisis molecular (análisis IHQ/ISH y panel mutacional) y de las muestras analizadas finalmente con éxito para cada panel.

Apartado 6.1.1. Figura 13. Diagrama de flujo descriptivo de la composición de la cohorte final del estudio (con los pacientes de los cuales disponemos de por lo menos un panel).

Apartado 6.1.1.1. Figura 14. Diagrama de flujo de la subcohorte para el análisis de beneficio del tratamiento.

Apartado 6.1.2. Figura 15. Gráfico circular que describe la distribución del estadio de la enfermedad basal de los pacientes.

Apartado 6.1.3.1. Figura 16. Distribución de los pacientes de nuestra cohorte en subtipos según el algoritmo de Setia modificado para incluir los resultados de HER2 y PD-L1 (se especifica la equivalencia con categorías TCGA).

Apartado 6.1.3.1. Figura 17. Selección de tratamiento por subtipos según el algoritmo de Setia adaptado.

Apartado 6.1.3.2. Figura 18. Resultados del *clustering* o agrupamiento jerárquico con el método aglomerativo, representados en forma de dendrograma (A) y de gráfico radial (B).

Apartado 6.1.3.2. Figura 19. Distribución de 69 pacientes ‘all-negatives’ (no-HER2/PD-L1/EBV/MSI) en distintos clústeres.

Apartado 6.1.3.2. Figura 20. Heatmap (o mapa de calor) de los biomarcadores en cada clúster resultante (parte A) y Spider plot (o gráfica de araña) de los biomarcadores en cada clúster resultante (parte B).

Apartado 6.1.3.2. Figura 21. Propuesta de algoritmo a partir de los resultados del *clustering* o agrupamiento jerárquico.

Apartado 6.1.4.1. Figura 22. Resultados del panel de mutaciones somáticas recurrentes en CG y su distribución en los distintos clústeres en los que se agrupaban los pacientes.

Apartado 6.1.4.2. Figura 23. Resultados del panel de mutaciones somáticas recurrentes en CG y su distribución en los distintos subgrupos del algoritmo de Setia adaptado.

Apartado 6.1.4.3.1. Figura 24. Perfil mutacional de los pacientes ‘all-negatives’ con resultado del panel de mutaciones (N= 50).

Apartado 6.1.6. Figura 25. Selección de tratamiento tras aplicar el algoritmo de Setia adaptado, analizando el perfil mutacional de los pacientes “all-negatives”.

Apartado 6.1.6. Figura 26. Selección de tratamiento tras aplicar nuestro algoritmo a partir de los resultados del *clustering* o agrupamiento jerárquico.

Apartado 6.1.6. Figura 27. Selección de tratamiento tras aplicar nuestro algoritmo a partir de los resultados del *clustering* o agrupamiento jerárquico, analizando el perfil mutacional de los pacientes “*all-negatives*”.

Apartado 6.2. Figura 28. Curva de Kaplan-Meier para la Supervivencia Libre de Recidiva (SLR) (A) y la Supervivencia Global (B1 y B2).

Apartado 6.2. Figura 29. Curva de Kaplan-Meier para la Supervivencia Libre de Progresión (SLP) a la primera línea de quimioterapia.

Apartado 6.2.1. Figura 30. Hazard Ratio (HR) univariados y Hazard Ratios (HR) ajustados para la Supervivencia Libre de Recidiva (SLR).

Apartado 6.2.1. Figura 31. Hazard Ratio (HR) univariados y Hazard Ratios (HR) ajustados para la Supervivencia Global (SG).

Apartado 6.2.1. Figura 32. Odds Ratio (OR) univariados y Odds Ratio Hazard Ratios (OR) ajustados para el beneficio de tratamiento.

Apartado 6.2.2. Figura 33. Curvas de Kaplan-Meier para Supervivencia global en función de clúster.

Apartado 6.2.3. Figura 34. Curvas de Kaplan-Meier para Supervivencia global en función de subgrupo de Setia adaptado.

10.3. Hojas de información al paciente y consentimiento informado

Consentimiento informado de ICObiobanc para tumores del tracto digestivo superior

Versión 3.1, fecha 06 de junio de 2019

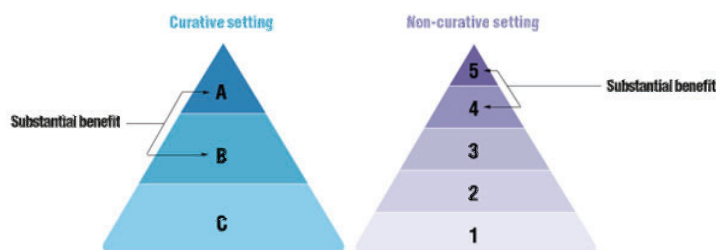
HOJA DE INFORMACION PARA EL PACIENTE

ESTUDIO DE DESARROLLO DE BIOMARCADORES DIAGNÓSTICOS, PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS EN TUMORES DEL TRACTO DIGESTIVO SUPERIOR DEL PROGRAMA ICOBIOBANC

El objetivo de este documento es ofrecerle información para que pueda decidir si quiere participar en el estudio de biomarcadores diagnósticos, pronósticos y predictivos en **tumores del tracto digestivo superior** (que corresponden a los tumores esofágicos, gástricos y hepato-bilio-pancreáticos), el cual tiene por objetivo final encontrar nuevos métodos para prevenir, diagnosticar y tratar mejor el cáncer. Este estudio se realizará sobre **muestra de sangre y muestra de tejido tumoral** y, para algunos estudios, muestras de **heces** y ciertos **fluidos biológicos** (ver apartado procedimiento), siguiendo siempre los preceptos que marca la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica. **Su participación en el estudio es voluntaria.** Puede rechazar participar y puede retirarse en cualquier momento sin que esto afecte su atención médica posterior.

Antecedentes: El cáncer es una enfermedad compleja que se caracteriza por un crecimiento celular descontrolado en un determinado órgano. En su origen y progresión intervienen múltiples factores, tanto genéticos como ambientales. Las células del cuerpo humano contienen gran variedad de sustancias, entre ellas el material genético, cuya molécula principal es el ADN. El material genético (ADN y ARN) es como un "libro de instrucciones" que contiene la información biológica que dirige el desarrollo de un individuo. El ADN se encuentra dentro de las células, organizado en genes que se ordenan en unas estructuras llamadas cromosomas. Los genes le dicen a la célula que proteínas (a partir del ARN) debe fabricar para organizar el trabajo biológico de cada célula. El conjunto de genes o material genético de un individuo es lo que denominamos genoma; pequeñas diferencias en el genoma determinan características diferenciales normales de los individuos, como el color de los ojos, pero también determinan el riesgo a desarrollar enfermedades como el cáncer y que distintos individuos respondan de distinto modo a ciertos tratamientos con medicamentos. El análisis del material genético (ADN y ARN) es pues de gran utilidad para investigar las causas de las enfermedades o para entender de qué manera las personas responden a los medicamentos; esta investigación se llama investigación genómica y, juntamente con el estudio del microambiente en el que se desarrolla el tumor, se usa para ayudar a

10.4. ESMO-Magnitude of Clinical Benefit Scale(53)



10.5. Escala ESCAT

Escala de ESCAT para gradar la evidencia y la utilidad clínica de las terapias diana(99,100)

	ESCAT evidence tier		Required level of evidence	Clinical Implication
Ready for routine use	I Alteration-drug match is associated with improved outcome in clinical trials	I-A	Prospective, randomised clinical trials show the alteration-drug match in a specific tumour type results in a clinically meaningful improvement of a survival end point	Access to the treatment should be considered standard of care
		I-B	Prospective, non-randomised clinical trials show that the alteration-drug match in a specific tumour type, results in clinically meaningful benefit as defined by ESMO MCBS 1.1	
		I-C	Clinical trials across tumour types or basket clinical trials show clinical benefit associated with the alteration-drug match, with similar benefit observed across tumour types	
Investigational	II Alteration-drug match is associated with antitumour activity, but magnitude of benefit is unknown	II-A	Retrospective studies show patients with the specific alteration in a specific tumour type experience clinically meaningful benefit with matched drug compared with alteration-negative patients	Treatment to be considered "preferable" in the context of evidence collection either as a prospective registry or as a prospective clinical trial
		II-B	Prospective clinical trial(s) show the alteration-drug match in a specific tumour type results in increased responsiveness when treated with a matched drug, however, no data currently available on survival end points	
Hypothetical target	III Alteration-drug match suspected to improve outcome based on clinical trial data in other tumour type(s) or with similar molecular alteration	III-A	Clinical benefit demonstrated in patients with the specific alteration (as tiers I and II above) but in a different tumour type. Limited/absence of clinical evidence available for the patient-specific cancer type or broadly across cancer types	Clinical trials to be discussed with patients
		III-B	An alteration that has a similar predicted functional impact as an already studied tier I abnormality in the same gene or pathway, but does not have associated supportive clinical data	
	IV Pre-clinical evidence of actionability	IV-A	Evidence that the alteration or a functionally similar alteration influences drug sensitivity in preclinical <i>in vitro</i> or <i>in vivo</i> models	Treatment should "only be considered" in the context of early clinical trials. Lack of clinical data should be stressed to patients
		IV-B	Actionability predicted <i>in silico</i>	
Combination development	V Alteration-drug match is associated with objective response, but without clinically meaningful benefit		Prospective studies show that targeted therapy is associated with objective responses, but this does not lead to improved outcome	Clinical trials assessing drug combination strategies could be considered
Lack of Evidence	X Lack of evidence for actionability		No evidence that the genomic alteration is therapeutically actionable	The finding should not be taken into account for clinical decision

