

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer: estudio multicaso-control MCC-Spain

Facundo Ezequiel Vitelli Storelli

Programa de doctorado
en Biomedicina y Ciencias de la Salud
Departamento de Ciencias Biomédicas

Directores de la tesis
Juan Pablo Barrio Lera
Tania Fernández Villa

León, 2020

universidad
de león





UNIVERSIDAD DE LEÓN

Departamento de Ciencias Biomédicas

Área de Medicina Preventiva y Salud Pública

Tesis Doctoral

Programa de doctorado en Biomedicina y Ciencias de la Salud

INFLUENCIA DE LA INGESTA DE POLIFENOLES EN EL
DESARROLLO DE DIFERENTES TIPOS DE CÁNCER:
ESTUDIO MULTICASO-CONTROL MCC-SPAIN.

“Influence of the intake of polyphenols in the development of different types of cancer: MCC-Spain multicase-control study.”

DIRECTORES:

Dr. Juan Pablo Barrio Lera

Dra. Tania Fernández Villa

Facundo Ezequiel Vitelli Storelli

León, 2020

INFLUENCIA DE LA INGESTA DE POLIFENOLES EN EL DESARROLLO DE
DIFERENTES TIPOS DE CÁNCER: ESTUDIO MULTICASO-CONTROL MCC-SPAIN.

Tesis doctoral que presenta **Facundo Ezequiel Vitelli Storelli** inscrita en el Programa de Doctorado en Biomedicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de León para aspirar al título de Doctor con Mención Internacional.

León, Octubre de 2020

Directores de la Tesis

Dr. Juan Pablo Barrio Lera

Handwritten signature of Dr. Juan Pablo Barrio Lera in blue ink.

Dra. Tania Fernández Villa

Handwritten signature of Dra. Tania Fernández Villa in blue ink.



universidad
de león

El doctorando **Facundo Ezequiel Vitelli Storelli** y los directores de la tesis **Juan Pablo Barrio Lera** y **Tania Fernández Villa** garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En León, Octubre de 2020

Directores de la Tesis

Fdo.: Juan Pablo Barrio Lera

Doctorando

Fdo.: Facundo Ezequiel Vitelli Storelli

Fdo.: Tania Fernández Villa

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

El Dr. D. Juan Pablo Barrio Lera como Tutor y Director de la Tesis Doctoral titulada “Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer: estudio multicaso-control MCC-Spain” realizado por Don Facundo Ezequiel Vitelli Storelli en el Programa de doctorado en Biomedicina y Ciencias de la Salud, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo en León, Octubre de 2020



Fdo.: Juan Pablo Barrio Lera

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

La Dra. Dña. **Tania Fernández Villa** como Directora de la Tesis Doctoral titulada **“Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer: estudio multicaso-control MCC-Spain”** realizado por Don Facundo Ezequiel Vitelli Storelli en el Programa de doctorado en Biomedicina y Ciencias de la Salud, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León Octubre 2020



Fdo.: Tania Fernández Villa

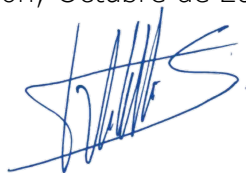
Escriba el texto aquí

D. Facundo Ezequiel Vitelli Storelli declara que la memoria de la tesis presentada bajo el título “Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer: estudio multicaso-control MCC-Spain” es, conforme al artículo 13.1 del R.D. 99/2011, de 28 de enero, un trabajo original de investigación, sin contribución significativa de otra persona que no aparezca reflejada en la misma, y citando adecuadamente la procedencia del contenido no original, conforme a la normativa vigente.

Asimismo, declaro que este trabajo no ha sido presentado y no lo será en el futuro como tesis doctoral, en ninguna universidad o institución de investigación, en España o en el extranjero.

Entiendo la política de tolerancia cero frente al plagio de la Universidad de León, la cual se reserva el derecho de retirar mi título de doctor y adoptar cuantas medidas procedan legalmente, en caso de incumplimiento de este compromiso.

León, Octubre de 2020



Fdo.: Facundo Ezequiel Vitelli Storelli

El trabajo ha sido desarrollado en el Área de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de León, habiéndose realizado una estancia internacional de cuatro meses de duración en el Departamento de “Clinical Sciences and Community Health” de la “Università degli studio di Milano” (Milán, Italia). Para la realización de la presente tesis doctoral se han tenido en cuenta los datos recogidos en el proyecto MCC-Spain financiado por “Acción transversal del Cáncer” aprobada por el Consejo de Ministros en 2007, por el Instituto de Salud Carlos III-FEDER, Gobierno de España (PI08/1770, PI08/0533, PI08/1359, PS09/00773-Cantabria, PS09/01286-León, PS09/01903-Valencia, PS09/02078-Huelva, PS09/01662-Granada, PI11/01403, PI11/01889-FEDER, PI11/00226, PI11/01810, PI11/02213, PI12/00488, PI12/00265, PI12/01270, PI12/00715, PI12/00150, PI14/01219, PI14/0613, PI15/00069, PI15/00914, PI15/01032, PI17CIII/00034).

*“Siempre deberemos recordar que lo que tenemos, hemos logrado y somos,
se debe en gran medida a lo que otros han sembrado en nosotros”*

Anónimo

Agradecimientos

Quiero agradecer, sin lugar a dudas, a mis padres Rodolfo y Lidia, por enseñarme todo aquello que no viene en los libros. A mi hermana Berni, a la que admiro y de quien aprendí a valorar la juventud y la amistad, de esas que bastan unos momentos para dibujarte una sonrisa.

A mis directores, el Dr. Juan Pablo Barrio, por su confianza en mí e ilustrarme con su meticulosa metodología en la investigación, y a la Dra. Tania Fernández, por enseñarme a mejorar día a día, y por su enorme dedicación y paciencia. También, como no, al Dr. Antonio José Molina, quien desde el principio contribuyó a acrecentar mis conocimientos y me propuso nuevos retos. Desde luego, tampoco podría presentar esta tesis sin la ayuda del Dr. Vicente Martín, quien al igual que el Dr. Juan Pablo, depositó su confianza en mí, y que con muchísima paciencia me ayudó a escribir artículos y a crecer como científico.

Tampoco sería posible sin los pilares del día a día, María, Alex, Laura, Rob, Ana e Isa, de quién me llevo muchísimos valores, conversaciones y momentos. A Muyas, Medina, Rafa y Monfi, cuatro enormes seres humanos, a los cuales tengo como hermanos.

No puedo olvidar tampoco a los cientos y cientos de pacientes, sin cuya contribución nada de esto sería posible, sois nuestro pilar y motivación diaria.

Gracias a todos y a los que he podido dejar en el tintero, por ser los cimientos para mi desarrollo personal y profesional.

Introducción.....	10
1- Cáncer.....	12
1.1 -Concepto y etiopatogenia.....	12
1.2- Epidemiología.....	15
1.3- Cáncer de mama.....	17
1.4- Cáncer gástrico.....	23
2- Polifenoles.....	27
- Flavonoides.....	29
- Lignanós.....	29
- Estilbenos.....	30
- Ácidos fenólicos	30
- Otros polifenoles	31
2.1- Absorción de polifenoles	31
2.2- Polifenoles y dieta	32
2.3- Papel de los polifenoles en CM y CG	39
Objetivos.....	40
Plan de trabajo.....	44
Metodología.....	48
3- Metodología.....	50
3.1- Proyecto MCC-Spain	50
3.2 StoP-Project	54
Resultados.....	56
4-Resultados.....	58
4.1 Desarrollo de algoritmos.....	58
4.2- Consumo de polifenoles y Cáncer de mama	70
4.3- Consumo de polifenoles y Cáncer gástrico.....	85
4.4- Metaanálisis sobre la ingesta de polifenoles y Cáncer gástrico: StoP-Project.	94
Discusión.....	98
5-Discusión.....	100
5.1-Polifenoles y cáncer de mama	100
5.2-Polifenoles y cáncer gástrico	104
5.3-Polifenoles y cáncer gástrico: StoP-project	109
Conclusiones.....	113
Conclusions.....	117

Resultados de investigación durante el periodo de doctorado.....	121
Bibliografía.....	128
ANEXOS.....	152

Índice de figuras

<i>Figura 1</i>	<i>Estadios en el desarrollo de cáncer.....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 2</i>	<i>Características adquiridas de las células cancerosas.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 3</i>	<i>Probabilidad (%) de desarrollar un cáncer en España durante el periodo 2003-2007.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 4</i>	<i>Evolución temporal de la mortalidad por cáncer de mama en mujeres en España.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 5</i>	<i>Evolución temporal de la mortalidad por cáncer de estómago en hombres en España.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 6</i>	<i>Evolución temporal de la mortalidad por cáncer de estómago en mujeres en España.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 7</i>	<i>Clasificación de los polifenoles.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 8</i>	<i>Estructura general de los flavonoides.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 9</i>	<i>Estructura de los lignanos.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 10</i>	<i>Estructura de los estilbenos.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 11</i>	<i>Estructura de los ácidos fenólicos.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 12</i>	<i>Proceso de absorción/excreción de los PF.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 13</i>	<i>Efectos de los PF sobre el organismo.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 14</i>	<i>Modelo multietapa de la carcinogénesis y los potenciales efectos protectores de los PF en la progresión del cáncer.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 15</i>	<i>Distribución geográfica de los centros de investigación y hospitales implicados en el estudio MCC-Spain.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 16</i>	<i>Esquema general de la metodología para el análisis del efecto de los PF.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 17</i>	<i>Representación de las distintas metodologías de cuantificación de PF y las unidades de expresión de resultados.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 18</i>	<i>Código HTML de PHEX en el que se aprecia la estructura CSS.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 19</i>	<i>Metodología de creación de bots y formato de los resultados.....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 20</i>	<i>Pantalla emergente indicando al usuario que elija el archivo con el contenido de CH y las líneas de comando para el uso de algunas funcionalidades.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 21</i>	<i>Esquema de funciones de PLP-Calculator.....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 22</i>	<i>Ejemplo de la base de datos C_TODO_VERSIONES.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 23</i>	<i>Ponderaciones de los ítems de la CFA de MCC-Spain del archivo RPon.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 24</i>	<i>Consumo en gramos de los alimentos por los individuos, archivo GraPon.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 25</i>	<i>Cálculo de contenido de PF de cada ítem del CFA.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 26</i>	<i>Esquema de los cálculos 2 y 3.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 27</i>	<i>Algoritmo del número de individuos aceptados al eliminar datos faltantes.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 28</i>	<i>Asociación entre la ingesta de PF y el riesgo de CM en el estudio MCC-Spain.....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 29</i>	<i>Asociación entre la ingesta de PF y el riesgo de CM en mujeres premenopáusicas.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 30</i>	<i>Asociación entre la ingesta de PF y el riesgo de CM en mujeres postmenopáusicas.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 31</i>	<i>Comparación del efecto de las distintas clases de PF sobre los status menopáusicos.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 32</i>	<i>Asociación entre la ingesta de PF y el riesgo de CM en tipo receptor de membrana (+).....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 33</i>	<i>Asociación entre la ingesta de PF y el riesgo de CM tipo ERB-2.....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 34</i>	<i>Asociación entre la ingesta de PF y el riesgo de CM tipo triple negativo.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 35</i>	<i>Algoritmo del número de individuos aceptados al eliminar datos faltantes. Fuente propia.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 36</i>	<i>Riesgo de cáncer gástrico) según la ingesta de flavonoides en el MCC-Spain.....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 37</i>	<i>Resultados de log₂ IC 95% para los subtipos anatómicos.....</i>	<i>90</i>
<i>Figura 38</i>	<i>Resultados de log₂ IC 95% para los subtipos histológicos.....</i>	<i>91</i>
<i>Figura 39</i>	<i>Resultados del meta-análisis para las clases seleccionadas en el estudio StoP-Project.....</i>	<i>96</i>

Índice de tablas

<i>Tabla 1</i>	<i>Incidencia y mortalidad de los cinco tumores más relevantes según relevancia y región geográfica. ...</i>	<i>16</i>
<i>Tabla 2</i>	<i>Características de los sujetos de estudio en CM.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabla 3</i>	<i>Alimentos con mayor aporte de PF a cada clase en todos los casos y controles de CM (MCC-Spain). ...</i>	<i>73</i>
<i>Tabla 4</i>	<i>Odds ratio y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% del análisis de todos los casos de CM.....</i>	<i>74</i>
<i>Tabla 5</i>	<i>Resultados del análisis de todos los casos y categorizado por status menopáusico.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabla 6</i>	<i>Características de los sujetos de estudio en CG.</i>	<i>86</i>
<i>Tabla 7</i>	<i>Alimentos con mayor aporte de PF a cada clase en todos los casos y controles de MCC-Spain.</i>	<i>87</i>
<i>Tabla 8</i>	<i>Resultados de \log_2 y cuartiles para todos los flavonoides en los modelos ajustados.</i>	<i>89</i>
<i>Tabla 9</i>	<i>\log_2 (IC 95%) de los subtipos de CG acorde a la ingesta de las distintas clases de flavonoides.</i>	<i>91</i>
<i>Tabla 10</i>	<i>Cuartiles (IC95%) de los subtipos de CG acorde a la ingesta de las distintas clases de flavonoides. ...</i>	<i>92</i>
<i>Tabla 11</i>	<i>Distribución de 3471 casos de GC y 11815 controles de cada estudio incluido en el StoP-Project.</i>	<i>94</i>
<i>Tabla 12</i>	<i>Tabla 2: Distribución de 3471 casos de cáncer gástrico de acuerdo con los cuartiles de ingesta y los odds ratios (OR) correspondientes e intervalos de confianza del 95%.....</i>	<i>95</i>
<i>Tabla 13</i>	<i>Pooled odds ratio (OR) agrupado y el IC del 95% correspondiente de GC para el cuartil más alto en comparación con el más bajo específico de la distribución de la ingesta de clases de PF, según los estratos de las variables</i>	<i>97</i>

Abreviaturas

<i>ACO</i>	<i>anticonceptivos</i>
<i>ADH</i>	<i>alcohol deshidrogenasas</i>
<i>AECC</i>	<i>asociación española contra el cáncer</i>
<i>BCRP/ABCG</i>	<i>proteína de resistencia al cáncer de mama</i>
<i>BRCA1</i>	<i>breast cancer associated gene 1</i>
<i>BRCA2</i>	<i>breast cancer associated gene 2</i>
<i>C</i>	<i>cromatografía</i>
<i>CFA</i>	<i>cuestionario de frecuencia alimentaria</i>
<i>CG</i>	<i>cáncer gástrico</i>
<i>CGC</i>	<i>cáncer gástrico de cardias</i>
<i>CGNC</i>	<i>cáncer gástrico no-cardias</i>
<i>CH</i>	<i>cromatografía tras hidrólisis</i>
<i>CM</i>	<i>cáncer de mama</i>
<i>CSS</i>	<i>cascading style sheets</i>
<i>CUP</i>	<i>continuous update project</i>
<i>CYP2E1</i>	<i>citocromo P450 2E1</i>
<i>DM</i>	<i>dieta mediterránea</i>
<i>ECG</i>	<i>epicatequina galato</i>
<i>EGFR</i>	<i>receptor de crecimiento epidérmico</i>
<i>EPIC</i>	<i>european prospective investigation into cancer</i>
<i>ERB-2</i>	<i>factor de crecimiento epidérmico 2</i>
<i>ERGE</i>	<i>enfermedad de reflujo gastroesofágico</i>
<i>ERO</i>	<i>especies reactivas del oxígeno</i>
<i>GSTM1</i>	<i>glutación S-transferasa Mu-1</i>
<i>IARC</i>	<i>agencia internacional para la investigación del cáncer</i>

<i>IMC</i>	<i>índice de masa corporal</i>
<i>mTOR</i>	<i>blanco farmacodinámico de la rapamicina</i>
<i>NSAID/AINE</i>	<i>antiinflamatorios no esteroides</i>
<i>OH</i>	<i>grupos hidroxilo</i>
<i>OR</i>	<i>odds ratio</i>
<i>PF</i>	<i>polifenoles</i>
<i>PHEX</i>	<i>phenol-explorer</i>
<i>PI3K</i>	<i>fosfoinositida 3-quinasa</i>
<i>RE</i>	<i>receptor de estrógeno</i>
<i>REC+</i>	<i>receptor hormonal positivo</i>
<i>RP</i>	<i>receptores de progesterona</i>
<i>RSV</i>	<i>resveratrol</i>
<i>StoP-Project</i>	<i>Stomach cancer Pooling Project</i>
<i>TNCM</i>	<i>cáncer de mama triple negativo</i>
<i>TNF-α</i>	<i>factor de necrosis tumoral α</i>

Introducción

Los polifenoles (PF) son metabolitos fenólicos secundarios presentes en una amplia variedad de vegetales. Estos fitoquímicos, son ingeridos en la dieta a través de diferentes frutas y verduras, y han demostrado poseer propiedades terapéuticas en una amplia variedad de enfermedades (cáncer, enfermedades cardiovasculares, reumatismo, osteoporosis, etc). Esta relación entre la cantidad de fitoquímicos ingeridos y sus efectos terapéuticos ha suscitado la atención de la comunidad científica. Por este motivo, el objetivo principal de la presente tesis doctoral es evaluar la influencia de la ingesta de PF en el desarrollo de cáncer de mama (CM) y cáncer gástrico (CG).

Metodología

Se utilizó la información del proyecto MCC-Spain, un estudio observacional de casos-contrroles de base poblacional, que recoge para CM y CG, el consumo en el último año de 66 alimentos que contienen PF. Mediante la creación de un algoritmo informatizado se realizó la extracción automática del contenido de PF desde la base de datos Phenol-Explorer y se cruzó con la base de datos del proyecto, obteniendo la ingesta de PF en mg/día de agliconas ajustadas por el método de residuales. La relación entre la ingesta de PF y el desarrollo de CM y CG, se evaluó mediante regresión logística no condicionada con el cálculo de odds ratio y ajustando los modelos por los factores confusores en función de cada tipo de tumor.

En el marco del consorcio internacional Stop-Project, se evaluó la asociación entre el consumo de PF y CG mediante un metaanálisis en dos etapas con la información obtenida de 10 estudios de diferentes países.

Resultados

Se desarrollaron dos programas en distintos lenguajes de programación para la automatización de la extracción de datos de PF de la base de datos Phenol-Explorer y el cálculo de la ingesta de PF de los individuos analizados.

En el marco del estudio MCC-Spain se observó una disminución del riesgo de CM en las mujeres con un mayor consumo de dihidroflavonoles (ORa=0,70;IC95%=0,55-0,88), estilbenos (ORa=0,70;IC95%=0,56-0,89),

hidroxibenzaldehídos (ORa=0,75;IC95%=0,59-0,95), e hidroxicumarinas (ORa=0,73;IC95%=0,57-0,93). Los análisis por status menopáusico, revelaron asociaciones inversas con el desarrollo de CM, entre la ingesta de dihidroflavonoles, estilbenos, hidroxicumarinas, hidroxibenzaldehídos en mujeres premenopáusicas, mientras que dihidroflavonoles, hidroxicumarinas y estilbenos mostraron una tendencia protectora en mujeres postmenopáusicas. En cuanto a los resultados por receptores hormonales, los dihidroflavonoles y los estilbenos se asociaron de manera protectora en todas las categorías analizadas.

En relación al CG en el proyecto MCC-Spain, la ingesta de flavonoides totales se asoció con una disminución del riesgo de este tumor (ORa=0,60;IC95%=0,40-0,89), observándose reducciones significativas en las subclases de las antocianidinas, chalconas, dihidroflavonoles y flavan-3-ols, no encontrándose diferencias significativas en los análisis estratificados por subtipos anatómicos o histológicos.

En el proyecto StoP-Project, se observó una asociación protectora entre el CG y el consumo total de PF (ORa=0,67;IC95%=0,54-0,81), flavonoides (ORa=0,73;IC95%=0,55-0,90), y los ácidos fenólicos (ORa=0,75;IC95%=0,55-0,94), siendo significativa la asociación en las subclases de antocianidinas, flavanoles, flavanonas y ácidos hidroxibenzoicos.

Conclusiones

Nuestros resultados ponen de manifiesto que el consumo de algunos PF, pueden tener un efecto protector en el desarrollo de CM y CG. Este efecto, está relacionado con el consumo de dihidroflavonoles, estilbenos, hidroxibenzaldehídos e hidroxicumarinas en CM y la ingesta de flavonoides totales en CG, en el estudio MCC-Spain. En el StoP-Project, la tendencia protectora se asoció en los estudios analizados con ingesta total de PF, flavonoides y ácidos fenólicos. No obstante, se precisan más estudios para evaluar estas relaciones.

Introduction

Polyphenols (PF) are secondary phenolic metabolites present in a wide variety of plants. These phytochemicals are ingested into the diet through different fruits and vegetables, and have been shown to have therapeutic properties in a wide variety of diseases (cancer, cardiovascular disease, rheumatism, osteoporosis, etc). This relationship between the amount of phytochemicals ingested and their therapeutic effects has attracted the attention of the scientific community. For this reason, the main objective of this doctoral thesis is to evaluate the influence of PF intake on the development of breast cancer (BC) and gastric cancer (GC).

Methodology

Observational case study - population-based controls MCC-Spain, which collects for BC and GC, the consumption in the last year of 66 foods containing PF. Through the creation of a computerized algorithm, the PF content was automatically extracted from the Phenol-Explorer database and crossed with the project's database, obtaining the PF intake in mg/day of aglycones adjusted by the residual method. The relationship between PF intake and the development of BC and GC was evaluated by means of unconditioned logistic regression with the calculation of odds ratios and their 95% confidence intervals, adjusting the models for the confusing factors according to each type of cancer.

In the framework of the international Stop-Project consortium, the association between PF and GC consumption was evaluated through a two-stage meta-analysis with information obtained from 10 studies from different countries.

Results

Two programs were developed in different programming languages for the automation of the extraction of PF data from the Phenol-Explorer database and the calculation of the PF intake of the analyzed individuals.

Within the framework of the MCC-Spain study, a reduction in the risk of BC was observed in women with a higher consumption of dihydroflavonols (aOR=0.70; 95%CI=0.55-0.88), stilbenes (aOR=0.70; 95%CI=0.56-0.89), hydroxybenzaldehydes (aOR=0.75; 95%CI=0.59-0.95), and hydroxycoumarins

(aOR=0.73; 95%CI=0.57-0.93). The analyses by menopausal status, revealed inverse associations with the development of CM, between the intake of dihydroflavonols, stilbenes, hydroxycoumarins, hydroxybenzaldehydes in premenopausal women, while dihydroflavonols, hydroxycoumarins and stilbenes showed a protective tendency in postmenopausal women. As regards results for hormone receptors, dihydroflavonols and stilbenes were associated with a protective effect in all the categories analysed.

In relation to GC in the MCC-Spain project, total flavonoid intake was associated with a decrease in the risk of this tumour (aOR=0.60; 95%CI=0.40-0.89), with significant reductions in the subclasses of anthocyanidins, chalcones, dihydroflavonols and flavan-3-ols, and no significant differences were found in the analyses stratified by anatomical or histological subtypes.

In the StoP-Project, a protective association was observed between GC and the total consumption of PF (aOR=0.67;95%CI=0.54-0.81), flavonoids (aOR=0.73;95%CI=0.55-0.90), and phenolic acids (aOR=0.75;95%CI=0.55-0.94), being significant the association in the subclasses of anthocyanidins, flavanols, flavanones and hydroxybenzoic acids.

Conclusions

Our results highlight that the consumption of some PFs can have a protective effect on the development of BC and GC. This effect is related to the consumption of dihydroflavonols, stilbenes, hydroxybenzaldehydes and hydroxycoumarins in BC and the intake of total flavonoids in GC, in the MCC-Spain study. In the StoP-Project, the protective trend was associated in the studies analysed with total PF, flavonoid and phenolic acid intakes. However, more studies are needed to assess these relationships.

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

1- Cáncer

1.1 -Concepto y etiopatogenia

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades relacionadas, que se caracterizan por el desarrollo de células anormales con una proliferación incontrolada, con capacidad de invadir nuevos tejidos y formar masas denominadas tumores (Figura 1) [1].

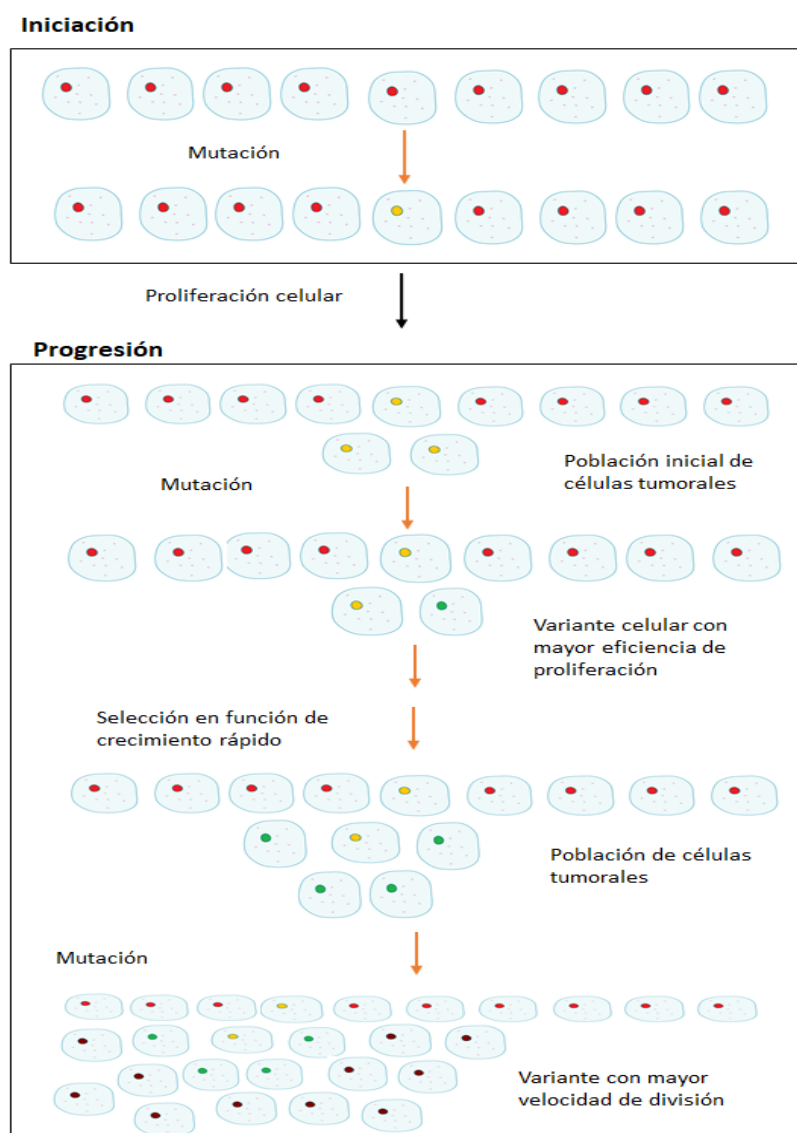


Figura 1 Estadios en el desarrollo de cáncer. Elaboración propia.

El proceso de desarrollo de los tumores, conocido como carcinogénesis, es el resultado de una acumulación aditiva de mutaciones como la delección de regiones cromosómicas, mutaciones puntuales, amplificaciones genéticas y translocaciones cromosómicas, aunque también pueden observarse a nivel nucleotídico, con inserciones, delecciones o sustituciones [1], tanto en proto-oncogenes o en genes supresores de tumores. Dichas mutaciones, son adquiridas en múltiples etapas, dando lugar a la alteración de los diferentes sistemas reguladores de la célula [2], por lo que las células cancerosas, en lugar de responder de forma adecuada a las señales que controlan el comportamiento celular normal, crecen y se dividen de manera incontrolada (Figura 1).

El desequilibrio en los sistemas reguladores, provoca un aumento de la señalización de la proliferación celular o sistemas vinculados con la evasión de los supresores de crecimiento, la apoptosis y/o la destrucción inmune, además de permitir la replicación indefinida, la reprogramación del metabolismo energético, la angiogénesis y la metástasis [3] (Figura 2).

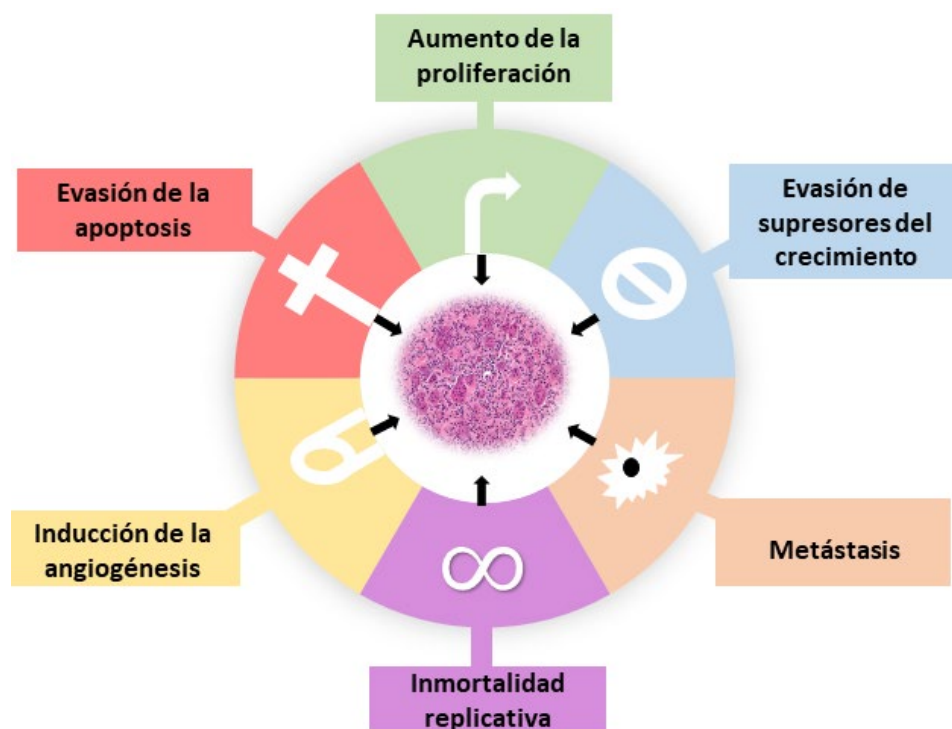


Figura 2 Características adquiridas de las células cancerosas. Elaboración propia.

Las modificaciones genéticas que alteran los mecanismos celulares, pueden ser adquiridas a lo largo de la vida (mutaciones somáticas) o heredadas. Algunos individuos nacen con mutaciones que promueven la proliferación de ciertas células o la generación de nuevas mutaciones (mutaciones germinales), aumentando el riesgo de desarrollo de cáncer, aunque también existen otros rasgos heredados que pueden contribuir a la génesis de neoplasias.

Otro aspecto a tener en cuenta en el proceso de carcinogénesis, es la inflamación como respuesta fisiológica en tejidos dañados. Los procesos inflamatorios comienzan cuando el tejido libera citocinas, que interactúan con los glóbulos blancos, liberando éstos últimos, factores de crecimiento que inducen la división celular para sustituir el tejido dañado. Los leucocitos y otras células fagocíticas inducen daños en el ADN de las células en proliferación, a través de la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y nitrógeno [4] que reaccionan para formar peroxinitrito, un agente mutagénico [4]. Por lo tanto, el daño tisular repetido y la regeneración de tejido, en presencia de especies de nitrógeno y oxígeno altamente reactivas liberadas por las células inflamatorias, interactúan con el ADN en proliferación, dando como resultado alteraciones genómicas permanentes. Con el tiempo, la inflamación crónica puede causar daño al ADN y, consecuentemente, el desarrollo de cáncer [5].

Por otra parte, los radicales libres pueden intervenir en el inicio de la carcinogénesis, dado que favorecen el aumento de las mutaciones, la activación de oncogenes y un incremento en la eficiencia de la progresión de los tumores. Además, el estrés oxidativo modifica el microambiente tumoral mejorando el crecimiento, la expansión de las células cancerosas e inicia la destrucción de tejido no tumoral circundante para obtener nutrientes [6].

Teniendo en cuenta lo citado anteriormente, la transformación de una célula normal a una célula cancerosa ocurre de manera progresiva por la acumulación de cambios genéticos. En este sentido, el cáncer puede considerarse una enfermedad relacionada con la edad, dado que la incidencia de la mayoría de los tumores aumenta con la misma, incrementando drásticamente a partir de los 40-44 años (Figura 3). Con la edad, existe una mayor exposición a factores exógenos, más acúmulo de mutaciones y pérdida de eficacia de los mecanismos de reparación celular [7].

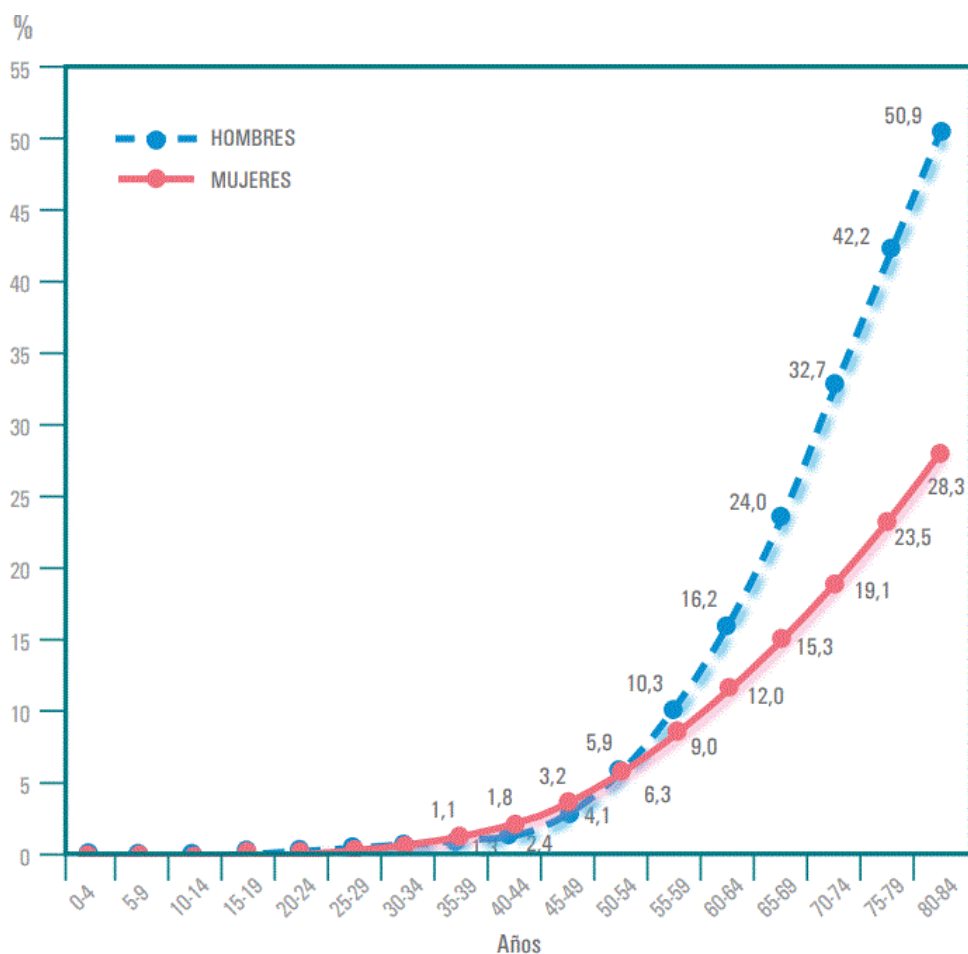


Figura 3 Probabilidad (%) de desarrollar un cáncer en España durante el periodo 2003-2007.

(Fuente: REDECAN, en Cancer incidence in Spain, 2015).

A pesar de que el cáncer es una enfermedad genética, como se ha podido observar, en su desarrollo influyen múltiples factores tanto endógenos como exógenos, por lo que las interacciones gen-ambiente tienen especial relevancia en su estudio. Estos factores serán explicados de manera más específica más adelante.

1.2- Epidemiología

1.2.1- Incidencia

Según los datos de la Agencia Internacional para la investigación del Cáncer (IARC), se estima que en 2018 se produjeron 18.078.957 nuevos casos de cáncer. La Tabla 1 recoge un resumen de los cinco tumores más relevantes en relación del número de nuevos casos diagnosticados según la región geográfica. En este

sentido, se puede observar cómo a nivel mundial los cánceres de pulmón, mama, colorrectal, próstata y estómago son los tumores más destacados, contribuyendo en un 46,1% al total de la incidencia mundial.

A nivel de Europa, se produjeron en 2018 más de 4,2 millones de nuevos casos de cáncer, encontrándose entre los tumores más relevantes por orden de aparición el cáncer de mama, colorrectal, pulmón, próstata y vejiga, los cuales representan el 50,6% de los nuevos casos. Mientras que, en nuestro país, 270.363 casos de cáncer fueron diagnosticados en 2018, ocupando las cinco posiciones más relevantes el cáncer colorrectal, mama, próstata, pulmón y vejiga, que representan un 54,5% de todos los nuevos casos (Tabla 1).

Tabla 1 Incidencia y mortalidad de los cinco tumores más relevantes según relevancia y región geográfica.

Población	Incidencia*			Mortalidad*		
	Cáncer	n	%	Cáncer	n	%
Mundo						
	Pulmón	2093876	11,6	Pulmón	1761007	18,4
	Mama	2088849	11,6	Colorrectal	880792	9,2
	Colorrectal	1849518	10,2	Estómago	782635	8,2
	Próstata	1276106	7,1	Hígado	782631	8,2
	Estómago	1033701	5,7	Mama	626679	6,6
Europa						
	Mama	522513	12,4	Pulmón	387913	20,0
	Colorrectal	499667	11,8	Colorrectal	242483	12,5
	Pulmón	470039	11,1	Mama	137707	7,1
	Próstata	449761	10,6	Páncreas	128045	6,6
	Vejiga	197105	4,7	Próstata	107315	5,5
España						
	Colorrectal	37172	13,7	Pulmón	22896	20,2
	Mama	32825	12,1	Colorrectal	16683	14,7
	Próstata	31728	11,7	Mama	7279	6,4
	Pulmón	27351	10,1	Páncreas	6421	5,7
	Vejiga	18268	6,8	Próstata	5793	5,1

* Estimación en número. Fuente GLOBOCAN 2018 (Cita IARC)

1.2.2- Mortalidad

En relación a la mortalidad por cáncer, la IARC estima que en 2018 se produjeron un total de 9,6 millones de muertes por esta causa en el mundo, siendo los cánceres de pulmón, colorrectal, estómago, hígado y mama los más significativos. En Europa, ese mismo año se registraron 1,9 millones de muertes por cáncer, de las cuales el 51,6% fueron ocasionadas por el cáncer de pulmón, colorrectal, mama, páncreas y próstata. Si observamos los datos referentes a España, hubo un total de 113.584 muertes por cáncer, encontrándose entre los cinco tumores de mayor mortalidad el cáncer de pulmón, colorrectal, páncreas, mama y próstata (Tabla 1).

En la presente tesis doctoral, se hará hincapié en dos tumores que poseen una importante relevancia tanto en incidencia como en mortalidad, el cáncer de mama y el cáncer gástrico, que serán descritos en más detalle a continuación.

1.3- Cáncer de mama

1.3.1- Epidemiología

El cáncer de mama (CM) se asocia principalmente al género femenino, ocupando la primera posición en incidencia y mortalidad tanto a nivel mundial como europeo. En nuestro país, representa también el tumor más incidente en mujeres, estando relevado a la segunda posición en mortalidad por detrás del cáncer colorrectal en dicho grupo poblacional (Tabla 1), observándose en la Figura 4 una variación geográfica en la tendencia temporal de mortalidad.

Respecto a la supervivencia, la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) estima en más del 90% las personas con CM que continúan vivas tras cinco años después de haber sido diagnosticadas [8].

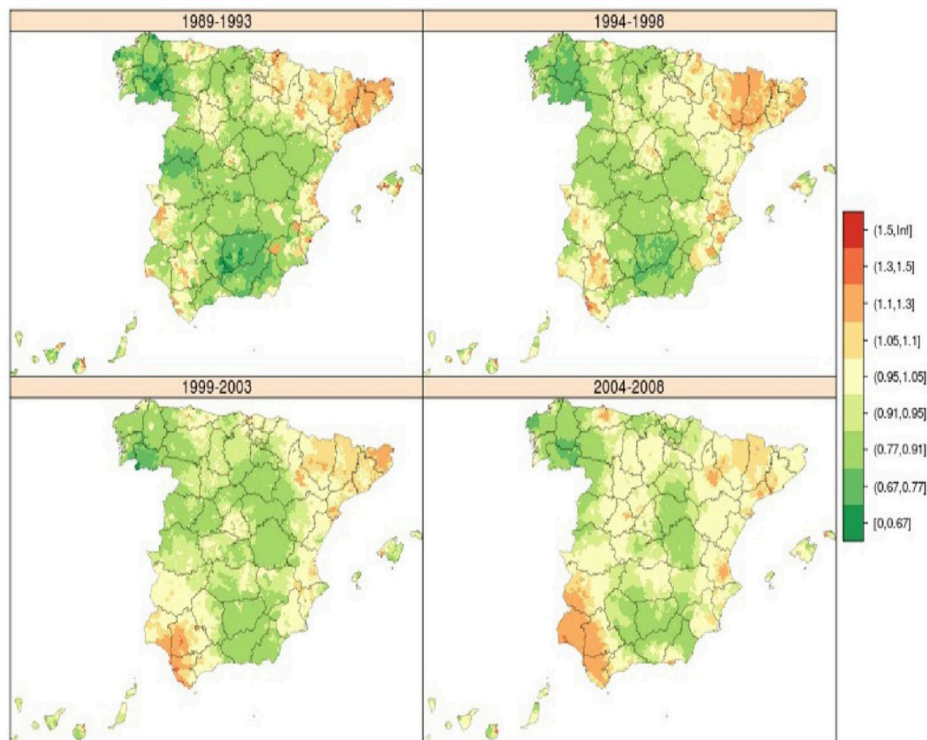


Figura 4 Evolución temporal de la mortalidad por cáncer de mama en mujeres en España. (Fuente: López-Abente et al.: Time trends in municipal distribution patterns of cancer mortality in Spain. BMC Cancer 2014 14:535.)

1.3.2- Clasificación del CM

El tipo de tejido en el cual surge el CM determina la forma en que se comporta el tumor, qué tratamientos son más eficaces y cómo se clasifica. El CM se puede clasificar según la localización anatómica en:

- Carcinoma ductal: es el tipo más común de CM. Recibe esta denominación cuando las células cancerosas se desarrollan en el revestimiento de un conducto mamario. Este carcinoma puede permanecer dentro de los conductos como un cáncer no invasivo (carcinoma ductal *in situ*) o puede extenderse por los conductos mamarios (carcinoma ductal invasivo).
- Carcinoma lobulillar: se distingue por desarrollarse en las glándulas productoras de leche.
- Sarcoma: se origina en los tejidos conectivos y como consecuencia se puede desarrollar un tumor filoide o un angiosarcoma [9].

Por otra parte, desde el punto de vista histológico, el CM se puede clasificar en 4 tipos, todos ellos relacionados con los receptores de membrana de las células mamarias:

- Luminal A: se caracteriza por presentar en su membrana celular receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP), pero no receptores para el factor de crecimiento epidérmico 2 (ERB-2).
- Luminal B: se caracteriza por presentar RE y ERB-2, y la ausencia de RP[10].
- Subtipo ERB-2: se caracteriza por la ausencia de RE y PR, y la presencia únicamente de ERB-2.
- Subtipo basal o triple negativo (TNM): no presenta ningún receptor hormonal en la membrana celular de las células cancerosas [11].

1.3.3- Factores asociados al CM

Aunque el CM se considera un tumor hormono-dependiente, existen otros factores de riesgo asociados, como son: el sexo, la edad, los antecedentes familiares, las mutaciones genéticas, el nivel socioeconómico o un estilo de vida poco saludable.

El CM se puede desarrollar tanto en hombres como en mujeres, aunque la incidencia en los varones es muy baja, aproximadamente 100 veces menor que en las mujeres. Esto es debido principalmente a que las mujeres tienen la glándula mamaria más desarrollada que los hombres, y además, está sometida a la estimulación constante de factores de crecimiento hormonales, los estrógenos y la progesterona [12].

En relación a la edad, aproximadamente el 18% de los CM se diagnostican alrededor de los 40 años, el 77% por encima de los 50 años y el riesgo disminuye en edades avanzadas superiores a los 75 años [12].

En sociedades desarrolladas donde la tasa de prevalencia de CM es elevada, se han observado factores hormonales asociados principalmente con el nivel de estrógenos, como una menarquia precoz, nuliparidad, menopausia tardía y una edad avanzada en el momento de dar a luz al primer hijo [13].

La exposición a hormonas exógenas como anticonceptivos orales [14] y la terapia hormonal sustitutiva [15] también se asocian con un mayor riesgo de CM, aunque el riesgo se reduce tras su supresión [16]. Por otra parte, varios estudios han concluido que la menarquia tardía disminuye el riesgo de CM [17], dado que la exposición de por vida al estrógeno es menor.

También existen factores genéticos estrechamente asociados con el CM, como las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, de sus siglas en inglés “breast cancer associated gene 1 and 2”, respectivamente, que codifican proteínas de supresión tumoral. La deficiencia de BRCA1 conlleva una desregulación del ciclo celular, duplicaciones anormales del centrosoma, inestabilidad genética y eventualmente la apoptosis [18], mientras que BRCA2 regula la reparación por recombinación en las roturas de doble cadena del ADN. Estos genes son de especial importancia, dado que entre el 20-25% de los CM heredados y el 5-10% de todos los CM están relacionados con dichas mutaciones, de la misma manera que sucede con el oncogen ERB-2, que está sobreexpresado en el 20% de los casos de CM.

Por otra parte, el receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una glicoproteína de la membrana celular de la familia de la tirosina quinasa, cuyas vías de señalización descendientes incluyen PI3K, Ras-Raf-MAPK y JNK, que se activan para promover la proliferación celular, evitar la apoptosis y la angiogénesis. EGFR se encuentra sobreexpresado en el 30% de los casos de CM inflamatorio, y en los casos de CM triple negativo (TNM) [19].

Además de todos estos factores anteriormente comentados, los estilos de vida guardan una estrecha relación con el CM, destacando principalmente:

a) Consumo de Alcohol: La relación entre el consumo de alcohol y el desarrollo de CM ha sido mostrado por diversos estudios [13,20-22]. A pesar de ello, el mecanismo de la carcinogénesis inducida por el alcohol no se ha entendido completamente. En líneas generales, la influencia del alcohol sobre el desarrollo de cáncer es atribuido a los efectos genotóxicos del acetaldehído, la generación EROs y los polimorfismos genéticos. Esto se debe a que el etanol es absorbido por el intestino delgado y luego es metabolizado por las alcohol deshidrogenasas (ADH) en acetaldehído en el hígado. Cuando el consumo de alcohol es alto, el citocromo P450 2E1 (CYP2E1) también cataliza etanol en acetaldehído mientras produce ERO [23]. A pesar de ello, existen factores individuales que modifican el riesgo de cada

individuo como factores genéticos, de género, de estilo de vida (fumar, nutrición), y la exposición simultánea a ciertos xenobióticos [23].

b) Consumo de Tabaco: Estudios recientes estiman que ser fumadora aumenta un 24% las probabilidades de desarrollar CM frente a los no fumadores [24]. El papel nocivo del tabaco ha sido ampliamente demostrado, y es la principal causa evitable de muerte prematura en los países desarrollados. La relación entre consumo de tabaco y cáncer está respaldada por evidencias epidemiológicas, histológicas y genéticas [13]. En el humo del tabaco se han identificado más de 4.000 sustancias químicas distintas, 69 de ellas altamente tóxicas y cancerígenas, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, nitrosaminas o aminas aromáticas, y otras promotoras de la carcinogénesis, como los derivados del fenol [25,26].

c) Actividad física: Por otra parte, el ejercicio tiene una amplia variedad de efectos biológicos sobre nuestro organismo, algunos de los cuales pueden influir bloqueando los mecanismos de carcinogénesis. Entre ellos encontramos, la reducción de las reservas de grasa, cambios relacionados con la actividad en los niveles de hormonas como los estrógenos o la insulina, mejora en la función inmune de los linfocitos T y NK, aumento de las citosinas antiinflamatorias y reducción de la generación de EROs.

Estos efectos se deben principalmente a que, en respuesta a la contracción muscular, se liberan algunos tipos de citoquinas llamadas mioquinas, como la interleucina-6 (IL-6), IL-8 e IL-15. La IL-6 induce la lipólisis y la oxidación de las grasas, y además interviene en mecanismos antiinflamatorios, dado que estimula la producción de citoquinas antiinflamatorias y la supresión de citosinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). Por otra parte, la IL-15 puede poseer un rol de importancia en el control de la deposición de grasa en el tejido adiposo, dado que está involucrada en la regulación metabólica recíproca entre el tejido adiposo y el músculo esquelético. Esto estimula las fibras musculares para acumular mayores cantidades de proteínas, induce la proliferación de células T, aumenta la citotoxicidad de las células NK y protege a estas células inmunitarias y neutrófilos de la apoptosis.

La amplia evidencia de estudios prospectivos sugiere que la actividad física puede ser protectora contra el CM en mujeres postmenopáusicas, aunque la evidencia sobre su efecto en las mujeres premenopáusicas es limitada [27,28].

d) **Obesidad:** Las personas obesas tienen con frecuencia una inflamación local crónica de grado bajo, que como se ha mencionado con anterioridad, causa daños en el material genético [29,30]. Por otra parte, el tejido adiposo también produce un exceso de estrógenos y adipocinas. En personas obesas, la concentración de adipocinas como la leptina es más abundante que la adiponectina. La función de la primera es promover la proliferación celular, mientras que la adiponectina inhibe el crecimiento celular [31].

El tejido adiposo puede tener también efectos directos e indirectos en otros reguladores del crecimiento celular, como el blanco mamífero de la rapamicina (mTOR), una proteína que ayuda a controlar varias funciones celulares, como la multiplicación y la supervivencia de las células. Otros posibles mecanismos por los que la obesidad podría afectar el riesgo de cáncer, son los cambios sobre el sistema del factor nuclear kappa beta, incremento del estrés oxidativo, y tener mayores concentraciones del factor-1 de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1). Las altas concentraciones de insulina y de IGF-1 pueden promover la formación de cáncer de colon, riñón, próstata y de endometrio [32].

Además, algunos estudios encontraron una asociación significativa entre una alta ingesta de grasa con una menarquia precoz, teniendo en cuenta la grasa corporal y los niveles de actividad física [33,34]. Por lo tanto, se produce un aumento de la exposición hormonal incrementando el riesgo de padecer cáncer.

e) **Dieta:** Una dieta poco saludable y actividad física baja aumentan el nivel de hormonas sexuales en mayor medida que cualquier otro factor de riesgo [35,36]. De hecho, las niñas con un alto consumo de verduras y frutas experimentaron su menarquia más tarde [33,34].

Los factores nutricionales pueden influir reduciendo el riesgo de padecer CM hasta un 30-35%, e influir en torno a un 60% si además incluimos variables como la actividad física, enfermedades metabólicas, hipovitaminosis D, diabetes y estrés psicosocial [37].

1.4- Cáncer gástrico

1.4.1- Epidemiología

El cáncer gástrico (CG) es uno de los tumores malignos más relevantes y ocupa el quinto lugar en incidencia y el tercero en mortalidad en todo el mundo [13], en parte debido a la dificultad para realizar un diagnóstico precoz [38-40]. En Europa, el CG es el octavo en incidencia y el sexto en mortalidad (5), y en muchos países la supervivencia a los cinco años del diagnóstico es inferior al 20% [41].

En España, ocupa el noveno lugar en incidencia y el séptimo en mortalidad, representando según los datos del GLOBOCAN 2018, el 2,8% de nuevos diagnósticos y el 4,9% de las defunciones por cáncer [42]. Los resultados de Aragonés et al. [43] muestran su importancia en ambos sexos en nuestro país, destacándose una incidencia de 20,2 casos en hombres y 8,7 en mujeres por cada 100.000 personas/año. Respecto a su mortalidad, este tumor se caracteriza por presentar grandes variaciones geográficas, tal y como se muestra en las Figuras 5 y 6, siendo la comunidad autónoma de Castilla y León la que presenta una mayor tasa de mortalidad. Estas diferencias geográficas probablemente son causadas por patrones dietéticos, diferencias genéticas y exposición a carcinógenos químicos [13].

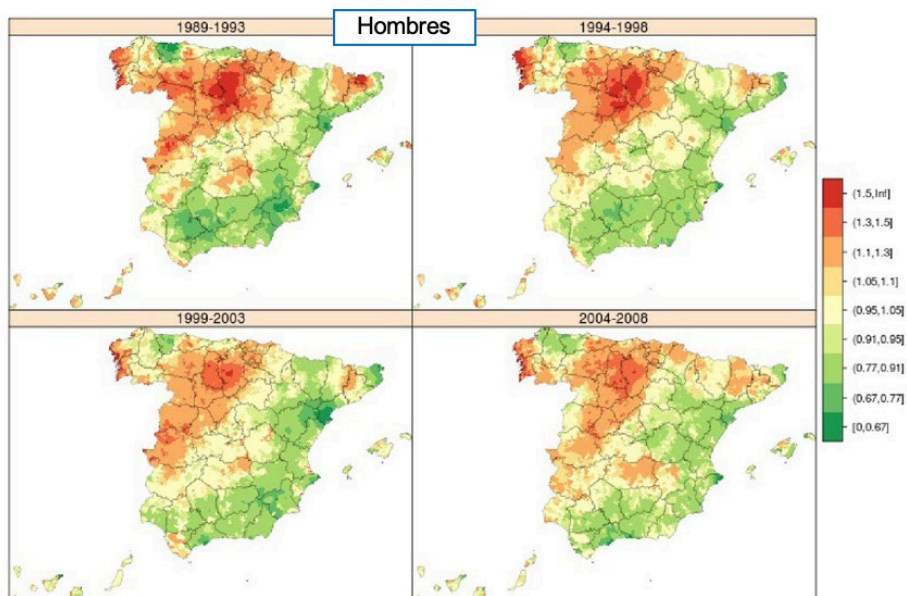


Figura 5 Evolución temporal de la mortalidad por cáncer de estómago en hombres en España. Fuente: López-Abente et al.: Time trends in municipal distribution patterns of cancer mortality in Spain. BMC Cancer 2014 14:535.

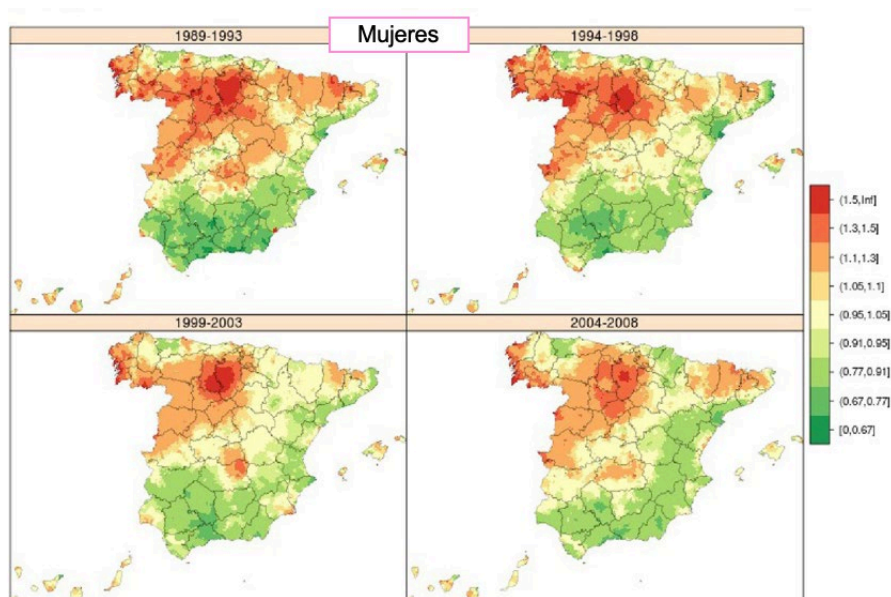


Figura 6 Evolución temporal de la mortalidad por cáncer de estómago en mujeres en España. (Fuente: López-Abente et al.: Time trends in municipal distribution patterns of cancer mortality in Spain. *BMC Cancer* 2014 14:535.)

1.4.2- Clasificación del cáncer gástrico

Se debe tener en cuenta que el CG es una agrupación heterogénea de tumores con distinta histopatología. Según su localización anatómica, se diferencia en CG de cardias (CGC) si se origina en zonas próximas al cardias y no-cardias (CGNC) si se produce alejado de ésta [44].

Por otra parte, teniendo en cuenta sus características histológicas, se identifican dos tipos básicos de CG:

- Difuso: las células tumorales están poco diferenciadas, se comportan agresivamente y tienden a dispersarse por todo el estómago (en lugar de formar glándulas). Este tipo se propaga a otras partes del cuerpo mucho más rápido que los tumores de tipo intestinal. El tipo difuso, ocurre igualmente entre hombres y mujeres y tiende a desarrollarse a una edad más joven que el tipo intestinal.

- Intestinal: las células tumorales están bien diferenciadas, crecen lentamente y forman glándulas. Este tipo se encuentra con mayor frecuencia en hombres que en mujeres y ocurre con mayor frecuencia en personas mayores.

1.4.3- Factores asociados al CG

Los mecanismos etiológicos de este tumor no están claramente establecidos, considerándose la interacción gen-ambiente un factor importante en su génesis [38].

Las diferencias de género son evidentes, existiendo una menor incidencia de CG en las mujeres, la cual se atribuye a los efectos protectores del estrógeno [45].

La edad también es un factor de riesgo de desarrollar CG debido a la acumulación de mutaciones genéticas antes mencionadas [7].

Un factor importante es la infección por *Helicobacter pylori* [5]. Dicha infección induce una respuesta inflamatoria en el huésped, liberando citoquinas y especies reactivas del oxígeno, aumentando la proliferación celular [46]. Una de las citoquinas liberadas es la interleucina-8 (IL-8), cuya función principal es promover la adhesión de los neutrófilos que se encuentran en la circulación sanguínea, para atraer los neutrófilos al lugar de infección y eliminar así las bacterias. No obstante, esta citoquina también promueve la angiogénesis en las células endoteliales, facilitando el desarrollo de cáncer. Además, las cepas de *H. pylori* citotóxicas [47] que expresan el gen *vacA* y *cagA* [48] liberan quimioquinas, que afectan a la señalización celular del huésped, dañando el epitelio gástrico por la liberación de enzimas proteolíticas de los neutrófilos activos, aumentando el estrés oxidativo, pudiendo producir úlceras.

Desde el punto de vista genético, se han identificado mutaciones en ciertos genes que están asociados con un elevado riesgo de desarrollar CG, como la glutatión S-transferasa Mu-1 (GSTM1) [49]. Esto se debe fundamentalmente a que GSTM1 se encarga de la detoxificación de un gran número de carcinógenos procedentes del tabaco. Además, la susceptibilidad genética individual puede ser muy importante en una variedad de procesos relevantes para la carcinogénesis gástrica, incluida la protección de la mucosa contra *H. pylori*, una respuesta inflamatoria a la infección, procesos de reparación del ADN y capacidad de proliferación celular [50]. Además, la comunidad científica también ha indicado un incremento del riesgo de CG con algunos SNP involucrados en las respuestas inflamatorias [51] o metabolización del alcohol [52].

La exposición a otros factores del ámbito laboral también ha sido relacionada con el aumento del riesgo de padecer algunos tipos de CG, como la exposición a ambientes calurosos y con elevado número de partículas suspendidas, que concretamente incrementa el riesgo de los subtipos difuso y no-cardias [53].

Al igual que ocurre en el CM, el CG se ve influenciado por estilos de vida poco saludables, entre que los que podríamos destacar:

a) Consumo de alcohol: la influencia del alcohol sobre el desarrollo de CG es atribuida a los efectos genotóxicos del acetaldehído y la generación de EROs a los que es expuesto el tejido digestivo [44].

b) Consumo de tabaco: Se estima que es el responsable del 11% de todos los casos de CG [13]. Aunque el aumento del riesgo es mayor en hombres que en mujeres, la relación dosis respuesta es clara en ambos sexos [26]. Tanto los fumadores actuales como los exfumadores tienen entre 1.5-2.5 más de posibilidades de padecer CG [25].

c) Actividad física: se ha demostrado repetidamente que la actividad física se asocia con reducciones en el riesgo de mortalidad por cualquier causa y reducciones en las principales causas de muerte, como enfermedades cardiovasculares y cánceres [54]. En relación al CG la actividad física regular parece estar asociada con una reducción del riesgo de hasta el 17% [44].

d) Obesidad: la relación entre el exceso de peso corporal y el riesgo de CG ha sido analizada por diferentes estudios de cohortes llegando a la conclusión de que los individuos con un índice de masa corporal (IMC) superior 25 kg/m² poseen mayor riesgo de CG, incrementando éste en un 55% [44,55].

e) Dieta: El estómago está expuesto directamente a los carcinógenos presentes en los alimentos que ingerimos, que pueden permanecer en él alrededor de 5 horas para realizar la digestión, por lo que la alimentación es un factor importante. En este tipo de tumor, el elevado consumo de sal, carnes rojas y un bajo consumo de frutas y vegetales aumentan un 18% el riesgo de desarrollo de CG [56].

Finalmente, cabe destacar que existen diferencias entre los factores de riesgo de CG en función del subtipo anatómico [57]. La incidencia de CG no-cardias (CGNC) es más común que el CG de cardias (CGC). El tipo difuso de CG es más

común en mujeres jóvenes, mientras que el subtipo intestinal generalmente ocurre en hombres de edad avanzada [58]. Si bien ambos están influenciados por el hábito de fumar cigarrillos [26], y posiblemente por una baja ingesta de frutas y verduras [58], existen otros factores de riesgo que difieren entre ellos. Los factores de riesgo de CGC incluyen obesidad [55] y enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) [59], mientras que el riesgo de CGNC aumenta con la infección por *H. pylori* [60] y un bajo nivel socioeconómico [44].

2- Polifenoles

Los polifenoles (PF) son metabolitos secundarios de las plantas, que no pueden ser producidos por el organismo humano, y que son ingeridos en la dieta a través de diferentes frutas y verduras.

En las plantas, estos fitoquímicos son los encargados de la protección frente agentes externos, como los nocivos efectos de los rayos ultravioletas o las bacterias. A pesar de que algunos pueden poseer complejas estructuras, la mayoría de estos compuestos comparten una estructura básica que permite la categorización de estos compuestos en diferentes familias. Los PF se agrupan en 5 familias, entre las cuales encontramos los flavonoides, lignanos, estilbenos, ácidos fenólicos y otras clases de PF, como se observa en la Figura 7. Los ácidos fenólicos y los flavonoides, son las principales familias que contribuyen al consumo total de PF [61]. Las 5 familias se pueden organizar a su vez en 20 subclases, existiendo más de 6000 compuestos, todos ellos presentes en una amplia variedad de frutas y verduras.

Estos compuestos, que en su mayoría son de bajo peso molecular, comparten un núcleo común, el difenilpirano ($C_6-C_3-C_6$), formado por dos anillos fenilo (A y B) unidos a través de un anillo C de pirano heterocíclico, y todos ellos presentan estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos. La posición, el número de grupos hidroxilo y los distintos grupos funcionales, permiten diferenciar cada uno de estos compuestos (metilos, azúcares o ácidos orgánicos). La mayor parte de estos compuestos se encuentran como glucósidos, pero también se pueden encontrar en su forma libre, denominada aglicona. Por otra parte, también se puede presentar como sulfatos, dímeros o polímeros.

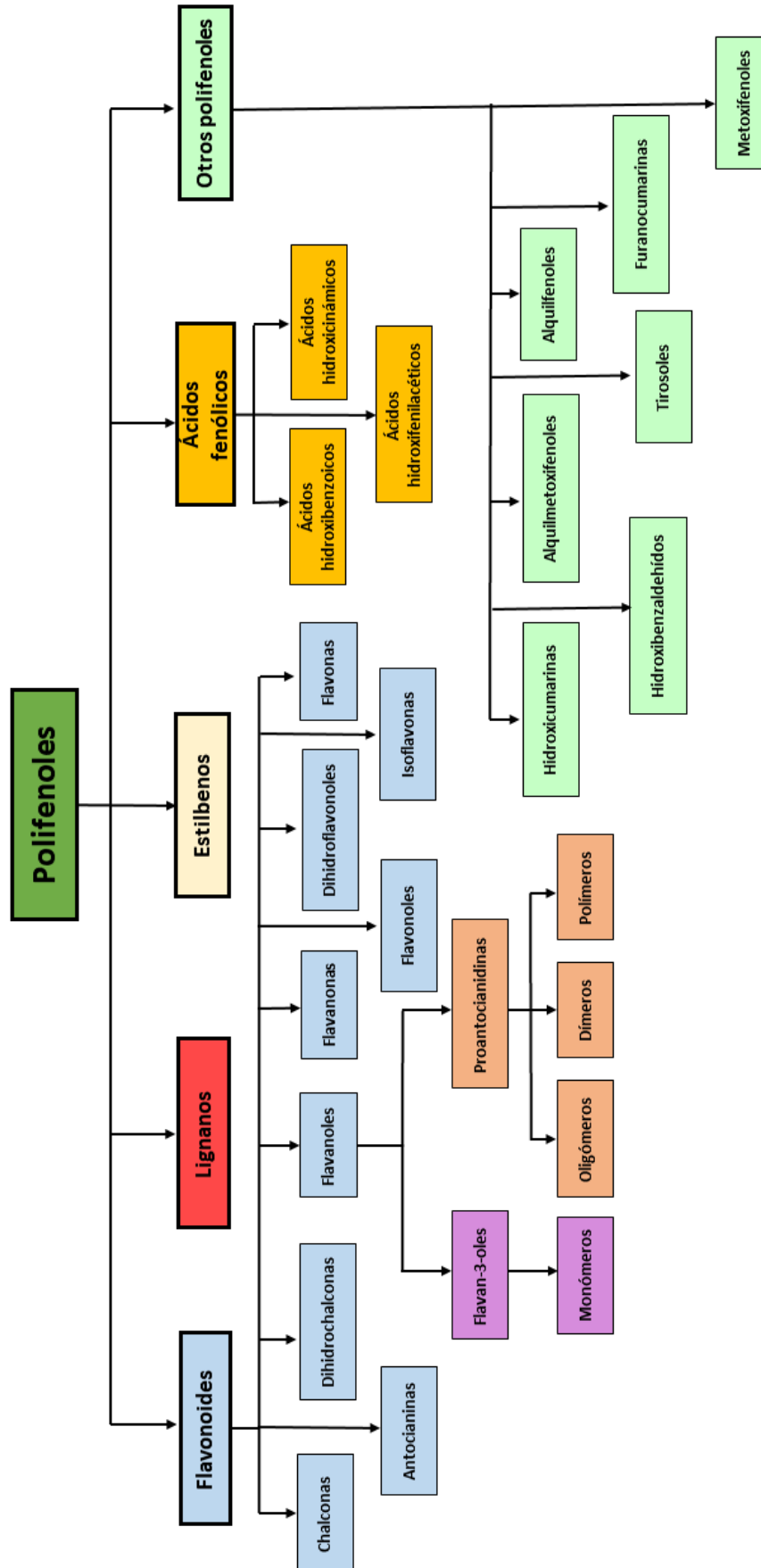


Figura 7 Clasificación de los polifenoles. Elaboración propia.

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

- Flavonoides

Los flavonoides son la clase de PF con mayor número de compuestos, y con las concentraciones más elevadas en frutas y verduras. Esta elevada concentración se debe a su amplio espectro de estructuras, dado que cada una de sus subclases puede dar lugar a diferentes funciones biológicas (Figura 8).

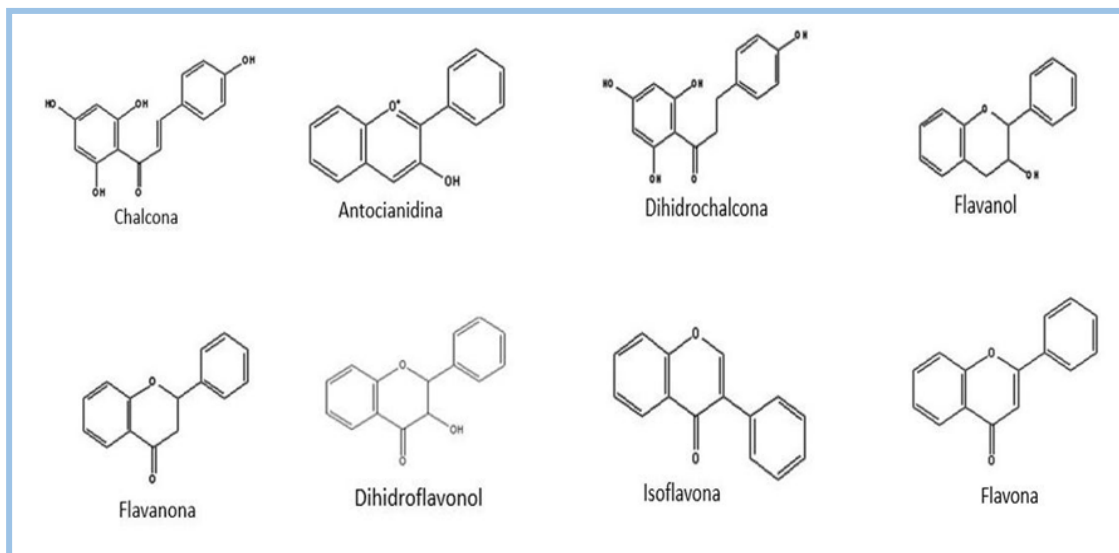


Figura 8 Estructura general de los flavonoides.

- Lignanos

Se encuentran en una amplia variedad de vegetales ricos en fibra, en la que se incluyen el trigo, la cebada, la avena, las lentejas, el ajo, los espárragos, el brócoli, las zanahorias y presente en una amplia variedad de semillas. Estos lignanos pueden ser metabolizados por las bacterias del intestino a enterolignanos, enterodiol y enterolactona [62,63] para ser absorbidos (Figura 9). Además, cabe destacar que son uno de los dos grupos principales de fitoestrógenos.

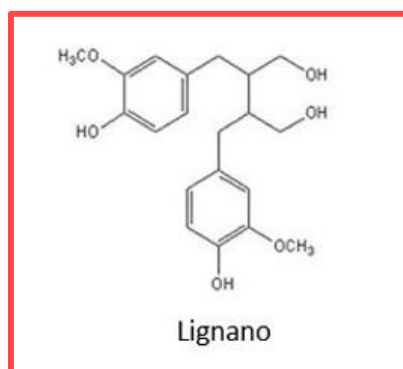


Figura 9 Estructura de los lignanos.

- Estilbenos

Es una de las familias de PF más estudiadas, y se encuentran principalmente en la uva y el vino. Es una pequeña familia de compuestos cuya función en las plantas es principalmente la protección frente a distintos tipos de bacterias (Figura 10).

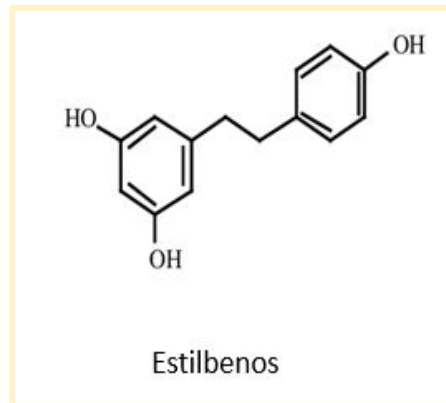


Figura 10 Estructura de los estilbenos.

- Ácidos fenólicos

Esta familia está compuesta por 3 subclases: ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinnámicos y ácidos fenilacéticos (Figura 11). Los principales alimentos que contribuyen al consumo de estas clases son las acelgas, el café y las aceitunas.

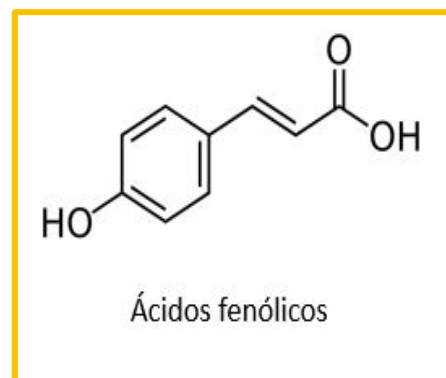


Figura 11 Estructura de los ácidos fenólicos.

- Otros polifenoles

En esta categoría se incluyen las clases de PF que no pueden ser clasificadas en otras dada su diversa estructura química. Entre ellas encontramos las hidroxycumarinas, hidroxibenzaldehídos, alquilmetoxifenoles, tirosoles, alquilfenoles, furanocumarinas y metoxifenoles. Esta familia de PF es la menos estudiada de todas.

2.1- Absorción de polifenoles

La biodisponibilidad de los PF depende de las características de cada compuesto, y se refiere a la fracción de PF que llega a la circulación sistémica. Esta característica de cada compuesto fenólico depende por tanto de características fisicoquímicas (solubilidad, pH, pKa, formación de puentes de hidrógeno, peso/tamaño molecular y superficie polar), factores fisiológicos del tracto gastrointestinal (motilidad intestinal, superficie de absorción, metabolismo intestinal, mecanismos de transporte, tensioactivos, secreciones intestinales y el flujo sanguíneo/linfático) y factores que dependen de la matriz y del procesado (liberación y velocidad de disolución)[64].

Los PF son ingeridos en forma de ésteres, glicósidos o sus formas poliméricas, y no son absorbidos directamente, por lo que deben ser transformados previa a su asimilación. La transformación previa absorción, se lleva a cabo principalmente en el intestino delgado, intestino grueso y colon [65]. La transformación enzimática facilita su transporte activo, pasivo o facilitado. Sin embargo, solo el 5%-10% del total de los PF pueden absorberse en el intestino delgado, y estos compuestos pueden experimentar un metabolismo más amplio. El resto de los PF pueden acumularse en el intestino grueso y excretarse en las heces [66-68].

La transformación consiste en la hidrólisis llevada a cabo por enzimas como la β -glucosidasa y la lactasa-florizina hidrolasa o la degradación por la microflora del colon. Una vez transformados en agliconas, los enterocitos conjugan los PF formando glucurónidos sobre los cuales se llevará a cabo una catalización enzimática por metilación, glucuronidación o sulfatación en el hígado. Como consecuencia de estos procesos (Figura 12), los metabolitos que se encuentran en el torrente sanguíneo son distintos a las estructuras iniciales, lo que dificulta la evaluación de su actividad biológica.

Después de ser liberados al torrente sanguíneo, los PF están sujetos a procesos de detoxificación metabólica, incrementando la hidrofiliidad y facilitando su excreción por vía urinaria o biliar. Para mantener una concentración de PF en el plasma, es preciso ingerir estos compuestos de forma constante. Sin embargo, la concentración de PF en plasma no está directamente relacionada con la concentración de PF en los tejidos ya que mayoritariamente, los PF se encuentran en los órganos que los metabolizan, pero además también pueden acumularse en tejidos dianas específicos[66].

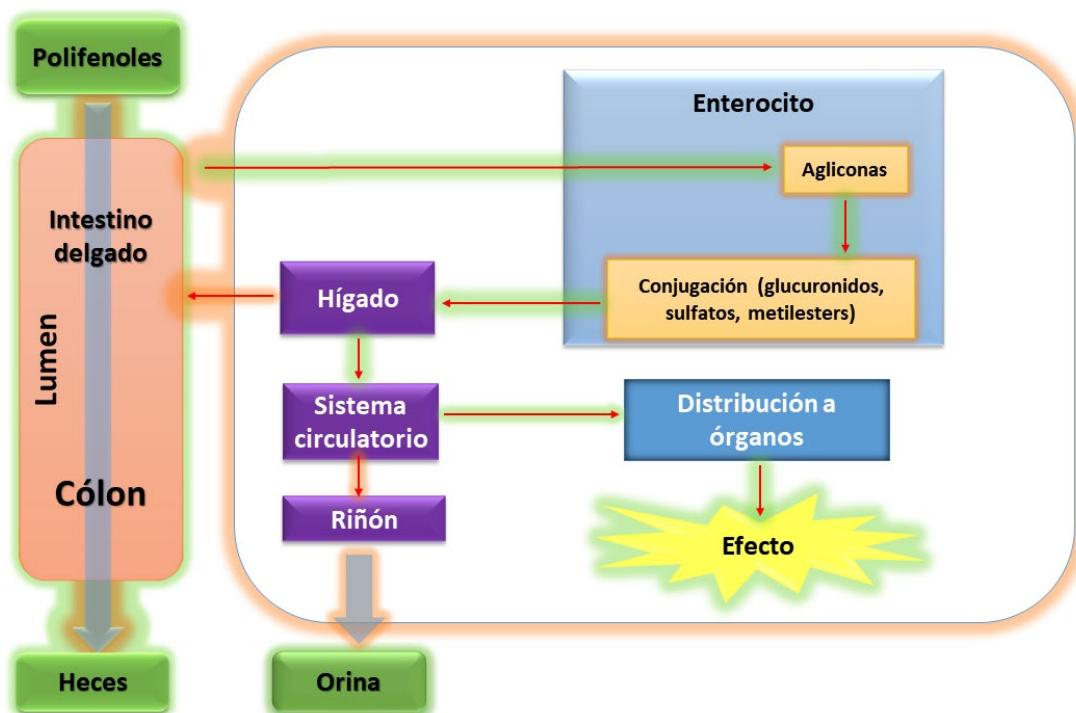


Figura 12 Proceso de absorción/excreción de los PF. Elaboración propia.

2.2- Polifenoles y dieta

Se ha demostrado que la ingesta de frutas y verduras está inversamente relacionada con el riesgo de cáncer colorrectal, de esófago, cavidad oral, laringe, ovario, hígado y CM [69-73], especialmente comparada con sujetos con una elevada ingesta de carnes rojas y procesadas [74]. En general, un alto consumo de frutas y verduras se asocia con efectos beneficiosos para la salud y se recomienda para la prevención del cáncer [75], atribuyéndose estos efectos al alto contenido de PF de dichos alimentos [76].

Aunque varios estudios han evaluado la relación inversa entre la ingesta de PF y el riesgo de cáncer del tracto digestivo [76-79], la evidencia epidemiológica sigue siendo insuficiente [76]. Un metaanálisis reciente concluyó que los PF de la dieta podrían reducir el riesgo de CG en la población europea, aunque no en los estadounidenses ni en los asiáticos [80]. Esta diferencia entre los estudios en Asia, América y Europa, sugiere que la heterogeneidad entre los resultados podría explicarse en parte por la variabilidad geográfica del consumo de alimentos.

Algunos autores como La Vecchia et al. [81], Turati et al. [72] o Giacosa et al. [82], han señalado que el riesgo de desarrollo de una amplia variedad de enfermedades pueden estar relacionadas con la dieta. Entre ellas, muchos aspectos de la dieta mediterránea (DM) han sido relacionados con una disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares [83], cáncer colorrectal, CM, CG o próstata [84]. Los efectos beneficiosos de la DM se relacionan con la elevada ingesta de frutas y verduras, y el bajo consumo de carnes rojas. A través de esta dieta se consigue disminuir los factores de riesgo como son la obesidad, factores hormonales e inflamatorios o EROs [82].

La DM se caracteriza por el elevado consumo de aceite de oliva como principal grasa del condimento, un consumo moderado de vino, un consumo limitado de carne, productos lácteos, frutas y verduras [85] que podrían actuar de manera protectora. La adherencia a esta dieta se ha relacionado con un menor riesgo de otras enfermedades cardiovasculares como la disfunción cardíaca y endotelial [86,87], el síndrome metabólico, y menor riesgo de cáncer, incluidos los del sistema digestivo [85].

Los PF son metabolitos fenólicos secundarios presentes en una amplia variedad de vegetales, importantes para la pigmentación de la planta, la protección frente al estrés oxidativo generado por los rayos ultravioleta o la contaminación ambiental, así como la defensa antimicrobiana[88].

Estos fitoquímicos, han demostrado poseer propiedades terapéuticas para una amplia variedad de enfermedades, tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, reumatismo, osteoporosis, etc. [88]. Esta relación entre la cantidad de fitoquímicos ingeridos y sus efectos terapéuticos ha suscitado la atención de la comunidad científica, como demuestra el elevado número de ensayos *in vivo*, *in vitro* y epidemiológicos que prestan especial atención a sus mecanismos de acción [89] y a su utilización en medicina preventiva [61]. Muchas

de estas investigaciones se han centrado en el posible papel de los PF como anticancerígenos, ya que se han identificado diversos mecanismos de acción (Figura 13), disminuyendo el comportamiento invasivo de los tumores [90].



Figura 13 Efectos de los PF sobre el organismo. Elaboración propia.

Además, en ensayos *in vivo* con diversos PF aplicados individualmente, se ha observado una reducción en el tamaño de los tumores de CM [91]. De igual modo, una amplia variedad de estudios señala que los PF presentan una menor capacidad antioxidante cuando se utilizan de forma individual [92]. Mientras que por otra parte, han sido observadas sinergias cuando se utiliza más de un compuesto polifenólico simultáneamente [93], por lo que el estudio de sinergias y efectos de los PF *in vitro* en líneas celulares ha aportado valiosa información sobre la interacción de los PF con diversos mecanismos de la célula [94-97]. Entre ellos se puede destacar el bloqueo del crecimiento celular en células cancerosas [98,99], la intervención en la expresión de distintos genes [100] o su unión directa con diversos receptores celulares de membrana, por lo que los PF pueden proteger a

las células a través de distintos mecanismos según el estadio de las células (Figura 14).

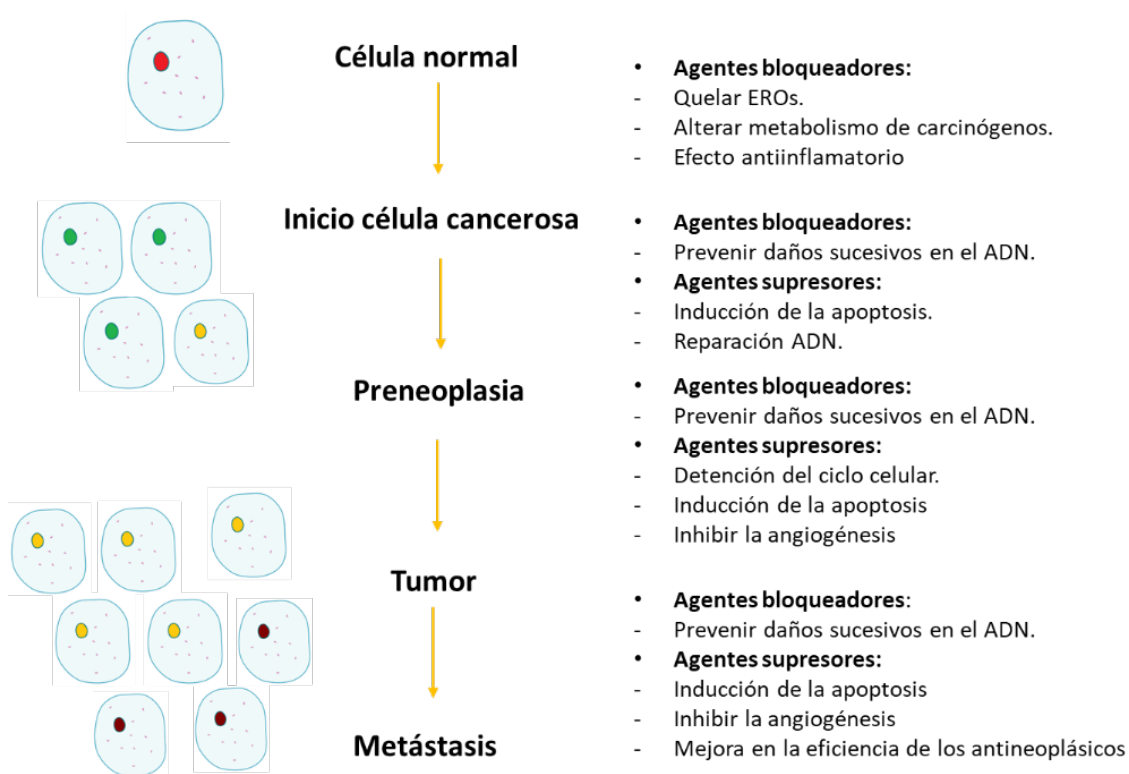


Figura 14 Modelo multietapa de la carcinogénesis y los potenciales efectos protectores de los PF en la progresión del cáncer. Elaboración propia.

2.2.1-Polifenoles como agentes antioxidantes

Como ya ha sido comentado, el estrés oxidativo modifica el microambiente tumoral para aumentar el crecimiento y la expansión de las células cancerosas. En estos mecanismos, el peróxido de hidrógeno producido por las células tumorales, puede desencadenar la destrucción de tejido no tumoral circundante para obtener nutrientes, lo que explica por qué los tumores son llamados “adictos a la señalización ROS”.

En este sentido, los PF poseen la capacidad de quelar las especies reactivas del oxígeno debido a la presencia de grupos hidroxilo (OH) y dobles enlaces, donando un átomo de hidrógeno al radical libre. Asimismo, los PF pueden interferir indirectamente sobre mecanismos celulares, dado que poseen la capacidad de inhibir la expresión de ciertos genes, como el gen NRF-2 que cuando se encuentra sobre-expresado incrementa el número de especies reactivas de oxígeno

[101,102]. Por lo tanto, este gen puede ser utilizado por las células tumorales para promover su propia supervivencia. Además, su activación constitutiva genera quimio resistencia en muchos tipos de cáncer, pero la inhibición de la actividad de este gen por parte de algunos PF mejora la eficacia de los agentes quimioterapéuticos.

2.2.2-Polifenoles como inductores de apoptosis

La apoptosis es un mecanismo celular mediante el cual las células emprenden un proceso de muerte celular programada para modular varios procedimientos vitales. Existen diversas etapas en el proceso de apoptosis: a) inducción de apoptosis; b) activación de proteínas proapoptóticas; c) cascada de caspasa (cisteína proteasas); d) degradación / reorganización de orgánulos intracelulares; (e) fragmentación de células en cuerpos apoptóticos; (f) preparación de células y sus fragmentos para la fagocitosis. Estos mecanismos de apoptosis son complejos e involucran una cascada de eventos moleculares mediada por la expresión de varias biomoléculas y/o inhibición de las vías de señales [103].

Diversos estudios sugieren que los PF más comunes ejercen su actividad anticancerígena a través de varios mecanismos apoptóticos [93,104-109]. Entre estos PF, encontramos por ejemplo la jaceosidina y casticina, que interactúan con las células cancerosas a través de diversos mecanismos de acción, que inducen la apoptosis mediante varias vías de regulación de proteínas transductoras, activadoras de la transcripción o inhibidores de factores de crecimiento. Las principales dianas de estos PF son el supresor de tumores p53, NF-kB1 y las vías de señalización JNK/caspasa, PI3K/MEK/ERK y PI3K/Akt/FoxO1.

Por otra parte, la quercetina, uno de los compuestos polifenólicos más comunes en los alimentos, demostró un efecto quimiopreventivo *in vivo* e *in vitro* sobre distintos tipos de cáncer, como próstata y gástrico entre otros, ejerciendo un efecto apoptótico en células cancerosas [92,110-115].

2.2.3-Polifenoles con efecto estrogénico

En los últimos años, los fitoquímicos han recibido especial atención dado su potencial para interferir en el desarrollo y formación de tumores.

Algunos subtipos de PF tienen la capacidad de generar respuestas similares a los estrógenos. Esto se debe a que su estructura posee grupos hidroxilo y anillos fenólicos, necesarios para unirse a los receptores de estrógeno, y asemejan al tipo más importante de estrógenos en los humanos, el 17- β -estradiol [116].

Además, algunos estudios han informado que algunas de las respuestas mediadas por ER inducidas por los PF, son comparables o incluso superiores a las inducidas por niveles fisiológicos de estradiol, una razón por la que algunos flavonoides todavía se describen como agonistas de estrógenos completos y que poseen una afinidad superior por el ER- β [117]. Éste receptor ejerce una respuesta que se opone a los efectos proliferativos de la activación de ER- α [118]. De hecho, la interacción entre ambos tipos de receptores y sus sustratos, proporciona una regulación para el efecto global de los estrógenos y la relación de ER- α / ER- β se utiliza como un marcador de pronóstico en CM [119]. Esto significa que es probable que los niveles fisiológicos de fitoestrógenos activen ER- β , pero no la señalización procancerígena mediada por ER- α (o la activen en un grado mucho menor), facilitando, por lo tanto, un efecto antiproliferativo beneficioso.

Los fitoestrógenos también pueden alterar la biosíntesis de estrógenos, actuando como inhibidores de la aromatasas del citocromo P450 19 (Cyp19), 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasas (HSD), la estrona sulfatasa y sulfotransferasa [120], todas ellas involucradas en la generación de estradiol en el tejido mamario y asociadas con el CM cuando se sobreexpresan. Se ha demostrado que algunos flavonoides inducen una disminución significativa en la concentración de estrógenos circulantes. Aunque su eficacia es inferior a la de los inhibidores de aromatasas esteroideas utilizados clínicamente, podrían ser muy beneficiosos para tratar tumores que muestran una falta de respuesta a terapias comunes. Por otra parte, los flavonoides también pueden alterar las enzimas que metabolizan los estrógenos, lo que reduce la producción de metabolitos genotóxicos.

2.2.4-Polifenoles implicados en la regulación de los transportadores ABC

Los transportadores ABC son una familia de proteínas de membrana que están involucradas en la absorción, disposición y secreción de xenobióticos, así como en el flujo de los medicamentos usados en las terapias.

Particularmente, se ha detectado la proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP o ABCG) en varios tumores humanos, incluido el CM, y representa un mecanismo destacado para el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos. Su sobreexpresión en sitios tumorales conduce a la exclusión activa de agentes citotóxicos, lo que limita su absorción y acumulación intracelular y, por lo tanto, dificulta el efecto de algunos tratamientos contra el cáncer [121].

Existe evidencia acumulada de la existencia de la interacción flavonoide-fármaco con BCRP. En la última década, algunos estudios han demostrado el efecto de los flavonoides como inhibidores del BCRP [122,123], mostrando que su ingesta durante el tratamiento del cáncer puede causar un aumento en la biodisponibilidad y acumulación de agentes antineoplásicos[124], revirtiendo la resistencia a múltiples quimioterapias.

2.2.5-Flavonoides como intermediarios antiinflamatorios

Diversos estudios han señalado la existencia de una correlación inversa entre el consumo de frutas/verduras y el nivel de marcadores inflamatorios [125-129]. También se ha identificado que los alimentos ricos en PF están inversamente relacionados con la concentración de TNF- α y la IL-6 [130,131], y un elevado número de evidencias provenientes de ensayos *in vitro* han sugerido su capacidad para inhibir la producción de estas dos citocinas [113,132,133], así como de los factores de transcripción como NF-kB y proteína activadora-1 (AP-1).

2.3- Papel de los polifenoles en CM y CG

Teniendo en cuenta las características antes mencionadas, los PF pueden reducir el riesgo de CM a través de reducción del estrés oxidativo, quelando los radicales libres que pueden generar mutaciones en el ADN a través de sus grupos hidroxilo y dobles enlaces. Estos compuestos también tienen la capacidad de modular el proceso de apoptosis, disminuyendo la proliferación celular de las células cancerosas. Por otra parte, dadas las características estructurales, algunos de estos compuestos pueden interactuar con receptores de membrana, como los ER, actuando como agonista estrogénico, ya que el estradiol es una hormona estrechamente relacionada con el riesgo de desarrollar CM. Además, existe una relación inversamente proporcional entre el consumo de PF y el nivel de marcadores inflamatorios, por lo que se reduce otro de los factores de riesgo para el desarrollo de CM.

Respecto a la relación entre los PF y la reducción del riesgo de CG, también puede deberse a las propiedades antes mencionadas, aunque caben destacarse algunos efectos diferenciadores. La infección por *H. pylori* puede incrementar significativamente el riesgo de CG, y algunos PF con capacidad antimicrobiana son capaces de actuar sobre las proteínas que segregan estas bacterias para protegerse y bloquean los efectos morfológicos.

Por todo ello, la hipótesis principal de este trabajo consiste en que una mayor ingesta de PF puede reducir el riesgo de desarrollar distintos tipos de cáncer, como puede ser el CM y el CG.

Objetivos

Objetivo General:

Evaluar la influencia del consumo de PF en el desarrollo de cáncer de mama y cáncer gástrico, en el marco del proyecto MCC-Spain.

Objetivos Específicos:

1- Diseñar una metodología de extracción del contenido de PF de la base de datos Phenol-Explorer y el cálculo de la ingesta individual de PF de manera automatizada.

2- Diseñar una metodología que permita el cálculo de los diferentes PF en la base de datos del proyecto MCC-Spain.

3- Evaluar el efecto del consumo de PF en el desarrollo de cáncer de mama en el marco del proyecto MCC-Spain.

4- Analizar el efecto del consumo de PF en el desarrollo de cáncer gástrico en el marco del proyecto MCC-Spain.

5- Analizar el efecto del consumo de PF en el desarrollo de cáncer gástrico en el consorcio internacional StoP-Project, en el que se encuentra incluido el estudio MCC-Spain.

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

Plan de trabajo

Plan de Trabajo:

La presente tesis doctoral se ha realizado en cinco fases:

- 1) Elaboración del algoritmo de extracción de datos de polifenoles de Phenol-Explorer. Este apartado ha dado lugar a la patente LE-168-2019 (PLP-scrap) (ANEXO I) y otra patente en proceso (PLP-calculator).
- 2) Elaboración de un algoritmo para el cálculo de consumo de polifenoles a partir del cuestionario de frecuencia alimentaria utilizado en el estudio MCC-Spain (www.mccspain.org).
- 3) Análisis del consumo de polifenoles y su relación con cáncer de mama. Este apartado dio lugar a una publicación en *Nutrients*, cuyo título es "Association between Polyphenol Intake and Breast Cancer Risk by Menopausal and Hormone Receptor Status" (Factor de impacto =4.171, Cuartil: 1, Área: Nutrición) (ANEXO II).
- 4) Análisis del consumo de polifenoles y su relación con cáncer gástrico. Este apartado ha dado lugar a una publicación en *Nutrients*, con el título "Flavonoids and the Risk of Gastric Cancer: An Exploratory Case-Control Study in the MCC-Spain Study" (Factor de impacto =4.171, Cuartil: 1, Área: Nutrición) (ANEXO III).
- 5) Se ha llevado a cabo una estancia internacional en la Universidad de Milán, a través del consorcio StoP-Project, que ha dado lugar a una publicación en la revista *Cancers* y cuyo título es "Polyphenol intake and gastric cancer risk: findings from the Stomach cancer Pooling" (Factor de impacto = 6.126, Cuartil: 1, Área: Oncología) (ANEXO IV).

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

3- Metodología

La presente tesis se enmarca en dos proyectos, el estudio nacional Multicaso-control - MCC-Spain y el consorcio internacional Stomach cancer Pooling Project (Stop-Project) cuyos datos han sido utilizados para realizar distintos estudios sobre el efecto de los PF en el desarrollo de distintos tipos de cáncer y en el cual también está presente el proyecto MCC-Spain.

3.1- Proyecto MCC-Spain

Este estudio evalúa la exposición a factores ambientales y genéticos de los tumores más frecuentes en España, CM, CG, cáncer de próstata, leucemia linfática crónica y cáncer colorrectal [134] de personas entre 20 y 85 años. El reclutamiento de casos y controles se llevó a cabo de forma simultánea: se contactaron con nuevos casos de cáncer en los 23 hospitales colaboradores (figura 15). En total, el estudio reclutó a 10.106 sujetos: 2140 casos de cáncer colorrectal, 1738 de CM, 1112 de cáncer de próstata, 459 de CG y 559 de leucemia linfática crónica, junto con 4098 controles.

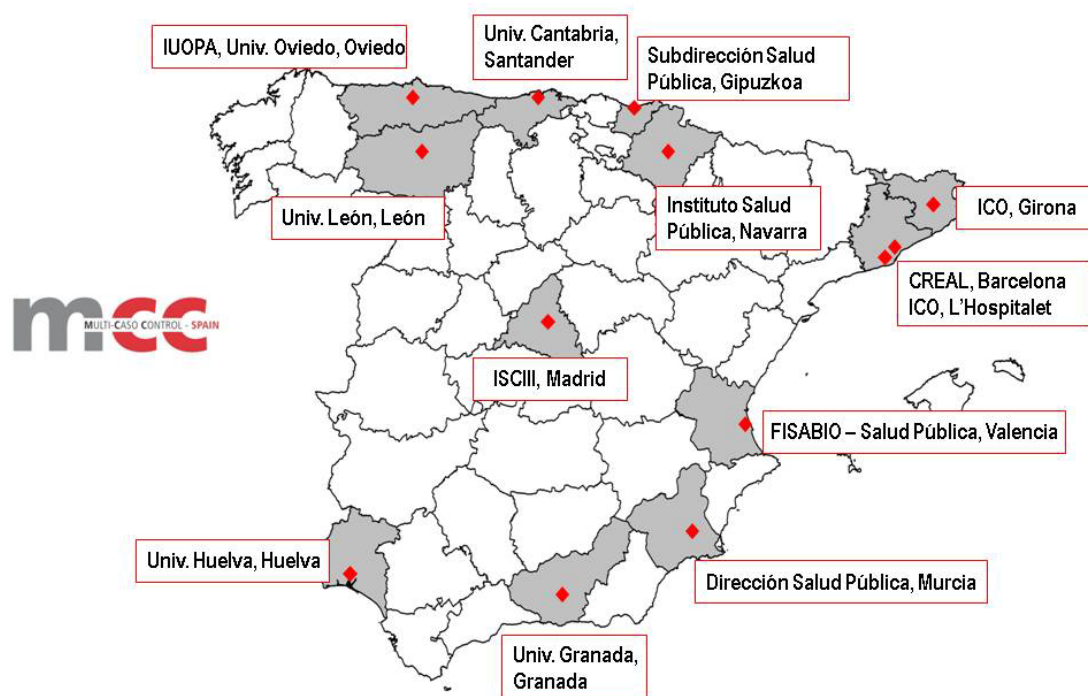


Figura 15 Distribución geográfica de los centros de investigación y hospitales implicados en el estudio MCC-Spain.

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

Los casos y los controles fueron entrevistados por personal capacitado, para recopilar información sobre factores sociodemográficos, comportamientos de salud (como el tipo, la frecuencia y la duración de la actividad física o el tabaquismo entre otros), afecciones médicas, tratamientos previos recibidos y antecedentes personales y familiares de cáncer. MCC-Spain tiene la intención de explorar y combinar diferentes enfoques para identificar nuevos factores de riesgo que proporcionen nuevos datos que podrían ayudar a prevenir su aparición en el futuro. Los objetivos específicos del estudio están relacionados con: a) exposiciones ambientales, incluidos contaminantes del agua potable, exposición a metales pesados y disruptores endocrinos; b) factores socioeconómicos y exposiciones ocupacionales, incluida la interrupción de la ritmo circadiano a través del trabajo por turnos; c) factores de estilo de vida, tabaquismo, nutrición, obesidad y actividad física; d) historial médico y consumo de drogas específicas; e) factores hormonales, incluida la exposición demanda en las primeras etapas de la vida; f) agentes infecciosos; y g) familia historia de cáncer y variación genética. Además, se analizaron específicamente factores genéticos con una evaluación por subfenotipos tumorales.

Se utilizó un cuestionario de frecuencia de alimentos validado (CFA) [135,136] para recopilar hábitos dietéticos y el consumo de alcohol en el pasado. El CFA consta de 140 ítems (www.mccspain.org), que recogen toda información sobre la frecuencia de consumo de alimentos agrupados en diez categorías: (1) Productos cárnicos (incluyendo artículos de aves y huevos, carne de cerdo, res, cordero, pescado y mariscos, y alimentos derivados de la carne precocinados), (2) verduras y legumbres, (3) frutas y nueces, (4) productos lácteos, (5) cereales (incluidos pan y pasta), (6) salsas y condimentos, (7) aceites y grasas, (8) dulces y bocadillos, (9) vitaminas y suplementos minerales, (10) bebidas alcohólicas y otras bebidas.

Algunas preguntas sobre hábitos alimenticios generales se incluyeron en el cuestionario y se usaron para ajustar las respuestas al CFA siguiendo la metodología descrita en Calvert et al. [137] .

3.1.1- Aspectos éticos

El protocolo del estudio MCC-Spain fue aprobado por los comités de ética de los centros participantes. Todos los participantes fueron informados sobre los objetivos del estudio y firmaron un formulario de consentimiento informado (ANEXO V). La confidencialidad de los datos se aseguró mediante la eliminación de identificadores personales en los conjuntos de datos, (Ley orgánica 3/2018, de 5 de diciembre de Protección de datos personales y garantía de los derechos digitales). La base de datos se registró en la Agencia Española de Protección de Datos, número 2102672171.

3.1.2- Desarrollo de herramientas metodológicas

En primer lugar, se planificaron y dimensionaron las plantillas para la organización de la información, de manera que el análisis y entrecruzamiento de las tablas de contingencia se pudieran realizar de la manera más eficiente posible. Para ello, los cálculos se realizaron en primer lugar, manualmente para comprender con mayor profundidad los mecanismos de extracción de datos y su cálculo.

Mediante la automatización, se consigue una mayor eficiencia en el proceso de planificación de almacenamiento de información, y en la gestión del procedimiento para desarrollar cálculos del contenido de PF en los alimentos y su consumo en los sujetos de estudio. En términos amplios y generales se siguieron los siguientes pasos:

1-Los datos se extrajeron de la base de datos europea Phenol-Explorer (PHEX) [138], recopilando información de diversas familias y subclases de PF (Figura 9). Esta extracción se realizó a través de un programa desarrollado en lenguaje Python, que será descrito como PLP-scrap a lo largo del presente documento (Figura 16-A).

2-A raíz de estas bases de datos generadas en Python [139], se realizó una corrección mediante el cálculo del consumo de PF por individuo y el cálculo del aporte de PF por alimentos con el programa R [140] (Figura 16-B).

3-Una vez generada la base de datos con el contenido de PF consumido por cada individuo se procedió al análisis estadístico de los datos a través del programa Stata 13 [141] (Figura 16-C).

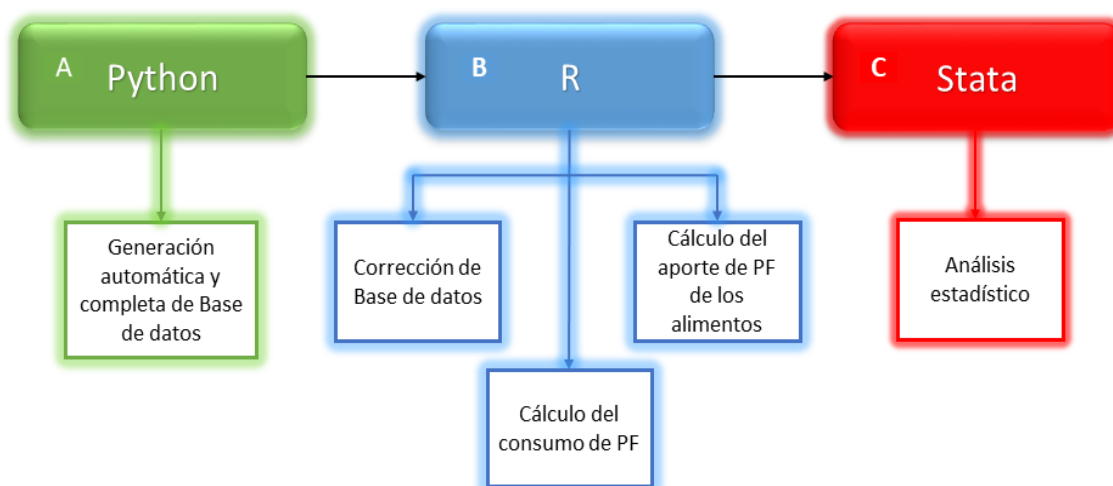


Figura 16 Esquema general de la metodología para el análisis del efecto de los PF. Elaboración propia.

3.1.3- Análisis estadístico

Las ingestas calculadas en agliconas y expresadas en mg/día de PF se ajustaron a la ingesta total de energía [142] para obtener una medida con respecto a la ingesta isocalórica de PF. Los residuos, se agregaron al consumo de PF predefinido para una ingesta de energía correspondiente a la ingesta promedio de los sujetos control y estratificados por género.

Las ingestas relativas a los cuartiles de los PF, se establecieron de acuerdo con la distribución entre los controles estratificados por género, usando la categoría de consumo más baja como referencia. El consumo de PF se transformó en \log_2 ya que los datos estaban desplazados a la derecha [143]. Por otro lado, se considera que la interpretación de \log_2 es más simple, dado que el *odds ratio* (OR) indica el riesgo de la variable estudiada al duplicar la ingesta de PF. Por lo tanto, la ingesta de PF se analizó como variable categórica (agrupando la ingesta de PF en cuartiles de su distribución entre controles) y continua (transformada en \log_2).

Se generaron dos modelos para la comparación del ajuste y los efectos de las variables. Uno mínimamente ajustado (sexo, edad y nivel socioeconómico) y

otro con todas las variables de ajuste para cada tipo de cáncer estudiado en función de los factores de riesgo conocidos. Para evaluar la asociación entre la ingesta de PF y el riesgo de cáncer, se calculó el OR con su respectivo intervalo de confianza al 95% mediante modelos de regresión logística mixta multivariante, utilizando el área de estudio como variable de efecto aleatorio.

Los análisis estadísticos fueron realizados con los paquetes estadísticos *Stata 13* [141] y R versión 3.6 [144].

-Modelos de ajuste para CM:

Se generó un modelo para cada subtipo de CM, ajustado por edad, IMC, consumo de tabaco, consumo de alcohol, nivel socioeconómico, historia familiar de CM, actividad física, energía, consumo de antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), edad de menarquia, número de hijos, consumo de NSAID, terapia de reemplazo hormonal, contraceptivos orales y energía, aleatorizadas por área geográfica.

-Modelos de ajuste para CG:

Se generó un modelo para cada subtipo de CG, ajustado por edad, IMC, fumador, consumo de alcohol, consumo de sodio, total de energía, antecedentes familiares, actividad física, nivel socioeconómico, consumo de vegetales, carnes rojas, y sexo, aleatorizadas por área geográfica.

3.2 StoP-Project

StoP-Project es un consorcio internacional de estudios epidemiológicos relacionados con el cáncer gástrico. Los criterios de inclusión para la participación en el estudio son: diseño de estudio de casos y controles, incluidos casos y controles anidados en 30 estudios de cohortes [145]. Los estudios participantes fueron reclutados a través de contactos personales de investigadores participantes, que fueron identificados mediante búsquedas en bases de datos electrónicas, incluidos Medline y Embase. Los investigadores principales de estos estudios fueron contactados e invitados a participar en el consorcio. Todos los conjuntos de datos de los estudios fueron recopilados, validados y armonizados a través de una coordinación centralizada.

3.2.1 Análisis estadístico

Fueron analizados los CFA de los 35 estudios para determinar cuáles contenían suficiente información sobre el consumo de alimentos con PF. De ellos, 10 estudios fueron seleccionados: dos procedentes de Italia [146,147], uno de Grecia [148], uno de Rusia [149], uno de Portugal [58], dos de España [53,134] y tres de México [150-152].

El proceso para realizar la base de datos con el contenido de PF y el cálculo del consumo de PF ha sido realizado acorde al punto 3.1.2.

Al igual que el estudio MCC-Spain, en el StoP-Project las ingestas de PF se ajustaron a la ingesta total de energía [142]. Los residuos, se agregaron al consumo de PF predefinido para una ingesta de energía correspondiente a la ingesta promedio de los sujetos control y estratificados por género.

Las ingestas calculadas en agliconas y expresadas en mg/día relativas a los cuartiles de PF, se establecieron de acuerdo con la distribución entre los controles estratificados por género, usando la categoría de consumo más baja como referencia. El consumo de PF se transformó en \log_2 para un incremento del consumo igual a 1 desviación estándar (computada sobre los controles) [143].

Se analizaron todas las variables armonizadas disponibles en los estudios para realizar el mismo ajuste en todos ellos. Se generaron dos modelos para la comparación del ajuste y los efectos de las variables. Uno mínimamente ajustado (sexo, edad y nivel socioeconómico) y otro ajustado por sexo, edad, nivel socioeconómico, consumo de alcohol, índice de masa corporal, tabaquismo y consumo de sal.

Se realizó un metaanálisis mediante cálculos basados en dos etapas. En primer lugar, se calculó el OR y su correspondiente intervalo de confianza del 95% para cada PF y cada estudio incluido, mediante modelos de regresión logística mixta multivariante, y en segundo lugar se realizó el metaanálisis por efectos fijos con estos resultados. Los análisis estadísticos fueron realizados con los paquetes estadísticos *Stata 13* [141] y R versión 3.6 [144].

Resultados

4-Resultados

4.1 Desarrollo de algoritmos

La generación automática de bases de datos se realiza con diversos programas y extensiones (Figura 16), creando una malla de programas que permiten la extracción directa de información de la PHEX para el cálculo del consumo de las distintas clases/compuestos de PF y las ponderaciones del aporte de los alimentos de manera completamente automática. Esta malla de programas y extensiones se realizó a partir de Python y R, utilizando distintas herramientas para su desarrollo como Sublime Text, XPath, CroPath, Shell, Pillow, Java C++ 14, y un entorno virtual. Este entorno virtual facilita ejecutar una determinada aplicación, sin afectar al sistema o a otros procesos.

4.1.1- PLP-scrap

La concentración de PF de la base de datos PHEX, es un punto de gran importancia para la obtención de datos fiables y realistas; por esta razón se creó un programa, denominado *PLP-scrap* (ANEXO I, nº LE-168-2019) para la extracción automática de la extensa y diversa información sobre PF contenida en PHEX. *PLP-scrap* anula la posibilidad de cometer errores al transcribir los datos, disminuye significativamente el tiempo de generación de bases de datos para cualquier modificación o futura investigación con PF, incrementa la eficiencia para el análisis de datos, reduce el tiempo de comprobación y corrección de la base de datos y, por último, posibilita el manejo de información tanto en agliconas como glucósidos a partir de todas las técnicas disponibles en PHEX.

Los datos utilizados para calcular los flavonoides, lignanos, estilbenos, ácidos fenólicos y otros PF se diversifican en cromatografía (C), cromatografía tras hidrólisis (CH), ensayo Folin y HPLC en fase normal, todos ellos de PHEX. Dependiendo de la metodología de cuantificación utilizada para conocer la concentración de PF en los alimentos, los resultados se pueden expresar en mg de aglicona /100g, en mg de glucósido/100mg o mg de PF/100g de alimento (Figura 17).

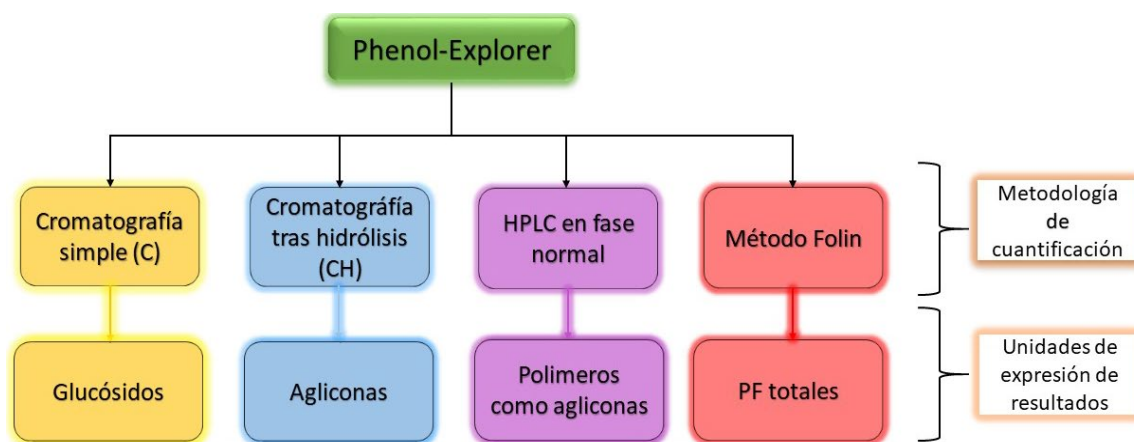


Figura 17 Representación de las distintas metodologías de cuantificación de PF y las unidades de expresión de resultados. Elaboración propia.

En los datos obtenidos a partir de cromatografía (C), se llevó a cabo la transformación de los mg de glucósidos a mg de aglicona, a partir de la ecuación 1 (ec.1) o en su defecto a través del cambio a equivalentes de aglicona en PHEX.

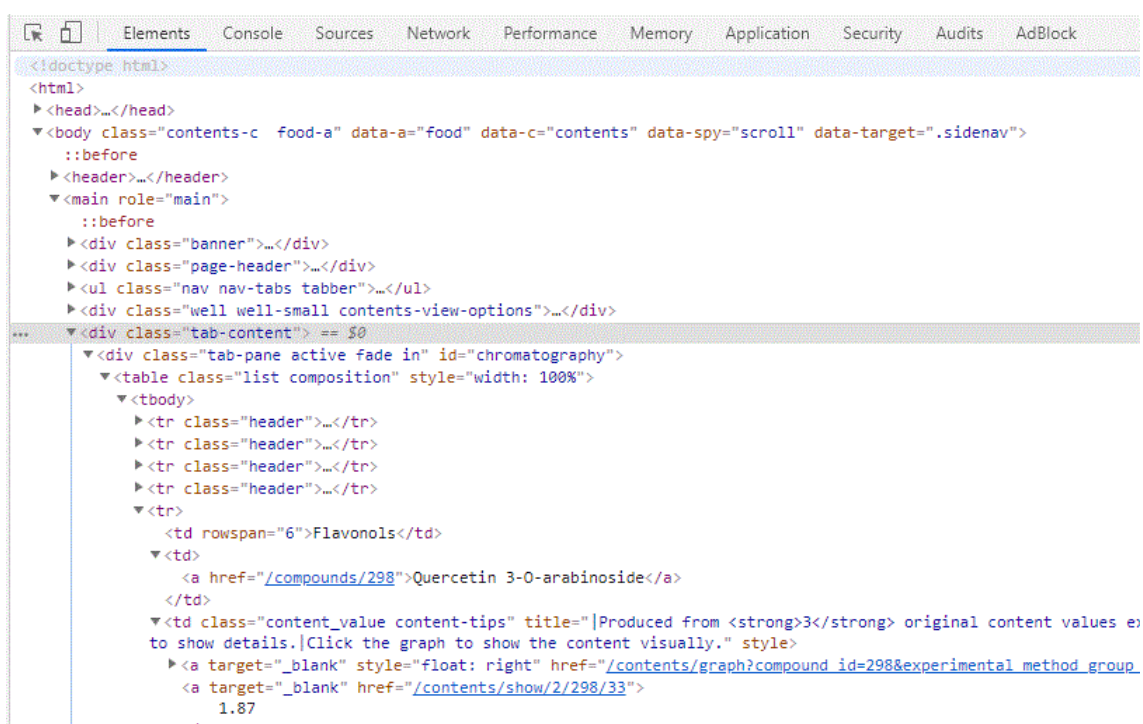
$$\text{Peso aglicona } \frac{\text{mg}}{100 \text{ mg}} = \left(\frac{[\text{glucósido}]}{\text{Peso molecular glucósido}} \right) \times \text{Peso molecular aglicona} \quad (\text{Ec.1})$$

Este cálculo se realizó principalmente por tres razones. En primer lugar, para obtener una base de datos con el mayor número de datos sobre PF, dado que es posible la transformación glucósido→aglicona pero no aglicona→glucósido, perdiendo información si sólo se calcula con C. En segundo lugar, porque las agliconas son la parte activa y como se mencionó con anterioridad, los glucósidos de los PF son transformados e hidrolizados. Y, en tercer lugar, si se tiene en cuenta el peso de los glucósidos, estamos sobreestimando el consumo de los PF, y podría afectar al comportamiento y resultado de los modelos matemáticos que se llevarán a cabo en etapas posteriores de la investigación.

Debido a las diferencias en el contenido de PF entre técnicas, se realizaron diferentes modelos para el cálculo de contenido de PF para cada alimento.

4.1.2- Programación de PLP-scrap

PLP-scrap (ANEXO I) es un conjunto de scripts que formarán entre ellos un *bot* (programa informático que posee la capacidad automática de interactuar con la base de datos PHEX y extraer la información contenida en ciertos puntos del código HTML). Previamente a la programación de los *bots* de *scraping* o “minado de datos”, es necesario comprender y detectar los patrones de programación de las “hojas de estilo en cascada” (CSS) de PHEX (Figura 18) que se encuentran en el código HTML.



```

<!doctype html>
<html>
  <head>...</head>
  <body class="contents-c food-a" data-a="food" data-c="contents" data-spy="scroll" data-target=".sidenav">
    ::before
    <header>...</header>
    <main role="main">
      ::before
      <div class="banner">...</div>
      <div class="page-header">...</div>
      <ul class="nav nav-tabs tabber">...</ul>
      <div class="well well-small contents-view-options">...</div>
      ...
      <div class="tab-content"> == $0
        <div class="tab-pane active fade in" id="chromatography">
          <table class="list composition" style="width: 100%">
            <tbody>
              <tr class="header">...</tr>
              <tr class="header">...</tr>
              <tr class="header">...</tr>
              <tr class="header">...</tr>
              <tr>
                <td rowspan="6">Flavonols</td>
                <td>
                  <a href="/compounds/298">Quercetin 3-O-arabinoside</a>
                </td>
                <td class="content_value content-tips" title="|Produced from <strong>3</strong> original content values e) to show details.|Click the graph to show the content visually." style">
                  <a target="_blank" style="float: right" href="/contents/graph?compound_id=298&experimental_method_group">
                    <a target="_blank" href="/contents/show/2/298/33">
                      1.87
                    </a>
                  </a>
                </td>
              </tr>
            </tbody>
          </table>
        </div>
      </div>
    </main>
  </body>
</html>

```

Figura 18 Código HTML de PHEX en el que se aprecia la estructura CSS. Elaboración propia.

Los patrones de CSS permitirán crear un *bot* que interactúe con PHEX para extraer información concreta. En este caso, el *bot* fue desarrollado para extraer el “nombre del alimento”, “clase de PF”, “compuesto” y su “contenido de PF” para C (tanto en glucósido como aglicona), CH, HPLC en fase normal y ensayo Folin, generando un archivo para cada metodología (Figura 19).

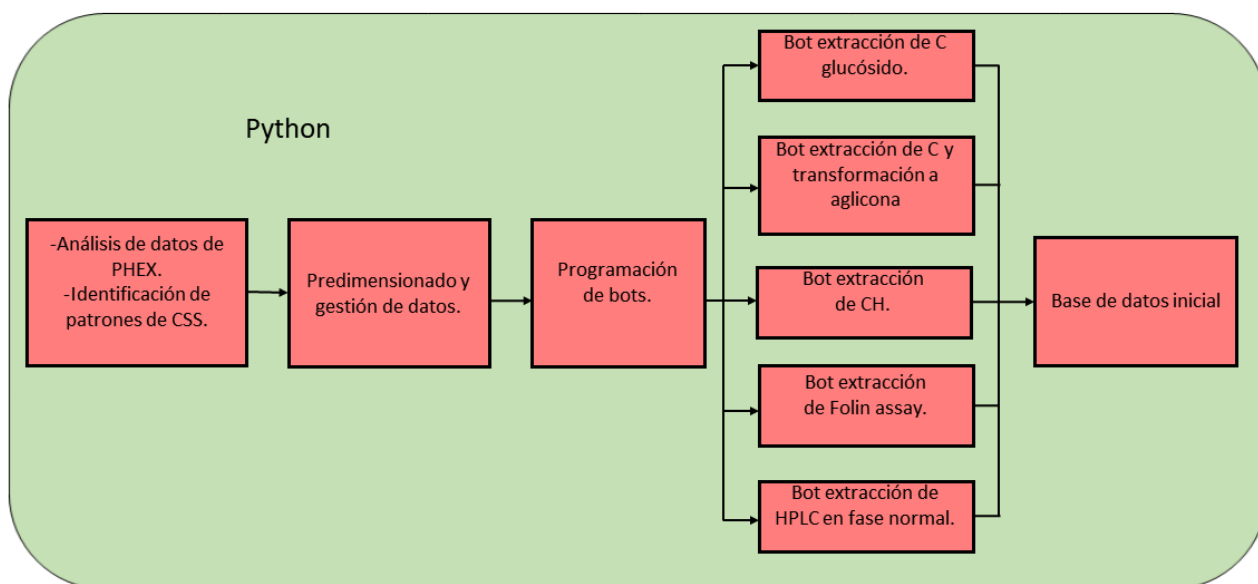


Figura 19 Metodología de creación de bots y formato de los resultados. Elaboración propia.

La estructura de cada bot consta de cinco scripts (ANEXO I), cada uno con una función concreta e intercomunicados entre sí para extraer información concreta, incluida en el código CSS:

- `Items.py`: Script donde se configuran los campos de *scraping*, es decir, el punto de partida del bot, y se define la variable inicial, lugar donde se recibe y almacena la información predeterminada por `Settings.py` y `Spider.py`.
- `Settings.py`: Script que configura el bot, encargado de ejecutar las órdenes de `Items.py`, así como el tipo de archivo (.xls,.csv,.json...) que se espera de respuesta, entre otras funciones.
- `Spider.py`: En este script se asignan las variables, las órdenes de extracción de datos y la manera de interactuar con la página web donde se encuentra la base de datos de PHEX.
- `Middleware.py`: Este script actúa como un puente entre `Items.py`, `Settings.py` y `Spider.py` con la página web PHEX.
- `Pipeline.py`: Este script envía la información entre `Items.py`, `Settings.py` e `Spiders.py` con `Middleware.py`.

4.1.3- Programación de PLP-calculator

Este programa está ideado de manera que el investigador no precise de conocimientos de programación para poder realizar los cálculos. El programa consiste en un conjunto de bucles, que permiten que los cálculos se realicen de forma automática, evitando la interacción del usuario con el código de programación. Esto se consigue generando un script para cada una de las funcionalidades e indicando al usuario a través de pantallas emergentes los datos que debe introducir y los lugares dónde se pretenden almacenar los resultados (Figura 20), simplificando las 1544 líneas de comando a 3 líneas: una para la creación de la base de datos, otra para el cálculo del consumo de PF de cada individuo y la última para el aporte de los alimentos a cada subclase de PF. Asimismo, el conjunto de comandos, están incluidos en el script, posibilitando modificaciones.

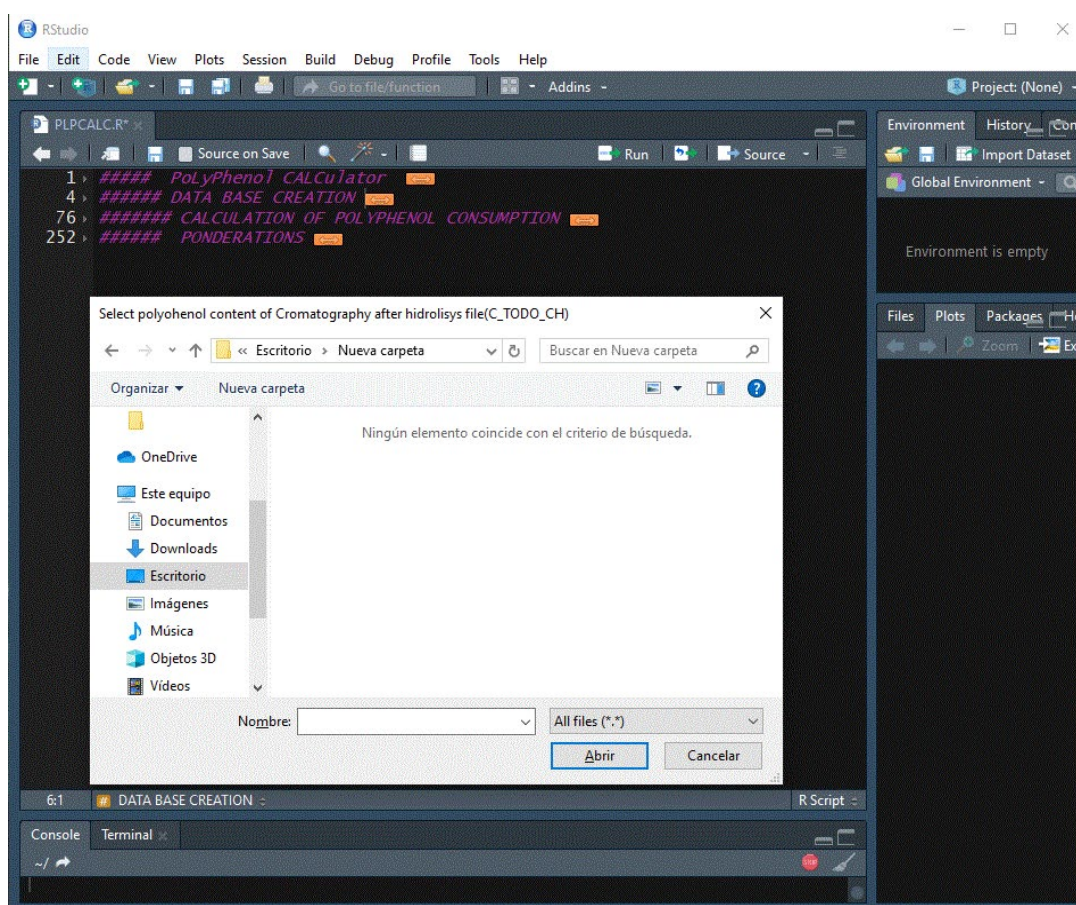


Figura 20 Pantalla emergente indicando al usuario que elija el archivo con el contenido de CH y las líneas de comando para el uso de algunas funcionalidades. Elaboración propia.

Por otra parte, se mantiene el desplegable que posibilita el acceso a las órdenes y que permite realizar cálculos específicos para cada estudio. Durante el desarrollo de este programa, también se contemplaron las limitaciones de hardware de los ordenadores, dado que los resultados de los cálculos pueden consumir grandes cantidades de memoria RAM y almacenamiento. Por lo que, dependiendo de las características de cada ordenador y el tamaño del proyecto de investigación, estas características impedirían la realización de estos cálculos principalmente por la saturación de memoria RAM. Para posibilitar la consecución de los mismos se tomaron las siguientes medidas:

-Los bucles están diseñados para realizar y almacenar cálculos sobre los alimentos que tienen determinada clase o compuesto fenólico, evitando barridos multinivel. Esto quiere decir, que no se calcula más de una clase de PF o compuesto fenólico al mismo tiempo.

-Dado que se precisa más de un cálculo para conocer el consumo de cada PF de los individuos estudiados, los resultados intermedios se almacenan y se sobrescriben de manera que no existen resultados duplicados, y únicamente se cargan los archivos con los que se está trabajando.

Además, se diseñó teniendo en cuenta un sistema de almacenamiento de archivos temporales para los cálculos intermedios, evitando así que el usuario trabaje sobre resultados obtenidos anteriormente, y desechando todos los resultados intermedios que consumen una elevada cantidad de recursos, indicándole al final de los cálculos al usuario dónde quiere almacenar los resultados finales. Esto imposibilita que el usuario utilice datos que no son los resultados finales, dado que los pasos intermedios pueden llevar a confusión si no se comprende el mecanismo del programa.

El mecanismo de cálculo de PF, fue desarrollado en 3 partes que posibilitan la realización de otros cálculos no relacionados con el cálculo de PF, como es la ponderación del aporte de PF de los alimentos.

Parte 1:

Sobre las bases de datos generadas anteriormente con PLP-scrap, se generó un script en R para llevar a cabo varias tareas de forma automática (Figura 21). Entre ellas, se realizaron una serie de correcciones, dado que PHEX contiene errores en la clasificación de algunos PF, como, por ejemplo, el ácido cafeico, el

ácido gálico, el ácido p-cumárico y el ácido ferúlico. Estos errores se deben principalmente a que tienen en cuenta alguno de los compuestos de los glicósidos que no forman parte de una misma clase.

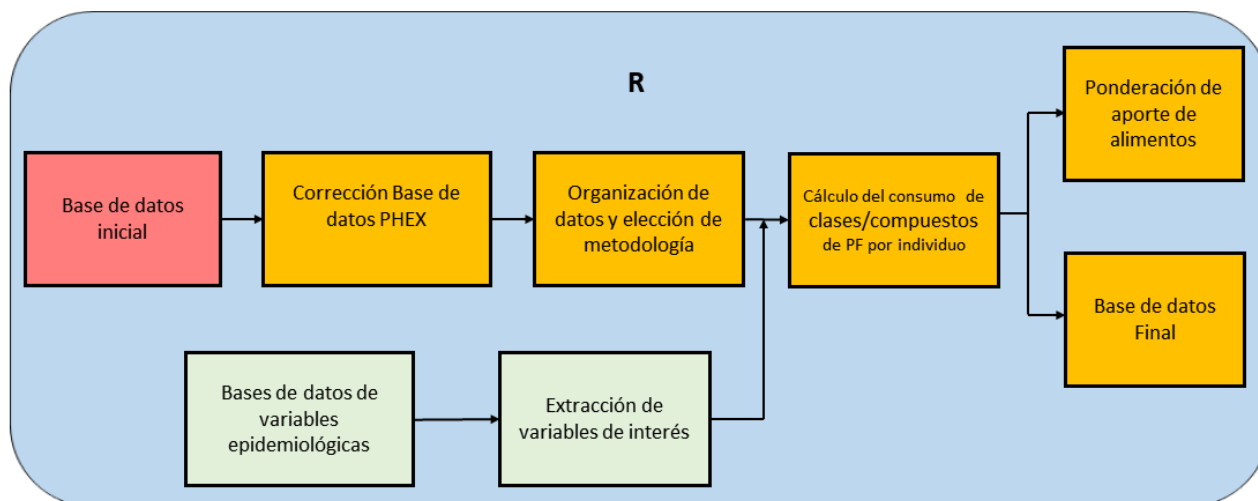


Figura 21 Esquema de funciones de PLP-Calculator. Elaboración propia.

A raíz de estos archivos, se genera la base de datos "C_TODO_VERSIONES". En esta base de datos se almacena la información de PF extraída de PHEX, y sobre ella se generarán nuevas variables para la ponderación de la metodología de cuantificación de PF. Estas nuevas variables, que reciben el nombre de "contentX", corresponden a la concentración de agliconas, haciendo "X" referencia a la metodología utilizada para la ponderación de los resultados de C y CH. Estas ponderaciones son necesarias debido a que existen una serie de casos en los cuales sólo se dispone de información de C y CH; de esta manera se minimiza la variación del contenido de PF entre los distintos métodos y se amplía el número de datos de contenido en PF para cada alimento. Las distintas columnas contentX se obtienen de la siguiente manera:

- Content1= Sólo contiene los valores de C.
Content2= Contiene sólo los datos de CH.
- Content3= Contiene los datos de CH, y cuando no se obtienen datos de este método de cuantificación de PF, se utilizan los datos de C.

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

- Content4= Contiene los datos de C, y cuando no hay datos de ese método de cuantificación de PF, se completa con datos de CH.

Dado que existe un mayor número de datos obtenidos a través de C, el enfoque planteado para el uso de datos sobre el contenido de PF, se basó en el uso de content4. A partir del contenido de esta columna se realizaron los cálculos del consumo de PF de cada individuo (Figura 22).

	title	class	subclass	content2	content	content3	content4
1	Almond, dehulled	Lignans	Secoisolaricresinol	0.08	NA	0.08	0.08
2	Apple [Cider], juice from concentrate	Dihydrochalcones	Phloretin	NA	0.86	0.86	0.86
3	Apple [Cider], juice from concentrate	Flavanols	(+)-Catechin	NA	0.11	0.11	0.11
4	Apple [Cider], juice from concentrate	Hydroxybenzoic acids	Gallic acid	NA	0.04	0.04	0.04
5	Apple [Cider], juice from concentrate	Hydroxybenzoic acids	Protocatechuic acid	NA	0.07	0.07	0.07
6	Apple [Cider], juice from concentrate	Hydroxycinnamic acids	Caffeic acid	NA	2.12	2.12	2.12
7	Apple [Cider], juice from concentrate	Hydroxycinnamic acids	Ferulic acid	NA	0.2	0.2	0.2
8	Apple [Cider], juice from concentrate	Hydroxycinnamic acids	p-Coumaric acid	NA	0.71	0.71	0.71
9	Apple [Cider], peeled	Dihydrochalcones	Phloretin	NA	3.15	3.15	3.15
10	Apple [Cider], peeled	Flavanols	(-)-Epicatechin	NA	28.67	28.67	28.67
11	Apple [Cider], peeled	Flavanols	(+)-Catechin	NA	5.56	5.56	5.56
12	Apple [Cider], peeled	Flavanols	Procyanidin dimer B1	NA	6.42	6.42	6.42
13	Apple [Cider], peeled	Flavanols	Procyanidin dimer B2	NA	19.6	19.6	19.6
14	Apple [Cider], peeled	Flavanols	Quercetin	NA	0.19	0.19	0.19
15	Apple [Cider], peeled	Hydroxycinnamic acids	Caffeic acid	NA	25.08	25.08	25.08
16	Apple [Cider], peeled	Hydroxycinnamic acids	p-Coumaric acid	NA	3.23	3.23	3.23
17	Apple [Cider], whole	Flavanols	Quercetin	NA	3.82	3.82	3.82
18	Apple [Dessert], juice from concentrate	Dihydrochalcones	Phloretin	NA	0.69	0.69	0.69
19	Apple [Dessert], juice from concentrate	Flavanols	(-)-Epicatechin	NA	0.02	0.02	0.02
20	Apple [Dessert], juice from concentrate	Flavanols	(+)-Catechin	NA	0.04	0.04	0.04
21	Apple [Dessert], juice from concentrate	Flavanols	Procyanidin dimer B1	NA	0.03	0.03	0.03
22	Apple [Dessert], juice from concentrate	Flavanols	Procyanidin dimer B2	NA	0.0075	0.0075	0.0075
23	Apple [Dessert], juice from concentrate	Flavanols	Procyanidin dimer B4	NA	0.02	0.02	0.02

Figura 22 Ejemplo de la base de datos C_TODO_VERSIONES. Fuente propia.

Independientemente a la base de datos “C_TODO_VERSIONES”, se deben generar dos tablas, una con la ponderación de cada alimento de los ítems del CFA que se denomina “RPon” (Figura 23) y otra sólo con los alimentos que contienen PF con una columna vacía para cada alimento (Figura 24), que será completada por el *PLP-Calculator*. Como ejemplo, en la Figura 23 se puede observar que el código 3400 del CFA de MCC-Spain aporta información sobre el consumo de lechuga, dado que no se especifica qué lechuga es la consumida y en PHEX existe información sobre lechuga, se pondera con un 50% la lechuga verde y un 50% la lechuga roja.

Nombre Phenol-explorer	Lettuce [Green], raw	Lettuce [Red], raw	Endive [Curly], raw	Endive [Escarole], raw	Tomato [Cherry], whole, raw	Tomato, whole, raw	Cucumber, raw
3400	0.5	0.5	NA	NA	NA	NA	NA
3500	NA	NA	0.5	0.5	NA	NA	NA
3600	NA	NA	NA	NA	0.5	0.5	NA
3700	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
3800	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3900	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4000	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Figura 23 Ponderaciones de los ítems de la CFA de MCC-Spain del archivo RPon. Elaboración propia.

id_study	id_entericos	area	plaus	fibra	fre3400	gra3400	fre3500	gra3500	fre3600	gra3600
8-1-0001	10-0001-1	87%	plausible	1.21980120	0	1.906697	0	3.268624	0	17.771482
8-1-0002	10-0002-1	87%	plausible	0.67501342	0	22.131100	0	0.000000	0	63.231712
8-1-0003	10-0003-1	87%	plausible	1.63669750	0	0.000000	0	2.372938	0	3.954897
8-1-0004	10-0004-1	87%	plausible	1.02576720	0	16.069883	0	17.524410	0	45.913952
8-1-0005	10-0005-1	87%	plausible	0.96315020	0	1.791608	0	0.000000	0	5.157661
8-1-0007	10-0007-1	87%	plausible	1.00838170	0	0.000000	0	0.000000	0	0.000000
8-1-0008	10-0008-1	87%	plausible	1.51703980	0	11.942768	0	0.000000	0	34.380695
8-1-0011	10-0011-1	87%	plausible	1.20435230	0	4.617717	0	7.916086	0	30.825878
8-1-0012	10-0012-1	87%	plausible	0.82509315	0	19.336557	0	0.000000	0	27.623653
8-1-0014	10-0014-1	87%	plausible	0.50859928	0	0.000000	0	2.368896	0	3.948160
8-1-0015	10-0015-1	87%	plausible	2.31422850	0	0.000000	0	0.000000	0	0.000000
8-1-0016	10-0016-1	87%	plausible	0.90691072	0	9.141090	0	15.670442	0	26.117403
8-1-0018	10-0018-1	87%	plausible	0.73076367	0	0.000000	0	0.000000	0	4.100000
8-1-0019	10-0019-1	87%	plausible	0.77734822	0	4.457329	0	0.000000	0	12.735227
8-1-0020	10-0020-1	87%	plausible	0.98625010	0	11.960785	0	8.775799	0	53.721012

Figura 24 Consumo en gramos de los alimentos por los individuos, archivo GraPon. Elaboración propia.

Parte 2:

PLP-Calculator fue diseñado de manera que posibilita la extracción o comprobación de datos en cada una de sus fases. De esta manera se pueden utilizar sus valores intermedios para realizar otros cálculos, como pueden ser la extracción del consumo de cada compuesto en lugar de cada clase o el aporte de cada alimento a cada subclase de PF.

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

El primer paso en R es el cálculo del contenido de todos los compuestos de PF de una misma clase, por la ponderación que hemos adjudicado a cada elemento, por lo tanto, se cruzan la tabla R_{Pon} con la base de datos "C_TODO_VERSIONES".

Para ejemplificar el mecanismo, se usará el cálculo de los flavonoles de la lechuga del ítem 3400 (lechuga), aunque el programa realiza este cálculo para todos los alimentos que contengan flavonoles (Ec. 2 y 3) (Figura 25).

$$[\text{Flavonoles en alimento}] = C_TODO_VERSIONES * R_{Pon} \quad (\text{EC. 2})$$

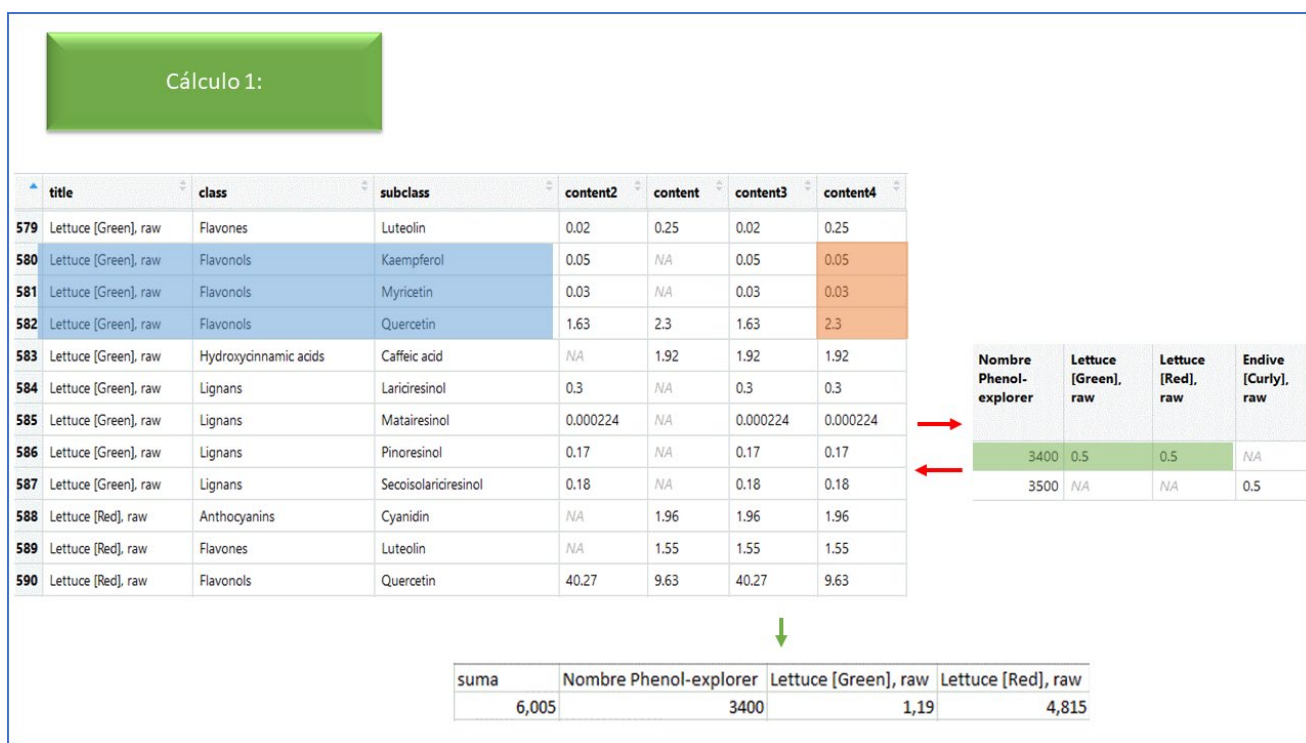


Figura 25 Cálculo de contenido de PF de cada ítem del CFA. Elaboración propia.

$$[\text{Código 3400}] = ([\text{Contenido flavonoles lechuga verde}] * [\text{Ponderación}]) + ([\text{Contenido lechuga roja}] * [\text{Ponderación}]) \quad (\text{Ec. 3})$$

$$[\text{Código 3400}] = [(0.05 + 0.03 + 2.3) \times 0.5] + [(9.63) \times 0.5] = [1.4] + [4.815] = 6.005 \text{ mg de flavonoles}$$

De esta manera, obtenemos en la primera columna el contenido de cada clase de PF de cada ítem de alimento.

Parte 3:

Una vez almacenado el contenido de cada clase de PF de cada ítem de alimento (cálculo 2), se calcula el consumo de cada clase de PF de cada individuo (Ec. 4), siendo el resultado final la suma del aporte de cada ítem (cálculo 3) (Figura 26).

$$[\text{Consumo de flavonoles}] = \frac{(\text{Consumo individuo} \times \text{Contenido de flavonoles})}{100} \quad (\text{Ec. 4})$$

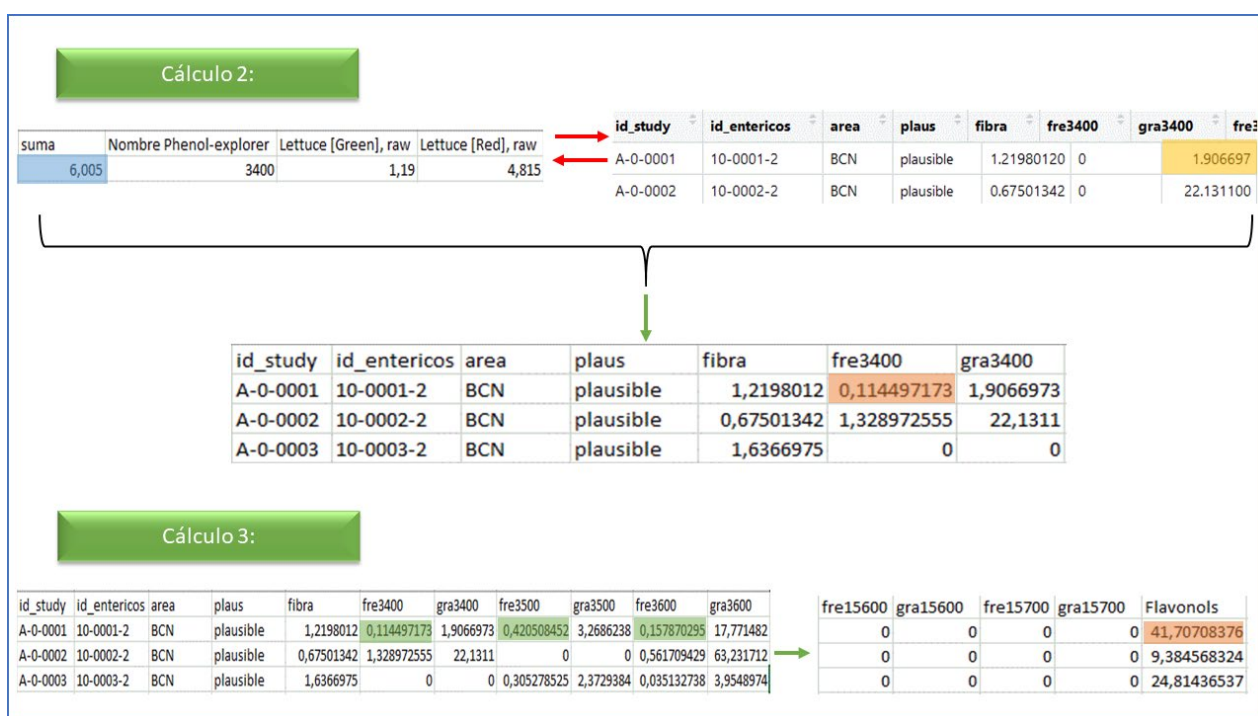


Figura 26 Esquema de los cálculos 2 y 3. Elaboración propia.

Una vez realizados estos cálculos, se obtiene una base de datos con el consumo por individuo de las 26 clases de PF.

4.1.4-Comprobación del PLP-scrap y PLP-calculator

Tras la realización del programa, tres expertos en distintas ramas (informática, estadística y PF) y universidades, comprobaron el correcto funcionamiento del mismo en el estudio MCC-Spain. Una vez realizada esta comprobación, se llevaron a cabo colaboraciones con distintos estudios a nivel nacional e internacional. Dentro de estas colaboraciones, se realizaron y comprobaron los datos a través de verificación con los estudios SUN (estudio de la Universidad de Navarra) y PREDIMED (estudio de todo el territorio nacional). Los resultados de estas dos colaboraciones indicaron que los programas ayudaban a detectar los errores producidos por la transcripción manual, corregir errores de la base de datos PHEX y errores de cálculo del consumo, teniendo como resultado final una coincidencia del 100% en los resultados. Además, también se realizaron los cálculos del consumo de PF para el consorcio internacional StoP-Project, que incluye 35 proyectos, y del que 10 contenían información suficiente para realizar estos cálculos, consiguiéndose los resultados en 5 días.

Una vez realizadas las correspondientes comprobaciones de los códigos de programación, se llevó a cabo el registro de propiedad del PLP-scrap (ANEXO I, Código LE-168-2019) y se encuentra en trámites de presentación al registro de la propiedad el código del PLP-calculator.

4.2- Consumo de polifenoles y Cáncer de mama

Para evaluar la influencia del consumo de PF y el riesgo de CM se utilizaron los datos recogidos en el estudio MCC-Spain, el cual incluye 1472 casos y 1577 controles, tras la eliminación de los individuos con datos faltantes (Figura 27).

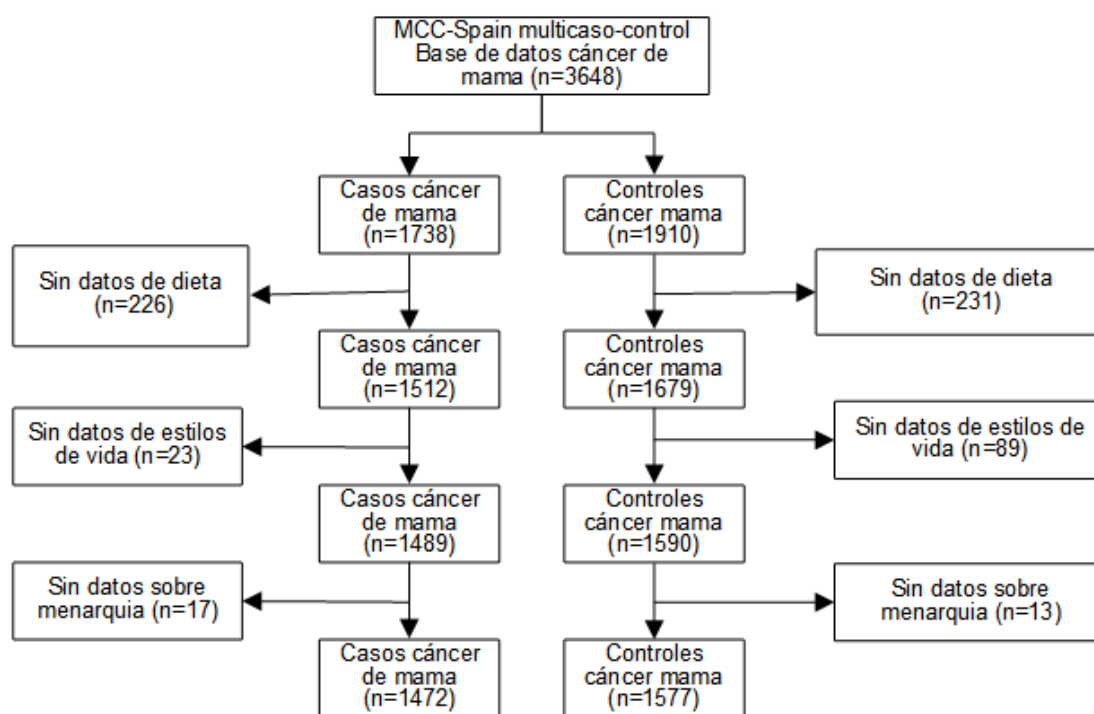


Figura 27 Algoritmo del número de individuos aceptados al eliminar datos faltantes.

Las características de las mujeres y los factores sociodemográficos se muestran en la Tabla 2. En cuanto a los casos y controles, podemos observar que el número de mujeres con antecedentes familiares de CM es mayor en los casos que en el grupo control.

Respecto al IMC el número de mujeres con un IMC ≥ 30 kg/m² es similar a las mujeres con un IMC < 30 kg/m². El consumo de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) es similar en ambos grupos, aunque ligeramente superior en los casos. Respecto al consumo de alcohol (g/día), el 85,6% de los controles y el 84,6% de los casos se distribuyen en consumo bajo a moderado.

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

Tabla 2 Características de los sujetos de estudio en CM.

Variables	Total	Controles	Casos	Premenopausia		Postmenopausia	
	n=3049	n=1577	n=1472	Controles n = 471	Casos n= 535	Controles n= 1106	Casos n= 937
Status socio-económico							
Alto (%)	519(17,0)	281(17,8)	238(16,2)	143(30,3)	129(25,3)	138(12,5)	109(11,6)
Medio (%)	1603(52,6)	8170(51,9)	786(53,4)	265(56,4)	335(62,5)	552(49,9)	452(48,2)
Bajo (%)	927(30,4)	479(30,3)	448(30,4)	63(13,4)	71(13,3)	416(37,6)	377(38,8)
Fumador/no fumador (%)							
Sí	1299(42,6)	639(40,5)	660(44,9)	261(55,3)	328(61,4)	378(34,2)	332(35,4)
No	1750(57,4)	938(59,5)	812(55,1)	210(44,7)	207(38,6)	728(65,8)	605(64,6)
Antecedentes familiares de CM (%)							
Sí	357(11,7)	145(9,2)	212(14,4)	25(5,3)	77(14,4)	120(10,9)	135(14,4)
No	2692(88,3)	1432(90,8)	1260(85,6)	446(94,7)	458(85,6)	986(89,2)	802(85,6)
NSAID (%)							
Sí	1463(48)	807(51,1)	656(44,6)	240(50,9)	235(43,8)	567(51,3)	421(44,9)
No	1586(52,0)	770(48,9)	816(55,4)	231(49,2)	300(56,2)	539(48,7)	516(55,1)
IMC (kg/m²)							
<30kg/m ²	2527(82,9)	1313(83,3)	1214(82,4)	417(88,6)	491(91,8)	896(81,0)	723(77,2)
>=30kg/m ²	522(17,1)	264(16,7)	268(17,6)	54(11,4)	44(8,2)	210(19)	210(22,8)
Consumo de alcohol(g/d)							
0g/d	758(25,0)	401(25,6)	357(24,5)	97(20,8)	97(19,4)	304(27,5)	260(27,8)
0-12g/d	1852(60,6)	965(61,0)	887(60,1)	320(67,8)	367(68,2)	645(58,3)	520(55,5)
12-47g/d	394(12,9)	192(12,2)	202(13,7)	50(10,6)	62(11,1)	142(12,8)	140(14,8)
>47g/d	45(1,5)	19(1,2)	26(1,8)	4(0,9)	9(1,3)	15(1,4)	17(1,8)
Actividad física							
0 METS*h/semana	1221(40,0)	592(37,6)	629(42,6)	207(44,1)	242(45,2)	385(34,8)	387(41,3)
0-8METS*h/semana	486(15,9)	257(16,3)	229(15,5)	86(18,2)	101(18,8)	171(15,6)	128(13,7)
8-16 METS*h/semana	417(13,7)	227(14,4)	190(12,9)	66(14,0)	71(13,4)	161(14,6)	119(12,7)
>16 METS*h/semana	925(30,4)	501(31,7)	424(28,9)	112(23,7)	121(22,6)	389(35,2)	303(32,3)
Consumo de contraceptivos orales							
Nunca	1555(51,0)	792(50,2)	763(51,8)	139(29,7)	178(33,2)	653(59,0)	585(62,4)
Siempre	1494(49,0)	785(49,8)	709(48,2)	332(70,3)	357(66,8)	453(41)	352(37,6)
Terapia de reemplazo hormonal							
Nunca	2738(89,8)	1403(89,0)	1335(90,7)	471(99,8)	534(99,6)	933(84,4)	801(85,5)
Siempre	225(7,4)	121(7,7)	104(7,1)	1(0,2)	1(0,2)	120(10,8)	103(11)
Desconocido	86(2,9)	53(3,5)	33(2,3)	0(0,0)	1(0,2)	53(4,8)	33(3,5)
Nº de hijos							
0	611(20,0)	303(19,2)	309(20,9)	132(28)	137(25,8)	171(15,4)	171(18,2)
1	5329(17,3)	251(16,0)	278(18,8)	114(34,4)	136(25,4)	137(12,4)	142(15,1)
2	1221(40,1)	629(39,9)	592(40,3)	183(38,8)	215(40,1)	446(40,4)	377(40,4)
>2	688(22,5)	394(24,9)	294(19,9)	42(8,9)	47(8,8)	352(31,8)	247(26,3)
Menarquia							
<11 años	175(5,8)	81(5,3)	94(6,4)	23(4,9)	31(5,8)	58(5,4)	63(6,7)
12-14 años	2516(82,5)	1305(82,7)	1211(82,3)	413(87,7)	460(85,8)	892(80,5)	751(80,2)
>14 años	358(11,8)	191(12,1)	167(11,4)	35(7,4)	44(8,4)	156(14,1)	123(13,1)

Según la clase socioeconómica, diferenciando entre las mujeres post- y premenopáusicas, podemos observar que las mujeres postmenopáusicas tienen una clase socioeconómica más baja que las mujeres premenopáusicas. Al comparar la categoría de consumo de tabaco, el 65% de las mujeres postmenopáusicas nunca han sido fumadoras y el 35% han sido fumadoras; por el contrario, el 40% de las premenopáusicas nunca han sido fumadoras y el 60% han sido fumadoras. En referencia al IMC, las mujeres postmenopáusicas tienen un mayor porcentaje de $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ que las mujeres premenopáusicas (Tabla 2).

El consumo de anticonceptivos (ACO) en las mujeres posmenopáusicas es más elevado que las premenopáusicas. Refiriéndose al consumo de alcohol en los controles, el 85,8% de las pacientes postmenopáusicas y el 88,6% de las premenopáusicas se distribuyen de bajo a moderado consumo. Por otra parte, referente al consumo de alcohol en los casos, el 83,3% de postmenopáusicas y el 87,6% de premenopáusicas se distribuyen en consumo bajo a moderado (inferior a 12 g/d) (Tabla 2).

Para facilitar el análisis de los resultados se realizó la Tabla 3, en la que se representan los alimentos que más aportan a cada subclase, dado que, a pesar de que un alimento sea muy consumido, no tiene porqué ser el que más PF contenga.

En la Tabla 4 y en la Figura 28, se muestran los OR ajustados y el IC 95% entre la ingesta de clases de PF y el riesgo de CM para todas las mujeres. En el análisis conjunto de todos los CM por flavonoides, sólo el grupo de estilbenos se asoció de forma estadísticamente significativa con un efecto protector ($OR_{Q4vsQ1}=0,70$, $IC95\%=0,56-0,89$, $p_{trend}=0,001$). En relación con las diferentes subclases, se observó una asociación estadísticamente significativa con efecto protector en el caso de los dihidroflavonoles ($OR_{Q4vsQ1}=0,70$; $IC95\%=0,55-0,88$, $p_{trend}=0,002$); hidroxibenzaldehídos ($OR_{Q4vsQ1}=0,75$, $IC95\%=0,59-0,95$, $p_{trend}=0,012$) e hidroxicumarinas ($OR_{Q4vsQ1}=0,73$, $IC95\%=0,57-0,93$, $p_{trend}=0,005$).

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

Tabla 3 Alimentos con mayor aporte de PF a cada clase en todos los casos y controles de CM (MCC-Spain).

	Subclases de polifenoles	Ingesta PF mg/día ± SD	Alimentos con mayor aporte de flavonoides a cada clase		
			Primero (%)	Segundo (%)	Tercero (%)
Flavonoides	Antocianinas	19,42±0,3	Cereza (39,6)	fresa (20,9)	Ciruela (15,9)
	Chalconas	0,002±0,0001	Cerveza (95)	Cerveza S/A (5)	-
	Dihidrochalconas	1,04±0,2	Manzana (73,3)	Otros zumos (26,7)	-
	Dihidroflavonoles	0,81±0,03	Vino tinto (95)	Vino Rosado/ Blanco (5)	
	Flavan-3-oles	22,74±0,3	Cacao polvo (58,1)	Chocolate (13,1)	Haba (5,6)
	Flavanonas	45,33±0,7	Zumo naranja (72,2)	Otros zumos (24,1)	Vino tinto (1,5)
	Flavonas	4,13±0,08	Alcachofa (62,9)	Apio (18,1)	Zumo naranja (1,5)
	Flavonoles	23,05±0,3	Acelga (23,1)	Habas (18,9)	Endivia (8)
	Isoflavonoides	2,26±0,1	Leche soja (93,9)	Habas (4,3)	Garbanzos (2,2)
	Proantocianidinas	24,57±0,4	Judía verde (32,5)	Manzana (23,3)	Vino tinto (11)
Lignanós	Lignanós	2,92±0,03	Aceite oliva (94,8)	Gazpacho (5,2)	-
Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxibenzoicos	13,48±0,2	Aceitunas (44,1)	Vino tinto (19,3)	Otros zumos (11,8)
	Ácidos hidroxicinámicos	149,37±1,8	Café (36,3)	Alcachofa (16,4)	Aceitunas (11,1)
	Ácidos hidroxifenilacéticos	0,55±0,02	Aceitunas (96,3)	Vino tinto (2,2)	Vino rosado/ blanco (0,6)
Estilbenos	Estilbenos	0,84±0,03	Vino tinto (76,1)	Fresa (7,7)	Vino rosado/ blanco (7,4)
Otros polifenoles	Alquilmetoxifenoles	0,72±0,02	Café (96,4)	Cerveza (3,6)	-
	Alquilfenoles	0,09±0,001	Café (83,4)	Cacao polvo (14,8)	Cerveza (1,8)
	Hidroxibenzaldehídos	0,17±0,01	Vino tinto (67,1)	Cacao polvo (9,5)	Coñac/ Ron/ whisky (7,8)
	Hidroxicumarinas	0,04±0,001	Vino tinto (58,9)	Cerveza (22,8)	Cacao polvo (11,4)
	Metoxifenoles	0,1±0,002	Café (100)	-	-
	Tirosoles	11,98±0,3	Aceitunas	Aceite oliva (11,9)	Vino tinto (2,4)
	Furanocumarinas	0,03±0,001	Apio	Otros zumos (8,4)	-

Tabla 4 Odds ratio y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% del análisis de todos los casos de CM.

Subclases de polifenoles		Cuartil	Ingesta (mg/d)	OR ^a IC (95%)	Todos los casos		
	Casos				P-tend	OR ^b (log ₂)	
Flavonoides	Antocianinas	Q1	<9,01	1	419	0,759	1,00 (0,94-1,07)
		Q2	9,1-15,65	0,91 (0,74-1,12)	338		
		Q3	15,65-25,96	0,94(0,76-1,15)	345		
		Q4	>25,96	1,03 (0,84-1,27)	370		
	Chalconas	Q1	<0,0001	1	408	0,201	0,94 (0,90-0,98)
		Q2	0,0001-0,001	1,20 (0,95-1,52)	368		
		Q3	0,001-0,003	1,11 (0,86-1,43)	341		
		Q4	>0,003	0,90 (0,71-1,15)	355		
	Dihidrochalconas	Q1	<0,29	1	400	0,839	0,99 (0,95-1,04)
		Q2	0,29-0,73	1,06 (0,86-1,31)	371		
		Q3	0,73-1,63	0,98 (0,79-1,21)	352		
		Q4	>1,63	1 (0,81-1,24)	349		
	Dihidroflavonoles	Q1	<0,03	1	491	0,002	0,96 (0,93-0,99)
		Q2	0,03-0,15	0,75 (0,61-0,93)	329		
		Q3	0,15-0,76	0,68 (0,54-0,86)	318		
		Q4	>0,76	0,70 (0,55-0,88)	334		
	Flavan-3-oles	Q1	<13,45	1	434	0,146	0,97 (0,90-1,04)
		Q2	13,45-21,15	0,95 (0,78-1,17)	371		
		Q3	21,15-30,18	0,87 (0,70-1,07)	323		
		Q4	>30,18	0,87 (0,71-1,08)	344		
Proantocianidinas	Q1	<11,48	1	402	0,914	0,99 (0,93-1,05)	
	Q2	11,48-20	1,02 (0,83-1,27)	371			
	Q3	20-31,31	1,00 (0,81-1,24)	341			
	Q4	>31,31	0,99 (0,80-1,23)	358			
Flavanonas	Q1	<18,71	1	428	0,894	1 (0,94-1,06)	
	Q2	18,71-39,01	0,92 (0,75-1,14)	351			
	Q3	39,01-61,36	0,86 (0,70-1,06)	313			
	Q4	>61,36	1,00 (0,82-1,24)	380			
Flavonas	Q1	<2,23	1	438	0,445	0,99 (0,93-1,06)	
	Q2	2,23-3,59	0,91 (0,74-1,13)	351			
	Q3	3,59-5,26	0,97 (0,78-1,19)	353			
	Q4	>5,26	0,90 (0,73-1,11)	330			
Flavonoles	Q1	<15,18	1	427	0,320	0,98 (0,90-1,08)	
	Q2	15,18-21,46	1,03 (0,83-1,27)	378			
	Q3	21,46-28,67	0,93 (0,75-1,15)	335			
	Q4	>28,67	0,93 (0,75-1,14)	332			
Isoflavonoides	Q1	<0,01	1	425	0,695	1 (0,97-1,03)	
	Q2	0,01-0,15	1,28 (1,02-1,62)	416			
	Q3	0,15-0,28	0,98 (0,74-1,28)	284			
	Q4	>0,28	1,18 (0,90-1,53)	347			
Total Flavonoides	Q1	<98,33	1	437	0,975	0,96 (0,87-1,06)	
	Q2	98,33-137,80	0,95 (0,77-1,17)	347			
	Q3	137,80-181,18	0,86 (0,69-1,06)	313			
	Q4	>181,18	1,03 (0,83-1,28)	375			
Lignanós	Lignanós	Q1	<26,8	1	442	0,527	1,01 (0,93-1,11)
		Q2	26,8-37,13	1,03 (0,84-1,27)	349		
		Q3	37,87-47,72	0,94 (0,76-1,16)	391		
		Q4	>47,72	0,96 (0,77-1,19)	290		
Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxibenzoicos	Q1	<8,05	1	432	0,560	0,94 (0,88-1,00)
		Q2	8,05-12,26	0,92 (0,75-1,13)	363		
		Q3	12,26-16,91	0,80 (0,64-0,99)	304		
		Q4	>16,91	0,97 (0,78-1,20)	373		
	Ácidos hidroxicinámicos	Q1	<83,33	1	362	0,114	1,04 (0,97-1,12)
		Q2	83,33-131,27	1,01(0,82-1,25)	339		
		Q3	131,27-187,38	1,15 (0,93-1,42)	383		
		Q4	>187,38	1,15(0,91-1,41)	388		
	Ácidos hidroxifenilacéticos	Q1	<0,13	1	397	0,745	1,01 (0,97-1,08)
		Q2	0,13-0,31	0,99 (0,79-1,23)	341		
		Q3	0,31-0,64	1,01(0,81-1,26)	357		
		Q4	>0,64	1,03 (0,84-1,28)	377		

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

		Q1	<99,26	1	364		
	Ácidos fenólicos	Q2	99,26-146,25	1,05 (0,85-1,30)	348	0,140	0,97(0,91-1,04)
		Q3	145,25-204,01	1,13 (0,91-1,39)	372		
		Q4	>204,01	1,16 (0,94-1,43)	388		
Estilbenos	Estilbenos	Q1	<0,10	1	509		
		Q2	0,10-0,24	0,71 (0,57-0,88)	322	0,001	0,96 (0,92-1,00)
		Q3	0,24-0,77	0,62 (0,49-0,78)	293		
		Q4	>0,77	0,70 (0,56-0,89)	348		
Alquilmtoxifenoles		Q1	<0,141	1	362		
		Q2	0,14-0,34	1,05 (0,85-1,30)	362	0,221	1,02 (0,98-1,06)
		Q3	0,34-1,05	0,98 (0,79-1,20)	360		
		Q4	>1,05	1,17 (0,95-1,45)	388		
Alquifenoles		Q1	<0,015	1	368		
		Q2	0,015-0,07	0,99 (0,80-1,22)	351	0,512	1,00 (0,96-1,04)
		Q3	0,07-0,13	0,99 (0,80-1,23)	352		
		Q4	>0,13	1,07 (0,86-1,33)	401		
Furanocumarinas		Q1	<0,001	1	463		
		Q2	0,001-0,01	1,08 (0,87-1,35)	353	0,761	0,97 (0,92-1,01)
		Q3	0,01-0,03	1,03 (0,80-1,32)	208		
		Q4	>0,03	0,99 (0,80-1,23)	348		
Hidroxi-benzaldehídos		Q1	<0,01	1	467		
		Q2	0,012-0,04	0,84 (0,67-1,04)	345	0,012	0,98 (0,94-1,02)
		Q3	0,04-0,15	0,71 (0,55-0,90)	317		
		Q4	>0,15	0,75 (0,59-0,95)	343		
Otros polifenoles	Hidroxicumarinas	Q1	<0,002	1	440		
		Q2	0,002-0,01	0,96 (0,77-1,20)	360	0,005	0,93 (0,89-0,98)
		Q3	0,01-0,04	0,82 (0,64-1,04)	331		
		Q4	>0,04	0,73 (0,57-0,93)	341		
Metoxifenoles		Q1	<0,02	1	370		
		Q2	0,02-0,04	1,02 (0,83-1,27)	353	0,168	1,01 (0,97-1,05)
		Q3	0,04-0,16	0,96 (0,78-1,18)	357		
		Q4	>0,16	1,19 (0,96-1,46)	392		
Tirosoles		Q1	<5,77	1	378		
		Q2	5,77-9,02	1,09 (0,87-1,34)	360	0,635	1,02 (0,95-1,08)
		Q3	9,02-13,77	1,08 (0,87-1,34)	366		
		Q4	>13,77	1,05 (0,85-1,30)	368		
Otros polifenoles (compuestos)		Q1	<1,11	1	398		
		Q2	1,11-1,79	0,99 (0,80-1,21)	361	0,576	1,01 (0,94-1,10)
		Q3	1,79-2,63	0,82 (0,66-1,02)	298		
		Q4	>2,63	1,11 (0,91-1,38)	415		
Otros polifenoles (clase)		Q1	<138,96	1	394		
		Q2	138,96-189,09	0,97 (0,79-1,20)	343	0,488	1,01 (0,92-1,13)
		Q3	189,09-250,63	1,00 (0,81-1,24)	353		
		Q4	>250,63	1,07 (0,87-1,32)	382		
Total polifenoles		Q1	<271,93	1	418		
		Q2	271,93-348,59	0,92 (0,75-1,14)	339	0,563	1,01 (0,90-1,14)
		Q3	348,59-431,49	0,94 (0,77-1,17)	332		
		Q4	>431,49	1,06 (0,86-1,30)	383		

^aOdds ratios y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% de cáncer de mama estimados según cuartiles de consumo de polifenoles.

^bOdds ratios y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% de cáncer de mama estimados según log₂.

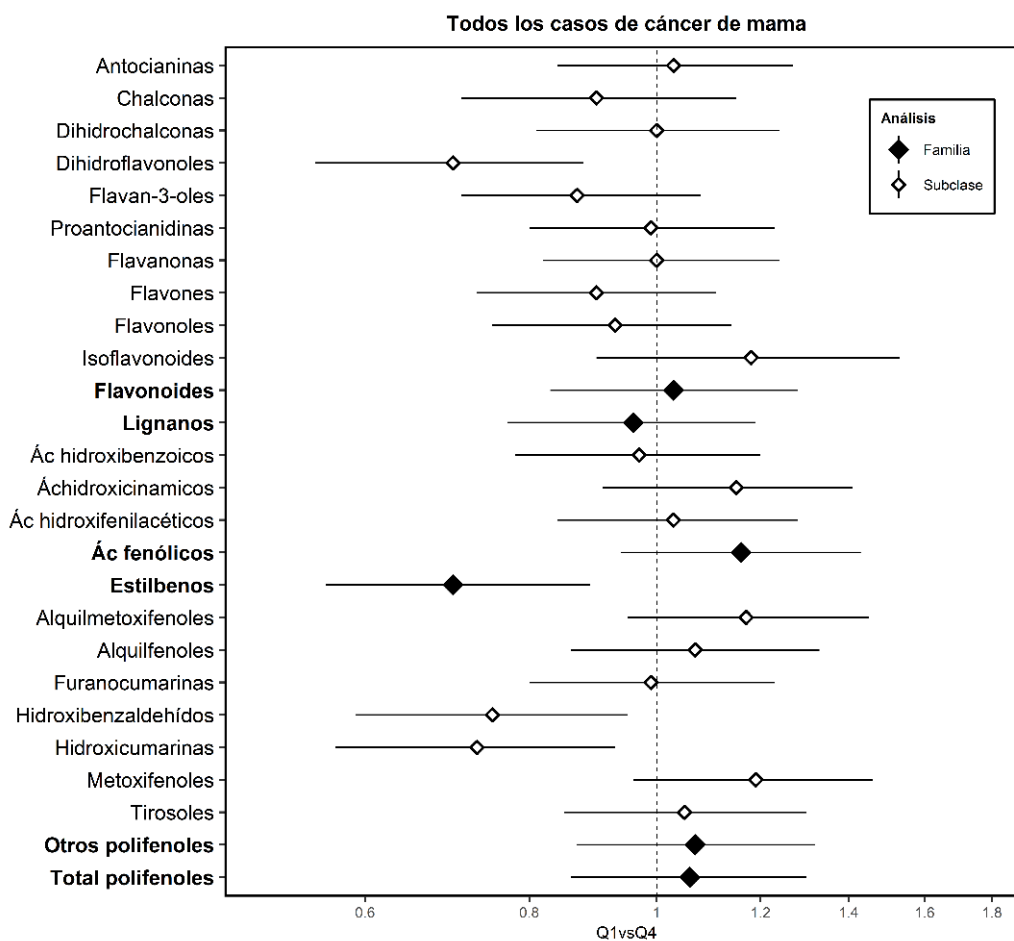


Figura 28 Asociación entre la ingesta de PF y el riesgo de CM en el estudio MCC-Spain.

En la Tabla 5 están representados los resultados por status menopáusico. En los casos de mujeres premenopáusicas, se observó un efecto protector con el consumo de dihidroflavonoles y estilbenos (Figura 29). Con respecto a las diferentes subclases, se observó una asociación estadísticamente significativa con un efecto protector en el caso de los hidroxibenzaldehídos e hidroxicumarinas

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

Tabla 5 Resultados del análisis de todos los casos y categorizado por status menopáusico.

Subclases de polifenoles	Cuartil	Ingesta mg/d	OR ^a IC (95%)	Premenopausia			Postmenopausia				
				Casos	p-tend	OR ^b (logz)	OR ^a IC (95%)	Casos	p-tend	OR ^b (logz)	
Flavonoides	Antocianinas	Q1	<9,01	1	200		1	219			
		Q2	9,1-15,65	0,63 (0,44-0,90)	116	0,399	0,97 (0,87-1,07)	1,17 (0,89-1,53)	222	0,378	1,02 (0,95-1,11)
		Q3	15,65-25,96	0,70 (0,60-1,00)	116			1,13 (0,86-1,52)	229		
		Q4	>25,96	0,89 (0,61-1,32)	103			1,14 (0,89-1,48)	267		
	Q1	<0,0001	1	135	1			273			
	Chalconas	Q2	0,0001-0,001	1,42 (0,91-2,14)	108	0,117	0,91 (0,85-0,97)	1,02 (0,78-1,36)	260	0,305	0,95 (0,89-1,00)
		Q3	0,001-0,003	1,51 (1,01-2,42)	134			0,87 (0,64-1,19)	207		
		Q4	>0,003	0,81 (0,54-1,21)	158			0,89 (0,66-1,22)	197		
		Q1	<0,29	1	177			1	223		
	Dihidrochalconas	Q2	0,29-0,73	1,02 (0,73-1,43)	156	0,85	1,01 (0,92-1,08)	1,09 (0,84-1,44)	215	0,486	0,98 (0,93-1,04)
		Q3	0,73-1,63	0,89 (0,62-1,29)	114			0,99 (0,76-1,28)	238		
		Q4	>1,63	1,13 (0,75-1,70)	88			0,94 (0,73-1,22)	261		
		Q1	<0,03	1	202			1	289		
	Dihidroflavonoles	Q2	0,03-0,15	0,86 (0,58-1,29)	107	0,012	0,89 (0,83-0,96)	0,69 (0,53-0,92)	222	0,027	0,98 (0,94-1,03)
		Q3	0,15-0,76	0,67 (0,45-1,00)	122			0,65 (0,48-0,88)	196		
		Q4	>0,76	0,61 (0,38-0,89)	104			0,70 (0,53-0,95)	230		
Q1		<13,45	1	217	1			217			
Flavan-3-oles	Q2	13,45-21,15	0,62 (0,44-0,87)	123	0,562	0,94 (0,83-1,07)	1,20 (0,92-1,56)	248	0,145	0,97 (0,88-1,07)	
	Q3	21,15-30,18	0,66 (0,46-0,96)	93			0,98 (0,75-1,27)	230			
	Q4	>30,18	0,97 (0,66-1,44)	102			0,87 (0,67-1,14)	242			
	Q1	<11,48	1	193			1	209			
Proantocianidinas	Q2	11,48-20	1,06 (0,75-1,49)	146	0,537	0,99 (0,89-1,10)	0,99 (0,76-1,30)	225	0,977	0,97 (0,89-1,05)	
	Q3	20-31,31	0,78 (0,54-1,13)	99			1,06 (0,81-1,38)	242			
	Q4	>31,31	0,99 (0,66-1,48)	97			0,98 (0,74-1,27)	261			
	Q1	<18,71	1	211			1	217			
Flavanonas	Q2	18,71-39,01	0,80 (0,56-1,12)	129	0,321	0,96 (0,88-1,07)	1,06 (0,81-1,38)	222	0,644	1,02 (0,96-1,09)	
	Q3	39,01-61,36	0,76 (0,52-1,10)	96			0,92 (0,70-1,20)	217			
	Q4	>61,36	0,87 (0,59-1,27)	99			1,10 (0,85-1,42)	281			
	Q1	<2,23	1	191			1	247			
Flavonas	Q2	2,23-3,59	0,92 (0,65-1,31)	127	0,741	1,00 (0,90-1,13)	0,88 (0,67-1,15)	224	0,285	0,99 (0,91-1,07)	
	Q3	3,59-5,26	1,11 (0,77-1,60)	123			0,89 (0,68-1,16)	230			
	Q4	>5,26	1,00 (0,68-1,48)	94			0,85 (0,65-1,10)	236			
	Q1	<15,18	1	205			1	222			
Flavonoles	Q2	15,18-21,46	0,93 (0,66-1,31)	126	0,824	1,03 (0,88-1,21)	1,09 (0,83-1,43)	252	0,140	0,95 (0,85-1,06)	
	Q3	21,46-28,67	0,88 (0,62-1,27)	105			0,93 (0,72-1,22)	230			
	Q4	>28,67	1,10 (0,75-1,62)	99			0,87 (0,66-1,13)	233			
	Q1	<0,01	1	177			1	248			
Isoflavonoides	Q2	0,01-0,15	1,52 (1,01-2,27)	159	0,156	1,02 (0,96-1,08)	1,17 (0,88-1,56)	257	0,278	0,99 (0,96-1,03)	
	Q3	0,15-0,28	1,06 (0,64-1,76)	84			0,90 (0,65-1,26)	200			
	Q4	>0,28	1,62 (1,00-2,62)	115			0,98 (0,71-1,35)	232			
	Q1	<98,33	1	238			1	199			
Total flavonoides	Q2	98,33-137,80	0,81 (0,57-1,14)	110	0,748	0,96 (0,83-1,12)	1 (0,76-1,32)	237	0,943	0,95 (0,84-1,08)	
	Q3	137,80-181,18	0,83 (0,58-1,19)	101			0,83 (0,63-1,10)	212			
	Q4	>181,18	1,01 (0,68-1,50)	86			1,03 (0,79-1,35)	289			
	Q1	<98,33	1	238			1	199			

Resultados

Lignanós	Lignanós	Q1	<26,8	1	223	0,099	0,88 (0,76-1,03)	1	219	0,929	1,05 (0,94-1,19)
		Q2	26,8-37,13	0,85 (0,61-1,19)	129			1,15 (0,88-1,52)	220		
		Q3	37,87-47,72	0,64 (0,44-0,94)	119			1,08 (0,83-1,42)	272		
		Q4	>47,72	0,82 (0,55-1,22)	64			1,03 (0,78-1,35)	226		
Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxibenzoicos	Q1	<8,05	1	184	0,308	0,99 (0,88-1,11)	1	248	0,144	0,91 (0,83-0,99)
		Q2	8,05-12,26	1,00 (0,71-1,42)	136			0,86 (0,66-1,12)	227		
		Q3	12,26-16,91	0,99 (0,68-1,46)	106			0,68 (0,52-0,89)	198		
		Q4	>16,91	1,27 (0,86-1,87)	109			0,85 (0,66-1,11)	264		
Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	Q1	<83,33	1	146	0,171	1,06 (0,94-1,20)	1	216	0,574	0,99 (0,91-1,10)
		Q2	83,33-131,27	1,06 (0,74-1,53)	128			0,92 (0,71-1,20)	211		
		Q3	131,27-187,38	0,95 (0,66-1,38)	116			1,15 (0,87-1,48)	267		
		Q4	>187,38	1,36 (0,94-1,96)	145			1,00 (0,77-1,30)	243		
Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxifenilacéticos	Q1	<0,13	1	139	0,460	1,03 (0,94-1,12)	1	258	0,930	1,01 (0,95-1,07)
		Q2	0,13-0,31	1,00 (0,68-1,49)	125			0,98 (0,75-1,28)	216		
		Q3	0,31-0,64	0,86 (0,58-1,26)	127			1,10 (0,84-1,45)	230		
		Q4	>0,64	1,21 (0,83-1,78)	144			0,95 (0,61-1,24)	233		
Estilbenos	Estilbenos	Q1	<99,26	1	168	0,229	0,98 (0,87-1,10)	1	230	0,574	0,96 (0,88-1,04)
		Q2	99,26-146,25	1,03 (0,72-1,49)	130			1,02 (0,78-1,32)	231		
		Q3	145,25-204,01	0,98 (0,68-1,42)	104			1,11 (0,85-1,44)	194		
		Q4	>204,01	1,30 (0,90-1,87)	133			1,06 (0,81-1,37)	282		
Estilbenos	Estilbenos	Q1	<0,10	1	215	0,003	0,92 (0,85-0,99)	1	294	0,034	0,98 (0,93-1,03)
		Q2	0,10-0,24	0,74 (0,50-1,09)	109			0,70 (0,53-0,91)	213		
		Q3	0,24-0,77	0,57 (0,38-0,85)	104			0,60 (0,45-0,81)	189		
		Q4	>0,77	0,57 (0,38-0,86)	107			0,75 (0,56-0,99)	241		
Otros polifenoles	Alquilmetoxifenoles	Q1	<0,141	1	133	0,666	1,02 (0,95-1,10)	1	229	0,412	1,01 (0,97-1,06)
		Q2	0,14-0,34	1,04 (0,73-1,50)	148			0,99 (0,76-1,30)	214		
		Q3	0,34-1,05	0,98 (0,67-1,42)	142			0,90 (0,69-1,18)	218		
		Q4	>1,05	1,13 (0,76-1,68)	112			1,14 (0,88-1,47)	276		
Otros polifenoles	Alquilfenoles	Q1	<0,015	1	115	0,595	0,99 (0,91-1,07)	1	253	0,956	1 (0,95-1,05)
		Q2	0,015-0,07	1,00 (0,68-1,47)	126			0,95 (0,74-1,22)	225		
		Q3	0,07-0,13	0,92 (0,63-1,36)	130			0,99 (0,77-1,29)	222		
		Q4	>0,13	1,12 (0,77-1,64)	164			0,99 (0,76-1,29)	237		
Otros polifenoles	Furanocumarinas	Q1	<0,001	1	192	0,489	1,04 (0,96-1,12)	1	271	0,403	0,94 (0,89-0,99)
		Q2	0,001-0,01	1,06 (0,72-1,57)	114			1,05 (0,80-1,39)	239		
		Q3	0,01-0,03	1,27 (0,82-1,98)	103			0,91 (0,67-1,24)	205		
		Q4	>0,03	1,12 (0,76-1,65)	126			0,93 (0,70-1,23)	222		
Otros polifenoles	Hidroxibenzaldehídos	Q1	<0,01	1	191	0,013	0,94 (0,87-1,01)	1	276	0,097	0,99 (0,95-1,04)
		Q2	0,012-0,04	0,72 (0,48-1,06)	112			0,90 (0,68-1,18)	233		
		Q3	0,04-0,15	0,69 (0,47-1,05)	125			0,67 (0,50-0,90)	192		
		Q4	>0,15	0,56 (0,37-0,87)	107			0,81 (0,60-1,09)	236		
Otros polifenoles	Hidroxicumarinas	Q1	<0,002	1	159	0,008	0,87 (0,80-0,95)	1	281	0,050	0,94 (0,89-1,00)
		Q2	0,002-0,01	1,08 (0,71-1,65)	113			0,87 (0,66-1,14)	247		
		Q3	0,01-0,04	0,79 (0,52-1,21)	133			0,79 (0,59-1,07)	198		
		Q4	>0,04	0,59 (0,39-0,91)	130			0,75 (0,59-1,00)	211		
Otros polifenoles	Metoxifenoles	Q1	<0,02	1	136	0,465	0,99 (0,93-1,07)	1	234	0,445	1,01 (0,96-1,06)
		Q2	0,02-0,04	1,36 (0,93-1,90)	146			0,85 (0,65-1,12)	207		
		Q3	0,04-0,16	1,16 (0,81-1,66)	148			0,81 (0,62-1,05)	209		
		Q4	>0,16	1,21 (0,82-1,78)	105			1,11 (0,86-1,43)	287		

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

Tirosoles	Q1	<5,77	1	145	0,879	1,03 (0,92-1,16)	1	233	0,768	0,99 (0,92-1,08)
	Q2	5,77-9,021	1,06 (0,72-1,55)	133			1,03 (0,80-1,35)	227		
	Q3	9,02-13,77	0,86 (0,59-1,27)	120			1,15 (0,88-1,50)	246		
	Q4	>13,77	1,10 (0,76-1,61)	137			1,00 (0,77-1,31)	231		
Otros polifenoles (compuestos)	Q1	<1,11	1	230	0,843	1,05 (0,92-1,20)	1	168	0,701	0,96 (0,81-1,12)
	Q2	1,11-1,79	0,83 (0,59-1,19)	231			1,05 (0,82-1,37)	130		
	Q3	1,79-2,63	0,71 (0,49-1,03)	194			0,84 (0,64-1,01)	104		
	Q4	>2,63	1,13 (0,77-1,64)	282			1,12 (0,86-1,45)	133		
Otros polifenoles (clase)	Q1	<138,96	1	178	0,35	1,05 (0,90-1,23)	1	216	0,799	0,96 (0,84-1,09)
	Q2	138,96-189,09	0,92 (0,64-1,30)	115			0,96 (0,73-1,25)	228		
	Q3	189,09-250,63	0,94 (0,65-1,36)	113			0,94 (0,72-1,22)	240		
	Q4	>250,63	1,22 (0,84-1,75)	129			0,97 (0,74-1,26)	253		
Total polifenoles	Q1	<271,93	1	205	0,561	1,04 (0,86-1,24)	1	213	0,971	0,96 (0,81-1,13)
	Q2	271,93-348,59	1,13 (0,80-1,61)	126			0,74 (0,57-0,97)	213		
	Q3	348,59-431,49	0,97 (0,67-1,40)	98			0,83 (0,64-1,09)	234		
	Q4	>431,49	1,18 (0,81-1,70)	106			0,93 (0,72-1,21)	277		

^aOdds ratios y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% de cáncer de mama categorizado por status menopáusico, estimados según cuartiles de consumo de polifenoles. Los odds ratios fueron obtenidos por regresión logística multivariable y ajustados por edad, nivel socioeconómico, antecedentes familiares de cáncer de mama, índice de masa corporal, tabaquismo, actividad física, energía, AINE, edad de la menarquia, número de hijos, ingesta previa de alcohol, terapia de reemplazo hormonal y consumo de anticonceptivos orales como efectos fijos y provincia de residencia como término de efecto aleatorio.

^bOdds ratios y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% de cáncer de mama estimados calculados con \log_2 .

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

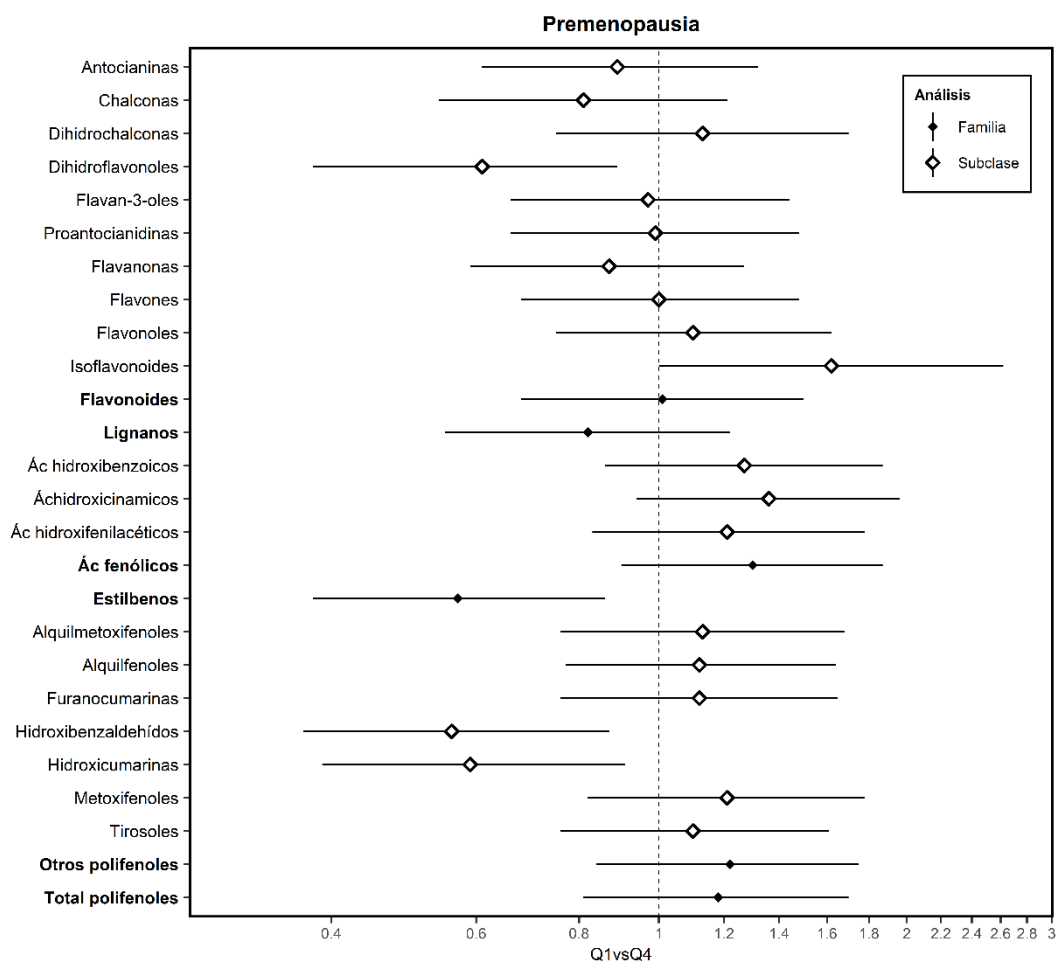


Figura 29 Asociación entre la ingesta de PF y el riesgo de CM en mujeres premenopáusicas.

En los casos de mujeres postmenopáusicas, se observó una asociación estadísticamente significativa con un efecto protector en el caso de los dihidroflavonoles, estilbenos, hidroxicumarinas (Figura 30). Al comparar los OR por el estado menopáusico (Figura 29 y 30), se observaron asociaciones más fuertes en mujeres premenopáusicas para todas las subclases de PF, especialmente los hidroxibenzaldehídos.

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

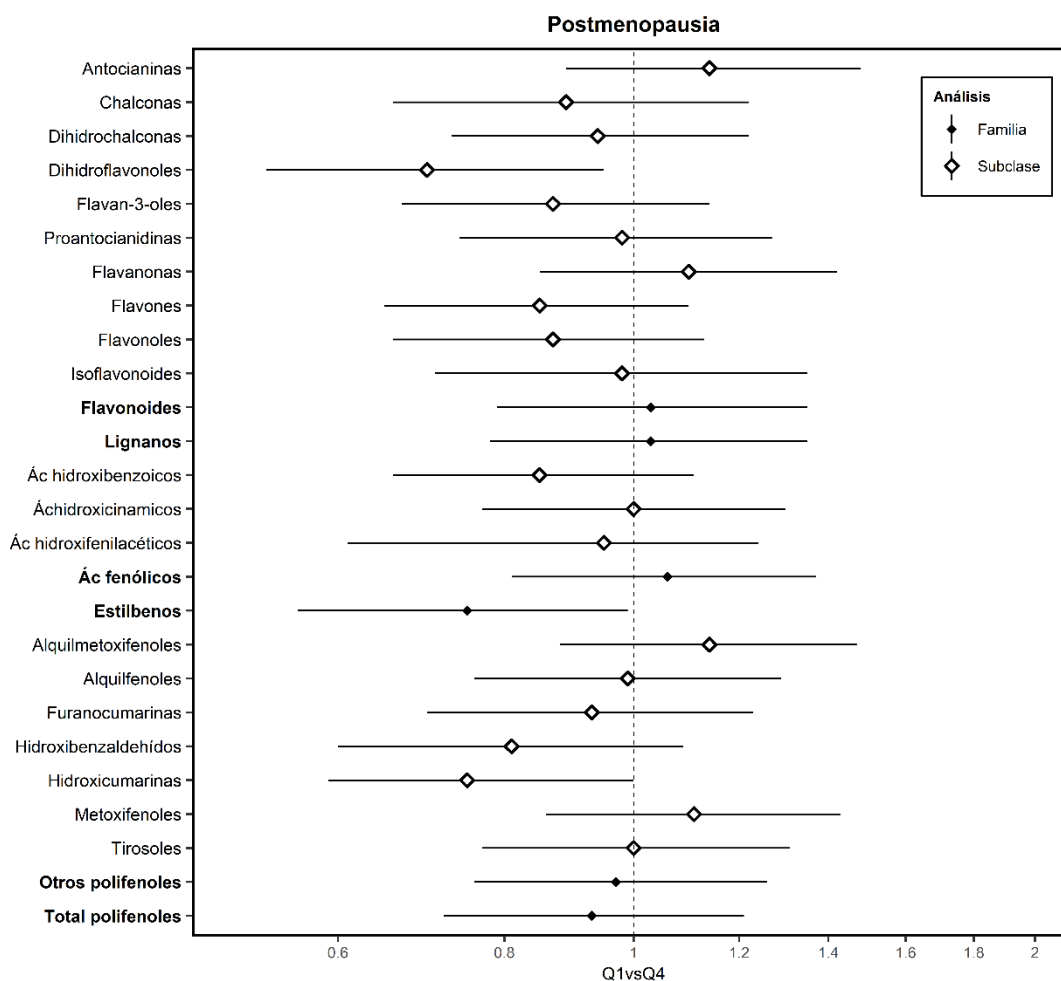


Figura 30 Asociación entre la ingesta de PF y el riesgo de CM en mujeres postmenopáusicas.

En la figura 31, se focalizan los resultados observados con diferentes direcciones de asociación entre ciertas clases de polifenoles y los status menopáusicos, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. Cabe destacar una diferencia notable en el caso de los isoflavonoides, en los cuales un elevado consumo incrementa un 62% el riesgo de desarrollar CM en mujeres premenopáusicas.

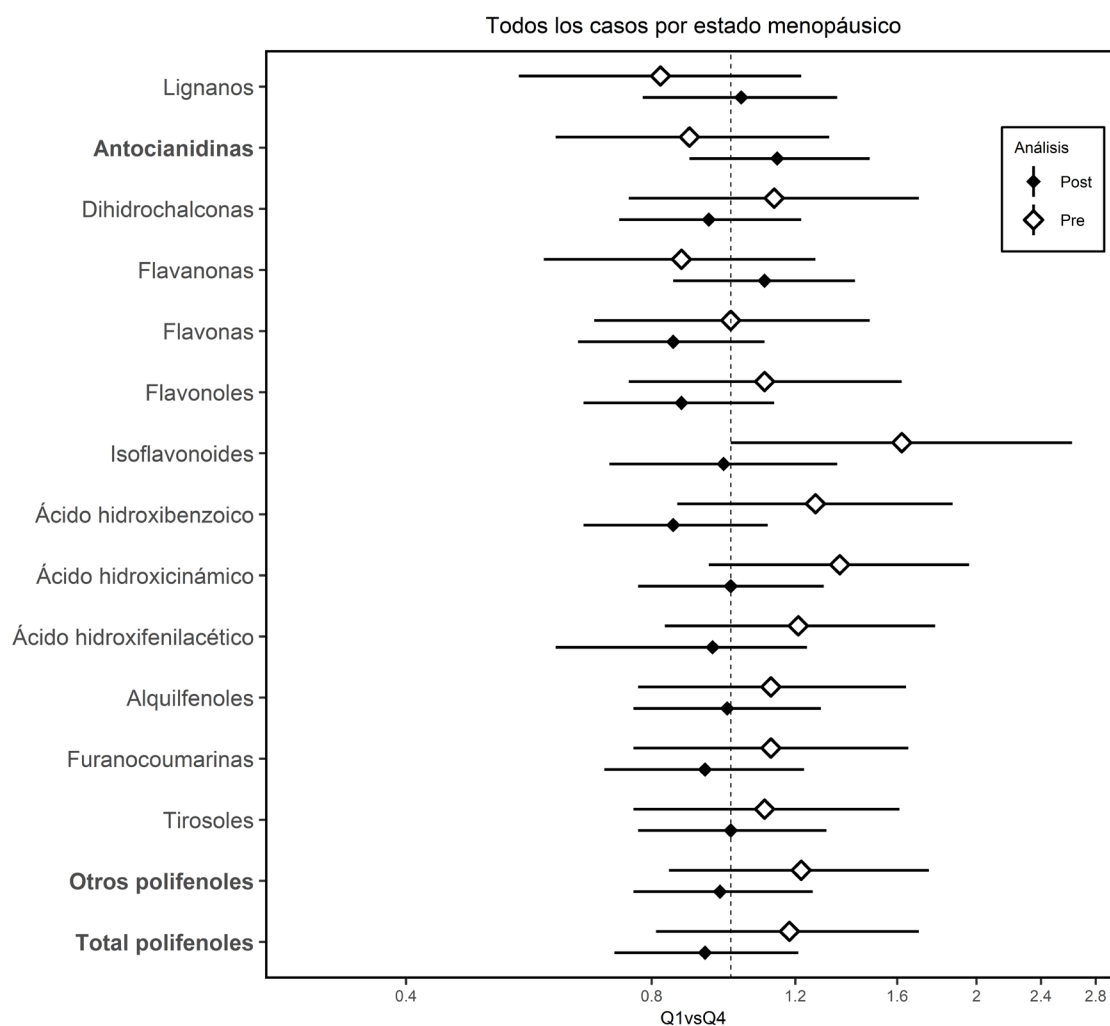


Figura 31 Comparación del efecto de las distintas clases de PF sobre los status menopáusicos

Las figuras 32, 33 y 34 muestran los OR por el estado del receptor (tablas en ANEXO II). Se observaron asociaciones inversas estadísticamente significativas para el receptor hormonal positivo (REC +) con dihidroflavonoles, flavan-3-oles y estilbenos. Del mismo modo, dihidroflavonoles, estilbenos, hidroxibenzaldehídos e hidroxicumarinas obtuvieron relaciones inversas y significativas, asociadas con un menor riesgo de subtipo de ERB-2, mientras que en las subclases alquilmetoxifenoles y los metoxifenoles se observaron un menor riesgo. Finalmente, dihidroflavonoles, estilbenos e hidroxibenzaldehídos se asociaron significativamente con un menor riesgo de desarrollar CM triple negativo (TNCM).

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

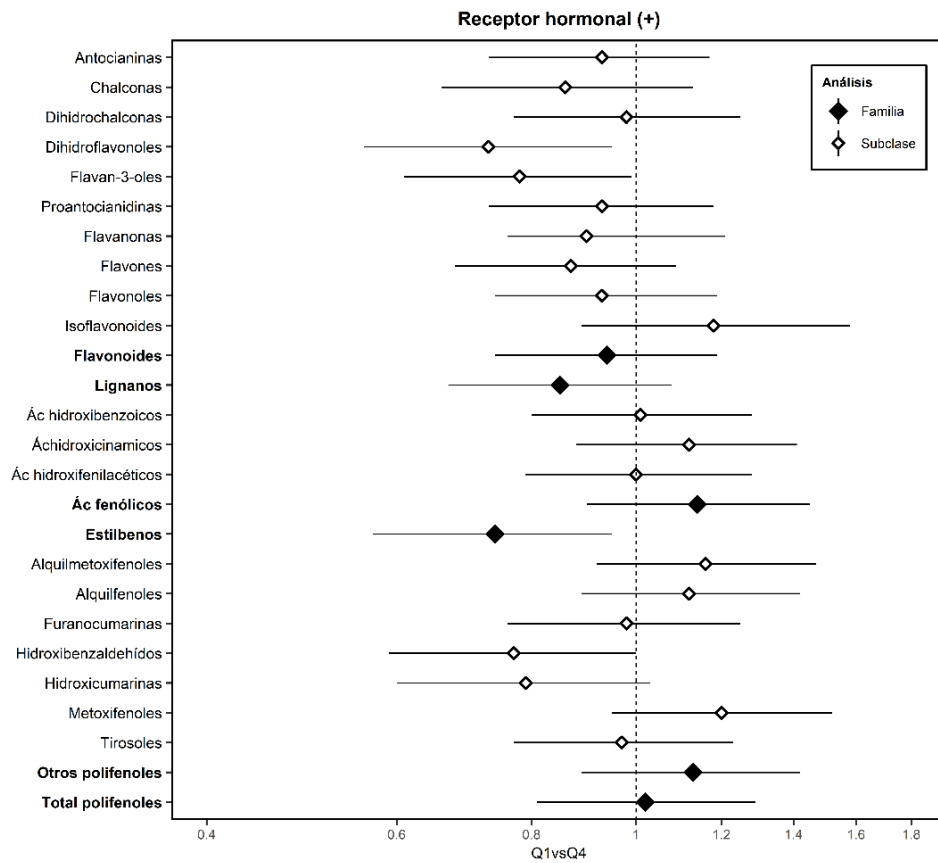


Figura 32 Asociación entre la ingesta de PF y el riesgo de CM en tipo receptor de membrana (+).

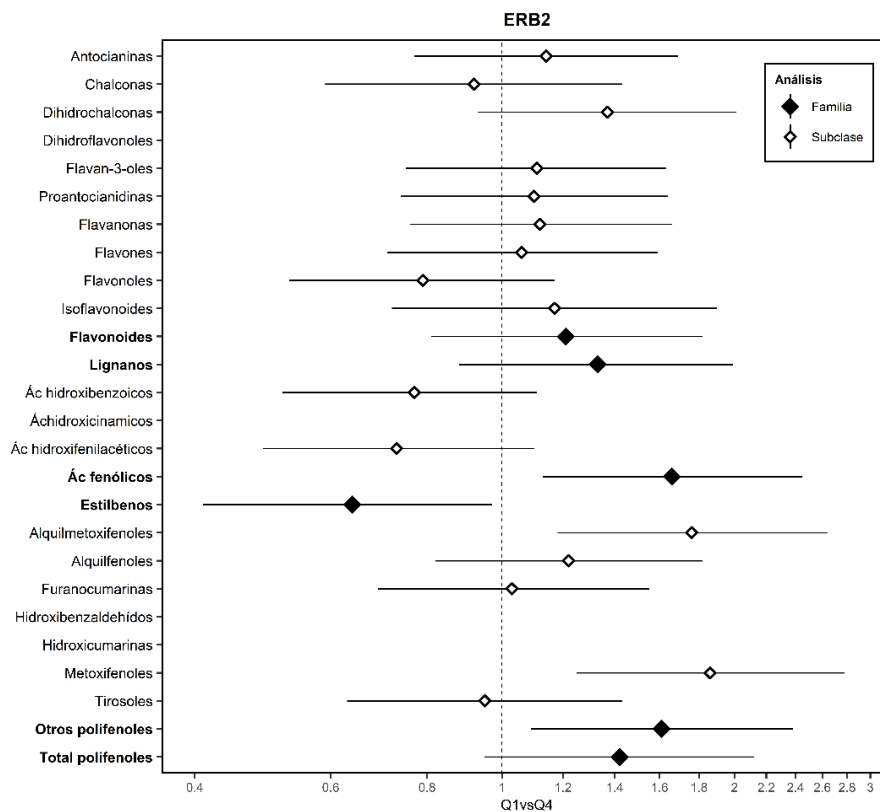


Figura 33 Asociación entre la ingesta de PF y el riesgo de CM tipo ERB-2.

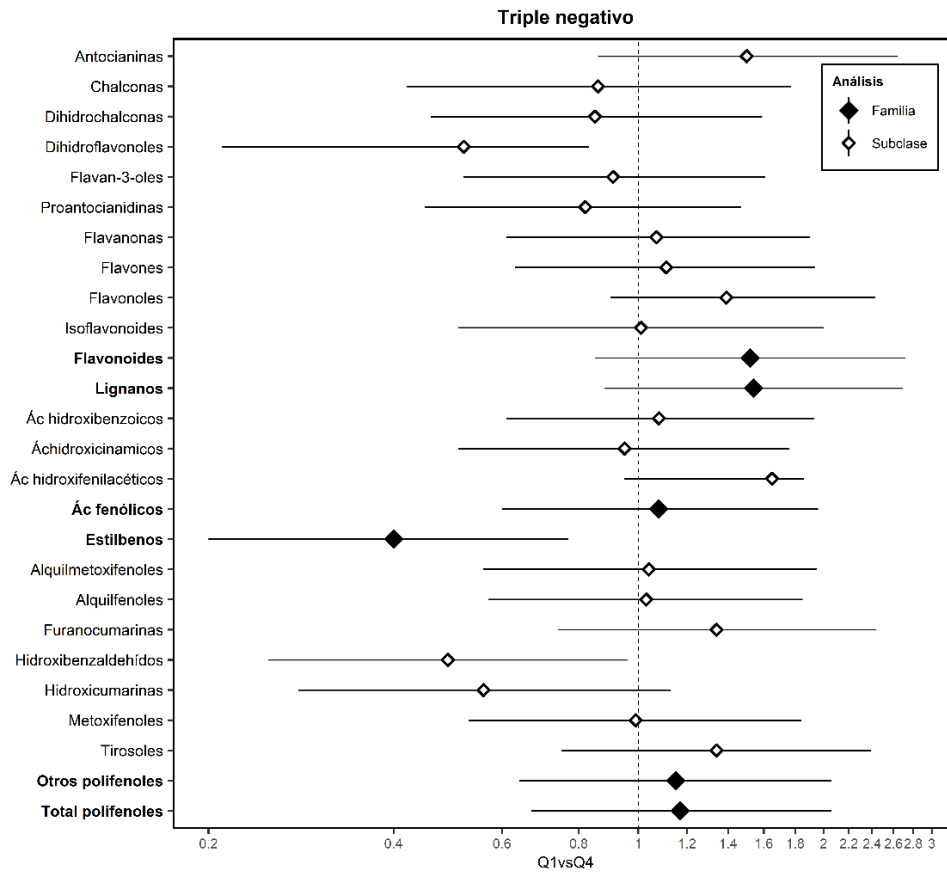


Figura 34 Asociación entre la ingesta de PF y el riesgo de CM tipo triple negativo.

4.3- Consumo de polifenoles y Cáncer gástrico

Para evaluar la influencia del consumo de PF y el riesgo de CG se utilizaron los datos recogidos en el estudio MCC-Spain. La Figura 35 muestra el algoritmo de selección de los casos (N=329) y controles (N=2700) utilizados para esta fase de análisis una vez descartados los datos faltantes en las variables de interés.

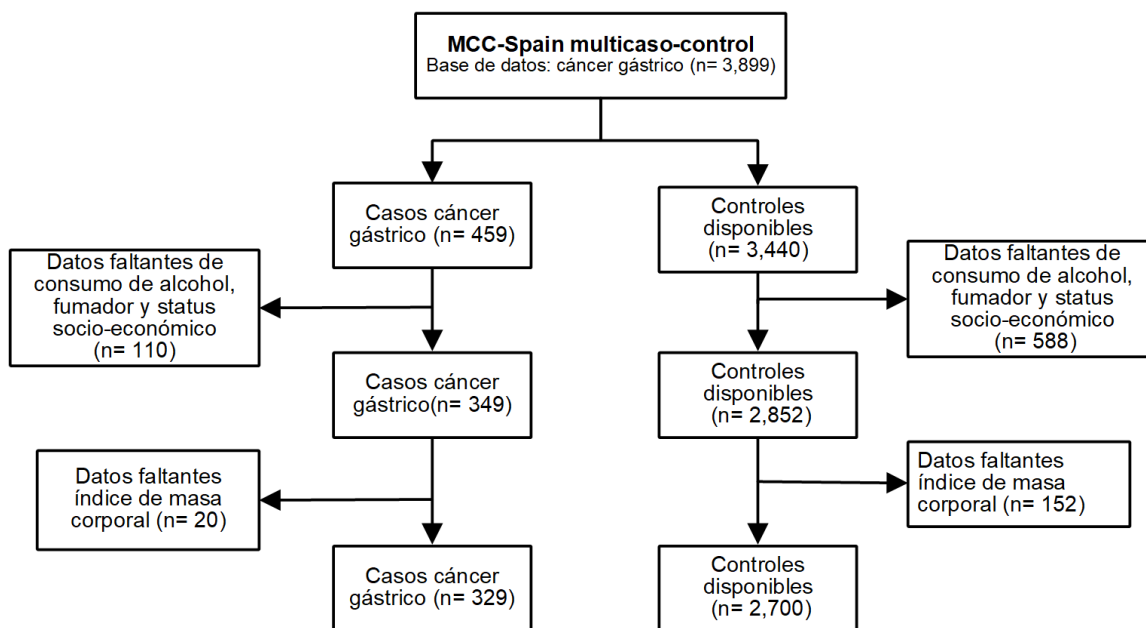


Figura 35 Algoritmo del número de individuos aceptados al eliminar datos faltantes. Fuente propia.

La Tabla 6 recoge la distribución de la muestra (casos: 72,6% varones con una edad media de $65,4 \pm 0,7$ años; controles: 56,2% varones con edad media de $63,5 \pm 0,2$ años) así como las características principales, tanto en el total de la muestra como en la diferenciación de los casos por subtipo anatómico e histológico. En base a ello, se puede observar como el bajo nivel socioeconómico es predominante en los casos (47,4% vs. 33,0%) y la proporción de casos con antecedentes de CG (16,1%) es mayor que en los controles (6,3%).

Los casos también muestran una mayor ingesta de alcohol (23,71%) que los controles (11,7%), así como un mayor consumo de sal.

Respecto al consumo de PF, la ingesta diaria de flavonoides fue superior en los controles ($326,93 \pm 3,33$ mg/día) que en los casos ($318,48 \pm 8,66$ mg/día). Según el subtipo anatómico, se observa un mayor consumo en los CCG que en los NCCG ($334,74$ mg/día vs. $310,69$ mg/día respectivamente), mientras que por subtipo histológico se observa una mayor ingesta diaria de flavonoides en los casos de CG intestinal que en CG difuso ($327,06$ mg/día vs. $317,17$ mg/día

respectivamente). Ninguno de los subtipos de CG mostró diferencias significativas cuando se comparó la ingesta total de flavonoides con los controles o entre sí.

Tabla 6 Características de los sujetos de estudio en CG.

Variables	Controles (n=2700)		Casos			
		Total (n=329)	Subtipo anatómico		Subtipo histológico	
			Cardias (n=84)	No-cardias (n=238)	Intestinal (n=122)	Difuso (n=75)
n (%)						
Género (hombres, %)						
	1518 (56,2)	239 (72,6)	77 (91,6)	156 (65,5)	86 (70,4)	45 (60)
Nivel socioeconómico						
Alto	448 (16,6)	27 (8,2)	9 (10,7)	18 (7,6)	8 (6,6)	8 (10,7)
Medio	1 361 (50,4)	146 (44,4)	38 (45,2)	103 (43,3)	49 (40,2)	34 (45,3)
Bajo	891 (33,0)	156 (47,4)	37 (44,1)	117(49,2)	65 (53,3)	33 (44,0)
Fumador						
Si	1 531 (56,7)	201 (61,1)	65 (77,4)	130 (54,6)	60 (49,2)	45 (60,0)
No	1 169 (43,3)	128 (39,0)	19 (22,6)	108 (45,4)	62 (50,8)	30 (40,0)
Antecedentes familiares de CG						
Si	170 (6,3)	53 (16,1)	11 (13,0)	40 (16,8)	27 (22,1)	13 (17,3)
No	2 530 (93,7)	276 (83,9)	73 (86,9)	198 (83,2)	95 (77,9)	62 (82,7)
Actividad física (METS*h/semana)						
<8	1 374 (50,9)	201 (61,1)	50 (59,5)	147 (61,8)	66 (54,1)	48 (64,0)
≥8	1 326 (49,1)	128 (38,9)	34 (40,5)	91 (38,2)	56 (45,9)	27 (36,0)
Índice de masa corporal (kg/m²)						
≤25	1 026 (38,0)	103 (31,3)	21 (25)	80 (33,6)	41 (33,6)	32 (42,7)
>25-30	1 129 (41,8)	150 (45,6)	37 (44,1)	110 (46,2)	59 (48,4)	31 (41,3)
≥30	545 (20,2)	76 (23,1)	26 (30,9)	48 (20,2)	22 (18,0)	12 (16,0)
Consumo de alcohol (g/día)						
0	418 (15,5)	47 (14,3)	8 (9,5)	39 (16,4)	22 (18,0)	13 (17,3)
<12	1 179 (43,6)	103 (31,3)	16 (19,0)	84 (35,3)	40 (32,8)	27 (36,00)
12-47	787 (29,2)	101 (30,7)	34 (40,5)	66 (27,7)	30 (24,6)	22 (29,4)
>47	316 (11,7)	78 (23,7)	26 (31,0)	49 (20,6)	30 (24,6)	13 (17,3)
media ± SD						
Edad	63,5 ± (0,2)	65,4 ± (0,7)	63,4 ± (1,3)	66,1 ± (0,8)	69,5 ± (1,0)	61,8 ± (1,6)
Ingesta total vegetales (g/día)	191,3 ± 2,4	180,8 ± 7	184,8 ± 18,3	177,9 ± 7,0	189,3 ± 9,7	185,6 ± 13,9
Ingesta carnes rojas (g/día)	64,0 ± 0,8	84,4 ± 2,9	97,5 ± 6,5	80,10 ± 3,3	84,63 ± 4,6	73,12 ± 5,2
Ingesta de sodio (g/día)	3008,6 ± 24,0	3529,3 ± 86,3	3758,6±200,7	3443,9 ± 94,9	3403,2±144,6	3821,43±187,7
Ingesta total PF (mg/día)	371,25 ± 3,72	358,5 ± 9,9	371,2 ± 18,6	351,2 ± 11,7	367,2 ± 14,7	362,5 ± 24,5

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

La cantidad diaria de flavonoides ingeridos por todos los sujetos se presenta en la Tabla 7, la cual incluye los alimentos que más flavonoides aportan a cada subclase.

Tabla 7 Alimentos con mayor aporte de PF a cada clase en todos los casos y controles de MCC-Spain.

Subclases de polifenoles	Ingesta PF mg/día ± SD	Primero (%)	Segundo (%)	Tercero (%)
Antocianinas	22,3±0,35	Vino tinto (31,3)	Cereza (24,70)	Fresa (15,9)
Chalconas	0,004±0,001	Cerveza (98,2)	Cerveza S/A (1,8)	-
Dihidrochalconas	1,15±0,02	Manzana (95,3)	Zumos (5,5)	-
Dihidroflavonoles	1,87±0,06	Vino tinto (97,8)	Vino rosado (2,2)	-
Flavan-3-oles	26,94±0,33	Manzana (33,4)	Vino tinto (20,6)	Habas (13,6)
Flavonoides				
Flavanonas	43,81±0,69	Naranja (75,1)	Zumo naranja (21,1)	Tomate (1,5)
Flavonas	3,88±0,08	Alcachofa (24,7)	Zumo naranja (18,0)	Aceitunas (16,1)
Flavonoles	23,75±0,28	Acelgas (34,2)	Lentejas/garbanzos (15,9)	Vino tinto (10,7)
Isoflavonoides	1,35±0,11	Leche soja (95,3)	Lentejas (4,3)	Nueces (0,3)
Proantocianidinas	200,99±2,16	Judías (32,5)	Manzana (23,3)	Vino tinto (11,1)
Lignanós				
Lignanós	2,71±0,02	Brassica oleracea (22,4)	Alubias (17,4)	Naranja/mandarina (11,8)
Ácidos fenólicos				
Ácidos hidroxibenzoicos	15,19±0,12	Acelgas (24,4)	Vino tinto (22,3)	Nueces (14,2)
Ácidos hidroxicinámicos	149,39±1,35	Café (45,0)	Café descaf (25,0)	Manzana (5,3)
Ácidos hidroxifenilacéticos	0,71±0,12	Aceitunas (83,4)	Vino tinto (11,1)	Cerveza (3,8)
Estilbenos				
Estilbenos	1,73±0,03	Vino tinto (92,2)	Vino rosado/blanco (3,8)	Uva (2)
Otros polifenoles				
Alquilmetoxifenoles	0,74±0,12	Café descaf (70,4)	Café (22,3)	Cerveza (7,3)
Alquilfenoles	0,10±0,01	Café (98)	Cerveza (1,9)	Cacao polvo (0,1)
Hidroxibenzaldehídos	0,35±0,01	Vino tinto (92,7)	Vino rosado/blanco (2,8)	Cerveza (1,8)
Hidroxicumarinas	0,07±0,01	Cerveza (55,2)	Vino rosado/blanco (44)	Jerez (0,7)
Metoxifenoles	0,10±0,01	Café descafeinado (75,2)	Café descafeinado (24,8)	-
Tirosoles	13,98±0,17	Aceitunas (58,2)	Aceite oliva (26,4)	Vino tinto (12,8)
Otros polifenoles	0,89±0,01	Café (36,9)	Zumo naranja (23,2)	Otros zumos (13,7)

Los resultados presentados en la Figura 36 y Tabla 8 muestran una asociación inversa estadísticamente significativa entre la ingesta del total de flavonoides y el riesgo de CG así como la ingesta de antocianidinas, chalconas, dihidroflavonoles y flavan-3-oles. La asociación inversa con la ingesta de proantocianidinas solo fue estadísticamente significativa cuando se utilizó la transformación \log_2 de la ingesta de flavonoides, pero no en el análisis de Q4vsQ1.

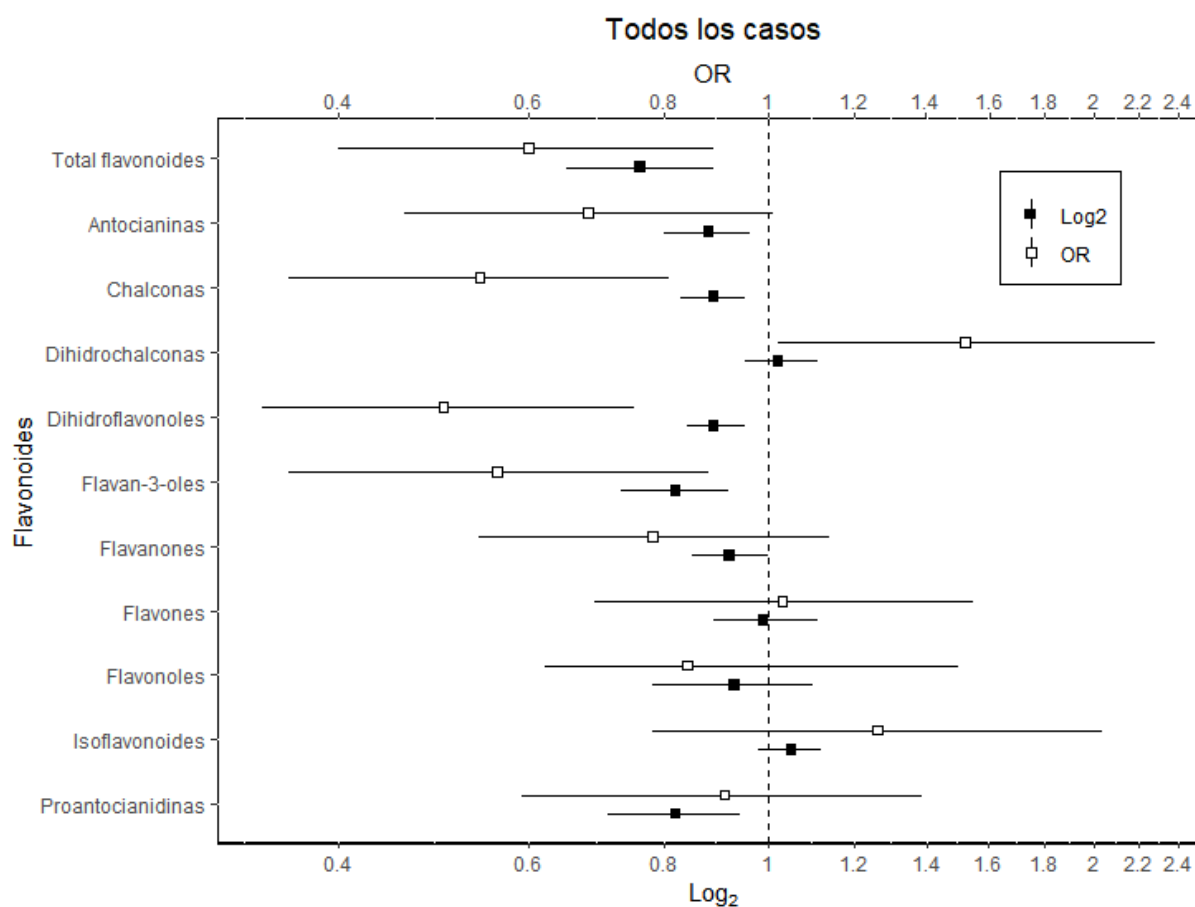


Figura 36 Riesgo de cáncer gástrico) según la ingesta de flavonoides en el MCC-Spain.

Tabla 8 Resultados de log₂ y cuartiles para todos los flavonoides en los modelos ajustados.

	Todos los casos (n=329)		Casos	OR ^a (95% IC)	<i>p-tend</i>	OR ^b log ₂ (95% IC)
Total flavonoides	Q1	<257,8	102	1	0,007	0,76 (0,65-0,89)
	Q2	257,8-360,6	97	0,95 (0,68-1,33)		
	Q3	360,6-470,7	83	0,78 (0,54-1,13)		
	Q4	>470,7	72	0,60 (0,40-0,89)		
Antocianinas	Q1	<10,0	108	1	0,019	0,88 (0,80-0,96)
	Q2	10,0-18,3	105	1,27 (0,92-1,77)		
	Q3	18,3-30,9	74	0,81 (0,57-1,17)		
	Q4	>30,9	67	0,68 (0,46-1,01)		
Chalconas	Q1	0	99	1	0,001	0,89 (0,83-0,95)
	Q2	0,000-0,002	135	1 (0,69-1,44)		
	Q3	0,002- 0,004	57	0,76 (0,5-1,17)		
	Q4	>0,004	63	0,54 (0,36-0,81)		
Dihidrochalconas	Q1	<0,3	83	1	0,02	1,02 (0,95-1,11)
	Q2	0,3-0,8	77	1,32 (0,91-1,91)		
	Q3	0,8-1,7	102	1,66 (1,15-2,39)		
	Q4	>1,7	92	1,52 (1,02-2,28)		
Dihidroflavonoles	Q1	<0,1	131	1	0,001	0,89 (0,84-0,95)
	Q2	0,1-0,6	99	1,15 (0,82-1,62)		
	Q3	0,6-2,5	69	0,86 (0,6-1,23)		
	Q4	>2,5	55	0,5 (0,34-0,75)		
Flavan-3-oles	Q1	<15,2	104	1	0,01	0,82 (0,73-0,92)
	Q2	15,2-24,1	87	0,85 (0,6-1,21)		
	Q3	24,1-35,3	84	0,73 (0,49-1,07)		
	Q4	>35,3	79	0,56 (0,36-0,88)		
Flavanonas	Q1	<17,3	106	1	0,178	0,92 (0,85-1,00)
	Q2	17,3-36,9	92	1,03 (0,73-1,45)		
	Q3	36,9-59,7	83	0,92 (0,64-1,32)		
	Q4	>59,7	73	0,78 (0,54-1,14)		
Flavonas	Q1	<1,8	115	1	0,714	0,99 (0,89-1,11)
	Q2	1,8-3,1	89	1,22 (0,86-1,73)		
	Q3	3,1-4,9	88	1,25 (0,88-1,78)		
	Q4	>4,9	62	1,03 (0,69-1,55)		
Flavonoles	Q1	<14,8	120	1	0,781	0,93 (0,78-1,10)
	Q2	14,8-22,1	79	0,79 (0,55-1,13)		
	Q3	22,1-29,4	83	0,82 (0,57-1,19)		
	Q4	>29,4	72	0,97 (0,62-1,51)		
Isoflavonoides	Q1	<0,01	96	1	0,144	1,05 (0,98-1,12)
	Q2	0,01-0,09	110	0,86 (0,58-1,28)		
	Q3	0,09-0,17	76	1,04 (0,65-1,65)		
	Q4	>0,17	72	1,26 (0,78-2,04)		
Proantocianidinas	Q1	<127,9	102	1	0,821	0,82 (0,71-0,94)
	Q2	127,9-188,1	83	0,94 (0,65-1,34)		
	Q3	188,1-256,0	89	1,06 (0,72-1,55)		
	Q4	>256,0	80	0,91 (0,59-1,39)		

^aOdds ratios y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% de cáncer de gástrico estimados según cuartiles de consumo de polifenoles. Los odds ratios fueron obtenidos por regresión logística multivariable y ajustados por edad, sexo, nivel socioeconómico, antecedentes familiares de cáncer gástrico, tabaquismo, actividad física, energía, consumo de sodio, consumo de carnes rojas, consumo de verduras e ingesta pasada de alcohol como efectos fijos y provincia de residencia como término de efecto aleatorio.

^bOdds ratios y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% de cáncer de mama estimados calculados por log₂.

Respecto al análisis del efecto de los flavonoides con los subtipos de CG anatómico e histológico, se identificaron las siguientes relaciones (Figura 37, Figura 38, Tablas 9 y 10). Según los subtipos anatómicos (Figura 37), existe una relación inversa y significativa en no-cardias para el total de flavonoides, antocianinas, dihidroflavonoles, flavanonas y proantocianidinas. Por otra parte, los resultados para cardias indicaron un efecto protector para chalconas y dihidroflavonoles. No se encontraron relaciones con efecto de riesgo significativo para ninguna de las subclases de PF ni diferencias significativas entre las subclases de CG anatómico.

Los análisis de los resultados para los subtipos histológicos (Figura 38) de CG han mostrado efectos protectores en CG intestinal para la ingesta total de flavonoides, antocianinas, chalconas, dihidroflavonoles, flavan-3-oles y proantocianidinas. En cambio, la subclase de isoflavonoides tiene un efecto de riesgo. Por otra parte, en el análisis del subtipo difuso se encuentran asociaciones protectoras y significativas para total de flavonoides, chalconas y flavan-3-ols. No existen diferencias significativas entre los grupos intestinal y difuso.

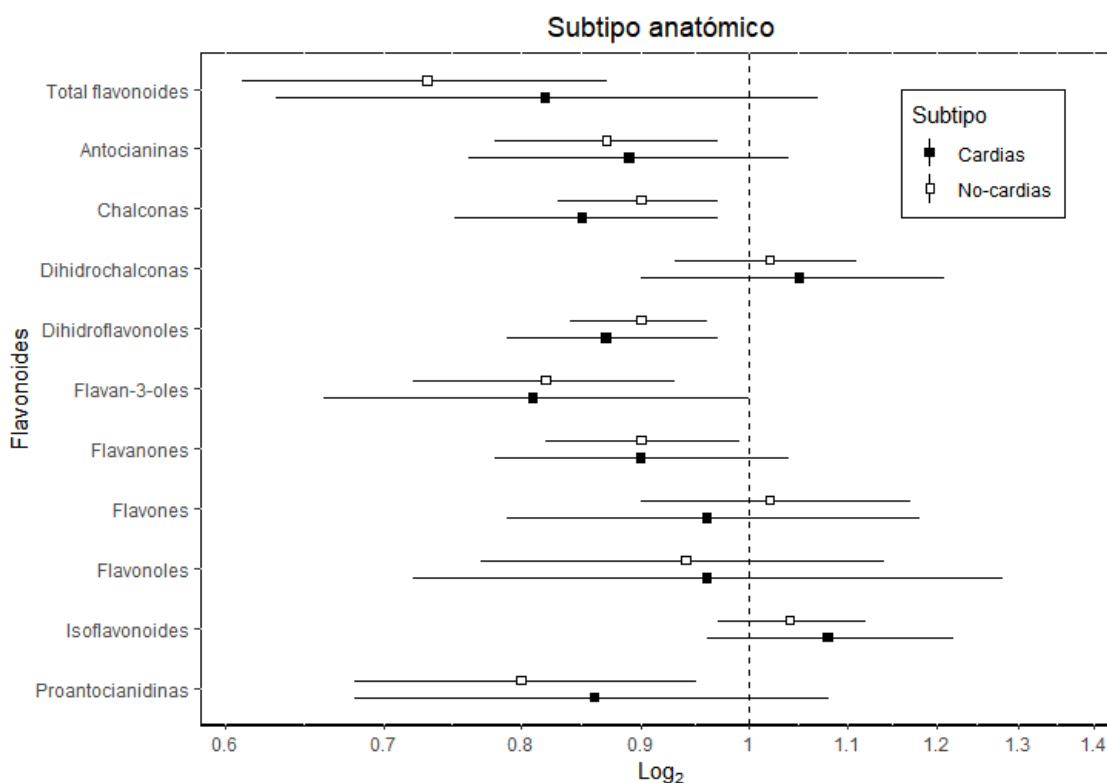


Figura 37 Resultados de log₂ IC 95% para los subtipos anatómicos.

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

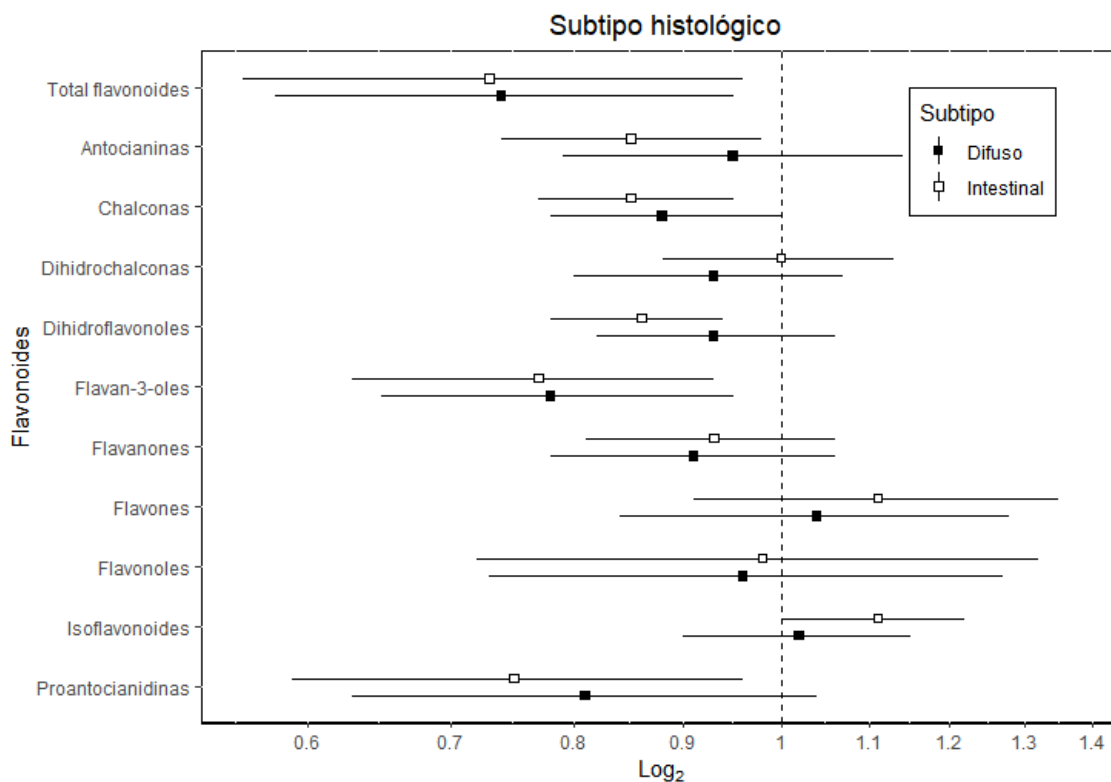


Figura 38 Resultados de \log_2 IC 95% para los subtipos histológicos.

Tabla 9 \log_2 (IC 95%) de los subtipos de CG acorde a la ingesta de las distintas clases de flavonoides.

Clases de flavonoides	Anatómico		Histológico	
	Cardias (n=85) OR ^a (95% IC)	No-cardias (n=238) OR ^a (95% IC)	Intestinal (n=123) OR ^a (95% IC)	Difuso (n=75) OR ^a (95% IC)
Total flavonoides	0,82 (0,63-1,07)	0,73 (0,61-0,87)	0,73 (0,56-0,96)	0,74 (0,58-0,95)
Antocianinas	0,89 (0,76-1,04)	0,87 (0,78-0,97)	0,85 (0,74-0,98)	0,95 (0,79-1,14)
Chalconas	0,85 (0,75-0,97)	0,90 (0,83-0,97)	0,85 (0,77-0,95)	0,88 (0,78-1,00)
Dihidrochalconas	1,05 (0,90-1,21)	1,02 (0,93-1,11)	1,00 (0,88-1,13)	0,93 (0,80-1,07)
Dihidroflavonoles	0,87 (0,79-0,97)	0,90 (0,84-0,96)	0,86 (0,78-0,94)	0,93 (0,82-1,06)
Flavan-3-oles	0,81 (0,66-1,00)	0,82 (0,72-0,93)	0,77 (0,63-0,93)	0,78 (0,65-0,95)
Flavanonas	0,90 (0,78-1,04)	0,90 (0,82-0,99)	0,93 (0,81-1,06)	0,91 (0,78-1,06)
Flavonas	0,96 (0,79-1,18)	1,02 (0,90-1,17)	1,11 (0,91-1,35)	1,04 (0,84-1,28)
Flavonoles	0,96 (0,72-1,28)	0,94 (0,77-1,14)	0,98 (0,72-1,32)	0,96 (0,73-1,27)
Isoflavonoides	1,08 (0,96-1,22)	1,04 (0,97-1,12)	1,11 (1,00-1,22)	1,02 (0,90-1,15)
Proantocianidinas	0,86 (0,68-1,08)	0,80 (0,68-0,95)	0,75 (0,59-0,96)	0,81 (0,63-1,04)

^aOdds ratios y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% de cáncer de mama estimados según \log_2 , ajustados por edad, sexo, nivel socioeconómico, antecedentes familiares de cáncer gástrico, tabaquismo, actividad física, energía, consumo de sodio, consumo de carnes rojas, consumo de verduras e ingesta pasada de alcohol como efectos fijos y provincia de residencia como término de efecto aleatorio.

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

Tabla 10 Cuartiles (IC95%) de los subtipos de CG acorde a la ingesta de las distintas clases de flavonoides.

Clases de flavonoides	Ingesta (mg/d)	Anatómico				Tipo histológico				
		Cardias (N=85)		No-cardias (N=238)		Intestinal (N=123)		Difuso (N=75)		
		n	OR ^a (95% CI)	n	OR ^a (95% CI)	n	OR ^a (95% CI)	n	OR ^a (95% CI)	
Total flavonoides	Q1	<257,8	30	-	71	-	26	-	30	-
	Q2	257,8-360,6	19	0,82 (0,43-1,57)	74	0,93 (0,63-1,36)	42	1,24 (0,7-2,19)	17	0,66 (0,34-1,26)
	Q3	360,6-470,7	22	0,93 (0,48-1,81)	60	0,74 (0,48-1,12)	36	0,86 (0,46-1,6)	20	0,85 (0,45-1,61)
	Q4	>470,7	18	0,67 (0,33-1,39)	51	0,55 (0,35-0,87)	31	0,74 (0,38-1,42)	11	0,38 (0,17-0,84)
		<i>p-tend</i>		0,373		0,006		0,165		0,047
Antocianinas	Q1	<10,0	27	-	79	-	36	-	26	-
	Q2	10,0-18,3	27	1,62 (0,88-2,98)	75	1,17 (0,8-1,70)	42	1,38 (0,81-2,36)	19	1,01 (0,52-1,97)
	Q3	18,3-30,9	18	0,9 (0,45-1,81)	56	0,81 (0,54-1,23)	33	0,84 (0,47-1,48)	17	1,06 (0,53-2,10)
	Q4	>30,9	17	0,62 (0,29-1,31)	46	0,67 (0,42-1,06)	24	0,61 (0,32-1,15)	16	0,92 (0,42-1,98)
		<i>p-tend</i>		0,143		0,046		0,062		0,896
Chalconas	Q1	0	34	-	62	-	39	-	17	-
	Q2	0,000-0,002	28	1,03 (0,55-1,93)	104	1 (0,64-1,54)	57	1,02 (0,57-1,83)	27	0,95 (0,43-2,06)
	Q3	0,002-0,004	9	0,38 (0,17-0,88)	46	0,86 (0,53-1,42)	26	1,06 (0,54-2,07)	14	0,88 (0,38-2,06)
	Q4	>0,004	18	0,4 (0,2-0,79)	44	0,6 (0,37-0,98)	13	0,39 (0,19-0,82)	20	0,89 (0,4-1,98)
		<i>p-tend</i>		0,002		0,022		0,021		0,755
Dihidrochalconas	Q1	<0,3	23	-	59	-	26	-	24	-
	Q2	0,3-0,8	20	1,45 (0,74-2,86)	55	1,27 (0,83-1,94)	28	1,49 (0,81-2,74)	17	1,12 (0,56-2,25)
	Q3	0,8-1,7	23	1,63 (0,82-3,24)	77	1,63 (1,08-2,46)	42	1,64 (0,91-2,97)	21	1,34 (0,69-2,62)
	Q4	>1,7	23	1,92 (0,92-4,02)	65	1,38 (0,87-2,20)	39	1,4 (0,73-2,67)	26	1,23 (0,57-2,67)
		<i>p-tend</i>		0,081		0,086		0,299		0,473
Dihidroflavonoles	Q1	<0,1	33	-	96	-	51	-	32	-
	Q2	0,1-0,6	24	1,31 (0,7-2,44)	72	1,04 (0,7-1,54)	43	1,11 (0,65-1,90)	16	0,89 (0,44-1,78)
	Q3	0,6-2,5	15	0,75 (0,38-1,51)	51	0,83 (0,55-1,25)	20	0,68 (0,37-1,25)	20	1,17 (0,6-2,28)
	Q4	>2,5	17	0,6 (0,29-1,23)	37	0,47 (0,29-0,76)	21	0,54 (0,29-1,01)	10	0,49 (0,21-1,11)
		<i>p-tend</i>		0,1		0,002		0,025		0,232
Flavan-3-oles	Q1	<15,2	28	-	74	-	31	-	30	-
	Q2	15,2-24,1	24	1,03 (0,54-1,97)	61	0,85 (0,57-1,28)	33	0,8 (0,44-1,43)	17	0,64 (0,32-1,26)
	Q3	24,1-35,3	15	0,59 (0,27-1,28)	66	0,78 (0,5-1,21)	37	0,7 (0,38-1,31)	18	0,66 (0,32-1,35)
	Q4	>35,3	22	0,65 (0,28-1,48)	55	0,59 (0,35-0,98)	34	0,57 (0,28-1,16)	13	0,42 (0,18-1,01)
		<i>p-tend</i>		0,186		0,048		0,122		0,066

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

Flavanonas	Q1	<17,3	32	-	73	-	31	-	26	-
	Q2	17,3-36,9	17	0,66 (0,34-1,29)	71	1,06 (0,72-1,56)	36	1,05 (0,6-1,84)	17	0,84 (0,43-1,67)
	Q3	36,9-59,7	25	1,15 (0,62-2,14)	56	0,8 (0,52-1,22)	38	1,02 (0,57-1,81)	20	1,18 (0,61-2,30)
	Q4	>59,7	15	0,6 (0,29-1,23)	56	0,79 (0,51-1,22)	30	0,89 (0,49-1,64)	15	0,64 (0,3-1,36)
	p-tend			0,412		0,16		0,7		0,448
Flavonas	Q1	<1,8	33	-	76	-	42	1	20	-
	Q2	1,8-3,1	19	0,92 (0,48-1,76)	70	1,43 (0,96-2,13)	34	1,17 (0,66-2,06)	22	2,13 (1,08-4,20)
	Q3	3,1-4,9	24	1,14 (0,61-2,14)	62	1,38 (0,91-2,08)	34	1,5 (0,85-2,63)	21	1,94 (0,96-3,92)
	Q4	>4,9	13	0,7 (0,32-1,50)	48	1,27 (0,8-2,02)	25	1,36 (0,72-2,56)	15	1,64 (0,74-3,62)
	p-tend			0,587		0,304		0,224		0,207
Flavonoles	Q1	<14,8	31	-	85	-	37	-	31	-
	Q2	14,8-22,1	19	0,74 (0,38-1,45)	59	0,86 (0,57-1,29)	33	0,97 (0,54-1,73)	11	0,54 (0,25-1,17)
	Q3	22,1-29,4	20	0,83 (0,42-1,67)	60	0,83 (0,54-1,27)	34	0,96 (0,53-1,74)	17	1 (0,49-2,07)
	Q4	>29,4	19	0,84 (0,36-1,98)	52	1,13 (0,68-1,88)	31	1,28 (0,63-2,56)	19	1,46 (0,63-3,4)
	p-tend			0,718		0,863		0,586		0,332
Isoflavonoides	Q1	<0,01	32	-	60	-	31	-	21	-
	Q2	0,01-0,09	23	0,98 (0,49-1,95)	85	0,88 (0,56-1,41)	42	0,98 (0,51-1,87)	26	0,77 (0,35-1,69)
	Q3	0,09-0,17	55	1,22 (0,56-2,68)	55	1,06 (0,61-1,83)	27	0,95 (0,43-2,1)	14	0,99 (0,4-2,46)
	Q4	>0,17	56	1,27 (0,54-2,98)	56	1,36 (0,78-2,38)	35	1,81 (0,8-4,08)	17	1,22 (0,51-2,93)
	p-tend			0,484		0,115		0,078		0,396
Proantocianidinas	Q1	<127,9	31	-	70	-	23	-	27	-
	Q2	127,9-188,1	19	0,83 (0,42-1,62)	61	0,94 (0,62-1,42)	37	1,36 (0,74-2,51)	17	0,74 (0,37-1,48)
	Q3	188,1-256,0	17	0,76 (0,37-1,6)	70	1,18 (0,77-1,81)	43	1,61 (0,86-3,02)	18	0,97 (0,47-1,99)
	Q4	>256,0	22	1,1 (0,52-2,35)	55	0,84 (0,51-1,38)	32	1,01 (0,5-2,07)	16	0,87 (0,39-1,98)
	p-tend			0,866		0,766		0,946		0,903

^aLos OR fueron obtenidos por regresión logística y ajustados por edad, sexo, nivel socioeconómico, antecedentes familiares de cáncer gástrico, tabaquismo, actividad física, energía, consumo de sodio, consumo de carnes rojas, consumo de verduras e ingesta pasada de alcohol como efectos fijos y provincia de residencia como término de efecto aleatorio.

4.4- Metaanálisis sobre la ingesta de polifenoles y Cáncer gástrico: StoP-Project.

Para estos análisis, seleccionamos 10 estudios de 6 países, incluidos dos de Italia [146,147], uno de Grecia [153], uno de Rusia [149], uno de Portugal [58], dos de España [53,134] y tres estudios llevados a cabo en México [150-152]. Estos estudios tenían suficientes datos para poder realizar cálculos de consumo de PF, quedando una base de datos final con 11815 controles y 3471 casos (Tabla 11).

Tabla 11 Distribución de 3471 casos de GC y 11815 controles de cada estudio incluido en el StoP-Project.

StoP-Project				
Estudio	País	Cases (%)	control (%)	Total
La Vecchia [146]	Italia 1	223 (29,2)	541 (70,8)	764 (6,4)
Ferraroni [147]	Italia 2	1001 (46,6)	1145 (53,3)	2146 (18)
Trichipoulos [148]	Grecia	105 (51,7)	98 (48,2)	203 (1,7)
Zaridze [149]	Rusia	361 (43,2)	474 (56,8)	835 (7)
Lunet [58]	Portugal	577 (26,8)	1578 (73,2)	2155 (18,0)
Aragonés;Martín [134]	España 1	329 (10,9)	2700 (89,1)	3029 (25,3)
Vioque [53]	España 2	317 (44,5)	396 (55,5)	856 (7,2)
Lopez-carrillo [150]	México 1	248 (34,2)	478 (65,8)	713 (6)
Lopez-carrillo [151]	México 2	220 (22,6)	752 (77,4)	972 (8,1)
Lopez-carrillo [152]	México 3	90 (33,3)	182 (66,7)	279 (2,3)
Total		3471 (100)	8344 (100)	11815 (100)

La Tabla 12 y Figura 39 proporciona los OR y el IC del 95% correspondiente de PF totales, flavonoides totales y ácidos fenólicos totales de los cuartiles de ingesta, y como variables continuas. El OR para el cuartil más alto vs. el más bajo fue de 0,67 (IC 95% = 0,54-0,81) para PF totales, 0,75 (IC 95% = 0,55-0,94) para ácidos fenólicos totales y 0,73 (IC 95% = 0,55-0,90) para flavonoides totales. Con respecto a las subclases de flavonoides, los OR para el cuartil más alto vs. el más bajo fueron 0,74 (IC del 95% = 0,56-0,92) para las antocianidinas, 0,77 (IC del 95% = 0,66-0,88) para los flavanoles y 0,57 (IC del 95% = 0,44-0,69) para

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

flavanonas En referencia a las clases de ácidos fenólicos totales, el OR de los ácidos hidroxibenzoicos fue 0,73 (IC 95% = 0,57-0,89). Los OR no fueron significativos en flavonoles con OR 0,76 (IC 95% = 0,51-1,01) y ácidos hidroxicinámicos con OR 0,82 (IC 95% = 0,58-1,06).

Tabla 12 Tabla 2: Distribución de 3471 casos de cáncer gástrico de acuerdo con los cuartiles de ingesta y los odds ratios (OR) correspondientes e intervalos de confianza del 95%.

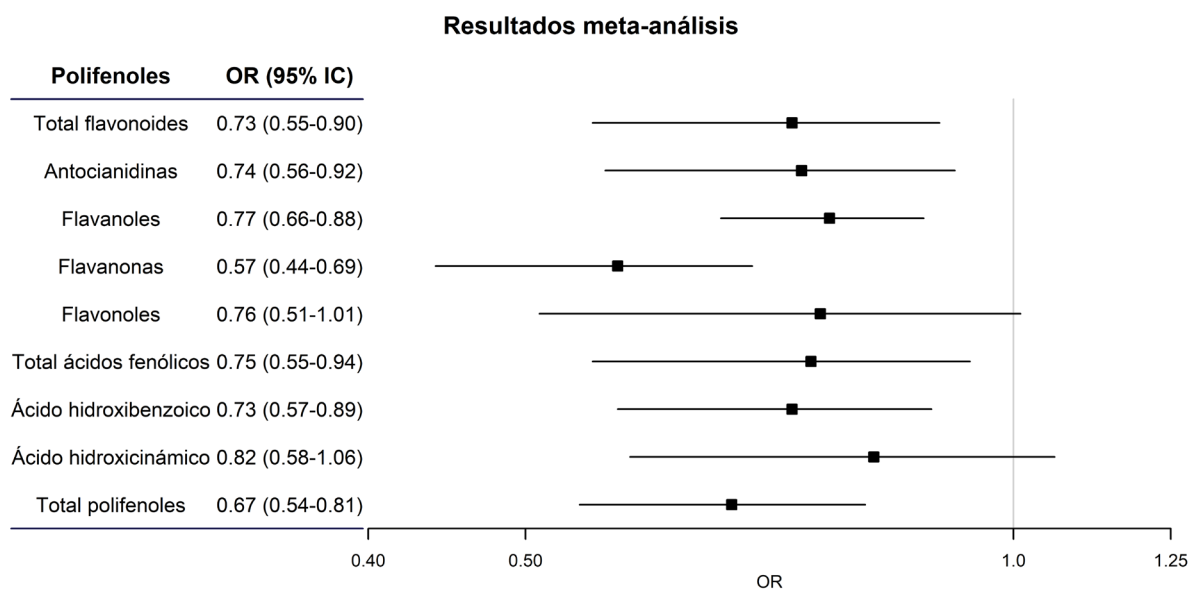
Clase de Polifenol	Variables	Cuartiles de la ingesta de Polifenoles				OR ^c Continuo
		1	2	3	4	
Total polifenoles	Ingesta media	285,6	402,6	534,2	853	
	Casos	991	809	846	825	0,88 (0,78-0,97)
	OR ^b (95% IC)	1	0,73 (0,59-0,88)	0,72 (0,54-0,89)	0,67 (0,54-0,81)	
Total flavonoides	Ingesta media	123,7	184,1	256,4	415	
	Casos	942	814	830	885	0,90 (0,82-0,98)
	OR ^b (95% IC)	1	0,78 (0,67-0,88)	0,76 (0,58-0,94)	0,73 (0,55-0,90)	
Antocianidinas	Ingesta media	12,8	21,9	36,9	79,3	
	Casos	951	779	857	884	0,93 (0,86-1,01)
	OR ^b (95% IC)	1	0,65 (0,52-0,85)	0,78 (0,62-0,93)	0,74 (0,56-0,92)	
Flavonoles	Ingesta media	33,9	54	90,6	179,6	
	Casos	903	841	837	891	0,93 (0,85-1,00)
	OR ^b (95% IC)	1	0,84 (0,73-0,95)	0,73 (0,67-0,88)	0,77 (0,66-0,88)	
Flavonoles	Ingesta media	19,6	30,2	36,7	61,2	
	Casos	982	818	798	873	0,90 (0,80-1,00)
	OR ^b (95% IC)	1	0,75(0,62-0,88)	0,70 (0,49-0,91)	0,76 (0,51-1,01)	
Flavanonas	Ingesta media	7,1	19,9	34,8	59	
	Casos	1173	934	716	648	0,84 (0,78-0,90)
	OR ^b (95% IC)	1	0,73 (0,55-0,92)	0,60 (0,40-0,79)	0,57 (0,44-0,69)	
Total ácidos fenólicos	Ingesta media	126,5	191,2	269,9	474,5	
	Casos	1023	843	822	783	0,93 (0,81-1,04)
	OR ^b (95% IC)	1	0,76 (0,60-0,92)	0,78 (0,68-0,88)	0,75 (0,55-0,94)	
Ácidos hidroxibenzoicos	Ingesta media	16,3	20,4	27,6	64,3	
	Casos	959	875	813	824	0,91 (0,85-0,98)
	OR ^b (95% IC)	1	0,87 (0,73-1,02)	0,73 (0,55-0,91)	0,73 (0,57-0,89)	
Ácidos hidroxicinámicos	Ingesta media	102,7	163,3	239	425	
	Casos	1004	866	794	807	0,93 (0,82-1,05)
	OR ^b (95% IC)	1	0,81 (0,63-0,99)	0,75 (0,65-0,85)	0,82 (0,58-1,06)	

^a Ingesta media expresada en mg/d.

^b Estimado mediante metaanálisis en dos etapas mediante modelos de regresión logística incondicional ajustados por edad, sexo, clase social, consumo de alcohol, índice de masa corporal, antecedentes familiares de cáncer gástrico, tabaquismo, consumo de sal y según modelo residual.

^c Estimado para un incremento de la ingesta igual a 1 desviación estándar (calculado de acuerdo con las distribuciones entre los controles).

Figura 39 Resultados del meta-análisis para las clases seleccionadas en el estudio StoP-Project,



La Tabla 13 proporciona los OR para el cuartil de ingesta más alto vs. el más bajo de PF seleccionados en estratos de sexo, edad, indicadores de clase social y estado de fumador. Todas las asociaciones inversas fueron consistentes entre los datos de las covariables consideradas.

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

Tabla 13 Pooled odds ratio (OR) agrupado y el IC del 95% correspondiente de GC para el cuartil más alto en comparación con el más bajo específico de la distribución de la ingesta de clases de PF, según los estratos de las variables

Variable	OR ^a (IC 95%)							
	Sexo		Edad		Social class		Tabaquismo	
	Hombres	Mujeres	≤60 años	>60 años	Bajo	Medio-Alto	No fumador	Fumador
Total polifenoles	0,61 (0,44-0,78)	0,67 (0,52-0,83)	0,71 (0,56-0,87)	0,60 (0,43-0,77)	0,59 (0,46-0,73)	0,71 (0,54-0,88)	0,64 (0,48-0,80)	0,62 (0,45-0,78)
Flavonoides	0,65 (0,45-0,86)	0,74 (0,56-0,92)	0,67 (0,49-0,85)	0,74 (0,51-0,96)	0,65 (0,42-0,88)	0,73 (0,58-0,89)	0,65 (0,48-0,83)	0,63 (0,44-0,82)
Antociandinas	0,68 (0,46-0,90)	0,79 (0,60-0,98)	0,66 (0,52-0,81)	0,78 (0,56-1)	0,63 (0,44-0,81)	0,74 (0,56-0,93)	0,78 (0,56-1,00)	0,64 (0,47-0,81)
Flavanoles	0,76 (0,59-0,92)	0,72 (0,54-0,90)	0,80 (0,62-0,97)	0,70 (0,53-0,88)	0,72 (0,55-0,89)	0,77 (0,61-0,93)	0,65 (0,49-0,80)	0,78 (0,63-0,93)
Flavonoles	0,66 (0,43-0,89)	0,75 (0,48-1,01)	0,71 (0,55-0,87)	0,74 (0,43-1,04)	0,77 (0,44-1,11)	0,66 (0,53-0,79)	0,73 (0,57-0,89)	0,67 (0,52-0,82)
Flavanones	0,55 (0,39-0,71)	0,56 (0,43-0,68)	0,48 (0,35-0,61)	0,59 (0,43-0,74)	0,51 (0,31-0,71)	0,61 (0,48-0,73)	0,56 (0,42-0,70)	0,52 (0,37-0,67)
Ácidos fenólicos	0,66 (0,46-0,86)	0,65 (0,45-0,84)	0,78 (0,50-1,06)	0,62 (0,43-0,81)	0,55 (0,39-0,71)	0,74 (0,50-0,97)	0,68 (0,46-0,91)	0,67 (0,50-0,84)
Ác hidroxibenzoicos	0,65 (0,49-0,80)	0,81 (0,48-1,14)	0,72 (0,53-0,92)	0,59 (0,40-0,78)	0,77 (0,53-1,00)	0,62 (0,39-0,84)	0,77 (0,48-1,06)	0,67 (0,55-0,80)
Ác hidroxicinámicos	0,74 (0,48-1,00)	0,67 (0,45-0,90)	0,87 (0,55-1,18)	0,69 (0,45-0,93)	0,56 (0,35-0,76)	0,86 (0,56-1,16)	0,69 (0,44-0,93)	0,75 (0,52-0,99)

^a Estimado mediante un metaanálisis de dos etapas utilizando modelos de regresión logística incondicional ajustados por edad, sexo, clase social, consumo de alcohol, índice de masa corporal, antecedentes familiares de cáncer gástrico, tabaquismo, consumo de sal.

5-Discusión

Los resultados obtenidos en la presente tesis sugieren que existe relación entre la ingesta de algunas clases de PF y el desarrollo de cáncer. Concretamente, se observó una reducción del riesgo de CM con los dihidroflavonoles, hidroxibenzaldehídos y hidroxicumarinas. Por otra parte, la ingesta de flavonoides antocianinas, chalconas, dihidroflavonoles y flavan-3-oles reducen el riesgo de desarrollo de CG.

A pesar de estos resultados, la mayoría de estudios que han obtenido evidencia sobre la relación entre el riesgo de cáncer y la ingesta de PF no han evaluado todas las familias y clases de PF, por lo que la presente tesis es el primer trabajo, hasta donde conocemos, que realiza un análisis epidemiológico de todas las familias y subclases de PF.

5.1-Polifenoles y cáncer de mama

Los flavonoides son la clase de PF más estudiada, mientras que otras subclases y compuestos fenólicos, que son ampliamente consumidos por la población europea [61], rara vez se han investigado. Nuestros resultados sugieren que la ingesta de subclases de PF como las chalconas, los dihidroflavonoles, los ácidos hidroxibenzoicos, los estilbenos y las hidroxicumarinas podría actuar como un factor protector en el desarrollo de CM.

Este efecto protector podría explicarse por la capacidad de algunas subclases de PF para generar respuestas similares a la estrogénica (compuestos fitoestrógenos), ya que su estructura se asemeja al tipo más importante de estrógeno en los seres humanos y posee grupos hidroxilo y anillos fenólicos, necesarios para unirse a los receptores de estrógeno. Además, algunos estudios han indicado que ciertas respuestas mediadas por el receptor de estrógeno (RE) inducidas por los PF son comparables, o incluso superiores, a las inducidas por los niveles fisiológicos de estradiol [154], razón por la cual algunos PF todavía se describen como completos agonistas de estrógenos y con una mayor afinidad por ER- β , ejerciendo una respuesta que se opone a los efectos proliferativos de la activación de ER- α [155,156]. Esto puede sugerir que, en los niveles fisiológicos,

los fitoestrógenos activan el ER- β pero no la señalización de pro-cáncer mediada por el ER α (o la activan en un grado mucho menor), lo que permite un efecto antiproliferativo beneficioso.

Los estudios de casos y controles en poblaciones de EE. UU. [157], México [158,159] y Grecia [160] han presentado un riesgo menor de CM en mujeres postmenopáusicas con alto consumo de algunas subclases de flavonoides (flavonas, flavanoles y flavonoles). Sin embargo, en estudios de cohorte prospectivos, el papel quimiopreventivo de los flavonoides y flavonoles sigue sin estar claro [89,161].

Algunos estudios sugieren que las asociaciones protectoras son más fuertes en mujeres premenopáusicas que en postmenopáusicas [162,163], mientras que otros estudios muestran lo contrario [164]. Con respecto a los isoflavonoides, un meta-análisis [164] concluyó que en los países asiáticos su consumo estaba asociado con un menor riesgo de CM pero no en los países europeos, debido a la diferencia de consumo entre Europa y Asia, siendo más elevada Asia.

En línea con nuestros resultados, el estudio de Levi *et al.*, [165] indicó una reducción del riesgo de CM con resveratrol (RSV), el principal contribuyente de la clase de estilbenos. Este compuesto tiene una asociación significativamente protectora, y el estudio tiene en cuenta el RSV del vino y las uvas juntos, y solo el de las uvas, pero este efecto no es significativo cuando solo se tiene en cuenta el RSV del vino.

Nuestros resultados muestran que el alto consumo de dihidroflavonoles, hidroxibenzaldehídos e hidroxicumarinas se asocia con un menor riesgo de CM. La falta de estudios epidemiológicos sobre el efecto de las subclases de PF y el riesgo de CM en mujeres premenopáusicas, postmenopáusicas y el estado de receptores, impide la comparabilidad con otros autores. Sin embargo, algunos estudios de la asociación de la ingesta de café y el riesgo de CM [95,166-168] podrían utilizarse para comparar el efecto de los ácidos hidroxicinámicos y los alquilmetoxifenoles, dado que el café es el principal contribuyente de estas clases. Estos trabajos indican que el consumo de café, té y cafeína no se asoció con el riesgo general de CM.

El papel de los hidroxibenzaldehídos en el riesgo de CM solo se ha evaluado en estudios *in vitro* que muestran sus efectos antiproliferativos [95], apoptóticos

y de regulación de los genes de metástasis en células de CM humanas [169]. Las hidroxycumarinas se caracterizan por su bajo peso molecular y alta biodisponibilidad, y los estudios *in vitro* indicaron que podrían inhibir la angiogénesis tumoral [170], inducir apoptosis [171] e inhibir la actividad de ERB-2 y EGFR [172]. Nuestros resultados de las subclases de PF mostraron un efecto protector en las hidroxycumarinas y estilbenos en todos los CM, antes y después de la menopausia.

Con respecto al estado del receptor, dos estudios no encontraron efectos sobre los flavonoides y el riesgo de CM [161,173]. En contraste, encontramos un efecto protector para el receptor hormonal (+) con chalconas, dihidroflavonoles, flavan-3-ols y estilbenos. Mientras tanto, chalconas, dihidroflavonoles, flavonoles, estilbenos, hidroxibenzaldehídos e hidroxycumarinas se asociaron con un efecto protector sobre el subtipo ERB-2, mientras que las subclases de alquilmtoxifenoles y metoxifenoles fueron identificados como factores de riesgo. Finalmente, los dihidroflavonoles, los estilbenos, los hidroxibenzaldehídos y las hidroxycumarinas se asociaron con un menor riesgo de desarrollar CM triple negativo (TNCM).

En nuestro estudio, las clases de PF con un efecto protector (por ejemplo, estilbenos, dihidroflavonoles e hidroxycumarinas) parecen estar relacionadas principalmente con el consumo de vino. Si bien el alto consumo de alcohol está relacionado con un aumento del riesgo de CM, en nuestra base de datos, el 85,6% de los controles y el 84,6% de los casos se distribuyeron en 0 g/día y 0-12 g/día de consumo de alcohol. Además, un metaanálisis ha indicado que las mujeres que beben una dosis baja de vino tinto podrían tener algunos efectos protectores [174,175]. El efecto protector del consumo de vino de baja dosis en CM podría explicarse por varios mecanismos, ya que el vino contiene altas concentraciones de muchos PF, entre ellos de RSV, el estilbeno más conocido. Un estudio ha demostrado la actividad antiproliferativa de estos compuestos en diferentes líneas celulares de CM, lo que indica que en nM o incluso en el rango pM las concentraciones plasmáticas, obtenidas después de una ingesta moderada de vino, podrían tener un efecto protector en el CM [174,175].

Sin embargo, nuestros resultados deben interpretarse con cautela, ya que no están exentos de limitaciones. La dificultad para evaluar la absorción de la ingesta total de PF por los enterocitos, las diferencias en la estimación del

contenido de PF en los alimentos entre las bases de datos (USDA, PHEX), las pérdidas de PF durante la cocción o el procesamiento, y la precisión del CFA, limitan la precisión de estudios epidemiológicos de este tipo. Los PF se metabolizan ampliamente en el cuerpo humano después de la ingestión, tanto a nivel hepático como intestinal, dando como resultado concentraciones que varían ampliamente entre los individuos y que podrían afectar a la biodisponibilidad de los PF. Se debe tener en cuenta que una parte de la variabilidad entre los resultados de cada estudio podría atribuirse a la heterogeneidad del patrón dietético de cada país, dado que el contenido de PF puede variar según las especies de plantas, las condiciones ambientales, las condiciones geográficas y geográficas así como las condiciones de almacenamiento [176].

En contraste, nuestros modelos están sobreajustados por la ingesta de energía, siendo los modelos resultantes más restrictivos, lo que dificulta la obtención de asociaciones significativas entre la ingesta de PF y CM. Además, los modelos se calcularon en cuartiles y \log_2 para facilitar la comparación, y la prueba FDR para controlar la tasa de falsos descubrimientos. La base de datos completa se construyó con toda la información disponible sobre los contenidos de PF en PHEX, con una combinación de datos extraídos de cromatografía, y de cromatografía después de hidrólisis. Esta base de datos y el alto número de casos y controles con todas las variables relacionadas con la CM, aumentan la precisión desde el punto de vista de la epidemiología nutricional. Además, en este estudio, la información se recopiló de manera similar para los casos y los controles, y utilizamos una metodología integral para evaluar la ingesta de PF, que nos permitió obtener resultados similares en comparación con otros estudios de casos y controles. En general, nuestros datos sobre la ingesta total de PF en la población española muestreada por el estudio MCC-Spain son consistentes con los informes anteriores [61]. Además, este es el estudio más completo sobre PF en CM hasta la fecha, dado que proporcionamos información sobre todos los CM según status menopáusico y estado del receptor hormonal.

5.2-Polifenoles y cáncer gástrico

Algunos estudios han resumido la evidencia epidemiológica sobre la asociación inversa entre la ingesta de PF en la dieta y el riesgo de cáncer, que sugieren una amplia variedad de beneficios biológicos [177-179]. Estos beneficios podrían estar relacionados con un menor riesgo de CG a través de diversos mecanismos, como el efecto antioxidante, el bloqueo de las vías carcinógenas, la inducción de la apoptosis y la inhibición del crecimiento de *H. pylori* [180,181]. Un estudio de casos y controles realizado en Italia [78] sugirió que el efecto protector de las frutas y hortalizas en el riesgo de CG era atribuible a un alto consumo de flavonoides.

Nuestros resultados muestran que la ingesta de flavonoides totales podría actuar como un factor protector en el desarrollo de CG, reduciendo el riesgo entre un 24% (\log_2) y un 40% (Q4vsQ1). En el metaanálisis de Bo et al. sobre la ingesta de flavonoides y CG ha mostrado claros efectos protectores de la ingesta total de flavonoides [80] para la población europea. Entre los estudios incluidos, dos de ellos encontraron un efecto protector significativo de la ingesta de flavonoides en todos los casos de CG, independientemente del tipo histológico y la ubicación anatómica [77,182], al reducir el riesgo un 19% (\log_2) en el estudio de Zamora-Ros et al. [77] y un 51% (Q3vsQ1) en el estudio de Woo et al. [182].

En el análisis del efecto de la ingesta de flavonoides por subclases, hemos observado tres comportamientos diferentes: efecto protector, efecto nulo y efecto de riesgo. Las subclases de flavonoides con efecto protector incluyen chalconas, dihidroflavonoles, proantocianidinas, antocianinas, flavan-3-ols y flavanonas.

Esta es la primera ocasión en la que se analiza el efecto de las chalconas y los dihidroflavonoles en todos los casos de CG. Un compuesto de chalconas, el xanthohumol, induce la muerte celular por apoptosis y la detención del ciclo celular en la fase S [183,184], lo que podría explicar el efecto protector de las chalconas, pero, según nuestro conocimiento, ningún estudio ha analizado el efecto de los dihidroflavonoles en la CG en ensayos *in vivo*, *in vitro* o epidemiológicos.

En el caso de las proantocianidinas, encontramos un efecto protector como en el estudio de Rossi et al. [78]. Un estudio *in vitro* indica que las proantocianidinas son antioxidantes fuertes con baja citotoxicidad, que podrían

desempeñar un papel relevante en la inducción de la apoptosis de las células cancerosas y la detención del ciclo celular [185].

Con respecto a las antocianinas, se observó una tendencia protectora en el estudio llevado a cabo por Woo *et al.* [182]. Entre las antocianinas, se ha demostrado que la delphinidina tiene una fuerte actividad contra el cáncer, posiblemente debido a la supresión de la vía NF- κ B [186,187]. El estudio de Ho *et al.*, encontró que la peonidina suprimió significativamente la invasión y la metástasis de las células de cáncer de pulmón al regular a la baja la metaloproteinasa de la matriz [188].

En el estudio de Woo *et al.*, la subclase de flavonoides, flavan-3-ols, mostró un efecto protector en todos los casos de CG, de manera similar a nuestros resultados. Se ha encontrado que varias líneas celulares de CG eran sensibles a la epicatequina galato (ECG), un flavan-3-ol bien estudiado, al inducir la apoptosis debido a la inhibición de una proteína anti-apoptótica [189]. Muchas vías de señalización podrían verse afectadas por el tratamiento con ECG y se ha demostrado que el ECG ejerce efectos antiproliferativos en las células CG al prevenir la vía de señalización oncogénica de la b-catenina [190].

Los resultados sobre flavanonas obtenidos por Woo *et al.*, están en línea con los resultados obtenidos en el presente estudio, lo que indica un efecto protector de esta subclase para todos los casos de CG. Sobre la clase de flavanonas, se encontró un efecto estadísticamente significativo en las células CG con naringenina, al inhibir la proliferación y migración de las células cancerosas e inducir la apoptosis, que podría estar relacionada con su inhibición de la vía de señalización de Akt [191]. Zhang *et al.* indicaron que otro tratamiento con una flavanona, la hesperetina, disminuyó la proliferación celular e indujo apoptosis a través de la promoción de la acumulación de ERO intracelular [192].

Por otro lado, nuestro estudio muestra que la subclase de flavonoides llamada flavonas no parece tener ningún efecto sobre el CG. Estos resultados no están en línea con otros artículos publicados, como Woo *et al.* en cuyo estudio muestran un efecto protector de esta subclase o Chen *et al.*, que en su estudio *in vitro* observaron efectos apoptóticos de las flavonas en células de CG humano. [193].

Sin embargo, los isoflavonoides y las dihidrochalconas se asociaron con un mayor riesgo de CG. Un estudio sobre el efecto de la ingesta de isoflavonoides y el riesgo de CG en Japón, indica que esta subclase de flavonoides no fue un factor de riesgo significativo de riesgo de CG en hombres o mujeres [194]. Por el contrario, en el estudio de Takayama *et al.* [195] encontró que los resultados no mostraban un efecto significativo de la ingesta de isoflavonoides y el riesgo de CG en los hombres, pero mostraron efectos protectores estadísticamente significativos en las mujeres. En el presente estudio, el bajo número de mujeres diagnosticadas con CG no nos permitió extraer conclusiones. Además, las diferencias en la ingesta de isoflavonoides son sobresalientes: 1,4 mg/día en nuestro estudio y 72,6 mg/día en el estudio japonés. Los resultados del presente estudio revelan un mayor riesgo de CG con el aumento de la ingesta de dihidrochalconas, pero ningún estudio previo ha evaluado esta asociación. Por lo tanto, los resultados deben interpretarse con cautela.

No encontramos diferencias relevantes en el efecto sobre diferentes subtipos histológicos o localización de CG según la ingesta de las diferentes subclases de flavonoides. Aunque los subtipos de CG tienen diferentes factores de riesgo [57], comparten el probable efecto protector de la ingesta de frutas y verduras [58], lo que puede explicar nuestros resultados. Sin embargo, el efecto de los flavonoides como agente quimiopreventivo (que inhibe la promoción del tumor al inducir la detención del ciclo celular y al promover la muerte celular) podría proteger en todos los subtipos de CG. Los análisis realizados por el *continuous update project* (CUP) [13] teniendo en cuenta 24 estudios sobre el consumo de frutas y verduras en relación con el riesgo de desarrollar CG indican que un alto consumo disminuye el riesgo, sin observar diferencias en la protección entre los subtipos anatómicos. Estos resultados pueden estar relacionados con los efectos protectores de los flavonoides, presentes en las frutas y verduras [13].

Contrariamente a los resultados obtenidos en la presente tesis, un estudio de Suecia sobre el flavonol quercetina indica un efecto protector estadísticamente significativo en todos los subtipos de CG y CG. Esta diferencia en los resultados podría explicarse por el uso de un número diferente de flavonoles. En el presente estudio, incluimos todos los compuestos de flavonoles, mientras que Ekstrom *et al.*, solo estudian la quercetina. Por otra parte, el estudio EPIC (European Prospective Investigation into Cancer) [77], muestra resultados similares a los

nuestros en cuanto a la ingesta de isoflavonoides, lo que sugiere una tendencia de riesgo entre el subtipo de CG intestinal para los isoflavonoides. La falta de estudios que analicen todos los casos, todas las clases de flavonoides por ubicación y subtipo histológico, dificulta la comparación.

La evaluación de los efectos de la ingesta de flavonoides y el riesgo de cáncer puede verse obstaculizada por una serie de factores subyacentes, incluida la dificultad para evaluar la biodisponibilidad de los flavonoides, las diferencias en la estimación de su contenido en los alimentos entre las fuentes de la base de datos (PHEX), el uso de factores de retención para tomar en cuenta las pérdidas de cocción o la precisión de los CFA. Todos estos efectos contribuyen a limitar la precisión de los estudios epidemiológicos. Además, los flavonoides se metabolizan ampliamente en el cuerpo humano después de la ingestión, tanto a nivel hepático como colónico, después de la interacción con el intestino [176,196], que varía ampliamente entre los individuos y podría afectar la respuesta del consumo de flavonoides. Debemos tener en cuenta que una parte de la variabilidad entre los resultados de diferentes estudios podría atribuirse a la heterogeneidad del patrón dietético de cada país, ya que el contenido de flavonoides en los alimentos puede variar según las diferentes especies de plantas, y las características ambientales, geográficas y las condiciones de almacenamiento [176].

Las principales fuentes de algunas subclases de flavonoides, como las chalconas, dihidrochalconas y dihidroflavonoles, provienen de las bebidas alcohólicas (vino y cerveza). Según algunos informes, los metabolitos reactivos del alcohol son carcinógenos para los humanos [197]. Este aumento del riesgo también podría explicarse por la producción de prostaglandinas, la generación de especies de radicales de oxígeno y la peroxidación lipídica. Además, el alcohol interfiere con el metabolismo de los retinoides que podrían afectar el crecimiento celular, la diferenciación celular y la apoptosis. El CUP encontró un efecto de riesgo estadísticamente significativo de 45 gramos de alcohol consumido por día [13]. En nuestra base de datos, cerca del 85% de las personas están por debajo de este valor. Dado que el presente estudio se basa en un diseño de estudio de casos y controles, es posible que los casos autorefieran un menor consumo de alcohol que el real y, por lo tanto, estos flavonoides aparezcan como protectores [198].

Existen diferencias en la incidencia de CG por género, probablemente debido a factores hormonales y estilos de vida [57]. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el comportamiento de la ingesta total de flavonoides y sus subclases para hombres y mujeres por separado, solo encontramos resultados estadísticamente significativos para los hombres, probablemente debido a la pequeña cantidad de casos de cáncer femenino incluidos en el estudio.

A pesar de todo ello, no hay que olvidar que la presente tesis comparte ciertas limitaciones conocidas con otros estudios epidemiológicos relacionados con la precisión de los datos inferidos de los métodos de informe indirecto de ingesta de alimentos como el CFA. Además, el contenido de flavonoides de aglicona en los alimentos se estimó sin considerar los factores de retención, lo que podría explicar las pérdidas durante la cocción. Sin embargo, esta información no está disponible para la mayoría de los flavonoides individuales y se necesita más investigación para llenar los vacíos en las bases de datos.

Por el contrario, como fortaleza se podría destacar que este es el primer estudio que incluye las subclases de dihidrochalconas y dihidroflavonoles, analizando los subtipos anatómicos e histológicos de CG tanto globales como categorizados por sexo. En referencia a los modelos utilizados, la inclusión de la ingesta de vegetales en el modelo ajustado final, podría haber disminuido el potencial para encontrar efectos protectores significativos de los flavonoides. Por otra parte, estos mismos modelos están sobreajustados por ingesta de energía, obteniendo resultados más restrictivos, dificultando obtener asociaciones significativas entre la ingesta de flavonoides y CG. En cuanto a la base de datos para el cálculo del consumo de polifenoles, ésta se ha generado automáticamente, incluyendo toda la información disponible sobre el contenido de flavonoides en PHEX. Además, para su cálculo se han realizado ponderaciones sobre los alimentos del CFA y el elevado número de registros de casos y controles con todas las variables relacionadas con el CG, lo que resulta en una mayor precisión desde el punto de vista de la epidemiología nutricional. Además, en este estudio, la información se ha obtenido de manera similar para los casos y los controles, donde utilizamos una metodología integral para evaluar la ingesta de flavonoides y obtuvimos resultados similares a otros estudios de casos y controles. En general, nuestros datos sobre la ingesta total de flavonoides en la población española

muestreada por el estudio MCC-Spain son consistentes con los informes anteriores [61].

5.3-Polifenoles y cáncer gástrico: StoP-project

Este análisis colaborativo de datos originales indica una asociación inversa entre el consumo de PF totales, flavonoides totales y los ácidos fenólicos totales y el riesgo de CG. Entre los flavonoides, encontramos una reducción del riesgo de CG con una mayor ingesta de antocianidinas, flavanoles y flavanonas; entre los ácidos fenólicos, los ácidos hidroxibenzoicos están inversamente relacionados con el riesgo de CG. Nuestro análisis colaborativo es, por lo tanto, consistente con algunas, aunque no todas las evidencias previas. En referencia a los flavonoides, se encontró una asociación inversa entre la ingesta total de sus subclases y el riesgo de CG en un estudio de casos y controles de España que incluyó 354 casos [199]. Además, un metaanálisis llevado a cabo por Bo *et al.* sobre flavonoides totales y cáncer del tracto digestivo encontró que los flavonoides estaban inversamente relacionados con el riesgo de CG en la población europea pero no en los EE. UU. ni en Asia [80].

Varios estudios indicaron una relación inversa entre la ingesta de flavanoles y CG, en línea con nuestros resultados. El estudio de Rossi *et al.* llevado a cabo en Italia, que incluye 230 casos de CG, informó sobre una asociación inversa entre las proantocianidinas, una subclase de flavanoles y el riesgo de CG [78]. En un estudio de casos y controles de Corea, que incluyó 334 casos de CG, se observaron asociaciones inversas para flavan-3-ols, que es parte de flavanoles, además de flavonoides dietéticos totales [182]. Por otra parte, un metaanálisis de estudios epidemiológicos sobre flavan-3-ols y riesgo de cáncer, también reveló una asociación inversa con el riesgo de CG entre las mujeres, pero no en hombres [200].

Con referencia a las antocianidinas, el estudio EPIC, que incluye 683 casos de CG incidentes, mostró una asociación inversa con el riesgo de CG en mujeres [77], pero un metaanálisis sobre antocianidinas y riesgo de CG no reveló ninguna asociación [201].

Lagiou *et al.* realizaron un estudio de casos y controles de Grecia que incluyó 110 casos de CG en el que se mostraron asociaciones protectoras con

flavanonas y flavonoles [148]. Además, Ekstrom *et al.* informó de una asociación inversa con la quercetina, un compuesto de la clase flavonol [114]. Del mismo modo, un metaanálisis con 4593 casos, apoyó la evidencia de una asociación inversa entre los flavonoles y el riesgo de CG [177].

Otros estudios prospectivos, dos de Finlandia, incluyendo 111 casos y 74 casos [202,203], y dos de EE. UU., incluyendo 248 y 1297 casos [76,204], no mostraron ninguna asociación con flavonoides totales y sus subclases. Sin embargo, el estudio EPIC [77] encontró una asociación inversa para flavonoides totales y otras subclases entre las mujeres.

En relación a los ácidos fenólicos, sólo un estudio de casos y controles de México con 257 casos de CG [150], sugirió una asociación inversa con el ácido cinámico, un derivado de los ácidos hidroxicinámicos.

El análisis llevado a cabo en la presente tesis, dado el alto número de casos, tiene el poder adecuado para cuantificar las asociaciones consideradas. Se ha generado automáticamente una base de datos completa, que incluye toda la información disponible sobre el contenido de PF en PHEX, junto con la mezcla de datos extraídos de la cromatografía y la cromatografía después de hidrólisis y las ponderaciones alimentarias del CFA. Además, el alto número de casos y controles, resulta en una mayor precisión desde el punto de vista de la epidemiología nutricional. Las agliconas pueden ser absorbidas por el intestino delgado, pero la mayoría de los PF están presentes en los alimentos en forma de ésteres, glucósidos o polímeros que no pueden ser absorbidos en su forma nativa [65], necesitando una transformación por la microbiota a agliconas para ser absorbidos. Por lo tanto, al estimar PF como agliconas, obtuvimos una aproximación más precisa al consumo real de las estructuras bioactivas [205], reduciendo la sobreestimación de los PF y teniendo una base de datos más completa de su consumo.

Una limitación presente en este análisis colaborativo está relacionada con la precisión de los datos de los CFA, con diferentes detalles e integridad en varios estudios. Además, se calculó la ingesta total de PF incluyendo todas las clases de PF con la excepción de los lignanos y el contenido de aglicona de PF, en los alimentos se estimó sin considerar los factores de retención, que podrían explicar las pérdidas durante la cocción. Sin embargo, esta información no está disponible para la mayoría de los compuestos fenólicos. Además, la metabolización de los PF

se produce después de la ingestión, tanto a nivel hepático como colónico [176,196], y varía entre individuos. Parte de la variabilidad entre los resultados de diferentes estudios puede atribuirse a la heterogeneidad del patrón dietético de cada país, ya que el contenido de PF en los alimentos varía según las diferentes especies de plantas y las condiciones ambientales, geográficas y de almacenamiento [176].

Las asociaciones inversas observadas pueden deberse en parte al efecto específico de una dieta rica en frutas y verduras en el riesgo de CG [58,69,79], en lugar de generalmente a PF. En particular, existe evidencia de una asociación inversa de cítricos [206], que son las principales fuentes alimenticias de Flavanonas. También el consumo de té, un importante contribuyente de flavanoles y ácidos hidroxibenzoicos podría explicar parcialmente la asociación inversa, ya que numerosos estudios encuentran un efecto protector de esta bebida común sobre el riesgo de CG [207]. La relación inversa para varios PF no fue lineal, sino que mostró una tendencia a indicar un exceso de riesgo en el cuartil más bajo en comparación con los posteriores.

Los PF mostraron en diversos estudios diferentes propiedades anticancerígenas, antioxidantes [205,208] antiinflamatorias [128,209,210], y algunos de ellos tienen efectos antimicrobianos, inhibiendo el crecimiento de *H. pylori* [180,181], un factor de riesgo en CG. Además, los flavonoides interactúan con una amplia gama de moléculas involucradas en la apoptosis y las vías de proliferación celular al afectar su expresión o actividad [211]. En particular, la epigallocatequina-3-galato, un compuesto de los flavanoles, puede inducir la apoptosis en distintas líneas celulares CG [189]. La naringenina, un compuesto de flavanonas, inhibe la proliferación y la migración de las células cancerosas e induce la apoptosis en CG [191]. Además, las antocianidinas pueden inducir autofagia y apoptosis en células CG humanas [212] y el ácido gálico, un ácido hidroxibenzoico, puede actuar como inhibidores de metástasis de líneas celulares específicas de CG [43].

En conclusión, los resultados de este nuevo análisis colaborativo sugieren que los PF totales y las subclases seleccionadas podrían reducir el riesgo de CG entre un 33% y un 43%.

Conclusiones

Como conclusiones de la presente tesis, podemos destacar los siguientes puntos:

1-La nueva metodología desarrollada permite a través de un software (*PLP-scrap*) extraer automáticamente los datos de concentración de compuestos fenólicos de los alimentos para la generación de bases de datos. Esto aporta grandes ventajas, entre las que se encuentran: 1) la reducción del tiempo de creación y corrección de dichas bases de datos y 2) la utilización de diferentes metodologías de cuantificación y expresión del contenido de PF de los alimentos.

2-La creación del algoritmo *PLP-calculator* permite la automatización del cálculo de la ingesta por clases, subclases o compuestos fenólicos de los individuos incorporados en las bases de datos. Este algoritmo fue implementado en MCC-Spain, PREDIMED, así como los diferentes estudios pertenecientes al consorcio internacional StoP-Project.

3- Nuestros resultados acerca de la ingesta de PF y su relación con el cáncer de mama en el marco del proyecto MCC-Spain, indican que una elevada ingesta de dihidroflavonoles, estilbenos, hidroxibenzaldehídos e hidroxycumarinas podría reducir el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer hasta en un 30%, no observándose diferencias estadísticamente significativas según el status menopáusico ni por receptores de membrana.

4-En el estudio del consumo de PF y su relación con CG en el proyecto MCC-Spain, se observa un efecto protector de la ingesta de flavonoides, con una reducción del riesgo de hasta el 40%. Este efecto es más notable en las subclases de antocianinas, chalconas, dihidroflavonoles y flavan-3-oles.

5-Finalmente, en relación al estudio sobre el consumo de PF en el marco del consorcio internacional StoP-Project, los resultados indican un efecto protector de la ingesta total de PF, total de flavonoides (especialmente las subclases antocianidinas, flavanoles y flavanonas), así como el total de ácidos fenólicos, con una reducción del riesgo del CG de hasta el 43%.

Conclusions

As conclusions of this thesis, we can highlight the following points:

1-The new methodology developed allows the automatic extraction of data dsxz databases. This provides great advantages, among which are: 1) the reduction of the creation and correction time of said databases and 2) the use of different methodologies for quantification and expression of the FP content of foods.

2-The creation of the PLP-calculator algorithm allows the automation of the calculation of intake by classes, subclasses or phenolic compounds of the individuals incorporated in the databases. This algorithm was implemented in MCC-Spain, PREDIMED, as well as the different studies belonging to the international StoP-Project consortium.

3- The results about the evaluation of the intake of polyphenol and their relationship with breast cancer in the framework of the MCC-Spain project, indicate that a high intake of dihydroflavonols, stilbenes, hydroxybenzaldehydes and hydroxycoumarins could reduce the risk of developing breast cancer up to 30%, not observing statistically significant differences according to the menopausal status or by membrane receptors.

4-In the study of the consumption of polyphenols and its relationship with gastric cancer in the MCC-Spain project, a protective effect of the intake of flavonoids is observed, with a risk reduction up to 40%. This effect is most notable in the subclasses of anthocyanins, chalcones, dihydroflavonols, and flavan-3-ols.

5-Finally, in relation to the consumption of polyphenol within the framework of the international consortium StoP-Project, the results indicate a protective effect of the intake of total polyphenol, total flavonoids (especially the anthocyanidins, flavanols and flavanones subclasses), as well as total phenolic acids, with a reduction in the risk of gastric cancer up to 43%.

*Resultados de investigación durante el
periodo de doctorado*

Publicaciones científicas relacionadas con la tesis doctoral e indicios de calidad:

- **Flavonoids and the Risk of Gastric Cancer: An Exploratory Case-Control Study in the MCC-Spain Study.**

Vitelli Storelli F, Molina AJ, Zamora-Ros R, Fernández-Villa T, Roussou V, Romaguera D, Aragonés N, Obón-Santacana M, Guevara M, Gómez-Acebo I, Fernández-Tardón G, Molina-Barceló A, Olmedo-Requena R, Capelo R, Chirlaque MD, Pérez-Gómez B, Moreno V, Castilla J, Rubín-García M, Pollán M, Kogevinas M, Lera JPB, Martín V. *Nutrients*, 2019 Apr 27;11(5), pii: E967, doi: 10.3390/nu11050967. [Factor de impacto: 4,171; Q1 de las categorías NUTRITION & DIETETICS - SCIENCES]

- **Association between Polyphenol Intake and Breast Cancer Risk by Menopausal and Hormone Receptor Status.**

Facundo Vitelli-Storelli, Raul Zamora-Ros, Antonio J, Molina, Tania Fernández-Villa, Adela Castelló, Juan Pablo Barrio, Pilar Amiano, Eva Ardanaz, Mireia Obón-Santacana, Inés Gómez-Acebo, Guillermo Fernández-Tardón, Ana Molina-Barceló, Juan Alguacil, Rafael Marcos-Gragera, Emma Ruiz-Moreno, Manuela Pedraza, Leire Gil, Marcela Guevara, Gemma Castaño-Vinyals, Trinidad Dierssen-Sotos, Manolis Kogevinas, Nuria Aragonés, Vicente Martín.

Nutrients, 2019 Apr 27;11(5):967, doi: 10.3390/nu11050967, [Factor de impacto: 4,171; Q1 de las categorías NUTRITION & DIETETICS - SCIENCES]

- **Polyphenol intake and gastric cancer risk: findings from the Stomach cancer Pooling (StoP).**

F Vitelli-Storelli, M Rossi, C Pelucchi, M Rota, D Palli, M Ferraroni, N Lunet, S Morais, L López-Carrillo, D Zaridze, D Maximovich, M Rubín García, G Castaño-Vinyals, N Aragonés, M Garcia de la Hera, R Ulises Hernández-Ramírez, E Negri, R Bonzi, M H Ward, A Lagiou, P Lagiou, M López-Cervantes, P Boffetta, M. Constanza Camargo, M P Curado, Zuo-Feng Zhang, J Vioque, C La Vecchia, V Martin.

Cancers [Factor de impacto: 6.126; Q1 de las categorías Investigación del cáncer y Oncología]

Registros de propiedad intelectual relacionados con la tesis doctoral:

- **PLP-scrap:** nº de inscripción LE-168-2019
- **PLP-calculator:** pendiente de tramitación.

Otros resultados publicados durante el periodo doctoral, no relacionados con la presente tesis.

-Otros resultados publicados:

- **Associations between Dietary Polyphenols and Type 2 Diabetes in a Cross-sectional Analysis of the PREDIMED-Plus Trial: Role of Body Mass Index and Sex.**

Tresserra-Rimbau A, Castro-Barquero S, **Vitelli-Storelli F**, Becerra-Tomas N, Vázquez-Ruiz Z, Díaz-López A, Corella D, Castañer O, Romaguera D, Vioque J, Alonso-Gómez ÁM, Wärnberg J, Martínez JA, Serra-Majem L, Estruch R, Tinahones FJ, Lapetra J, Pintó X, Tur JA, López-Miranda J, García-Molina L, Delgado-Rodríguez M, Matía-Martín P, Daimiel L, Rubín-García M, Vidal J, Galdon A, Ros E, Basterra-Gortari FJ, Babio N, Sorlí JV, Hernández Á, Konieczna J, Notario-Barandiaran L, Tojal-Sierra L, Pérez-López J, Abete I, Álvarez-Pérez J, Fernández-García JC, Santos-Lozano JM, Galera-Cusí A, Julibert A, Ruiz-Canela M, Martinez-Lacruz R, Pérez-Vega KA, Galmes-Panades AM, Pastor-Polo C, Moreno-Rodriguez A, Gea A, Fitó M, Lamuela-Raventós RM, Salas-Salvadó J. *Antioxidants (Basel)*, 2019 Nov 8;8(11):537, doi: 10.3390/antiox8110537.

- **Effect of intensive nutritional intervention in patients refractory to weight loss.**

Álvarez-Álvarez L, Rubín-García M, **Vitelli Storelli F**, Fernández-Vázquez JP, Basora J, Fitó M, *Semergen*, 2019 Nov 20:S1138-3593(19)30365-X, doi: 10.1016/j.semereg.2019.09.006,

- **Compositional analysis of dietary patterns.**

Solans M, Coenders G, Marcos-Gragera R, Castelló A, Gràcia-Lavedan E, Benavente Y, Moreno V, Pérez-Gómez B, Amiano P, Fernández-Villa T, Guevara M, Gómez-Acebo I, Fernández-Tardón G, Vanaclocha-Espi M, Chirlaque MD, Capelo R, Barrios R, Aragonés N, Molinuevo A, **Vitelli-Storelli F**, Castilla J, Dierssen-Sotos T, Castaño-Vinyals G, Kogevinas M, Pollán M, Saez M, *Stat Methods Med Res*, 2019 Sep;28(9):2834-2847, doi: 10.1177/0962280218790110.

- **Total polyphenol intake and breast cancer risk in the Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) cohort.**

Gardeazabal I, Romanos-Nanclares A, Martínez-González MÁ, Sánchez-Bayona R, **Vitelli-Storelli F**, Gaforio JJ, Aramendía-Beitia JM, Toledo E. *Br J Nutr*, 2019 Sep 14;122(5):542-551, doi: 10.1017/S0007114518003811.

- **Dietary Polyphenol Intake is Associated with HDL-Cholesterol and A Better Profile of other Components of the Metabolic Syndrome: A PREDIMED-Plus Sub-Study.**

Castro-Barquero S, Tresserra-Rimbau A, **Vitelli-Storelli F**, Doménech M, Salas-Salvadó J, Martín-Sánchez V, Rubín-García M, Buil-Cosiales P, Corella D, Fitó M, Romaguera D, Vioque J, Alonso-Gómez ÁM, Wärnberg J, Martínez JA, Serra-Majem L, Tinahones FJ, Lapetra J, Pintó X, Tur JA, Garcia-Rios A, García-Molina L, Delgado-Rodríguez M, Matía-Martín P, Daimiel L, Vidal J, Vázquez C, Cofán M, Romanos-Nanclares A, Becerra-Tomas N, Barragan R, Castañer O, Konieczna J, González-Palacios S, Sorto-Sánchez C, Pérez-López J, Zulet MA, Bautista-Castaño I, Casas R, Gómez-Perez AM, Santos-Lozano JM, Rodríguez-Sanchez MÁ, Julibert A, Martín-Calvo N, Hernández-Alonso P, Sorlí JV, Sanllorente A, Galmés-Panadés AM, Cases-Pérez E, Goicolea-Güemez L, Ruiz-Canela M, Babio N, Hernáez Á, Lamuela-Raventós RM, Estruch R. *Nutrients*, 2020 Mar 4;12(3):689, doi: 10.3390/nu12030689.

- **Validation of self-reported perception of proximity to industrial facilities: MCC-Spain study.**

Castelló A, Pérez-Gómez B, Lora-Pablos D, Lope V, Castaño-Vinyals G, **Vitelli-Storelli F**, Dierssen-Sotos T, Amiano P, Guevara M, Moreno V, Lozano-Lorca M, Tardón A, Alguacil J, Hernández-García M, Marcos-Gragera R, Chirlaque López MD, Ardanaz E, Ibarluzea J, Gómez-Acebo I, Molina AJ, O'Callaghan-Gordo C, Aragonés N, Kogevinas M, Pollán M, García-Pérez J. *Environ Int*, 2020 Feb;135:105316, doi: 10.1016/j.envint.2019.105316.

- Analysis of fatality rates case of SARS-CoV-2 infection in the Autonomous Communities of Spain,

Martín-Sánchez V, Barquilla-García A, **Vitelli-Storelli F**, Segura-Fragoso A, Ruiz-García A, Serrano-Cumplido A, Olmo-Quintana V, Calderón-Montero A. *Semergen*, 2020 Aug; 46 Suppl 1:12-19. doi:10.1016/j.semereg.2020.06.013.

1. National Cancer institute (NIH) (2019) Definición de cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/cancer>. Accessed 17/05/2019
2. Weitzel JN, Blazer KR, MacDonald DJ, Culver JO, Offit K (2011) Genetics, genomics, and cancer risk assessment: State of the Art and Future Directions in the Era of Personalized Medicine. *CA: a cancer journal for clinicians* 61 (5):327-359. doi:10.3322/caac.20128
3. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
4. Maeda H, Akaike T (1998) Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry Biokhimia* 63 (7):854-865
5. Grinberg-Bleyer Y, Ghosh S (2016) A Novel Link between Inflammation and Cancer. *Cancer cell* 30 (6):829-830. doi:10.1016/j.ccell.2016.11.013
6. Fiaschi T, Chiarugi P (2012) Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *International journal of cell biology* 2012:762825. doi:10.1155/2012/762825
7. White MC, Holman DM, Boehm JE, Peipins LA, Grossman M, Henley SJ (2014) Age and cancer risk: a potentially modifiable relationship. *American journal of preventive medicine* 46 (3 Suppl 1):S7-15. doi:10.1016/j.amepre.2013.10.029
8. Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). Datos cáncer de mama 2018.. <http://observatorio.aecc.es/>. Accessed 21-07-2019
9. American Cancer Society (2018). Tipos de cáncer de seno. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/tipos-de-cancer-de-seno.html>. Accessed 15/09/2018
10. Yeo SK, Guan JL (2017) Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? *Trends in cancer* 3 (11):753-760. doi:10.1016/j.trecan.2017.09.001
11. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Shi W, Jiang J, Yao PP, Zhu HP (2017) Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International journal of biological sciences* 13 (11):1387-1397. doi:10.7150/ijbs.21635
12. Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). Prevención cáncer de mama. <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-mama/prevencion/factores-riesgo-cancer-mama>. Accessed 23/08/2019
13. World cancer research fund/American institute for cancer research. Diet, nutrition, physical activity and cancer: a global perspective. Continuous update project expert report. (2018).

14. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast C (1996) Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 347 (9017):1713-1727
15. Beral V, Million Women Study C (2003) Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362 (9382):419-427
16. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Hormonal Contraception and Post-menopausal Hormonal Therapy. (1999). International Agency for Research on Cancer; 1999 No 72
17. Kelsey JL, Gammon MD, John EM (1993) Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiologic reviews* 15 (1):36-47
18. Deng CX (2006) BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic acids research* 34 (5):1416-1426. doi:10.1093/nar/gkl010
19. Kim A, Jang MH, Lee SJ, Bae YK (2017) Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of breast cancer* 20 (2):150-159. doi:10.4048/jbc.2017.20.2.150
20. Petri AL, Tjonneland A, Gamborg M, Johansen D, Hoidrup S, Sorensen TI, Gronbaek M (2004) Alcohol intake, type of beverage, and risk of breast cancer in pre- and postmenopausal women. *Alcoholism, clinical and experimental research* 28 (7):1084-1090
21. Shield KD, Soerjomataram I, Rehm J (2016) Alcohol Use and Breast Cancer: A Critical Review. *Alcoholism, clinical and experimental research* 40 (6):1166-1181. doi:10.1111/acer.13071
22. Touvier M, Druesne-Pecollo N, Kesse-Guyot E, Andreeva VA, Fezeu L, Galan P, Hercberg S, Latino-Martel P (2013) Dual association between polyphenol intake and breast cancer risk according to alcohol consumption level: a prospective cohort study. *Breast cancer research and treatment* 137 (1):225-236. doi:10.1007/s10549-012-2323-y
23. Seitz HK, Stickel F (2007) Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nature reviews Cancer* 7 (8):599-612. doi:10.1038/nrc2191
24. Jones ME, Schoemaker MJ, Wright LB, Ashworth A, Swerdlow AJ (2017) Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. *Breast cancer research : BCR* 19 (1):118. doi:10.1186/s13058-017-0908-4
25. Tredaniel J, Boffetta P, Buiatti E, Saracci R, Hirsch A (1997) Tobacco smoking and gastric cancer: review and meta-analysis. *International journal of cancer* 72 (4):565-573

26. Ladeiras-Lopes R, Pereira AK, Nogueira A, Pinheiro-Torres T, Pinto I, Santos-Pereira R, Lunet N (2008) Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Cancer causes & control : CCC* 19 (7):689-701. doi:10.1007/s10552-008-9132-y
27. Monninkhof EM, Elias SG, Vlems FA, van der Tweel I, Schuit AJ, Voskuil DW, van Leeuwen FE, Tfpac (2007) Physical activity and breast cancer: a systematic review. *Epidemiology* 18 (1):137-157. doi:10.1097/01.ede.0000251167.75581.98
28. Margolis KL, Mucci L, Braaten T, Kumle M, Trolle Lagerros Y, Adami HO, Lund E, Weiderpass E (2005) Physical activity in different periods of life and the risk of breast cancer: the Norwegian-Swedish Women's Lifestyle and Health cohort study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 14 (1):27-32
29. Montano MA, da Cruz IB, Duarte MM, Krewer Cda C, da Rocha MI, Manica-Cattani MF, Soares FA, Rosa G, Maris AF, Battiston FG, Trott A, Lera JP (2012) Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 60 (1):30-33. doi:10.1016/j.cyto.2012.05.022
30. Montano MA, Barrio Lera JP, Gottlieb MG, Schwanke CH, da Rocha MI, Manica-Cattani MF, dos Santos GF, da Cruz IB (2009) Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. *Molecular and cellular biochemistry* 328 (1-2):33-40. doi:10.1007/s11010-009-0071-z
31. Annina Seiler MAC, Ryan L. Brown, Christopher P. Fagundes (2018) Obesity, Dietary Factors, Nutrition, and Breast Cancer Risk. *Current Breast Cancer Reports*
32. Michael J. Thun MSL, James R. Cerhan, Christopher Haiman, David Schottenfeld (2018) *Cancer epidemiology*, vol 4to. Oxford University Press,
33. Moisan J, Meyer F, Gingras S (1990) Diet and age at menarche. *Cancer causes & control : CCC* 1 (2):149-154
34. Maclure M, Travis LB, Willett W, MacMahon B (1991) A prospective cohort study of nutrient intake and age at menarche. *The American journal of clinical nutrition* 54 (4):649-656. doi:10.1093/ajcn/54.4.649
35. Ennour-Idrissi K, Maunsell E, Diorio C (2015) Effect of physical activity on sex hormones in women: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Breast cancer research : BCR* 17 (1):139. doi:10.1186/s13058-015-0647-3
36. Duncan AM (2004) The role of nutrition in the prevention of breast cancer. *AACN clinical issues* 15 (1):119-135

37. Ronco A.L. SE (2012) Nutricional epidemiology of breast cancer. doi:10.1007/978-94-007-2397-9
38. Boyle P, Levin B (2008) World cancer report 2008. International Agency for Research on Cancer, Lyon
39. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015) Global cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians 65 (2):87-108. doi:10.3322/caac.21262
40. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International journal of cancer 136 (5):E359-386. doi:10.1002/ijc.29210
41. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians 61 (2):69-90. doi:10.3322/caac.20107
42. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians. doi:10.3322/caac.21492
43. Aragonés N, Izarzugaza MI, Ramos M, Chirlaque MD, Almar E, Martínez C, Oesophago-gastric Cancer Working G (2010) Trends in oesophago-gastric cancer incidence in Spain: analysis by subsite and histology. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology 21 Suppl 3:iii69-75. doi:10.1093/annonc/mdq083
44. de Martel C, Forman D, Plummer M (2013) Gastric cancer: epidemiology and risk factors. Gastroenterology clinics of North America 42 (2):219-240. doi:10.1016/j.gtc.2013.01.003
45. Sheh A, Ge Z, Parry NM, Muthupalani S, Rager JE, Raczynski AR, Mobley MW, McCabe AF, Fry RC, Wang TC, Fox JG (2011) 17beta-estradiol and tamoxifen prevent gastric cancer by modulating leukocyte recruitment and oncogenic pathways in Helicobacter pylori-infected INS-GAS male mice. Cancer prevention research 4 (9):1426-1435. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0219
46. Holian O, Wahid S, Atten MJ, Attar BM (2002) Inhibition of gastric cancer cell proliferation by resveratrol: role of nitric oxide. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology 282 (5):G809-816. doi:10.1152/ajpgi.00193.2001
47. Figueiredo C, Van Doorn LJ, Nogueira C, Soares JM, Pinho C, Figueira P, Quint WG, Carneiro F (2001) Helicobacter pylori genotypes are associated with clinical outcome in Portuguese patients and show a high prevalence of infections with multiple strains. Scandinavian journal of gastroenterology 36 (2):128-135

48. Basset C, Holton J, Gatta L, Ricci C, Bernabucci V, Liuzzi G, Vaira D (2004) Helicobacter pylori infection: anything new should we know? *Alimentary pharmacology & therapeutics* 20 Suppl 2:31-41. doi:10.1111/j.1365-2036.2004.02040.x
49. Gu J, Zou H, Zheng L, Li X, Chen S, Zhang L (2014) GSTM1 null genotype is associated with increased risk of gastric cancer in both ever-smokers and non-smokers: a meta-analysis of case-control studies. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35 (4):3439-3445. doi:10.1007/s13277-013-1454-z
50. Gonzalez CA, Sala N, Rokkas T (2013) Gastric cancer: epidemiologic aspects. *Helicobacter* 18 Suppl 1:34-38. doi:10.1111/hel.12082
51. Xue H, Liu J, Lin B, Wang Z, Sun J, Huang G (2012) A meta-analysis of interleukin-8 -251 promoter polymorphism associated with gastric cancer risk. *PloS one* 7 (1):e28083. doi:10.1371/journal.pone.0028083
52. Duell EJ, Sala N, Travier N, Munoz X, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Barricarte A, Arriola L, Navarro C, Sanchez-Cantalejo E, Quiros JR, Krogh V, Vineis P, Mattiello A, Tumino R, Khaw KT, Wareham N, Allen NE, Peeters PH, Numans ME, Bueno-de-Mesquita HB, van Oijen MG, Bamia C, Benetou V, Trichopoulos D, Canzian F, Kaaks R, Boeing H, Bergmann MM, Lund E, Ehrnstrom R, Johansen D, Hallmans G, Stenling R, Tjonneland A, Overvad K, Ostergaard JN, Ferrari P, Fedirko V, Jenab M, Nesi G, Riboli E, Gonzalez CA (2012) Genetic variation in alcohol dehydrogenase (ADH1A, ADH1B, ADH1C, ADH7) and aldehyde dehydrogenase (ALDH2), alcohol consumption and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. *Carcinogenesis* 33 (2):361-367. doi:10.1093/carcin/bgr285
53. Santibanez M, Alguacil J, de la Hera MG, Navarrete-Munoz EM, Llorca J, Aragonés N, Kauppinen T, Vioque J, Group PS (2012) Occupational exposures and risk of stomach cancer by histological type. *Occupational and environmental medicine* 69 (4):268-275. doi:10.1136/oemed-2011-100071
54. Wolin KY, Tuchman H (2011) Physical activity and gastrointestinal cancer prevention. Recent results in cancer research *Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer* 186:73-100. doi:10.1007/978-3-642-04231-7_4
55. Yang P, Zhou Y, Chen B, Wan HW, Jia GQ, Bai HL, Wu XT (2009) Overweight, obesity and gastric cancer risk: results from a meta-analysis of cohort studies. *European journal of cancer* 45 (16):2867-2873. doi:10.1016/j.ejca.2009.04.019
56. Fund WCR (2018) Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. .

57. Colquhoun A, Arnold M, Ferlay J, Goodman KJ, Forman D, Soerjomataram I (2015) Global patterns of cardia and non-cardia gastric cancer incidence in 2012. *Gut* 64 (12):1881-1888. doi:10.1136/gutjnl-2014-308915
58. Lunet N, Valbuena C, Vieira AL, Lopes C, Lopes C, David L, Carneiro F, Barros H (2007) Fruit and vegetable consumption and gastric cancer by location and histological type: case-control and meta-analysis. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation* 16 (4):312-327. doi:10.1097/01.cej.0000236255.95769.22
59. Ye W, Chow WH, Lagergren J, Yin L, Nyren O (2001) Risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia in patients with gastroesophageal reflux diseases and after antireflux surgery. *Gastroenterology* 121 (6):1286-1293
60. Kamangar F, Dawsey SM, Blaser MJ, Perez-Perez GI, Pietinen P, Newschaffer CJ, Abnet CC, Albanes D, Virtamo J, Taylor PR (2006) Opposing risks of gastric cardia and noncardia gastric adenocarcinomas associated with *Helicobacter pylori* seropositivity. *Journal of the National Cancer Institute* 98 (20):1445-1452. doi:10.1093/jnci/djj393
61. Zamora-Ros R, Knaze V, Rothwell JA, Hemon B, Moskal A, Overvad K, Tjonneland A, Kyro C, Fagherazzi G, Boutron-Ruault MC, Touillaud M, Katzke V, Kuhn T, Boeing H, Forster J, Trichopoulou A, Valanou E, Peppas E, Palli D, Agnoli C, Ricceri F, Tumino R, de Magistris MS, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Engeset D, Skeie G, Hjartaker A, Menendez V, Agudo A, Molina-Montes E, Huerta JM, Barricarte A, Amiano P, Sonestedt E, Nilsson LM, Landberg R, Key TJ, Khaw KT, Wareham NJ, Lu Y, Slimani N, Romieu I, Riboli E, Scalbert A (2016) Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *European journal of nutrition* 55 (4):1359-1375. doi:10.1007/s00394-015-0950-x
62. Borriello SP, Setchell KD, Axelson M, Lawson AM (1985) Production and metabolism of lignans by the human faecal flora. *The Journal of applied bacteriology* 58 (1):37-43
63. Wang CZ, Ma XQ, Yang DH, Guo ZR, Liu GR, Zhao GX, Tang J, Zhang YN, Ma M, Cai SQ, Ku BS, Liu SL (2010) Production of enterodiols from defatted flaxseeds through biotransformation by human intestinal bacteria. *BMC microbiology* 10:115. doi:10.1186/1471-2180-10-115
64. Velázquez Armenta Y. NOA (2005) Factors affecting drug absorption in children. *Revista mexicana de pediatría* 72 (3):148-153
65. Bohn T (2014) Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition reviews* 72 (7):429-452. doi:10.1111/nure.12114

66. Gonzales GB, Smagghe G, Grootaert C, Zotti M, Raes K, Van Camp J (2015) Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: a sequential structure-activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity. *Drug metabolism reviews* 47 (2):175-190. doi:10.3109/03602532.2014.1003649
67. D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scaccocchio B, Masella R (2010) Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences* 11 (4):1321-1342. doi:10.3390/ijms11041321
68. Gan RY, Li HB, Sui ZQ, Corke H (2018) Absorption, metabolism, anti-cancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): An updated review. *Critical reviews in food science and nutrition* 58 (6):924-941. doi:10.1080/10408398.2016.1231168
69. Turati F, Rossi M, Pelucchi C, Levi F, La Vecchia C (2015) Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies. *The British journal of nutrition* 113 Suppl 2:S102-110. doi:10.1017/S0007114515000148
70. van Duijnhoven FJ, Bueno-De-Mesquita HB, Ferrari P, Jenab M, Boshuizen HC, Ros MM, Casagrande C, Tjonneland A, Olsen A, Overvad K, Thorlacius-Ussing O, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Morois S, Kaaks R, Linseisen J, Boeing H, Nothlings U, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Misirli G, Palli D, Sieri S, Panico S, Tumino R, Vineis P, Peeters PH, van Gils CH, Ocke MC, Lund E, Engeset D, Skeie G, Suarez LR, Gonzalez CA, Sanchez MJ, Dorronsoro M, Navarro C, Barricarte A, Berglund G, Manjer J, Hallmans G, Palmqvist R, Bingham SA, Khaw KT, Key TJ, Allen NE, Boffetta P, Slimani N, Rinaldi S, Gallo V, Norat T, Riboli E (2009) Fruit, vegetables, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *The American journal of clinical nutrition* 89 (5):1441-1452. doi:10.3945/ajcn.2008.27120
71. Bosetti C, Turati F, Dal Pont A, Ferraroni M, Polesel J, Negri E, Serraino D, Talamini R, La Vecchia C, Zeegers MP (2013) The role of Mediterranean diet on the risk of pancreatic cancer. *British journal of cancer* 109 (5):1360-1366. doi:10.1038/bjc.2013.345
72. Turati F, Carioli G, Bravi F, Ferraroni M, Serraino D, Montella M, Giacosa A, Toffolutti F, Negri E, Levi F, La Vecchia C (2018) Mediterranean Diet and Breast Cancer Risk. *Nutrients* 10 (3). doi:10.3390/nu10030326
73. Bamia C, Lagiou P, Buckland G, Grioni S, Agnoli C, Taylor AJ, Dahm CC, Overvad K, Olsen A, Tjonneland A, Cottet V, Boutron-Ruault MC, Morois S, Grote V, Teucher B, Boeing H, Buijsse B, Trichopoulos D, Adarakis G, Tumino R, Naccarati A, Panico S, Palli D, Bueno-de-Mesquita HB, van Duijnhoven FJ, Peeters PH, Engeset D, Skeie G, Lund E, Sanchez MJ, Barricarte A, Huerta JM, Quiros JR, Dorronsoro M, Ljuslinder I, Palmqvist R, Drake I, Key

- TJ, Khaw KT, Wareham N, Romieu I, Fedirko V, Jenab M, Romaguera D, Norat T, Trichopoulou A (2013) Mediterranean diet and colorectal cancer risk: results from a European cohort. *European journal of epidemiology* 28 (4):317-328. doi:10.1007/s10654-013-9795-x
74. Larsson SC, Orsini N, Wolk A (2006) Processed meat consumption and stomach cancer risk: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* 98 (15):1078-1087. doi:10.1093/jnci/djj301
75. Norat T, Aune D, Chan D, Romaguera D (2014) Fruits and vegetables: updating the epidemiologic evidence for the WCRF/AICR lifestyle recommendations for cancer prevention. *Cancer treatment and research* 159:35-50. doi:10.1007/978-3-642-38007-5_3
76. Petrick JL, Steck SE, Bradshaw PT, Trivers KF, Abrahamson PE, Engel LS, He K, Chow WH, Mayne ST, Risch HA, Vaughan TL, Gammon MD (2015) Dietary intake of flavonoids and oesophageal and gastric cancer: incidence and survival in the United States of America (USA). *British journal of cancer* 112 (7):1291-1300. doi:10.1038/bjc.2015.25
77. Zamora-Ros R, Agudo A, Lujan-Barroso L, Romieu I, Ferrari P, Knaze V, Bueno-de-Mesquita HB, Leenders M, Travis RC, Navarro C, Sanchez-Cantalejo E, Slimani N, Scalbert A, Fedirko V, Hjartaker A, Engeset D, Skeie G, Boeing H, Forster J, Li K, Teucher B, Agnoli C, Tumino R, Mattiello A, Saieva C, Johansson I, Stenling R, Redondo ML, Wallstrom P, Ericson U, Khaw KT, Mulligan AA, Trichopoulou A, Dilis V, Katsoulis M, Peeters PH, Iqbal L, Tjønneland A, Halkjaer J, Touillaud M, Perquier F, Fagherazzi G, Amiano P, Ardanaz E, Bredsdorff L, Overvad K, Ricceri F, Riboli E, Gonzalez CA (2012) Dietary flavonoid and lignan intake and gastric adenocarcinoma risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *The American journal of clinical nutrition* 96 (6):1398-1408. doi:10.3945/ajcn.112.037358
78. Rossi M, Rosato V, Bosetti C, Lagiou P, Parpinel M, Bertuccio P, Negri E, La Vecchia C (2010) Flavonoids, proanthocyanidins, and the risk of stomach cancer. *Cancer causes & control : CCC* 21 (10):1597-1604. doi:10.1007/s10552-010-9588-4
79. Metere A, Giacomelli L (2017) Absorption, metabolism and protective role of fruits and vegetables polyphenols against gastric cancer. *European review for medical and pharmacological sciences* 21 (24):5850-5858. doi:10.26355/eurrev_201712_14034
80. Bo Y, Sun J, Wang M, Ding J, Lu Q, Yuan L (2016) Dietary flavonoid intake and the risk of digestive tract cancers: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports* 6:24836. doi:10.1038/srep24836

81. La Vecchia C, Bosetti C (2006) Diet and cancer risk in Mediterranean countries: open issues. *Public health nutrition* 9 (8A):1077-1082. doi:10.1017/S1368980007668475
82. Giacosa A, Barale R, Bavaresco L, Gatenby P, Gerbi V, Janssens J, Johnston B, Kas K, La Vecchia C, Mainguet P, Morazzoni P, Negri E, Pelucchi C, Pezzotti M, Rondanelli M (2013) Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation* 22 (1):90-95. doi:10.1097/CEJ.0b013e328354d2d7
83. Billingsley HE, Carbone S (2018) The antioxidant potential of the Mediterranean diet in patients at high cardiovascular risk: an in-depth review of the PREDIMED. *Nutrition & diabetes* 8 (1):13. doi:10.1038/s41387-018-0025-1
84. Trichopoulou A, Lagiou P, Kuper H, Trichopoulos D (2000) Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 9 (9):869-873
85. Rosato V, Guercio V, Bosetti C, Negri E, Serraino D, Giacosa A, Montella M, La Vecchia C, Tavani A (2016) Mediterranean diet and colorectal cancer risk: a pooled analysis of three Italian case-control studies. *British journal of cancer* 115 (7):862-865. doi:10.1038/bjc.2016.245
86. Fung TT, McCullough ML, Newby PK, Manson JE, Meigs JB, Rifai N, Willett WC, Hu FB (2005) Diet-quality scores and plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *The American journal of clinical nutrition* 82 (1):163-173. doi:10.1093/ajcn.82.1.163
87. Fito M, Estruch R, Salas-Salvado J, Martinez-Gonzalez MA, Aros F, Vila J, Corella D, Diaz O, Saez G, de la Torre R, Mitjavila MT, Munoz MA, Lamuela-Raventos RM, Ruiz-Gutierrez V, Fiol M, Gomez-Gracia E, Lapetra J, Ros E, Serra-Majem L, Covas MI, Investigators PS (2014) Effect of the Mediterranean diet on heart failure biomarkers: a randomized sample from the PREDIMED trial. *European journal of heart failure* 16 (5):543-550. doi:10.1002/ejhf.61
88. Martinez-Florez S, Gonzalez-Gallego J, Culebras JM, Tunon MJ (2002) [Flavonoids: properties and anti-oxidizing action]. *Nutricion hospitalaria* 17 (6):271-278
89. Martinez-Perez C, Ward C, Cook G, Mullen P, McPhail D, Harrison DJ, Langdon SP (2014) Novel flavonoids as anti-cancer agents: mechanisms of action and promise for their potential application in breast cancer. *Biochemical Society transactions* 42 (4):1017-1023. doi:10.1042/BST20140073

90. Charles C, Chemais M, Stevigny C, Dubois J, Nachergael A, Duez P (2012) Measurement of the influence of flavonoids on DNA repair kinetics using the comet assay. *Food chemistry* 135 (4):2974-2981. doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.112
91. Yang X, Luo E, Liu X, Han B, Yu X, Peng X (2016) Delphinidin-3-glucoside suppresses breast carcinogenesis by inactivating the Akt/HOTAIR signaling pathway. *BMC cancer* 16:423. doi:10.1186/s12885-016-2465-0
92. Niedzwiecki A, Roomi MW, Kalinovsky T, Rath M (2016) Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations. *Nutrients* 8 (9). doi:10.3390/nu8090552
93. Fujiki H, Sueoka E, Watanabe T, Suganuma M (2015) Synergistic enhancement of anticancer effects on numerous human cancer cell lines treated with the combination of EGCG, other green tea catechins, and anticancer compounds. *Journal of cancer research and clinical oncology* 141 (9):1511-1522. doi:10.1007/s00432-014-1899-5
94. Chen C, Yu R, Owuor ED, Kong AN (2000) Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Archives of pharmacal research* 23 (6):605-612
95. Elsherbiny NM, Younis NN, Shaheen MA, Elseweidy MM (2016) The synergistic effect between vanillin and doxorubicin in ehrlich ascites carcinoma solid tumor and MCF-7 human breast cancer cell line. *Pathology, research and practice* 212 (9):767-777. doi:10.1016/j.prp.2016.06.004
96. Gao Y, Tollefsbol TO (2018) Combinational Proanthocyanidins and Resveratrol Synergistically Inhibit Human Breast Cancer Cells and Impact Epigenetic(-)Mediating Machinery. *International journal of molecular sciences* 19 (8). doi:10.3390/ijms19082204
97. Liu RH (2004) Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of nutrition* 134 (12 Suppl):3479S-3485S. doi:10.1093/jn/134.12.3479S
98. Wu JM, Hsieh TC (2008) Suppression of cell proliferation and gene expression by combinatorial synergy of EGCG, resveratrol and γ -tocotrienol in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. *International Journal of Oncology* 33 (4). doi:10.3892/ijo_00000073
99. Hsieh TC, Wu JM (2008) Suppression of cell proliferation and gene expression by combinatorial synergy of EGCG, resveratrol and gamma-tocotrienol in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. *International journal of oncology* 33 (4):851-859

100. Kim J, Cho YA, Choi WJ, Jeong SH (2014) Gene-diet interactions in gastric cancer risk: a systematic review. *World journal of gastroenterology* 20 (28):9600-9610. doi:10.3748/wjg.v20.i28.9600
101. Fetoni AR, Paciello F, Mezzogori D, Rolesi R, Eramo SL, Paludetti G, Troiani D (2015) Molecular targets for anticancer redox chemotherapy and cisplatin-induced ototoxicity: the role of curcumin on pSTAT3 and Nrf-2 signalling. *British journal of cancer* 113 (10):1434-1444. doi:10.1038/bjc.2015.359
102. Niestroy J, Barbara A, Herbst K, Rode S, van Liempt M, Roos PH (2011) Single and concerted effects of benzo[a]pyrene and flavonoids on the AhR and Nrf2-pathway in the human colon carcinoma cell line Caco-2. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 25 (3):671-683. doi:10.1016/j.tiv.2011.01.008
103. Wyllie AH (1985) The biology of cell death in tumours. *Anticancer research* 5 (1):131-136
104. Oh J, Hlatky L, Jeong YS, Kim D (2016) Therapeutic Effectiveness of Anticancer Phytochemicals on Cancer Stem Cells. *Toxins* 8 (7). doi:10.3390/toxins8070199
105. Pires BR, IS DEA, Souza LD, Rodrigues JA, Mencialha AL (2016) Targeting Cellular Signaling Pathways in Breast Cancer Stem Cells and its Implication for Cancer Treatment. *Anticancer research* 36 (11):5681-5691. doi:10.21873/anticancer.11151
106. Dandawate PR, Subramaniam D, Jensen RA, Anant S (2016) Targeting cancer stem cells and signaling pathways by phytochemicals: Novel approach for breast cancer therapy. *Seminars in cancer biology* 40-41:192-208. doi:10.1016/j.semcancer.2016.09.001
107. Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, Agarwal B, Ye L, Ramadori G, Teodoro JS, Hubbard BP, Varela AT, Davis JG, Varamini B, Hafner A, Moaddel R, Rolo AP, Coppari R, Palmeira CM, de Cabo R, Baur JA, Sinclair DA (2012) SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell metabolism* 15 (5):675-690. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.003
108. Rothwell JA, Knaze V, Zamora-Ros R (2017) Polyphenols: dietary assessment and role in the prevention of cancers. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 20 (6):512-521. doi:10.1097/MCO.0000000000000424
109. Azqueta A, Collins A (2016) Polyphenols and DNA Damage: A Mixed Blessing. *Nutrients* 8 (12). doi:10.3390/nu8120785
110. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, Montagna JP, De Biasi S, Roat E, Bertocelli L, Cooper EL, Cossarizza A (2011) Quercetin and cancer chemoprevention. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2011:591356. doi:10.1093/ecam/nea053

111. Zhang JY, Lin MT, Zhou MJ, Yi T, Tang YN, Tang SL, Yang ZJ, Zhao ZZ, Chen HB (2015) Combinational Treatment of Curcumin and Quercetin against Gastric Cancer MGC-803 Cells in Vitro. *Molecules* 20 (6):11524-11534. doi:10.3390/molecules200611524
112. Wang K, Liu R, Li J, Mao J, Lei Y, Wu J, Zeng J, Zhang T, Wu H, Chen L, Huang C, Wei Y (2011) Quercetin induces protective autophagy in gastric cancer cells: involvement of Akt-mTOR- and hypoxia-induced factor 1alpha-mediated signaling. *Autophagy* 7 (9):966-978
113. Nair MP, Mahajan S, Reynolds JL, Aalinkeel R, Nair H, Schwartz SA, Kandaswami C (2006) The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF-kappa beta system. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 13 (3):319-328. doi:10.1128/CVI.13.3.319-328.2006
114. Ekstrom AM, Serafini M, Nyren O, Wolk A, Bosetti C, Bellocco R (2011) Dietary quercetin intake and risk of gastric cancer: results from a population-based study in Sweden. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 22 (2):438-443. doi:10.1093/annonc/mdq390
115. Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI (1989) Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical pharmacology* 38 (11):1763-1769
116. Sirtori CR, Arnoldi A, Johnson SK (2005) Phytoestrogens: end of a tale? *Annals of medicine* 37 (6):423-438. doi:10.1080/07853890510044586
117. Matsumura A, Ghosh A, Pope GS, Darbre PD (2005) Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 94 (5):431-443. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.12.041
118. Koehler KF, Helguero LA, Haldosen LA, Warner M, Gustafsson JA (2005) Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocrine reviews* 26 (3):465-478. doi:10.1210/er.2004-0027
119. Balfe P, McCann A, McGoldrick A, McAllister K, Kennedy M, Dervan P, Kerin MJ (2004) Estrogen receptor alpha and beta profiling in human breast cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 30 (5):469-474. doi:10.1016/j.ejso.2004.02.010
120. Rice S, Whitehead SA (2006) Phytoestrogens and breast cancer--promoters or protectors? *Endocrine-related cancer* 13 (4):995-1015. doi:10.1677/erc.1.01159

121. Mao Q, Unadkat JD (2015) Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update. *The AAPS journal* 17 (1):65-82. doi:10.1208/s12248-014-9668-6
122. Tan KW, Li Y, Paxton JW, Birch NP, Scheepens A (2013) Identification of novel dietary phytochemicals inhibiting the efflux transporter breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Food chemistry* 138 (4):2267-2274. doi:10.1016/j.foodchem.2012.12.021
123. Katayama K, Masuyama K, Yoshioka S, Hasegawa H, Mitsuhashi J, Sugimoto Y (2007) Flavonoids inhibit breast cancer resistance protein-mediated drug resistance: transporter specificity and structure-activity relationship. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 60 (6):789-797. doi:10.1007/s00280-007-0426-7
124. Zhang S, Yang X, Coburn RA, Morris ME (2005) Structure activity relationships and quantitative structure activity relationships for the flavonoid-mediated inhibition of breast cancer resistance protein. *Biochemical pharmacology* 70 (4):627-639. doi:10.1016/j.bcp.2005.05.017
125. Hermsdorff HH, Zulet MA, Puchau B, Martinez JA (2010) Fruit and vegetable consumption and proinflammatory gene expression from peripheral blood mononuclear cells in young adults: a translational study. *Nutrition & metabolism* 7:42. doi:10.1186/1743-7075-7-42
126. Panagiotakos DB, Dimakopoulou K, Katsouyanni K, Bellander T, Grau M, Koenig W, Lanki T, Pistelli R, Schneider A, Peters A, Group AS (2009) Mediterranean diet and inflammatory response in myocardial infarction survivors. *International journal of epidemiology* 38 (3):856-866. doi:10.1093/ije/dyp142
127. Salas-Salvado J, Garcia-Arellano A, Estruch R, Marquez-Sandoval F, Corella D, Fiol M, Gomez-Gracia E, Vinales E, Aros F, Herrera C, Lahoz C, Lapetra J, Perona JS, Munoz-Aguado D, Martinez-Gonzalez MA, Ros E, Investigators P (2008) Components of the Mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease. *European journal of clinical nutrition* 62 (5):651-659. doi:10.1038/sj.ejcn.1602762
128. Kaulmann A, Bohn T (2016) Bioactivity of Polyphenols: Preventive and Adjuvant Strategies toward Reducing Inflammatory Bowel Diseases-Promises, Perspectives, and Pitfalls. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016:9346470. doi:10.1155/2016/9346470
129. Knobloch TJ, Uhrig LK, Pearl DK, Casto BC, Warner BM, Clinton SK, Sardo-Molmenti CL, Ferguson JM, Daly BT, Riedl K, Schwartz SJ, Vodovotz Y, Buchta AJ, Sr., Schuller DE, Ozer E, Agrawal A, Weghorst CM (2016) Suppression of Proinflammatory and Prosurvival Biomarkers in Oral Cancer Patients Consuming a Black Raspberry Phytochemical-Rich Troche. *Cancer prevention research* 9 (2):159-171. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-15-0187

130. Holt EM, Steffen LM, Moran A, Basu S, Steinberger J, Ross JA, Hong CP, Sinaiko AR (2009) Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents. *Journal of the American Dietetic Association* 109 (3):414-421. doi:10.1016/j.jada.2008.11.036
131. Song Y, Manson JE, Buring JE, Sesso HD, Liu S (2005) Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. *Journal of the American College of Nutrition* 24 (5):376-384
132. Okoko T, Oruambo IF (2009) Inhibitory activity of quercetin and its metabolite on lipopolysaccharide-induced activation of macrophage U937 cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 47 (4):809-812. doi:10.1016/j.fct.2009.01.013
133. Liu J, Li X, Yue Y, Li J, He T, He Y (2005) The inhibitory effect of quercetin on IL-6 production by LPS-stimulated neutrophils. *Cellular & molecular immunology* 2 (6):455-460
134. Castano-Vinyals G, Aragones N, Perez-Gomez B, Martin V, Llorca J, Moreno V, Altzibar JM, Ardanaz E, de Sanjose S, Jimenez-Moleon JJ, Tardon A, Alguacil J, Peiro R, Marcos-Gragera R, Navarro C, Pollan M, Kogevinas M, Group MC-SS (2015) Population-based multicase-control study in common tumors in Spain (MCC-Spain): rationale and study design. *Gaceta sanitaria* 29 (4):308-315. doi:10.1016/j.gaceta.2014.12.003
135. Garcia-Closas R, Garcia-Closas M, Kogevinas M, Malats N, Silverman D, Serra C, Tardon A, Carrato A, Castano-Vinyals G, Dosemeci M, Moore L, Rothman N, Sinha R (2007) Food, nutrient and heterocyclic amine intake and the risk of bladder cancer. *European journal of cancer* 43 (11):1731-1740. doi:10.1016/j.ejca.2007.05.007
136. Multicaso-Control Spain (MCC-Spain). MCC-Spain questionnaires. http://www.mccspain.org/wp-content/uploads/2016/07/Quest_MCCSpain.pdf
137. Calvert C, Cade J, Barrett JH, Woodhouse A (1997) Using cross-check questions to address the problem of mis-reporting of specific food groups on Food Frequency Questionnaires. UKWCS Steering Group. United Kingdom Women's Cohort Study Steering Group. *European journal of clinical nutrition* 51 (10):708-712
138. Rothwell JA, Perez-Jimenez J, Neveu V, Medina-Remon A, M'Hiri N, Garcia-Lobato P, Manach C, Knox C, Eisner R, Wishart DS, Scalbert A (2013) Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database : the journal of biological databases and curation* 2013:bat070. doi:10.1093/database/bat070
139. Python Software Foundation (2018) Python Language Reference. 3.6.5 edn.,

140. R Development Core Team (2010) R: A language and environment for statistical computing. 3.4.3 edn. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
141. StataCorp. (2013) Stata Statistical Software: Release 13. StataCorp LP, College Station, TX
142. Willett WC, Howe GR, Kushi LH (1997) Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition* 65 (4 Suppl):1220S-1228S; discussion 1229S-1231S. doi:10.1093/ajcn/65.4.1220S
143. Zumel NM, J. (2014) Practical data science with R. Manning Publications Co.,
144. Team. RC (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. .
145. Pelucchi C, Lunet N, Boccia S, Zhang ZF, Praud D, Boffetta P, Levi F, Matsuo K, Ito H, Hu J, Johnson KC, Ferraroni M, Yu GP, Peleteiro B, Malekzadeh R, Derakhshan MH, Ye W, Zaridze D, Maximovitch D, Aragonés N, Martin V, Pakseresht M, Pourfarzi F, Bellavia A, Orsini N, Wolk A, Mu L, Arzani D, Kurtz RC, Lagiou P, Trichopoulos D, Muscat J, La Vecchia C, Negri E (2015) The stomach cancer pooling (StoP) project: study design and presentation. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation* 24 (1):16-23. doi:10.1097/CEJ.0000000000000017
146. Lucenteforte E, Scita V, Bosetti C, Bertuccio P, Negri E, La Vecchia C (2008) Food groups and alcoholic beverages and the risk of stomach cancer: a case-control study in Italy. *Nutrition and cancer* 60 (5):577-584. doi:10.1080/01635580802054512
147. Buiatti E, Palli D, Decarli A, Amadori D, Avellini C, Bianchi S, Biserni R, Cipriani F, Cocco P, Giacosa A, et al. (1989) A case-control study of gastric cancer and diet in Italy. *International journal of cancer* 44 (4):611-616. doi:10.1002/ijc.2910440409
148. Lagiou P, Samoli E, Lagiou A, Peterson J, Tzonou A, Dwyer J, Trichopoulos D (2004) Flavonoids, vitamin C and adenocarcinoma of the stomach. *Cancer causes & control : CCC* 15 (1):67-72. doi:10.1023/B:CACO.0000016619.18041.b0
149. Zaridze D, Borisova E, Maximovitch D, Chkhikvadze V (1999) Aspirin protects against gastric cancer: results of a case-control study from Moscow, Russia. *International journal of cancer* 82 (4):473-476. doi:10.1002/(sici)1097-0215(19990812)82:4<473::aid-ijc1>3.0.co;2-k
150. Hernandez-Ramirez RU, Galvan-Portillo MV, Ward MH, Agudo A, Gonzalez CA, Onate-Ocana LF, Herrera-Goepfert R, Palma-Coca O, Lopez-Carrillo L (2009) Dietary intake of polyphenols, nitrate and nitrite and gastric cancer risk in Mexico City. *International journal of cancer* 125 (6):1424-1430. doi:10.1002/ijc.24454

151. Lopez-Carrillo L, Hernandez Avila M, Dubrow R (1994) Chili pepper consumption and gastric cancer in Mexico: a case-control study. *American journal of epidemiology* 139 (3):263-271. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a116993
152. Lopez-Carrillo L, Lopez-Cervantes M, Robles-Diaz G, Ramirez-Espitia A, Mohar-Betancourt A, Meneses-Garcia A, Lopez-Vidal Y, Blair A (2003) Capsaicin consumption, *Helicobacter pylori* positivity and gastric cancer in Mexico. *International journal of cancer* 106 (2):277-282. doi:10.1002/ijc.11195
153. Lagiou P, Trichopoulos D (2007) Parental family structure, *Helicobacter pylori*, and gastric adenocarcinoma. *PLoS medicine* 4 (1):e25. doi:10.1371/journal.pmed.0040025
154. Hsieh RW, Rajan SS, Sharma SK, Guo Y, DeSombre ER, Mrksich M, Greene GL (2006) Identification of ligands with bicyclic scaffolds provides insights into mechanisms of estrogen receptor subtype selectivity. *The Journal of biological chemistry* 281 (26):17909-17919. doi:10.1074/jbc.M513684200
155. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139 (10):4252-4263. doi:10.1210/endo.139.10.6216
156. Basu P, Maier C (2018) Phytoestrogens and breast cancer: In vitro anticancer activities of isoflavones, lignans, coumestans, stilbenes and their analogs and derivatives. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 107:1648-1666. doi:10.1016/j.biopha.2018.08.100
157. Fink BN, Steck SE, Wolff MS, Britton JA, Kabat GC, Schroeder JC, Teitelbaum SL, Neugut AI, Gammon MD (2007) Dietary flavonoid intake and breast cancer risk among women on Long Island. *American journal of epidemiology* 165 (5):514-523. doi:10.1093/aje/kwk033
158. Torres-Sanchez L, Galvan-Portillo M, Wolff MS, Lopez-Carrillo L (2009) Dietary consumption of phytochemicals and breast cancer risk in Mexican women. *Public health nutrition* 12 (6):825-831. doi:10.1017/S136898000800325X
159. Torres-Sánchez L, Galván-Portillo M, Lewis S, Gómez-Dantés H, López-Carrillo L (2009) Dieta y cáncer de mama en latinoamérica. *Salud Pública de México* 51:s181-s190
160. Peterson J, Lagiou P, Samoli E, Lagiou A, Katsouyanni K, La Vecchia C, Dwyer J, Trichopoulos D (2003) Flavonoid intake and breast cancer risk: a case-control study in Greece. *British journal of cancer* 89 (7):1255-1259. doi:10.1038/sj.bjc.6601271
161. Zamora-Ros R, Ferrari P, Gonzalez CA, Tjonneland A, Olsen A, Bredsdorff L, Overvad K, Touillaud M, Perquier F, Fagherazzi G, Lukanova A, Tikk K, Aleksandrova K, Boeing H, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Dilis V, Masala G, Sieri S, Mattiello A, Tumino R, Ricceri F,

- Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Weiderpass E, Skeie G, Engeset D, Menendez V, Travier N, Molina-Montes E, Amiano P, Chirlaque MD, Barricarte A, Wallstrom P, Sonestedt E, Sund M, Landberg R, Khaw KT, Wareham NJ, Travis RC, Scalbert A, Ward HA, Riboli E, Romieu I (2013) Dietary flavonoid and lignan intake and breast cancer risk according to menopause and hormone receptor status in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study. *Breast cancer research and treatment* 139 (1):163-176. doi:10.1007/s10549-013-2483-4
162. Qin LQ, Xu JY, Wang PY, Hoshi K (2006) Soyfood intake in the prevention of breast cancer risk in women: a meta-analysis of observational epidemiological studies. *Journal of nutritional science and vitaminology* 52 (6):428-436
163. Trock BJ, Hilakivi-Clarke L, Clarke R (2006) Meta-analysis of soy intake and breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute* 98 (7):459-471. doi:10.1093/jnci/djj102
164. Dong JY, Qin LQ (2011) Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies. *Breast cancer research and treatment* 125 (2):315-323. doi:10.1007/s10549-010-1270-8
165. Levi F, Pasche C, Lucchini F, Ghidoni R, Ferraroni M, La Vecchia C (2005) Resveratrol and breast cancer risk. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation* 14 (2):139-142
166. Arthur R, Kirsh VA, Rohan TE (2018) Associations of coffee, tea and caffeine intake with risk of breast, endometrial and ovarian cancer among Canadian women. *Cancer epidemiology* 56:75-82. doi:10.1016/j.canep.2018.07.013
167. Ganmaa D, Willett WC, Li TY, Feskanich D, van Dam RM, Lopez-Garcia E, Hunter DJ, Holmes MD (2008) Coffee, tea, caffeine and risk of breast cancer: a 22-year follow-up. *International journal of cancer* 122 (9):2071-2076. doi:10.1002/ijc.23336
168. Ishitani K, Lin J, Manson JE, Buring JE, Zhang SM (2008) Caffeine consumption and the risk of breast cancer in a large prospective cohort of women. *Archives of internal medicine* 168 (18):2022-2031. doi:10.1001/archinte.168.18.2022
169. Choi J, Jiang X, Jeong JB, Lee SH (2014) Anticancer activity of protocatechualdehyde in human breast cancer cells. *Journal of medicinal food* 17 (8):842-848. doi:10.1089/jmf.2013.0159
170. Lee S, Sivakumar K, Shin WS, Xie F, Wang Q (2006) Synthesis and anti-angiogenesis activity of coumarin derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 16 (17):4596-4599. doi:10.1016/j.bmcl.2006.06.007
171. Chuang JY, Huang YF, Lu HF, Ho HC, Yang JS, Li TM, Chang NW, Chung JG (2007) Coumarin induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through a

- mitochondria- and caspase-3 dependent mechanism and NF-kappaB down-regulation. *In vivo* 21 (6):1003-1009
172. Reddy NS, Gumireddy K, Mallireddigari MR, Cosenza SC, Venkatapuram P, Bell SC, Reddy EP, Reddy MV (2005) Novel coumarin-3-(N-aryl)carboxamides arrest breast cancer cell growth by inhibiting ErbB-2 and ERK1. *Bioorganic & medicinal chemistry* 13 (9):3141-3147. doi:10.1016/j.bmc.2005.02.051
173. Wang Y, Gapstur SM, Gaudet MM, Peterson JJ, Dwyer JT, McCullough ML (2014) Evidence for an association of dietary flavonoid intake with breast cancer risk by estrogen receptor status is limited. *The Journal of nutrition* 144 (10):1603-1611. doi:10.3945/jn.114.196964
174. Chen JY, Zhu HC, Guo Q, Shu Z, Bao XH, Sun F, Qin Q, Yang X, Zhang C, Cheng HY, Sun XC (2016) Dose-Dependent Associations between Wine Drinking and Breast Cancer Risk - Meta-Analysis Findings. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 17 (3):1221-1233
175. Bessaoud F, Daures JP (2008) Patterns of alcohol (especially wine) consumption and breast cancer risk: a case-control study among a population in Southern France. *Annals of epidemiology* 18 (6):467-475. doi:10.1016/j.annepidem.2008.02.001
176. Grosso G, Bella F, Godos J, Sciacca S, Del Rio D, Ray S, Galvano F, Giovannucci EL (2017) Possible role of diet in cancer: systematic review and multiple meta-analyses of dietary patterns, lifestyle factors, and cancer risk. *Nutrition reviews* 75 (6):405-419. doi:10.1093/nutrit/nux012
177. Xie Y, Huang S, Su Y (2016) Dietary Flavonols Intake and Risk of Esophageal and Gastric Cancer: A Meta-Analysis of Epidemiological Studies. *Nutrients* 8 (2):91. doi:10.3390/nu8020091
178. Bertuccio P, Rosato V, Andreano A, Ferraroni M, Decarli A, Edefonti V, La Vecchia C (2013) Dietary patterns and gastric cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 24 (6):1450-1458. doi:10.1093/annonc/mdt108
179. Grosso G, Godos J, Lamuela-Raventos R, Ray S, Micek A, Pajak A, Sciacca S, D'Orazio N, Del Rio D, Galvano F (2017) A comprehensive meta-analysis on dietary flavonoid and lignan intake and cancer risk: Level of evidence and limitations. *Molecular nutrition & food research* 61 (4). doi:10.1002/mnfr.201600930
180. Baltas N, Karaoglu SA, Tarakci C, Kolayli S (2016) Effect of propolis in gastric disorders: inhibition studies on the growth of *Helicobacter pylori* and production of its urease. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 31 (sup2):46-50. doi:10.1080/14756366.2016.1186023

181. Harsha C, Banik K, Bordoloi D, Kunnumakkara AB (2017) Antiulcer properties of fruits and vegetables: A mechanism based perspective. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 108 (Pt A):104-119. doi:10.1016/j.fct.2017.07.023
182. Woo HD, Lee J, Choi IJ, Kim CG, Lee JY, Kwon O, Kim J (2014) Dietary flavonoids and gastric cancer risk in a Korean population. *Nutrients* 6 (11):4961-4973. doi:10.3390/nu6114961
183. Yong WK, Abd Malek SN (2015) Xanthohumol induces growth inhibition and apoptosis in ca ski human cervical cancer cells. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2015:921306. doi:10.1155/2015/921306
184. Yong WK, Ho YF, Malek SN (2015) Xanthohumol induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in A549 non-small cell lung cancer cells. *Pharmacognosy magazine* 11 (Suppl 2):S275-283. doi:10.4103/0973-1296.166069
185. Yu RJ, Liu HB, Yu Y, Liang L, Xu R, Liang C, Tang JS, Yao XS (2016) Anticancer activities of proanthocyanidins from the plant *Urceola huaitingii* and their synergistic effects in combination with chemotherapeutics. *Fitoterapia* 112:175-182. doi:10.1016/j.fitote.2016.05.015
186. Yun JM, Afaq F, Khan N, Mukhtar H (2009) Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, induces apoptosis and cell cycle arrest in human colon cancer HCT116 cells. *Molecular carcinogenesis* 48 (3):260-270. doi:10.1002/mc.20477
187. Bin Hafeez B, Asim M, Siddiqui IA, Adhami VM, Murtaza I, Mukhtar H (2008) Delphinidin, a dietary anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables: a new weapon to blunt prostate cancer growth. *Cell cycle* 7 (21):3320-3326. doi:10.4161/cc.7.21.6969
188. Ho ML, Chen PN, Chu SC, Kuo DY, Kuo WH, Chen JY, Hsieh YS (2010) Peonidin 3-glucoside inhibits lung cancer metastasis by downregulation of proteinases activities and MAPK pathway. *Nutrition and cancer* 62 (4):505-516. doi:10.1080/01635580903441261
189. Onoda C, Kuribayashi K, Nirasawa S, Tsuji N, Tanaka M, Kobayashi D, Watanabe N (2011) (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in gastric cancer cell lines by down-regulating survivin expression. *International journal of oncology* 38 (5):1403-1408. doi:10.3892/ijo.2011.951
190. Tanaka T, Ishii T, Mizuno D, Mori T, Yamaji R, Nakamura Y, Kumazawa S, Nakayama T, Akagawa M (2011) (-)-Epigallocatechin-3-gallate suppresses growth of AZ521 human gastric cancer cells by targeting the DEAD-box RNA helicase p68. *Free radical biology & medicine* 50 (10):1324-1335. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.024
191. Bao L, Liu F, Guo HB, Li Y, Tan BB, Zhang WX, Peng YH (2016) Naringenin inhibits proliferation, migration, and invasion as well as induces apoptosis of gastric cancer

- SGC7901 cell line by downregulation of AKT pathway. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37 (8):11365-11374. doi:10.1007/s13277-016-5013-2
192. Zhang J, Wu D, Vikash, Song J, Wang J, Yi J, Dong W (2015) Hesperetin Induces the Apoptosis of Gastric Cancer Cells via Activating Mitochondrial Pathway by Increasing Reactive Oxygen Species. *Digestive diseases and sciences* 60 (10):2985-2995. doi:10.1007/s10620-015-3696-7
193. Chen J, Chen J, Li Z, Liu C, Yin L (2014) The apoptotic effect of apigenin on human gastric carcinoma cells through mitochondrial signal pathway. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35 (8):7719-7726. doi:10.1007/s13277-014-2014-x
194. Hara A, Sasazuki S, Inoue M, Iwasaki M, Shimazu T, Sawada N, Yamaji T, Tsugane S, Japan Public Health Center-Based Prospective Study G (2012) Isoflavone intake and risk of gastric cancer: a population-based prospective cohort study in Japan. *The American journal of clinical nutrition* 95 (1):147-154. doi:10.3945/ajcn.111.020479
195. Wada K, Tsuji M, Tamura T, Konishi K, Kawachi T, Hori A, Tanabashi S, Matsushita S, Tokimitsu N, Nagata C (2015) Soy isoflavone intake and stomach cancer risk in Japan: From the Takayama study. *International journal of cancer* 137 (4):885-892. doi:10.1002/ijc.29437
196. Lampe JW (2009) Interindividual differences in response to plant-based diets: implications for cancer risk. *The American journal of clinical nutrition* 89 (5):1553S-1557S. doi:10.3945/ajcn.2009.26736D
197. Humans IWGotEoCRt (2010) Alcohol consumption and ethyl carbamate. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* 96:3-1383
198. Knott CS, Coombs N, Stamatakis E, Biddulph JP (2015) All cause mortality and the case for age specific alcohol consumption guidelines: pooled analyses of up to 10 population based cohorts. *Bmj* 350:h384. doi:10.1136/bmj.h384
199. Garcia-Closas R, Gonzalez CA, Agudo A, Riboli E (1999) Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer causes & control : CCC* 10 (1):71-75
200. Lei L, Yang Y, He H, Chen E, Du L, Dong J, Yang J (2016) Flavan-3-ols consumption and cancer risk: A meta-analysis of epidemiologic studies. *Oncotarget* 7 (45):73573-73592. doi:10.18632/oncotarget.12017

201. Yang D, Wang X, Yuan W, Chen Z (2019) Intake of Anthocyanins and Gastric Cancer Risk: A Comprehensive Meta-Analysis on Cohort and Case-Control Studies. *Journal of nutritional science and vitaminology* 65 (1):72-81. doi:10.3177/jnsv.65.72
202. Hirvonen T, Mennen LI, de Bree A, Castetbon K, Galan P, Bertrais S, Arnault N, Hercberg S (2006) Consumption of antioxidant-rich beverages and risk for breast cancer in French women. *Annals of epidemiology* 16 (7):503-508. doi:10.1016/j.annepidem.2005.09.011
203. Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American journal of clinical nutrition* 76 (3):560-568. doi:10.1093/ajcn/76.3.560
204. Sun L, Subar AF, Bosire C, Dawsey SM, Kahle LL, Zimmerman TP, Abnet CC, Heller R, Graubard BI, Cook MB, Petrick JL (2017) Dietary Flavonoid Intake Reduces the Risk of Head and Neck but Not Esophageal or Gastric Cancer in US Men and Women. *The Journal of nutrition* 147 (9):1729-1738. doi:10.3945/jn.117.251579
205. Pandey KB, Rizvi SI (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2 (5):270-278. doi:10.4161/oxim.2.5.9498
206. Bertuccio P, Alicandro G, Rota M, Pelucchi C, Bonzi R, Galeone C, Bravi F, Johnson KC, Hu J, Palli D, Ferraroni M, Lopez-Carrillo L, Lunet N, Ferro A, Malekzadeh R, Zaridze D, Maximovitch D, Vioque J, Navarrete-Munoz EM, Pakseresht M, Hernandez-Ramirez RU, Lopez-Cervantes M, Ward M, Pourfarzi F, Tsugane S, Hidaka A, Zhang ZF, Kurtz RC, Lagiou P, Lagiou A, Boffetta P, Boccia S, Negri E, La Vecchia C (2019) Citrus fruit intake and gastric cancer: The stomach cancer pooling (StoP) project consortium. *International journal of cancer* 144 (12):2936-2944. doi:10.1002/ijc.32046
207. Huang Y, Chen H, Zhou L, Li G, Yi D, Zhang Y, Wu Y, Liu X, Wu X, Song Q, Liu L, Yi D (2017) Association between green tea intake and risk of gastric cancer: a systematic review and dose-response meta-analysis of observational studies. *Public health nutrition* 20 (17):3183-3192. doi:10.1017/S1368980017002208
208. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry* 13 (10):572-584
209. Sznarkowska A, Kostecka A, Meller K, Bielawski KP (2017) Inhibition of cancer antioxidant defense by natural compounds. *Oncotarget* 8 (9):15996-16016. doi:10.18632/oncotarget.13723
210. Serafini M, Peluso I, Raguzzini A (2010) Flavonoids as anti-inflammatory agents. *The Proceedings of the Nutrition Society* 69 (3):273-278. doi:10.1017/S002966511000162X

Influencia de la ingesta de polifenoles en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

211. Ramos S (2007) Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *The Journal of nutritional biochemistry* 18 (7):427-442. doi:10.1016/j.jnutbio.2006.11.004
212. Zhang L, Zhou J, Luo J, Wang Q, Liu J, Zeng QQ (2016) [Study on Mulberry Anthocyanins Induced Autophagy and Apoptosis of Human Gastric Cancer SGC-7901 Cell Autophagy]. *Zhong yao cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese medicinal materials* 39 (5):1134-1138

ANEXO I



Junta de Castilla y León

Delegación Territorial de León
Servicio Territorial de Cultura y Turismo
R. P. Intelectual
Rfa.: mah

D. Carlos Gaspar Polanco de la Puente
Avda. de la Facultad, 25
24004 León

ASUNTO: NOTIFICACIÓN DE INSCRIPCIÓN EN EL REGISTRO DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL

En relación a su solicitud de inscripción número **LE-168-2019**, presentada el día **02/12/2019** en el Registro Provincial de León, referente a los derechos de propiedad intelectual de la obra titulada: "**PLP-scrap**" le notifico que ha obtenido la calificación jurídica favorable y que dichos derechos han quedado inscritos en el **REGISTRO CENTRAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL**.

Se adjunta fotocopia de la matriz de inscripción correspondiente.

León, 29 de enero de 2020
LA JEFA DEL SERVICIO TERRITORIAL
P.S. EL SECRETARIO TÉCNICO
(Resolución de 14/02/2018)



Fdo.: Avelino Crespo Crespo



JUSTIFICANTE DE PRESENTACIÓN

Oficina de registro: JUNTA DE CASTILLA Y LEÓN. DELEGACIÓN TERRITORIAL EN LEÓN. - 103 DIR3: 000008253

Fecha y hora del registro de salida: 29/01/20 11:58

Número del registro de salida: 202010300004151

Origen

SERVICIO TERRITORIAL DE CULTURA Y TURISMO DE LEÓN - 05958 DIR3: A07024181
DELEGACIÓN TERRITORIAL DE LEÓN
JUNTA DE CASTILLA Y LEÓN

Destinatario

CARLOS GASPAR POLANCO DE LA PUENTE- LEÓN

Información del registro

Resumen: NOTIFICACIÓN DE INSCRIPCIÓN EN EL REGISTRO DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL .

Documentación

Documentación física requerida: SÍ

Documentación física complementaria: NO

Documentación electrónica anexa: NO

Información administrativa:

El registro realizado está amparado en el artículo 16 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas. De acuerdo con el artículo 31.2b de la citada Ley 39/2015, a los efectos del cómputo de plazo fijado en días hábiles, y en lo que se refiere al cumplimiento de plazos por los interesados, la presentación en un día inhábil se entenderá realizada en la primera hora del primer día hábil siguiente salvo que una norma permita expresamente la recepción en día inhábil.

Información relativa a la protección de datos personales para personas físicas:

Los datos de carácter personal facilitados en esta inscripción registral serán tratados por la Dirección General de Atención al Ciudadano y Calidad de los Servicios con la finalidad de gestionar el Registro Único de la Administración de Castilla y León. El tratamiento de estos datos es necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable. Sus datos van a ser cedidos a los órganos administrativos a los que se dirige la solicitud. Tiene derecho a acceder, rectificar y suprimir los datos, así como otros derechos recogidos en la información adicional. Puede consultar la información adicional y detallada sobre protección de datos en <https://www.jcyl.es/oficinasderegistro>



MINISTERIO
DE CULTURA
Y DEPORTE

REGISTRO CENTRAL
DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL

REGISTRO GENERAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL

Según lo dispuesto en la Ley de Propiedad Intelectual (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril), quedan inscritos en este Registro los derechos de propiedad intelectual en la forma que se determina seguidamente:

NÚMERO DE ASIENTO REGISTRAL 00 / 2020 / 130

Título: PLP-scrap

Objeto de propiedad intelectual: Programa de ordenador

Clase de obra: Programa de ordenador



PRIMERA INSCRIPCIÓN

Autor/es y titular/es originarios de derechos

- **Apellidos y nombre:** VITELLI STORELLI, Facundo Ezequiel
Nacionalidad: España **D.N.I./N.I.F./Pasaporte:** 20922972X
- **Apellidos y nombre:** MOLINA DE LA TORRE, Antonio José
Nacionalidad: España **D.N.I./N.I.F./Pasaporte:** 71120850C
- **Apellidos y nombre:** FERNÁNDEZ VILLA, Tania
Nacionalidad: España **D.N.I./N.I.F./Pasaporte:** 71440545S
- **Apellidos y nombre:** ÁLVAREZ ÁLVAREZ, Laura
Nacionalidad: España **D.N.I./N.I.F./Pasaporte:** 71448786E
- **Apellidos y nombre:** RUBÍN GARCÍA, María
Nacionalidad: España **D.N.I./N.I.F./Pasaporte:** 71463248V
- **Apellidos y nombre:** MARTÍN SÁNCHEZ, Vicente
Nacionalidad: España **D.N.I./N.I.F./Pasaporte:** 10182250N

Transmisión de derechos

- **Titular cesionario:** UNIVERSIDAD DE LEÓN
Nacionalidad: España **D.N.I./N.I.F./Pasaporte:** Q2432001B

Es titular en exclusiva de los derechos de explotación de esta obra por mediar relación laboral y estar creada en el ejercicio de las funciones asignadas en la empresa al autor/es o siguiendo las instrucciones de su empresario.

- **Cedente:** VITELLI STORELLI, Facundo Ezequiel







MINISTERIO
DE CULTURA
Y DEPORTE

**REGISTRO CENTRAL
DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL**

Nacionalidad: España

D.N.I./N.I.F./Pasaporte: 20922972X

- **Cedente:** MOLINA DE LA TORRE, Antonio José

Nacionalidad: España

D.N.I./N.I.F./Pasaporte: 71120850C

- **Cedente:** FERNÁNDEZ VILLA, Tania

Nacionalidad: España

D.N.I./N.I.F./Pasaporte: 71440545S

- **Cedente:** ÁLVAREZ ÁLVAREZ, Laura

Nacionalidad: España

D.N.I./N.I.F./Pasaporte: 71448786E

- **Cedente:** RUBÍN GARCÍA, María

Nacionalidad: España

D.N.I./N.I.F./Pasaporte: 71463248V

- **Cedente:** MARTÍN SÁNCHEZ, Vicente

Nacionalidad: España

D.N.I./N.I.F./Pasaporte: 10182250N

Datos de la solicitud

Núm. solicitud: LE-168-19

Fecha de presentación y efectos: 02/12/2019

Hora: 10:45

En Madrid, a catorce de enero de dos mil veinte



LA REGISTRADORA CENTRAL

Lucía Gutiérrez García



Memoria: PLP-scrap

*Automatización de la extracción del
contenido de polifenoles en
alimentos.*

Autor:

Facundo Ezequiel Vitelli Storelli

Índice general:

Capítulo 1	3
1-Introducción	3
1.1-Descripción, lenguaje y entorno	4
Capítulo 2	5
2- Listado de ficheros	5
2.1 PLP	5
2.2 _pysache_	6
2.3 spiders	6
2.3.1- _psyache_	7
Capítulo 3	9
3-Diagrama de flujo: Extracción de datos.	9
Capítulo 4	10
4- Código fuente:	10
4.1 PLP-scrap	10
4.2 PLP/spiders	12
Capítulo 5	20
5- Uso de PLP-scrap	20

Capítulo 1

1-Introducción

Los polifenoles han demostrado poseer propiedades terapéuticas en una amplia variedad de enfermedades (cáncer, enfermedades cardiovasculares, reumatismos, osteoporosis, etc). Dado el elevado número de compuestos existentes, el principal inconveniente para su estudio en investigaciones epidemiológicas es la construcción de base de datos con el contenido de las distintas clases, subclases y compuestos fenólicos, ya que existen más de 8000 compuestos. La generación de estas bases de datos pueden demorar 7-8 meses. A raíz de este inconveniente, se creó el PLP-scrap, capaz de generar estas bases de datos en tan sólo 1 hora.

El PLP-scrap extrae de manera directa y automática la información de la Phenol-Explorer generando una base de datos según la metodología que desee emplear el investigador. La concentración de polifenoles de la base de datos Phenol-Explorer es un punto de gran importancia para la obtención de datos fiables y realistas, por esta razón se creó un script (PLP-scrap) para la extracción automática de la extensa y diversa información sobre polifenoles contenida en Phenol-explorer. De esta manera, el PLP-scrap anula la posibilidad de cometer errores al transcribirla, disminuye significativamente el tiempo de generación de bases de datos para cualquier modificación o futura investigación con polifenoles, incrementa la eficiencia para el análisis de datos, reduce el tiempo comprobación y corrección de la base de datos y por último, posibilita el manejo de datos tanto en aglicona como glucósidos a partir de todas las técnicas de cuantificación disponibles en Phenol-explorer.

Los datos utilizados para calcular los flavonoides, lignanos, estilbenos, ác. fenólicos y otros polifenoles totales se diversifican en cromatografía (C), cromatografía tras hidrolisis (CH), Folin-assay, HPLC en fase normal, todos ellos de PHEX. Dependiendo de la metodología de cuantificación utilizada para conocer la concentración en los alimentos polifenoles, los resultados se pueden expresar en mg aglicona /100g, en mg de glucósido/100mg o mg de polifenoles/100g de alimento.

PLP-scrap es un conjunto de scripts que formarán entre ellos un bot con la capacidad automática de interactuar con la base de datos Phenol-explorer y extraer la información contenida en ciertos puntos del código HTML que son de interés para la investigación de polifenoles. Previamente a la programación de los bots de scraping o “minado de datos” es necesario comprender y detectar los patrones de programación de las “hojas de estilo en cascada” (CSS) de Phenol-explorer que se encuentran en el código HTML.

1.1-Descripción, lenguaje y entorno

- El programa permite la extracción automática de la concentración de polifenoles (PF) en los alimentos de la base de datos Phenol-Explorer (PHEX). Este es un punto de gran importancia para la obtención de datos fiables y realistas a la hora de realizar investigaciones sobre estos compuestos, por esta razón se creó un programa (*PLP-scrap*).
- *PLP-scrap* anula la posibilidad de cometer errores al transcribir datos, disminuyendo significativamente el tiempo de generación de bases de datos para cualquier modificación o futura investigación con PF.
- Incrementa la eficiencia para el análisis de datos, reduce el tiempo de comprobación y corrección de la base de datos y, por último, posibilita el manejo de información tanto en agliconas como glucósidos a partir de todas las técnicas disponibles en PHEX.
- La solución se ha desarrollado mediante el lenguaje de programación Python y se ejecuta a través de CMD.

Capítulo 2

2- Listado de ficheros

Dentro de la carpeta principal *PLP* encontramos diversas carpetas y archivos. Dentro de la carpeta *Requirements* encontramos los programas que deben ser instalados para la utilización de PLP-scrap. Estos programas son C++ 14 de visual studio y el instalador de Python.

Por otra parte encontramos un archivo *get-pip* el cuál nos facilita la instalación de *pip*, permitiendo la ejecución del archivo instalador de PLP-scrap. El archivo *PLP-scrap-INSTALL* es un ejecutable del sistema operativo Windows que permite la instalación del programa. Por último, el archivo *README* es una guía con las instrucciones para poder utilizar las distintas metodologías aplicadas en este programa.

Dentro de la carpeta PLP-scrap existe una carpeta denominada PLP, y un archivo. El archivo denominado *scrapy.cfg* que contiene la configuración de variables. Dentro de la carpeta PLP encontramos los scripts necesarios para la extracción automática de las distintas metodologías de extracción de la Phenol-explorer.

2.1 PLP

Dentro de esta carpeta encontramos los siguientes archivos:

- *_init_.cpython-36.pyc*: iniciación de la máquina virtual Python.
- *item.py*: contiene los campos de información que serán extraídos
- *middlewares.py*: Se definen los modelos para nuestro middleware spider.

- *pipelines.py*: Definimos el proceso de comunicación entre los scripts.
- *settings.py*: Se adjudica un nombre al bot e indicamos que los resultados de las respuestas de los spiders sean en formato texto.

2.2 `_pysache_`

Esta carpeta contiene dos archivos:

- `_init_.cpython-36.pyc`: iniciación de la máquina virtual Python.
- `Settings.cpython-36.pyc`: compilación de las configuraciones de la máquina virtual.

2.3 spiders

Esta carpeta contiene los bots para la extracción de los distintos métodos de cuantificación de la base de datos Phenol-explorer.

- `_init_.py`: iniciación de Python.
- *PHEX-C-AGLICONA-ON.py*: script extrae las concentraciones por cromatografía en agliconas de todos los alimentos cuya información estén disponibles.
- *PHEX-C-AGLICONA-ON-EXE*: ejecutable del *PHEX-C-AGLICONA-ON.py*.
- *PHEX-C-GLUCOSIDO-ON.py*: extrae las concentraciones por cromatografía en glucósidos.

- *PHEX-C-GLUCOSIDO-ON-EXE*: ejecutable del *PHEX-C-GLUCOSIDO-ON.py*.
- *PHEX-CH-AGLICONA-ON.py*: script para extraer las concentraciones de cromatografía tras hidrólisis de todos los alimentos cuya información estén disponibles.
- *PHEX-CH-AGLICONA-ON-EXE*: ejecutable de *PHEX-CH-AGLICONA-ON.py*
- *PHEX-Folin.py*: extrae la concentración de la metodología Folin-assay de todos los alimentos cuya información estén disponibles.
- *PHEX-Folin-EXE*: ejecutable de *PHEX-Folin.py*.
- *PHEX-HPLC-NP-PROANT-ON.py*: extrae información de los polimeros de los Flavanoles por HPLC (High performance liquid chromatography) en fase normal de todos los alimentos cuya información estén disponibles.
- *PHEX-HPLC-NP-PROANT-ON-EXE*: ejecutable de *PHEX-HPLC-NP-PROANT-ON.py*

2.3.1- **_psyache_**

Contiene los archivos que serán ejecutados en el entorno virtual.

- *_init_.py*: iniciación del archivo *_init_.py* en el entorno virtual.
- *PHEX-C-AGLICONA*: iniciación del archivo *PHEX-C-AGLICONA* en el entorno virtual

- PHEX-C-GLUCOSIDO-ON: iniciación del archivo PHEX-C-GLUCOSIDO-ON en el entorno virtual
- PHEX-CH-AGLICONA: iniciación del archivo PHEX-CH-AGLICONA en el entorno virtual.
- PHEX-Folin: iniciación del archivo PHEX-Folin en el entorno virtual.
- PHEX-HPLC-NP-PROANT-ON: iniciación del archivo PHEX-HPLC-NP-PROANT-ON en el entorno virtual.

Capítulo 3

3-Diagrama de flujo: Extracción de datos.

Esquema general del mecanismo de extracción de datos de PLP-scrap.

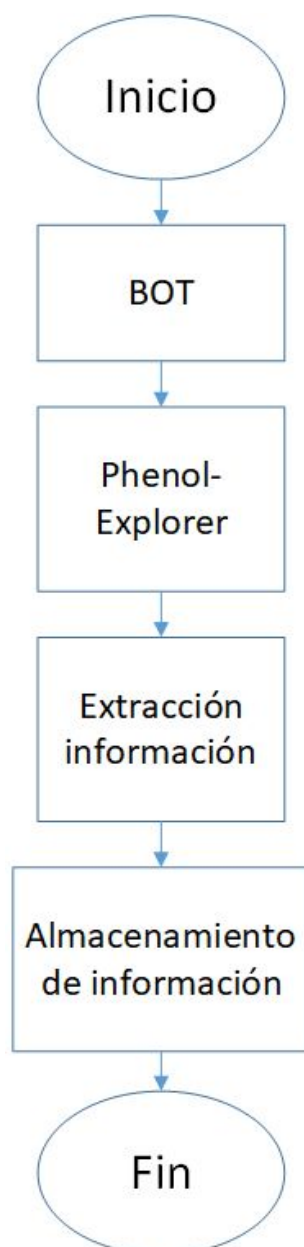


Figura 3.1-Mecanismo de extracción de datos de Phenol-explorer.

Capítulo 4

4- Código fuente:

4.1 PLP-scrap

- scrapy.cfg

```
import scrapy

class PlpItem(scrapy.Item):
    pass
```

- middlewares.py

```
from scrapy import signals

class PlpSpiderMiddleware(object):
    @classmethod
    def from_crawler(cls, crawler):
        s = cls()
        crawler.signals.connect(s.spider_opened,
            signal=signals.spider_opened)
        return s

    def process_spider_input(self, response, spider):
        return None

    def process_spider_output(self, response, result, spider):
        for i in result:
            yield i

    def process_spider_exception(self, response, exception, spider):
        pass

    def process_start_requests(self, start_requests, spider):
        for r in start_requests:
            yield r
```

```

def spider_opened(self, spider):
    spider.logger.info('Spider opened: %s' % spider.name)

class PlpDownloaderMiddleware(object):

    @classmethod
    def from_crawler(cls, crawler):
        s = cls()
        crawler.signals.connect(s.spider_opened,
signal=signals.spider_opened)
        return s

    def process_request(self, request, spider):
        return None

    def process_response(self, request, response, spider):
        return response

    def process_exception(self, request, exception, spider):
        pass

    def spider_opened(self, spider):
        spider.logger.info('Spider opened: %s' % spider.name)

```

- pipelines.py

```

class PlpPipeline(object):
    def process_item(self, item, spider):
        return item

```

- settings.py

```

BOT_NAME = 'PLP'

SPIDER_MODULES = ['PLP.spiders']
NEWSPIDER_MODULE = 'PLP.spiders'
ROBOTSTXT_OBEY = True

```


4.2 PLP/spiders

- PHEX-C-AGLICONA-ON.py

```
import scrapy

class PlpSpider(scrapy.Spider):
    name = 'PHEX-C-AGLICONA-ON'
    start_urls = [

        'http://phenol-
explorer.eu/contents/food/1?utf8=%E2%9C%93&options%5Blist_format%5D=list&options%5Bsort_
by%5D=by_classification&options%5Bempty_rows%5D=off&options%5Bshow_aglycones%5D=on&optio
ns%5Bcompound_level%5D=compound&options%5Bunit_type%5D=weight',
        .
        ..
        ...

        'http://phenol-
explorer.eu/contents/food/1292?utf8=%E2%9C%93&options%5Blist_format%5D=list&options%5Bso
rt_by%5D=by_classification&options%5Bempty_rows%5D=off&options%5Bshow_aglycones%5D=on&op
tions%5Bcompound_level%5D=compound&options%5Bunit_type%5D=weight',
        'http://phenol-
explorer.eu/contents/food/1518?utf8=%E2%9C%93&options%5Blist_format%5D=list&options%5Bso
rt_by%5D=by_classification&options%5Bempty_rows%5D=off&options%5Bshow_aglycones%5D=on&op
tions%5Bcompound_level%5D=compound&options%5Bunit_type%5D=weight',

    ]

    def parse(self, response):

        chromatography = response.xpath('//div[@id="chromatography"']

        title =
            chromatography.xpath
            ('./tr/th[@class="outer"]/strong/a/text()').extract_first()

        for row in chromatography.xpath('./tr[not(@class="header")]'):
            class_ = row.xpath('./td[@rowspan]/text()').extract_first()

            if not class_:
                class_ =
                row.xpath('./preceding-sibling::tr[td[@rowspan]][1]/td[@rowspan]/
```

```

text()).extract_first()

        subclass =
row.xpath('./td[not(@rowspan)][1]/a/text()').extract_first()
        content =
row.xpath('./td[not(@rowspan)][2]/text()').extract_first()

        yield {
            'title': title.strip(),
            'class': class_.strip(),
            'subclass': subclass.strip(),
            'content': content.strip(),
            'N' : 1,
            'FR' : 1,
        }

```

- PHEX-C-AGLICONA-ON-EXE

@echo on

```
scrapy crawl PHEX-C-AGLICONA-ON -o PHEX-C-AGLICONA-ON-RESULTADO.csv
```

- PHEX-C-GLICOSIDO-ON.py

```

import scrapy

class PlpSpider(scrapy.Spider):
    name = 'PHEX-C-GLUCOSIDO-ON'
    start_urls = [

'http://phenol-
explorer.eu/contents/food/1?utf8=%E2%9C%93&options%5Blist_format%5D=li
st&options%5Bsort_by%5D=by_classification&options%5Bempty_rows%5D=off&
options%5Bshow_aglycones%5D=off&options%5Bcompound_level%5D=compound&o
ptions%5Bunit_type%5D=weight',

.

..

...

```

```

'http://phenol-
explorer.eu/contents/food/1517?utf8=%E2%9C%93&options%5Blist_format%5D
=list&options%5Bsort_by%5D=by_classification&options%5Bempty_rows%5D=o
ff&options%5Bshow_aglycones%5D=off&options%5Bcompound_level%5D=compoun
d&options%5Bunit_type%5D=weight',
'http://phenol-
explorer.eu/contents/food/1518?utf8=%E2%9C%93&options%5Blist_format%5D
=list&options%5Bsort_by%5D=by_classification&options%5Bempty_rows%5D=o
ff&options%5Bshow_aglycones%5D=off&options%5Bcompound_level%5D=compoun
d&options%5Bunit_type%5D=weight',
]
def parse(self, response):

    chromatography = response.xpath('//div[@id="chromatography"]')

    title =
chromatography.xpath('./tr/th[@class="outer"]/strong/a/text()').extra
ct_first()

    for row in
chromatography.xpath('./tr[not(@class="header")]'):
        class_ = row.xpath('./td[@rowspan]/text()').extract_first()

        if not class_:
            class_ = row.xpath('./preceding-
sibling::tr[td[@rowspan]][1]/td[@rowspan]/text()').extract_first()
            subclass =
row.xpath('./td[not(@rowspan)][1]/a/text()').extract_first()
            content =
row.xpath('./td[not(@rowspan)][2]/text()').extract_first()

        yield {
            'title': title.strip(),
            'class': class_.strip(),
            'subclass': subclass.strip(),
            'content': content.strip(),
            'N' : 1,
            'FR' : 1,
        }

```

- PHEX-C-GLICOSIDO-ON-EXE

@echo on

```
scrapy crawl PHEX-C-GLUCOSIDO-ON -o PHEX-C-GLUCOSIDO-ON-RESULTADO.csv
```

- PHEX-CH-AGLICONA-ON

```
import scrapy
```

```
class PlpSpider(scrapy.Spider):
```

```
    name = 'PHEX-CH-AGLICONA-ON'
```

```
    start_urls = [
```

```
        'http://phenol-
```

```
explorer.eu/contents/food/1?utf8=%E2%9C%93&options%5Blist_format%5D=li
st&options%5Bsort_by%5D=by_classification&options%5Bempty_rows%5D=off&
options%5Bshow_aglycones%5D=on&options%5Bcompound_level%5D=compound&op
tions%5Bunit_type%5D=weight',
```

```
        .
```

```
        ..
```

```
        ...
```

```
        'http://phenol-
```

```
explorer.eu/contents/food/1517?utf8=%E2%9C%93&options%5Blist_format%5D
=list&options%5Bsort_by%5D=by_classification&options%5Bempty_rows%5D=o
ff&options%5Bshow_aglycones%5D=on&options%5Bcompound_level%5D=compound
&options%5Bunit_type%5D=weight',
```

```
        'http://phenol-
```

```
explorer.eu/contents/food/1518?utf8=%E2%9C%93&options%5Blist_format%5D
=list&options%5Bsort_by%5D=by_classification&options%5Bempty_rows%5D=o
ff&options%5Bshow_aglycones%5D=on&options%5Bcompound_level%5D=compound
&options%5Bunit_type%5D=weight',
```

```
    ]
```

```
    def parse(self, response):
```

```
        chromatographyH =
```

```
        response.xpath('//div[@id="chromatography-after-hydrolysis"]')
```

```

        title =
chromatographyH.xpath('//tr/th[@class="outer"]/strong/a/text()').extra
ct_first()

        for row in
chromatographyH.xpath('..//tr[not(@class="header")]'):
            class_ =
row.xpath('./td[@rowspan]/text()').extract_first()
            if not class_:
                class_ = row.xpath('./preceding-
sibling::tr[td[@rowspan]][1]/td[@rowspan]/text()').extract_first()
                subclass =
row.xpath('./td[not(@rowspan)][1]/a/text()').extract_first()
                content =
row.xpath('./td[not(@rowspan)][2]/text()').extract_first()
            yield {
                'title': title.strip(),
                'class': class_.strip(),
                'subclass': subclass.strip(),
                'content': content.strip(),
                'N' : 1,
                'FR' : 1,

            }

```

- PHEX-CH-AGLICONA-ON-EXE

@echo on

```
scrapy crawl PHEX-CH-AGLICONA-ON -o PHEX-CH-AGLICONA-RESULTADO.csv
```

- PHEX-Folin.py

```
import scrapy
```

```
class PlpSpider(scrapy.Spider):
```

```
    name = 'PHEX-folin'
```

```
    start_urls = [
```

```
        'http://phenol-explorer.eu/contents/food/1',
```

```
.
```

```

..
...

'http://phenol-explorer.eu/contents/food/1517',
'http://phenol-explorer.eu/contents/food/1518',

    ]

def parse(self, response):

    folin = response.xpath('//div[@id="folin-assay"]')

    title =
folin.xpath('//tr/th[@class="outer"]/strong/a/text()').extract_first()

    for row in folin.xpath('./tr[not(@class="header")]'):
        class_ =
row.xpath('./td[@rowspan]/text()').extract_first()
        if not class_:
            class_ = row.xpath('./preceding-
sibling::tr[td[@rowspan]][1]/td[@rowspan]/text()').extract_first()
        content =
row.xpath('./td[not(@rowspan)][2]/a[2]/text()').extract_first()
        yield {
            'title': title.strip(),
            'class': class_.strip(),
            'content': content.strip(),
            #'N' : 1,
            #'FR' : 1,

        }

```

- PHEX-Folin-EXE

@echo on

```
scrapy crawl PHEX-Folin -o PHEX-Folin-RESULTADO.csv
```

- PHEX-HPLC-NP-PROANT-ON.py

```

import scrapy

class PlpSpider(scrapy.Spider):
    name = 'PHEX-HPLC-NP-PROANT-ON'
    start_urls = [

'http://phenol-
explorer.eu/contents/food/1?utf8=%E2%9C%93&options%5Blist_format%5D=li
st&options%5Bsort_by%5D=by_classification&options%5Bempty_rows%5D=off&
options%5Bshow_aglycones%5D=off&options%5Bcompound_level%5D=compound&o
ptions%5Bunit_type%5D=weight',
.
..
...

'http://phenol-
explorer.eu/contents/food/1517?utf8=%E2%9C%93&options%5Blist_format%5D
=list&options%5Bsort_by%5D=by_classification&options%5Bempty_rows%5D=o
ff&options%5Bshow_aglycones%5D=off&options%5Bcompound_level%5D=compoun
d&options%5Bunit_type%5D=weight',
'http://phenol-
explorer.eu/contents/food/1518?utf8=%E2%9C%93&options%5Blist_format%5D
=list&options%5Bsort_by%5D=by_classification&options%5Bempty_rows%5D=o
ff&options%5Bshow_aglycones%5D=off&options%5Bcompound_level%5D=compoun
d&options%5Bunit_type%5D=weight',

]

    def parse(self, response):

        hplcproanthocyanidins = response.xpath('//div[@id="normal-
phase-hplc-proanthocyanidins"]')

        title =
hplcproanthocyanidins.xpath('//tr/th[@class="outer"]/strong/a/text()')
.extract_first()

        for row in
hplcproanthocyanidins.xpath('..//tr[not(@class="header")]'):

```

```

        class_ =
row.xpath('./td[@rowspan]/text()').extract_first()
        if not class_:
            class_ = row.xpath('./preceding-
sibling::tr[td[@rowspan]][1]/td[@rowspan]/text()').extract_first()
            subclass =
row.xpath('./td[not(@rowspan)][1]/a/text()').extract_first()
            content =
row.xpath('./td[not(@rowspan)][2]/a[2]/text()').extract_first()
            #content =
row.xpath('./td[not(@rowspan)][2]/text()').extract_first()
        yield {
            'title': title.strip(),
            'class': class_.strip(),
            'subclass': subclass.strip(),
            'content': content.strip(),
            #'N' : 1,
            #'FR' : 1,

        }

```

- PHEX-HPLC-NP-PROANT-ON-EXE

@echo on

```

scrapy crawl PHEX-HPLC-NP-PROANT-ON -o PHEX-HPLC-NP-PROANT-
RESULTADOS.csv

```


Capítulo 5

5- Uso de PLP-scrap

En caso de no estar instalado C++14 y Python, en la carpeta "Requirements" existen dos archivos para instalarlos. En caso de la instalación de Python hay que tener en cuenta que se debe incluir la carpeta de instalación en el la variables de entorno (pudiéndose realizar con la instalación de Python). Para obtener las bases de datos debe realizar los siguientes pasos:

1-Copiar la carpeta PLP en el pc.

2- Doble click en *PLP-scrap-INSTALL*.

3-Entrar en la ubicación: PLP/PLP-scrap/PLP/spiders.

4- Doble click sobre la metodología que deseamos extraer.

- PHEX-C-AGLICONA-ON-EXE: Extrae datos de cromatografía en agliconas (mg/100g de alimento).

- PHEX-C-GLUCOSIDO-ON-EXE: Extrae datos de cromatografía en glucósidos (mg/100g de alimento).

- PHEX-CH-AGLICONA-ON-EXE: Extrae datos de cromatografía tras hidrólisis en agliconas (mg/100g de alimento).











- PHEX-Folin-EXE: Extrae datos de Folin assay en polifenoles totales (mg/100g de alimento).

- PHEX-HPLC-NP-PROANT-ON-EXE: Extrae datos de HPLC en fase normal de polimenores de flavanoles (mg/100g de alimento).

ANEXO II

Article

Association between Polyphenol Intake and Breast Cancer Risk by Menopausal and Hormone Receptor Status

Facundo Vitelli-Storelli ¹, Raul Zamora-Ros ^{2,*} , Antonio J. Molina ¹, Tania Fernández-Villa ¹ , Adela Castelló ^{3,4}, Juan Pablo Barrio ¹, Pilar Amiano ^{4,5}, Eva Ardanaz ^{4,6}, Mireia Obón-Santacana ^{7,8,9} , Inés Gómez-Acebo ⁴, Guillermo Fernández-Tardón ^{4,10}, Ana Molina-Barceló ¹¹ , Juan Alguacil ^{4,12} , Rafael Marcos-Gragera ^{4,13,14,15} , Emma Ruiz-Moreno ^{4,16} , Manuela Pedraza ¹⁷, Leire Gil ^{4,18}, Marcela Guevara ^{4,6} , Gemma Castaño-Vinyals ^{4,19,20,21} , Trinidad Dierssen-Sotos ^{4,22}, Manolis Kogevinas ^{4,19,20,21}, Nuria Aragonés ^{4,23} and Vicente Martín ^{1,4} 

- ¹ Group of Investigation in Interactions Gene-Environment and Health (GIIGAS)/Institute of Biomedicine (IBIOMED), Universidad de León, 24071 León, Spain; fvits@unileon.es (F.V.-S.); ajmolt@unileon.es (A.J.M.); tferv@unileon.es (T.F.-V.); jpbarl@unileon.es (J.P.B.); vicente.martin@unileon.es (V.M.)
- ² Unit of Nutrition and Cancer, Cancer Epidemiology Research Programme, Catalan Institute of Oncology (ICO), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet del Llobregat, 08908 Barcelona, Spain
- ³ School of Medicine, University of Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain; acastello@externos.isciii.es
- ⁴ Consortium for Biomedical Research in Epidemiology & Public Health (CIBER Epidemiología y Salud Pública—CIBERESP), 28029 Madrid, Spain; epicss-san@euskadi.eus (P.A.); me.ardanaz.aicua@navarra.es (E.A.); ines.gomez@unican.es (I.G.-A.); fernandeztguillermo@uniovi.es (G.F.-T.); alguacil@dbasp.uhu.es (J.A.); rafael.marcos@udg.edu (R.M.-G.); e.ruiz@externos.isciii.es (E.R.-M.); l-gil@euskadi.eus (L.G.); mp.guevara.eslava@navarra.es (M.G.); gemma.castano@isglobal.org (G.C.-V.); trinidad.dierssen@unican.es (T.D.-S.); manolis.kogevinas@isglobal.org (M.K.); nuria.aragones@salud.madrid.org (N.A.)
- ⁵ Public Health Division of Gipuzkoa, BioDonostia Research Institute, 20014 San Sebastian, Spain
- ⁶ Public Health Institute of Navarra, IdiSNA, 31003 Pamplona, Spain
- ⁷ Oncology Data Analytics Program (ODAP), Catalan Institute of Oncology (ICO), L'Hospitalet del Llobregat, 08908 Barcelona, Spain; mobon@idibell.cat
- ⁸ ONCOBELL Program, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, 08908 Barcelona, Spain
- ⁹ Consortium for Biomedical Research in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), 28029 Madrid, Spain
- ¹⁰ Oncology Institute, University of Oviedo, 33003 Oviedo, Spain
- ¹¹ Cancer and Public Health Area, FISABIO—Public Health, 46035 Valencia, Spain; molina_anabar@gva.es
- ¹² Centro de Investigación en Salud y Medio Ambiente (CYSMA), Universidad de Huelva, Campus Universitario de El Carmen, 21071 Huelva, Spain
- ¹³ Catalan Institute of Oncology, Epidemiology Unit and Girona Cancer Registry, Oncology Coordination Plan, Department of Health, Autonomous Government of Catalonia, Catalan Institute of Oncology, 17007 Girona, Spain
- ¹⁴ Descriptive Epidemiology, Genetics and Cancer Prevention Group, Biomedical Research Institute (IDIBGI), 17090 Girona, Spain
- ¹⁵ Research Group on Statistics, Econometrics and Health (GRECS), University of Girona, 17004 Girona, Spain
- ¹⁶ National Center for Epidemiology, Carlos III Institute of Health, 20014 San Sebastián, Spain
- ¹⁷ Department of Oncology, Complejo Asistencial Universitario de León, 24071 León, Spain; maitapedraza@hotmail.com
- ¹⁸ Biodonostia Health Research Institute, 20013 San Sebastian, Spain
- ¹⁹ ISGlobal, Barcelona, 08036 Barcelona, Spain
- ²⁰ IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), 08003 Barcelona, Spain
- ²¹ Universitat Pompeu Fabra (UPF), Campus del Mar, 08003 Barcelona, Spain
- ²² Universidad de Cantabria—IDIVAL, 39011 Santander, Spain

²³ Epidemiology Section, Public Health Division, Department of Health of Madrid, 28035 Madrid, Spain

* Correspondence: rzamora@idibell.cat; Tel.: +34-932607401

Received: 2 March 2020; Accepted: 2 April 2020; Published: 3 April 2020



Abstract: There is limited evidence of phenolic compounds acting as protective agents on several cancer types, including breast cancer (BC). Nevertheless, some polyphenol classes have not been investigated and there is a lack of studies assessing the effect on menopausal status and hormone receptor status as influenced by these compounds. The objective of this study is to evaluate the association between the intake of all polyphenol classes in relation to the BC risk by menopausal and hormone receptor status. We used data from a population-based multi-case-control study (MCC-Spain) including 1472 BC cases and 1577 controls from 12 different regions of Spain. The odds ratios (ORs) with 95% CI were calculated using logistic regression of mixed effects by quartiles and log₂ of polyphenol intakes (adjusted for the residual method) of overall BC, menopausal and receptor status. No associations were found between total intake of polyphenols and BC risk. However, inverse associations were found between stilbenes and all BC risk (OR_{Q4 vs. Q1}: 0.70, 95%CI: 0.56–0.89, $P_{\text{trend}} = 0.001$), the consumption of hydroxybenzaldehydes (OR_{Q4 vs. Q1}: 0.75, 95%CI: 0.59–0.93, $P_{\text{trend}} = 0.012$) and hydroxycoumarins (OR_{Q4 vs. Q1}: 0.73, 95%CI: 0.57–0.93; $P_{\text{trend}} = 0.005$) were also inversely associated. The intake of stilbenes, hydroxybenzaldehydes and hydroxycoumarins can contribute to BC reduction risk on all menopausal and receptor statuses.

Keywords: flavonoids; polyphenols; classes; intake; breast cancer; case-control

1. Introduction

Vegetables and fruits contain plant secondary metabolites called polyphenols, which can be classified in more than 24 subclasses based on their chemical structure, comprising more than 5000 different individual compounds. Polyphenols can have diverse bioactive effects [1].

Polyphenol consumption could reduce the risk of cancer development through various mechanisms [2–5], protecting against DNA damage [6], blocking specific carcinogen pathways [7], inducing apoptosis [8], acting as antioxidant and anti-inflammatory agents [9], inhibiting angiogenesis [10], and/or suppressing matrix metalloproteinase secretion and tumor invasiveness [11].

Breast cancer (BC) is the leading cause of cancer death among women in the world, responsible for 25% of the total new cancer cases and 627,000 deaths in 2018 [12]. Incidence rates vary across world regions, with a higher prevalence rate in more developed areas. In Spain, the BC yearly incidence is estimated to be more than 30,000 new cases and over 6000 deaths [12].

According to the continuous update project, early menarche (before the age of 12), late menopause (after the age of 55) and not bearing children increase time exposure to estrogen and progesterone and the risk of BC [13]. This report also indicated that, although there is limited evidence on the effect of vegetables on reducing the risk of BC [13], unhealthy diets and low physical activity increase sex hormones status independently from any other BC risk factor [14,15]. In addition, some studies have reported that a few polyphenol-induced estrogen receptor (ER) responses are comparable or even superior to those induced by physiological levels of estradiol. This can be a reason why some polyphenols are still described as complete estrogen agonists and have a superior affinity for ER- β [16]. Moreover, phytoestrogens can also alter estrogen biosynthesis and decrease the concentrations of circulating levels, acting as cytochrome P450 19 (Cyp19) aromatase inhibitors, of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (HSD), estrone sulfatases and sulfotransferases [17]. Thus, some polyphenols, particularly phytoestrogens, may have different effects on BC risk depending on hormone receptor status.

Several epidemiological studies, focused on lignans and flavonoids, have detected a protective association with BC risk [1,18,19], but, to our knowledge, the effect of other polyphenol classes has not been assessed. Nevertheless, meta-analyses have shown that flavonoid intake effect on BC risk is not well established, considering differences between tumor characteristics such as estrogen receptor, progesterone receptor and HER2 receptor status [20,21].

The aim of this study was to evaluate the effect of dietary intake of all polyphenol classes (flavonoids, phenolic acids, stilbenes, lignans and others) on total BC and by and hormone receptor status in the Multi-Case-Control (MCC)-Spain study.

2. Materials and Methods

MCC-Spain [22] is a population-based multi-case-control study carried out between September 2008 and December 2013 in 12 Spanish provinces. The methodology included recruiting cases and controls, as has been previously described [23]. Briefly, BC cases were women aged 20 to 85 years old and newly diagnosed with histologically confirmed BC, and were recruited from 10 of the 12 participating Spanish provinces. A single set of population-based controls were frequency-matched to cases, by age and region. Controls were randomly selected from primary care centers within catchment areas of the hospitals where the cases were recruited. As can be observed in Figure 1, the initial 3648 individuals (1738 first confirmed cases of BC and 1910 controls) were filtered by specific exclusion criteria for the statistic models—participants with no polyphenol dietary data, menopausal status, socioeconomic status, smoking status, alcohol consumption, oral contraceptive consumption (OCC), family history of BC, menarche, number of children, physical activity, and body mass index (BMI). The final database included 1577 controls and 1472 BC cases, of which 990 were hormonal receptor positive (ER+ or PR+), 249 were ERB2+ (independently of ER and PR status) and 106 were triple negative (TNBC) tumors.

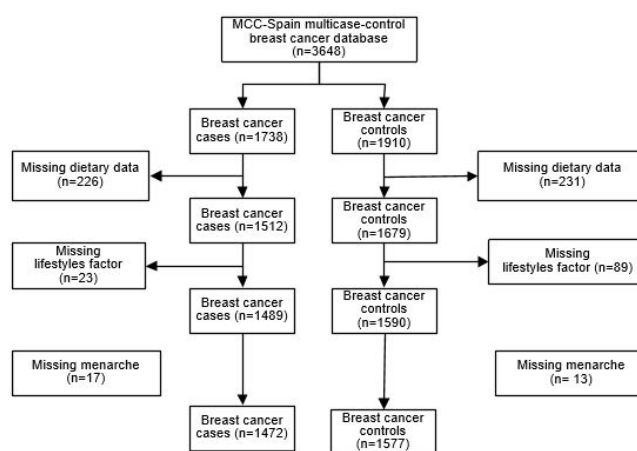


Figure 1. Algorithm for selection of breast cancer controls and cases in the multi-case-control (MCC)-Spain study.

2.1. Data Collection

Data on sociodemographic factors, lifestyle and personal/family medical history were collected with a structured computerized epidemiological questionnaire that was administered by trained personnel in a face-to-face interview [23]. Habitual dietary information of the previous year was obtained with a validated 154-item food frequency questionnaire (FFQ) [24].

Similarly to other studies, if a given food was a mixture of several others (e.g., “soup” or vegetable puree) the recipe was calculated (sum of ingredients). Total energy intake and nutrients were also estimated. Moreover, some questions about general dietary habits were included in the questionnaire and were used to adjust the responses to the FFQ according to Calvert et al. methodology [25].

In this study, the daily intake of four classes and 22 subclasses of polyphenols was estimated using both Phenol-Explorer food-composition database [26] and USDA food-composition databases [27].

Data on proanthocyanidins (dimers, trimers, 4–6 mers, 7–10 mers and >10-mers) were extracted from the United States Department of Agriculture (USDA) database [27], because more data were available in the USDA database than in Phenol-Explorer.

Polyphenol intake was calculated in mg per day, using the food consumption data from the FFQ and the polyphenol content (expressed as aglycones) of each food included in the Phenol-Explorer database [28]. Data provided by the Phenol-Explorer tool were insufficient to apply retention factors in the calculation of polyphenol intake. Phenol-Explorer data provide information on polyphenol content obtained from chromatography with and without hydrolysis. Since polyphenol data using chromatography without hydrolysis has missing values, this information was completed using data on chromatography after hydrolysis.

2.2. Statistical Analysis

Polyphenol intake was positively correlated with total energy intake. For this reason, the contents of polyphenols were adjusted for total energy using the residuals method [29], and posteriorly categorized in quartiles according to its distribution among controls. In addition, the consumption of polyphenols was log₂-transformed to correct right-skewedness [30] and to facilitate the interpretation of the results.

Odds ratios (ORs) and 95% confidence interval (CI) of BC risk were calculated according to the polyphenol consumption quartiles using mixed effects logistic regression adjusted by known BC risk factors and by menopausal status and receptor status [13,31]. Adjusted ORs of Q4 vs. Q1 and 95% confidence intervals (CI) of BC according to polyphenol intake were adjusted.

Age (y), family history of cancer (yes, no), smoking status (never-smoker, ever-smoker), consumption of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs; yes, no), consumption of alcohol (0, <12, 12–47, >47 g/day), socioeconomic status (low, medium, high), BMI (<30, ≥30 kg/m²), physical activity (0, 0–8, 8–16, >16 METS*h/week), age of menarche (≤11, 12–14, >14 years), number of children (0, 1, 2, >2), oral contraception consumption (ever, never), hormone replacement therapy (ever, never; only for postmenopausal women) and energy intake (kcal/day) as fixed effects and province of residence as a random effect term. In a sensitivity analysis, we further adjusted the previous model for fibre (mg/d) and vitamin C (mg/d) to account for potential interactions with other bioactive nutrients also present in some polyphenol-rich foods. The age at first child and lactation were included in the first models that we carried out as in other studies, but did not generate any change in the results.

Heterogeneity of the effects by menopausal status was tested by including in the models an interaction term between polyphenol intake and menopausal status. To evaluate these associations by BC subtypes, multinomial logistic regression methods were used. These models were adjusted by the same set of variables described above, plus the province of residence.

Given the multiple comparisons, to control the expected proportion of discoveries that are false, an FDR (false discovery rate) test through the Benjamini–Hochberg procedure was made ($p < 0.05$) (see Tables S1–S6).

Stata statistical software (Version 13, Stata Corp, College Station, TX, US) [32] was used for mixed effects logistic regression, Python Version 3.14, Python Software Foundation, Delaware, US) [33] and R (Version 3.6, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) [34] for the extraction of polyphenol content data in each food, and the calculation of polyphenol consumption by each individual, respectively.

3. Results

Characteristics of the study population and sociodemographic factors by case-control status and by menopausal status are shown in Table 1. The percentage of polyphenol input of food in all individuals studied is presented in Table 2.

Table 1. Distribution of lifestyle by cases, controls of breast cancer and menopausal status.

Variables		Controls (N = 1577)	Breast Cancer Cases (N = 1472)	Premenopausal (N = 1006)		Postmenopausal (N = 2043)	
				Control (N = 471)	Cases (N = 535)	Control (N = 1106)	Cases (N = 937)
Socioeconomic status	High (%)	281 (17.78)	238 (16.19)	143 (30.36)	129 (24.11)	138 (12.48)	109 (11.63)
	Medium (%)	8170 (51.90)	786 (53.39)	265 (56.26)	335 (62.62)	552 (49.51)	451 (48.13)
	Low (%)	479 (30.32)	448 (30.42)	63 (13.38)	71 (13.27)	416 (37.61)	377 (40.23)
Smoking status (%)	Yes	639 (40.51)	660 (44.92)	261 (55.41)	328 (61.31)	378 (34.18)	332 (35.43)
	No	938 (59.49)	812 (55.08)	210 (44.59)	207 (38.69)	728 (65.82)	605 (64.57)
Family history of breast cancer (%)	Yes	145 (9.24)	212 (14.36)	25 (5.31)	77 (14.39)	120 (10.85)	135 (14.41)
	No	1432 (90.76)	1260 (85.64)	446 (94.69)	458 (85.61)	986 (89.15)	802 (85.59)
NSAID (%)	Yes	807 (51.14)	656 (44.58)	240 (50.96)	235 (43.93)	567 (51.27)	421 (44.93)
	No	770 (48.86)	816 (55.42)	231 (49.04)	300 (56.07)	539 (48.73)	516 (55.07)
BMI (kg/m ²)	<30 kg/m ²	1313 (83.29)	1214 (82.38)	417 (88.54)	491 (91.78)	896 (81.01)	723 (77.16)
	≥30 kg/m ²	264 (16.71)	268 (17.62)	54 (11.46)	44 (8.22)	210 (18.99)	214 (22.84)
Alcohol consumption (g/day)	0 g/day	401 (25.57)	357 (24.46)	97 (20.59)	97 (18.13)	304 (27.49)	260 (27.75)
	0–12 g/day	965 (61.08)	887 (60.09)	320 (67.94)	367 (69.60)	645 (58.32)	520 (55.50)
	12–47 g/day	192 (12.15)	202 (13.69)	50 (10.62)	62 (11.59)	142 (12.82)	140 (14.94)
	>47 g/day	19 (1.2)	26 (1.76)	4 (0.85)	9 (1.68)	15 (1.36)	17 (1.81)
Physical activity	0 METS*h/week	592 (37.59)	629 (42.62)	207 (43.95)	242 (45.23)	385 (34.81)	387 (41.30)
	0–8 METS*h/week	257 (16.33)	229 (15.51)	86 (18.26)	101 (18.88)	171 (14.46)	128 (13.66)
	8–16 METS*h/week	227 (14.37)	190 (12.94)	66 (14.01)	71 (13.27)	161 (14.56)	119 (12.70)
	>16 METS*h/week	501 (31.71)	424 (28.93)	112 (23.78)	121 (22.62)	389 (35.17)	303 (32.34)
Oral contraceptive consumption	never	792 (50.19)	763 (51.83)	139 (29.51)	178 (33.27)	653 (59.04)	585 (62.43)
	ever	785 (49.81)	709 (48.17)	332 (70.49)	357 (66.73)	453 (40.96)	352 (37.57)
Hormone replace therapy	never	1403 (88.99)	1335 (90.65)	-	-	933 (84.36)	801 (85.49)
	ever	121 (7.66)	104 (7.05)	470 (99.79)	534 (99.81)	120 (10.85)	103 (10.99)
	not known	53 (3.35)	33 (2.3)	1 (0.21)	2 (0.20)	53 (4.79)	33 (3.52)
Number of children	0	303 (19.18)	309 (20.93)	132 (28.03)	137 (25.61)	171 (15.46)	171 (18.25)
	1	251 (15.95)	278 (18.83)	114 (24.20)	136 (25.42)	137 (12.39)	142 (15.15)
	2	629 (39.94)	592 (40.31)	183 (38.85)	215 (40.19)	446 (40.33)	377 (40.23)
	>2	394 (24.94)	294 (19.92)	42 (8.92)	47 (8.79)	352 (31.83)	247 (26.36)
Menarche	<11 years old	81 (5.25)	94 (6.37)	23 (4.88)	31 (5.79)	58 (5.24)	63 (6.72)
	12–14 years old	1305 (82.66)	1211 (82.25)	413 (87.69)	460 (85.98)	892 (80.65)	751 (80.15)
	>14 years old	191 (12.09)	167 (11.38)	35 (7.43)	44 (8.22)	156 (14.10)	123 (13.13)

Table 2. Main foods that contribute more to each subclass of polyphenol.

Polyphenol Class	Subclass	Compound	Food Sources *	Mean Intake (g/d)
Lignans		1-Acetoxy-pinoreosin, Pinoreosin, 7-Hydroxymatairesin, 7-Oxomatairesin, Conidendrin, Cyclolariciresin, Isolariciresin, Lariciresin, Lariciresin-sesquilignan, Matairesin, Medioresin, Pinoreosin, Secoisolariciresin, Secoisolariciresin-sesquilignan, Syringaresin	Olive oil (94.8%), Gazpacho (5.2%)	2.92
Stilbene		d-Viniferin, Pallidol, Piceatannol, Resveratrol	Red wine (76.1%), Strawberry (7.7%), Rosé/White wine (7.5%), Grapes (5.8%), Lentils (1.1%), Chocolate (1.1%)	0.85
Flavonoids				143.38
Anthocyanins		Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Pelargonidin, Peonidin, Petunidin, Pinotin A, Vitisin A	Sweet cherry (39.6%), Strawberry (21.0%), Plum (11.3%), Grapes (10.6%), Olives (9.6%), Red wine (6.5%)	19.42
Chalcones		Xanthumol	Beer Ale (95%), Beer alcohol free (5%)	0.002
Dihydrochalcones		Phloretin, 3-Hydroxyphloretin	Apple (73.4%), Nonorange juice (26.6%)	1.05
Dyhydroflavonols		Dihydroquercetin	Red wine (95%), Rosé/White wine (5%)	0.83
Flavanols		(-)-Epicatechin, (-)-Epigallocatechin, (+)-Catechin, (+)-Epicatechin-(2a-7)(4a-8)-epicatechin, (+)-Galocatechin, Cinnamtannin A2	Cocoa powder (58.1%), Chocolate (13.1%), Broad bean seed (5.6%), Plum (5.3%), Red Wine (5.3%), Apple (3.5%), Sweet cherry (1.7%), Persimmon/Custard apple (1.5%), Strawberry (1.0%), Grapes (1.0%)	23.10
Flavanones		6-Prenylnaringenin, 8-Prenylnaringenin, Eriodictyol, Hesperetin, Isosakuranetin, Isoxanthohumol, Naringenin	Orange pure juice (72.2%), Non-orange pure juice (24.1%), Red wine (1.5%)	43.33
flavones		Apigenin, Chrysoeriol, Diosmetin, Luteolin, Nobiletin, Sinensetin, Tangeretin, Tetramethylscutellarein	Globe artichoke (62.9%), Celery (18.1%), Olives (11.7%), Orange pure juice (2.0%), Vegetable soup (1.3%), Sweet pepper green (1.1%), Lettuce (1.1%)	4.00
Flavonols		3,7-Dimethylquercetin, 3-Methoxynobiletin, 5,3',4'-Trihydroxy-3-methoxy-6:7-methylenedioxyflavone, 5,4'-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-6:7-methylenedioxyflavone, 6,8-Dihydroxykaempferol, Ferulic acid, Isorhamnetin, Jaceidin, Kaempferol, Morin, Myricetin, Patuletin, Quercetin, Spinacetin	Swiss chard (23.2%), Common beans (18.9%), Endive (8.0%), Olives (7.9%), Chocolate (7.8%), Asparagus (7.2%), Chickpea/Common beans (5.8%), Lettuce (3.7%), Red wine (3.2%), Plum (2.2%), Green bean (2.0%), Onion (1.8%), Apple (1.4%), Grapes (1.1%)	23.10
Isoflavonoids		Biochanin A, Daidzein, Genistein, Glycitein, Formononetin	Soy milk (93.9%), Common Beans (4.3%), Chickpea/Common beans (1.3%)	2.26
Phenolic acids				163.85

Table 2. Cont.

Polyphenol Class	Subclass	Compound	Food Sources *	Mean Intake (g/d)
Hydroxybenzoic acids		Valoneic acid dilactone, 2,3-Dihydroxybenzoic acid, 2,4-Dihydroxybenzoic acid, 2,6-Dihydroxybenzoic acid, 2-Hydroxybenzoic acid, 3,5-Dihydroxybenzoic acid, 3-Hydroxybenzoic acid, 4-Hydroxybenzoic acid, Benzoic acid, Ellagic acid, Gallagic acid, Gallic acid, Gentisic acid, Protocatechuic acid, Syringic acid, Vanillic acid	Olives (44.1%), Red wine (19.4%), Non-orange pure juice (11.8%), Strawberry (6.4%), Nuts (5.7%), Rosé/White wine (2.1%), Beer Ale (1.9%), Banana (1.6%), Lentils (1.7%)	14.47
Hydroxycinnamic acids		Caffeic acid, Caffeoyl aspartic acid, Cinnamic acid, Ferulic acid, Hydroxycaffeic acid, m-Coumaric acid, o-Coumaric acid, p-Coumaric acid, Sinapic acid	Coffee (36.3%), Globe artichoke (16.4%), Olives (11.1%), Plum (7.2%), Sweet cherry (7.0%), cocoa powder (5.9%), Red wine (2.1%), Apple (2.0%), chocolate (1.9%), Peach/Apricot (1.5%), Carrot (1.5%), Potato (1.2%), Grapes (1.0%)	149.37
Hydroxyphenylacetic acids		3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, 4-Hydroxyphenylacetic acid, Homovanillic acid, Homoveratric acid, Methoxyphenylacetic acid	Olives (96.3%), Red wine (2.3%)	0.55
Other polyphenols				13.12
Alkylmethoxyphenols		4-Vinylguaiacol	Coffee (96.4%), Beer Ale (3.6%)	0.72
Alkylphenols		3-Methylcatechol, 4-Ethylcatechol, 4-Methylcatechol, 3-Methylcatechol, 4-Vinylphenol	Coffee (83.4%), Cocoa powder (14.8%), Beer (1.8%)	0.1
furanocoumarins		Bergapten, Isopimpinellin, Psoralen, Xanthotoxin	Celery (91.6%), Non-orange pure juice (8.4%)	0.03
Hydroxybenzaldehydes		Protocatechuic aldehyde, Syringaldehyde, Vanillin	Red wine (67.2%), Cocoa powder (9.5%), Cognac/Rum/Whisky (7.8%), Olives (4.7%), Rosé/White wine (4.7%), Sherry (3.3%), Cider/Champagne (1.1%)	0.17
Hydroxycoumarins		4-Hydroxycoumarin, Esculetin, Mellein, Scopoletin, Umbelliferone	Rosé/White wine (58.8%), Beer Ale (22.8%), Cocoa powder (11.4%), Sherry (7.0%)	0.04
Methoxyphenols		Guaiacol	Coffee (100%)	0.10
Tyrosol		Hydroxytyrosol acetate (4-DHPEA-AC), Hydroxytyrosol, Oleoside 11-methylester, Tyrosol acetate (p-HPEA-AC), Tyrosol	Olives (83.2%), Olive oil (11.9%), Red wine (2.4%), Cider/Champagne (1.0%)	11.98

* Food sources that contribute >1%.

Figure 2 shows the results of the different subclasses of polyphenols for all cases of BC (see Table S7). Total consumption of polyphenols has not been associated with BC risk (aOR_{Q4 vs. Q1} = 1.06; 95% CI = 0.86–1.30). The intake behavior of the various families is heterogeneous, ranging from the clear protective association with stilbenes (aOR_{Q4 vs. Q1} = 0.70; 95% CI = 0.56–0.89) to the probable higher risk with phenolic acids (aOR_{Q4 vs. Q1} = 1.16; 95% CI = 0.94–1.43) and without noticeable effect in the case of flavonoids, lignans and other polyphenols. As with families, a heterogeneous behavior with the various compounds is observed, highlighting the protective and statistically significant association with dihydroflavonols (aOR_{Q4 vs. Q1} = 0.70; 95% CI = 0.55–0.88), hydroxybenzaldehydes (aOR = 0.75; 95% CI = 0.59–0.95) and hydroxycoumarins (aOR_{Q4 vs. Q1} = 0.73; 95% CI = 0.57–0.93). We also observed a possible higher risk associated with high methoxyphenol intake (aOR_{Q4 vs. Q1} = 1.19; 95% CI = 0.96–1.46). In the sensitivity analysis, almost identical values were observed after additionally adjusting the multivariable model for fiber and vitamin C.

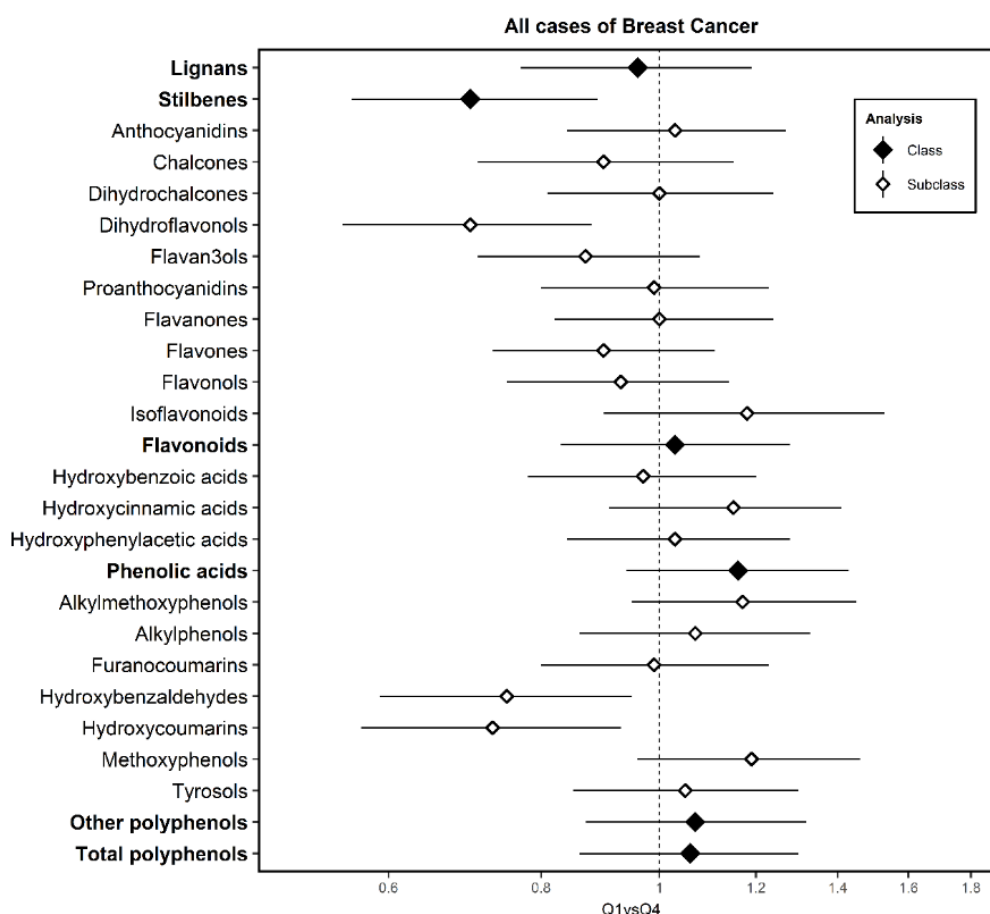


Figure 2. Adjusted Odds Ratios (ORs) of Quartile 4 (Q4) vs. Quartile 1 (Q1) and 95% confidence intervals (CI) of breast cancer according to polyphenol intake in the multi-case-control (MCC)-Spain study. Adjusted ORs of Q4 vs. Q1 and 95% confidence intervals (CI) of BC according to polyphenol intake. ORs were adjusted for age, socioeconomic status, BC family history, body mass index, smoking, physical activity, energy, NSAIDs, age of menarche, number of children, past alcohol intake, hormone replacement therapy and oral contraceptives consumption as fixed effects and province of residence as a random effect term.

In Figure 3 we only represented the results for the polyphenols that we observed a different direction in the associations between pre- and postmenopausal women (the rest of the results are in Table S7). A notable difference has been observed for the case of isoflavonoids, in which high consumption was associated with higher risk among premenopausal women (aOR_{Q4 vs. Q1} = 1.62; 95%

CI = 1.00–1.62) while no association was observed among postmenopausal (aOR_{Q4 vs. Q1} = 0.98; 95% CI = 0.71–1.35).

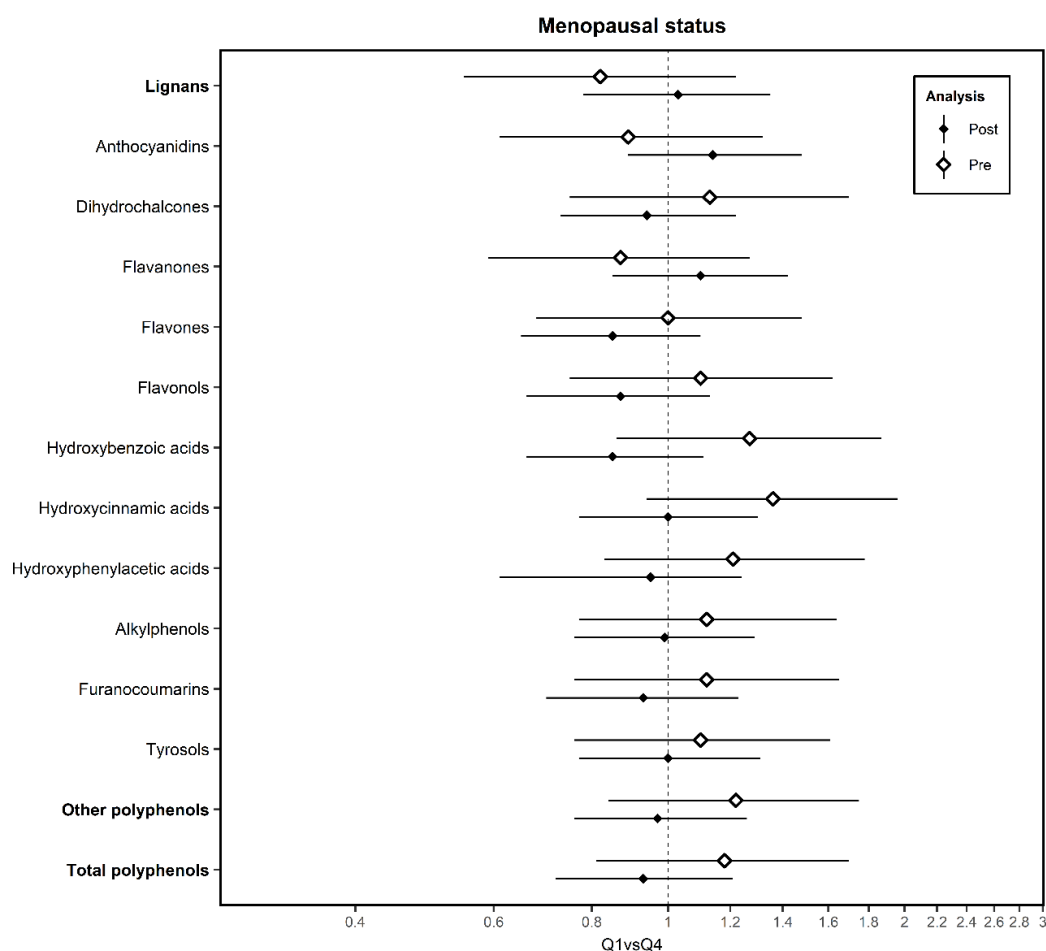


Figure 3. Association between estimated intake of subclasses of polyphenols with breast cancer by menopausal status, in the Multi-Case-Control (MCC)-Spain study. Post: Postmenopausal women; Pre: Premenopausal women. Adjusted ORs of Q4 vs. Q1 and 95% confidence intervals (CI) of BC by menopausal status according to polyphenol intake. ORs were adjusted for age, socioeconomic status, BC family history, body mass index, smoking, physical activity, energy, NSAIDs, age of menarche, number of children, past alcohol intake, hormone replacement therapy and oral contraceptives consumption as fixed effects and province of residence as a random effect term.

Regarding hormonal receptors, we highlighted only polyphenols with differences in the results (Figure 4); the rest of the results are shown in Table S8. In the case of flavan-3-ols where they behave as a protective factor against tumors with positive hormonal receptors (aOR_{Q4 vs. Q1} = 0.78; 95% CI = 0.61–0.99), flavonols as a risk factor against TNBC (aOR_{Q4 vs. Q1} = 1.39; 95% CI = 0.90–2.43) and protective against ERB (+), hydroxybenzoic acids as a possible protective association in the case of ERB (+), the higher risk of hydroxycinnamic acids for ERB (+) (aOR_{Q4 vs. Q1} = 2.00; 95% CI = 1.34–2.98) and metoxyphenols (aOR_{Q4 vs. Q1} = 1.86; 95% CI = 1.25–2.78).

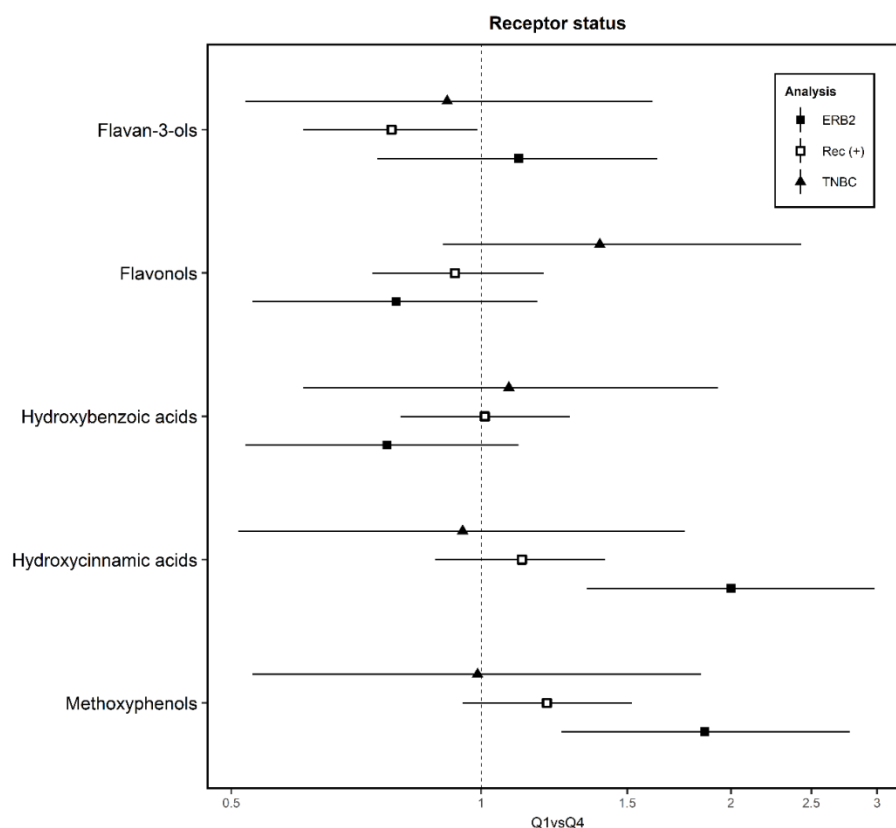


Figure 4. Association between estimated intake of subclasses of polyphenols with breast cancer by receptor status, in the Multi-Case-Control (MCC)-Spain study. ERB2: Erb B-2 receptor; Rec (+): hormonal receptor positive; TNBC: triple negative breast cancer. Adjusted ORs of Q4 vs. Q1 and 95% confidence intervals (CI) of BC by receptor status according to polyphenol intake. ORs were adjusted for age, socioeconomic status, BC family history, body mass index, smoking, physical activity, energy, NSAIDs, age of menarche, number of children, past alcohol intake, hormone replacement therapy and oral contraceptives consumption, and area of residence (random effects).

4. Discussion

Our results suggest that the intake of total polyphenols, flavonoids, and lignans was not associated with BC risk. However, a significantly lower risk was found with stilbenes and, a probable higher risk with phenolic acid intake. Our results indicate an inverse significant association between all BC cases with dihydroflavonols, hydroxybenzaldehydes and hydroxycoumarins. Regarding the results by menopausal status, it is important to take into account the variability of the associations with dihydrochalcones, flavanones, flavonols, hydroxybenzoic acids, isoflavones with menopausal status. Moreover, polyphenol subclasses showed a protective association with hydroxycoumarins and a higher risk with isoflavonoids only for postmenopausal women. In relation to receptor status, our results showed that the intake of polyphenol subclasses such as chalcones, dihydroflavonols, hydroxybenzoic acids, stilbenes, and hydroxycoumarins could act as a protective factor in the development of BC. We found protective associations for hormonal receptor (+) BC with chalcones, dihydroflavonols, flavan-3-ols, and stilbenes. Meanwhile, chalcones, dihydroflavonols, flavonols, stilbenes, hydroxybenzaldehydes, and hydroxycoumarins were inversely associated with the risk of the Erb2 subtype, while alkylmethoxyphenols and methoxyphenols subclasses are directly associated. Finally, dihydroflavonols, stilbenes, hydroxybenzaldehydes and hydroxycoumarins were associated with a lower risk of developing TNBC.

These results are in line with those obtained by the study of Zamora-Ros et al. [28], in which the consumption of flavonoids and lignans had no significant association with BC risk. The protective

association found in the case of stilbenes was also found in the study of Levi et al. [35], which indicated a reduction of BC risk with resveratrol (the main contributor of the stilbene class). It had a protective significant association taking into account resveratrol from wine and grapes together, and only from grapes, but this effect was not significant when only resveratrol from wine was taken into account, probably due to the alcohol content of wine.

In contrast, there is controversy about our results with other published studies as Feng et al. [36] and Gardeazabal [37]. The first one determined that the consumption of flavonoids was associated with lower BC risk [36]. The second one (that studied the total intake of different classes of polyphenols) did not find any significant associations between BC risk and the intake of total flavonoids, total lignans, stilbenes and total phenolic acids [37], although achieving a nonsignificant risk reduction. However, a Fink et al. [38] study found a significant inverse association for lignans but not for total flavonoid consumption.

In relation to the different subclasses of polyphenols in all categories performed (menopausal status and receptor status) and the risk of developing BC, the heterogeneity found must be taken into account. Contrary to these results, the Fink et al. study [38] found a significant inverse association of flavonols and flavones consumption with BC risk. On the other hand, Feng et al. [36] found a protective effect of anthocyanidins, proanthocyanidins, flavanones, flavones, flavonols and isoflavones. Some other studies found a protective effect of flavonol consumption against BC risk among none-to-low alcohol drinkers compared to heavy drinkers [18,19].

Case-control studies carried out in USA [38], Mexico [39,40] and Greece [41] observed a lower risk of BC among postmenopausal women with a high intake of some flavonoid subclasses (i.e., flavones, flavanols, and flavonols). Nevertheless, results from prospective cohort studies indicated that the chemopreventive role of flavonoids and flavonols in BC carcinogenesis still remains unclear [18,19,42]. Other studies suggested that protective associations were stronger in premenopausal than in postmenopausal women [43,44], whereas Dong et al. showed the opposite [45]. Concerning isoflavones, a meta-analysis [45] concluded that in Asian countries its consumption might be associated with a lower risk of BC, probably due to the high soy intake. The same meta-analysis did not find an association between isoflavone intake and BC risk in European countries.

This protective associations could be explained by the ability of some polyphenol subclasses to generate similar responses to estrogen (phytoestrogens), as their structure resembles the most important type of estrogen in humans and possesses hydroxyl groups and phenolic rings, necessary for binding to estrogen receptors [46]. In addition, several studies reported that some of the estrogen receptor (ER)-mediated responses induced by flavonoids are comparable, or even superior, to those induced by physiological levels of estradiol [47]. Thus, some flavonoids are still described as complete estrogen agonists and with a higher affinity for ER β , exerting a response that opposes the proliferative effects of ER α activation [48,49]. This suggests that, at physiological levels, phytoestrogens can activate ER β but not procancer signaling mediated by ER α (or activate it to a much lesser extent) enabling a beneficial antiproliferative effect. Regarding receptor status, two studies found no association between flavonoid intake and BC risk [28,50]. In contrast, we found a protective relation for hormonal receptor (+) BC with chalcones, dihydroflavonols, flavan-3-ols, and stilbenes.

In our study, polyphenol classes showing a protective association against BC risk (i.e., stilbenes, dihydroflavonols, and hydroxycoumarins) seem to be mainly related to grape-wine consumption. Even though high alcohol consumption is related to an increase of BC risk, in our database, 85.6% of controls and 84.6% of cases were distributed in 0 and 0–12 g/day of alcohol consumption. The protective association for low dose wine consumption with BC risk could be explained by several mechanisms, as wine contains high concentrations of many polyphenols, among them resveratrol, the most well-known stilbene. An *in vitro* study has proved the antiproliferative activity of these compounds on different BC cell lines, indicating that at nM or even at pM plasma concentrations, obtained after moderate stilbene ingestion, stilbenes have a protective effect against BC risk [51].

However, our results must be interpreted with caution, given that they are not exempt from limitations. Since the present study is based on a case-control study design, therefore results are prone to selection and recall bias. The MCC recruited the controls from the general population (population-based case-control study), so selection bias was reduced. BC patients did not usually change their diet before diagnosis; although, recall bias is difficult to control in retrospective studies. Moreover, it is possible that cases applied as a lower consumption of alcohol than the reality, and as a consequence these flavonoids appear as protective features [52]. The difficulty in estimating of polyphenol content in foods between databases (USDA, Phenol-Explorer), the losses of polyphenols during cooking or processing, and the accuracy of FFQ, limit the precision of associations found in epidemiological studies. Polyphenols are extensively metabolized within the human body after ingestion, both at the hepatic and intestinal level, which vary widely among individuals and could affect the bioavailability of polyphenols. It must be taken into account that a part of the variability between the results from different studies could be attributable to the heterogeneity of the local dietary patterns as well as to the variations of polyphenol content in foods that can vary according to plant species, environmental conditions, or geographic and storage conditions [53]. Finally, dietary polyphenols are consumed simultaneously with other nutrients and compounds. Although we have adjusted for some of the most relevant ones found in polyphenolic-rich foods (such as alcohol, fiber and vitamin C), the possible confounding/interactions with other nutrients/compounds cannot be ruled out.

This is the first study to carry out an analysis including all polyphenol classes and subclasses by menopausal and receptor status. Several reviews [2–5] summarized the existing evidence about the association between cancer risk and polyphenol intake [53–55], suggesting many potential beneficial effects. Flavonoids are the most studied polyphenol class, while other polyphenol classes and compounds, which are also widely consumed by the European population [56], have been rarely investigated. This lack of epidemiologic studies exploring the relationships between the intake of polyphenol subclasses and BC risk by menopausal and receptor status precluded us from comparing our results with others. In addition, models were calculated in quartiles and log₂ to facilitate the comparison with previous studies. An FDR test was used to control false discoveries. Phenol-Explorer was built including all the available information about polyphenol contents in Phenol-Explorer, with a mix of extracted data from chromatography, chromatography after hydrolysis, and USDA data. Overall, our data on total polyphenol intake in the Spanish population sampled by the MCC-Spain study are consistent with previous reports [56], which speak in favor of the accuracy of our estimations of polyphenol intake. Finally, to our knowledge, this is the first study that explores the association of a high intake of polyphenols with BC risk including a wide variety of classes and subclasses and taking into account menopausal and hormonal receptor status.

5. Conclusions

The present study suggests that there might be a high variability in the results obtained when exploring the effect of polyphenols on BC risk if classes and subclasses of polyphenols or menopausal and hormonal receptor status are taken into account. Therefore, it is important that future studies on this topic include such information.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/12/4/994/s1>, Table S1: Results of Benjamini-Hochberg in all breast cancer cases according to polyphenol subclass intake in the MCC-Spain, Table S2: Results of Benjamini-Hochberg in all premenopausal cases according to polyphenol subclass intake in the MCC-Spain, Table S3: Results of Benjamini-Hochberg in all postmenopausal cases according to polyphenol subclass intake in the MCC-Spain, Table S4: Results of Benjamini-Hochberg in hormonal receptor (+) according to polyphenol subclass intake in the MCC-Spain, Table S5: Results of Benjamini-Hochberg in erb-2 according to polyphenol subclass intake in the MCC-Spain, Table S6: Results of Benjamini-Hochberg in triple-negative breast cancer according to polyphenol subclass intake in the MCC-Spain, Table S7: Association between estimated intake of subclasses of flavonoids, phenolic acids, and other polyphenols with breast cancer among all BC cases, pre- and postmenopausal women, in the MCC-Spain case-control database; Table S8: Association between estimated intake of subclasses of flavonoids, phenolic acids, and other polyphenols by hormonal receptor, in the MCC-Spain case-control database.

Author Contributions: F.V.-S. wrote the draft of the manuscript; F.V.-S., A.J.M., R.Z.-R. and T.F.-V. were responsible for data analysis; V.M. and J.P.B. were responsible for conception and design of the research. A.C., J.P.B., P.A., E.A., M.O.-S., I.G.-A., G.F.-T., A.M.-B., J.A., R.M.-G., E.R.-M., M.P., L.G., M.G., G.C.-V., T.D.-S., M.K., N.A., V.M. Contributed to the design of the study, data collection, and data acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was partially funded by the “Accion Transversal del Cancer”, approved by the Spanish Ministry Council on the 11th October 2007, by the Instituto de Salud Carlos III-FEDER (PI08/1770, PI08/0533, PI08/1359, PS09/00773-Cantabria, PS09/01286-León, PS09/01903-Valencia, PS09/02078-Huelva, PS09/01662-Granada, PI11/01403, PI11/01889-FEDER, PI11/00226, PI11/01810, PI11/02213, PI12/00488, PI12/00265, PI12/01270, PI12/00715, PI12/00150, PI14/01219, PI14/0613, PI15/00069, PI15/00914, PI15/01032, PI17CIII/00034), by the Fundación Marqués de Valdecilla (API 10/09), by the ICGC International Cancer Genome Consortium CLL (The ICGC CLL-Genome Project is funded by Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) through the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and Red Temática de Investigación del Cáncer (RTICC) del ISCIII (RD12/0036/0036)), by the Junta de Castilla y León (LE22A10-2), by the Consejería de Salud of the Junta de Andalucía (PI-0571-2009, PI-0306-2011, salud201200057018tra), by the Conselleria de Sanitat of the Generalitat Valenciana (AP_061/10), by the Recercaixa (2010ACUP 00310), by the Regional Government of the Basque Country, by the Consejería de Sanidad de la Región de Murcia, by the European Commission grants FOOD-CT-2006-036224-HIWATE, by the Spanish Association Against Cancer (AECC) Scientific Foundation, by the Catalan Government- Agency for Management of University and Research Grants (AGAUR) grants 2017SGR723 and 2014SGR850, by the Fundación Caja de Ahorros de Asturias and by the University of Oviedo. and IDIBELL is a member of the CERCA Programme, Generalitat de Catalunya. RZ-R was supported by the “Miguel Servet” program (CP15/00100) from the Institute of Health Carlos III (Co-funded by the European Social Fund (ESF)—ESF investing in your future).

Acknowledgments: We are thankful to all participants in the MCC-Spain study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Hui, C.; Qi, X.; Qianyong, Z.; Xiaoli, P.; Jundong, Z.; Mantian, M. Flavonoids, flavonoid subclasses and breast cancer risk: A meta-analysis of epidemiologic studies. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54318. [CrossRef] [PubMed]
- Niedzwiecki, A.; Roomi, M.W.; Kalinovsky, T.; Rath, M. Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations. *Nutrients* **2016**, *8*, 552. [CrossRef] [PubMed]
- Liu, R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 3479S–3485S. [CrossRef] [PubMed]
- Martinez-Perez, C.; Ward, C.; Cook, G.; Mullen, P.; McPhail, D.; Harrison, D.J.; Langdon, S.P. Novel flavonoids as anti-cancer agents: Mechanisms of action and promise for their potential application in breast cancer. *Biochem. Soc. Trans.* **2014**, *42*, 1017–1023. [CrossRef] [PubMed]
- Rodriguez-Garcia, C.; Sanchez-Quesada, C.; Gaforio, J.J. Dietary Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents: An Updated Review of Human Studies. *Antioxidants* **2019**, *8*, 137. [CrossRef] [PubMed]
- Azqueta, A.; Collins, A. Polyphenols and DNA Damage: A Mixed Blessing. *Nutrients* **2016**, *8*, 785. [CrossRef]
- Ramos, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J. Nutr. Biochem.* **2007**, *18*, 427–442. [CrossRef]
- Oh, J.; Hlatky, L.; Jeong, Y.S.; Kim, D. Therapeutic Effectiveness of Anticancer Phytochemicals on Cancer Stem Cells. *Toxins* **2016**, *8*, 199. [CrossRef]
- Sznarkowska, A.; Kostecka, A.; Meller, K.; Bielawski, K.P. Inhibition of cancer antioxidant defense by natural compounds. *Oncotarget* **2017**, *8*, 15996–16016. [CrossRef]
- Khalid, E.B.; Ayman, E.E.; Rahman, H.; Abdelkarim, G.; Najda, A. Natural products against cancer angiogenesis. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **2016**, *37*, 14513–14536. [CrossRef]
- Kandaswami, C.; Lee, L.T.; Lee, P.P.; Hwang, J.J.; Ke, F.C.; Huang, Y.T.; Lee, M.T. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo* **2005**, *19*, 895–909. [PubMed]
- Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer J. Clin.* **2018**. [CrossRef] [PubMed]
- World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Diet, Nutrition, Physical Activity and Cancer: A Global Perspective. Continuous Update Project Expert Report. Available online: <https://www.wcrf.org/dietandcancer> (accessed on 24 January 2020).

14. Ennour-Idrissi, K.; Maunsell, E.; Diorio, C. Effect of physical activity on sex hormones in women: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Breast Cancer Res. BCR* **2015**, *17*, 139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Duncan, A.M. The role of nutrition in the prevention of breast cancer. *AACN Clin. Issues* **2004**, *15*, 119–135. [[CrossRef](#)]
16. Matsumura, A.; Ghosh, A.; Pope, G.S.; Darbre, P.D. Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *94*, 431–443. [[CrossRef](#)]
17. Rice, S.; Whitehead, S.A. Phytoestrogens and breast cancer—promoters or protectors? *Endocr. Relat. Cancer* **2006**, *13*, 995–1015. [[CrossRef](#)]
18. Kyro, C.; Zamora-Ros, R.; Scalbert, A.; Tjønneland, A.; Dossus, L.; Johansen, C.; Bidstrup, P.E.; Weiderpass, E.; Christensen, J.; Ward, H.; et al. Pre-diagnostic polyphenol intake and breast cancer survival: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. *Breast Cancer Res. Treat.* **2015**, *154*, 389–401. [[CrossRef](#)]
19. Touvier, M.; Druesne-Pecollo, N.; Kesse-Guyot, E.; Andreeva, V.A.; Fezeu, L.; Galan, P.; Hercberg, S.; Latino-Martel, P. Dual association between polyphenol intake and breast cancer risk according to alcohol consumption level: A prospective cohort study. *Breast Cancer Res. Treat.* **2013**, *137*, 225–236. [[CrossRef](#)]
20. Sak, K. Epidemiological Evidences on Dietary Flavonoids and Breast Cancer Risk: A Narrative Review. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **2017**, *18*, 2309–2328. [[CrossRef](#)]
21. Baena Ruiz, R.; Salinas Hernandez, P. Cancer chemoprevention by dietary phytochemicals: Epidemiological evidence. *Maturitas* **2016**, *94*, 13–19. [[CrossRef](#)]
22. MCC-Spain, Estudio Multi-Caso Control Poblacional. Available online: <http://www.mccspain.org/> (accessed on 15 January 2020).
23. Castano-Vinyals, G.; Aragonés, N.; Perez-Gomez, B.; Martín, V.; Llorca, J.; Moreno, V.; Altzibar, J.M.; Ardanaz, E.; de Sanjose, S.; Jimenez-Moleon, J.J.; et al. Population-based multicase-control study in common tumors in Spain (MCC-Spain): Rationale and study design. *Gac. Sanit.* **2015**, *29*, 308–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Garcia-Closas, R.; Garcia-Closas, M.; Kogevinas, M.; Malats, N.; Silverman, D.; Serra, C.; Tardon, A.; Carrato, A.; Castano-Vinyals, G.; Dosemeci, M.; et al. Food, nutrient and heterocyclic amine intake and the risk of bladder cancer. *Eur. J. Cancer* **2007**, *43*, 1731–1740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Calvert, C.; Cade, J.; Barrett, J.H.; Woodhouse, A. Using cross-check questions to address the problem of mis-reporting of specific food groups on Food Frequency Questionnaires. UKWCS Steering Group. United Kingdom Women’s Cohort Study Steering Group. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1997**, *51*, 708–712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Rothwell, J.A.; Perez-Jimenez, J.; Neveu, V.; Medina-Remon, A.; M’Hiri, N.; Garcia-Lobato, P.; Manach, C.; Knox, C.; Eisner, R.; Wishart, D.S.; et al. Phenol-Explorer 3.0: A major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database J. Biol. Databases Curation* **2013**, *2013*, bat070. [[CrossRef](#)]
27. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. USDA Food and Nutrient Database for Dietary Studies 2011–2012. Available online: https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/80400530/pdf/fndds/fndds_2011_2012.pdf (accessed on 24 January 2020).
28. Zamora-Ros, R.; Ferrari, P.; Gonzalez, C.A.; Tjønneland, A.; Olsen, A.; Bredsdorff, L.; Overvad, K.; Touillaud, M.; Perquier, F.; Fagherazzi, G.; et al. Dietary flavonoid and lignan intake and breast cancer risk according to menopause and hormone receptor status in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study. *Breast Cancer Res. Treat.* **2013**, *139*, 163–176. [[CrossRef](#)]
29. Willett, W.C.; Howe, G.R.; Kushi, L.H. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **1997**, *65*, 1220S–1228S. [[CrossRef](#)]
30. Zumel, N.; Mount, J. Practical Data Science with R; Manning Publications Co.: 2014. Available online: <https://www.manning.com/books/practical-data-science-with-r-second-edition> (accessed on 24 January 2020).
31. Wiseman, M. The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: A global perspective. *Proc. Nutr. Soc.* **2008**, *67*, 253–256. [[CrossRef](#)]
32. StataCorp. *Stata Statistical Software: Release 13*; StataCorp LP: College Station, TX, USA, 2013.
33. Python Software Foundation. *Python Language Reference*, 3.6.5. 2018. Available online: <https://www.stata.com/> (accessed on 24 January 2020).

34. R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, 3.4.3; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2010.
35. Levi, F.; Pasche, C.; Lucchini, F.; Ghidoni, R.; Ferraroni, M.; La Vecchia, C. Resveratrol and breast cancer risk. *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ.* **2005**, *14*, 139–142. [[CrossRef](#)]
36. Feng, X.L.; Ho, S.C.; Mo, X.F.; Lin, F.Y.; Zhang, N.Q.; Luo, H.; Zhang, X.; Zhang, C.X. Association between flavonoids, flavonoid subclasses intake and breast cancer risk: A case-control study in China. *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ.* **2019**. [[CrossRef](#)]
37. Gardeazabal, I.; Romanos-Nanclares, A.; Martinez-Gonzalez, M.A.; Sanchez-Bayona, R.; Vitelli-Storelli, F.; Gaforio, J.J.; Aramendia-Beitia, J.M.; Toledo, E. Total polyphenol intake and breast cancer risk in the SUN cohort. *Br. J. Nutr.* **2018**. [[CrossRef](#)]
38. Fink, B.N.; Steck, S.E.; Wolff, M.S.; Britton, J.A.; Kabat, G.C.; Schroeder, J.C.; Teitelbaum, S.L.; Neugut, A.I.; Gammon, M.D. Dietary flavonoid intake and breast cancer risk among women on Long Island. *Am. J. Epidemiol.* **2007**, *165*, 514–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Torres-Sanchez, L.; Galvan-Portillo, M.; Wolff, M.S.; Lopez-Carrillo, L. Dietary consumption of phytochemicals and breast cancer risk in Mexican women. *Public Health Nutr.* **2009**, *12*, 825–831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Torres-Sánchez, L.; Galván-Portillo, M.; Lewis, S.; Gómez-Dantés, H.; López-Carrillo, L. Dieta y cáncer de mama en latinoamérica. *Salud Pública De México* **2009**, *51*, s181–s190.
41. Peterson, J.; Lagiou, P.; Samoli, E.; Lagiou, A.; Katsouyanni, K.; La Vecchia, C.; Dwyer, J.; Trichopoulos, D. Flavonoid intake and breast cancer risk: A case—Control study in Greece. *Br. J. Cancer* **2003**, *89*, 1255–1259. [[CrossRef](#)]
42. Bosetti, C.; Spertini, L.; Parpinel, M.; Gnagnarella, P.; Lagiou, P.; Negri, E.; Franceschi, S.; Montella, M.; Peterson, J.; Dwyer, J.; et al. Flavonoids and breast cancer risk in Italy. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. A Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **2005**, *14*, 805–808. [[CrossRef](#)]
43. Qin, L.Q.; Xu, J.Y.; Wang, P.Y.; Hoshi, K. Soyfood intake in the prevention of breast cancer risk in women: A meta-analysis of observational epidemiological studies. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2006**, *52*, 428–436. [[CrossRef](#)]
44. Trock, B.J.; Hilakivi-Clarke, L.; Clarke, R. Meta-analysis of soy intake and breast cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* **2006**, *98*, 459–471. [[CrossRef](#)]
45. Dong, J.Y.; Qin, L.Q. Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: A meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res. Treat.* **2011**, *125*, 315–323. [[CrossRef](#)]
46. Puranik, N.V.; Srivastava, P.; Bhatt, G.; John Mary, D.J.S.; Limaye, A.M.; Sivaraman, J. Determination and analysis of agonist and antagonist potential of naturally occurring flavonoids for estrogen receptor (ERalpha) by various parameters and molecular modelling approach. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 7450. [[CrossRef](#)]
47. Hsieh, R.W.; Rajan, S.S.; Sharma, S.K.; Guo, Y.; DeSombre, E.R.; Mrksich, M.; Greene, G.L. Identification of ligands with bicyclic scaffolds provides insights into mechanisms of estrogen receptor subtype selectivity. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 17909–17919. [[CrossRef](#)]
48. Kuiper, G.G.; Lemmen, J.G.; Carlsson, B.; Corton, J.C.; Safe, S.H.; van der Saag, P.T.; van der Burg, B.; Gustafsson, J.A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **1998**, *139*, 4252–4263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Basu, P.; Maier, C. Phytoestrogens and breast cancer: In vitro anticancer activities of isoflavones, lignans, coumestans, stilbenes and their analogs and derivatives. *Biomed. Pharmacother. Biomed. Pharmacother.* **2018**, *107*, 1648–1666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Wang, Y.; Gapstur, S.M.; Gaudet, M.M.; Peterson, J.J.; Dwyer, J.T.; McCullough, M.L. Evidence for an association of dietary flavonoid intake with breast cancer risk by estrogen receptor status is limited. *J. Nutr.* **2014**, *144*, 1603–1611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Damianaki, A.; Bakogeorgou, E.; Kampa, M.; Notas, G.; Hatzoglou, A.; Panagiotou, S.; Gemetzi, C.; Kouroumalis, E.; Martin, P.M.; Castanas, E. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.* **2000**, *78*, 429–441. [[CrossRef](#)]
52. Knott, C.S.; Coombs, N.; Stamatakis, E.; Biddulph, J.P. All cause mortality and the case for age specific alcohol consumption guidelines: Pooled analyses of up to 10 population based cohorts. *BMJ* **2015**, *350*, h384. [[CrossRef](#)]

53. Grosso, G.; Bella, F.; Godos, J.; Sciacca, S.; Del Rio, D.; Ray, S.; Galvano, F.; Giovannucci, E.L. Possible role of diet in cancer: Systematic review and multiple meta-analyses of dietary patterns, lifestyle factors, and cancer risk. *Nutr. Rev.* **2017**, *75*, 405–419. [[CrossRef](#)]
54. Wang, Y.; Stevens, V.L.; Shah, R.; Peterson, J.J.; Dwyer, J.T.; Gapstur, S.M.; McCullough, M.L. Dietary flavonoid and proanthocyanidin intakes and prostate cancer risk in a prospective cohort of US men. *Am. J. Epidemiol.* **2014**, *179*, 974–986. [[CrossRef](#)]
55. Bo, Y.; Sun, J.; Wang, M.; Ding, J.; Lu, Q.; Yuan, L. Dietary flavonoid intake and the risk of digestive tract cancers: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24836. [[CrossRef](#)]
56. Zamora-Ros, R.; Knaze, V.; Rothwell, J.A.; Hemon, B.; Moskal, A.; Overvad, K.; Tjønneland, A.; Kyro, C.; Fagherazzi, G.; Boutron-Ruault, M.C.; et al. Dietary polyphenol intake in Europe: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur. J. Nutr.* **2016**, *55*, 1359–1375. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ANEXO III



Article

Flavonoids and the Risk of Gastric Cancer: An Exploratory Case-Control Study in the MCC-Spain Study

Facundo Vitelli Storelli ¹, Antonio José Molina ¹, Raul Zamora-Ros ² , Tania Fernández-Villa ^{1,*} , Vasiliki Roussou ¹, Dora Romaguera ^{3,4,5}, Nuria Aragonés ^{6,7}, Mireia Obón-Santacana ^{6,8,9}, Marcela Guevara ^{6,10} , Inés Gómez-Acebo ^{6,11}, Guillermo Fernández-Tardón ^{6,11}, Ana Molina-Barceló ¹², Rocío Olmedo-Requena ^{6,13} , Rocío Capelo ¹⁴, María Dolores Chirlaque ^{6,15}, Beatriz Pérez-Gómez ^{6,16} , Victor Moreno ^{6,17,18,19} , Jesús Castilla ^{6,10} , María Rubín-García ¹, Marina Pollán ^{6,16}, Manolis Kogevinas ^{4,6,20,21}, Juan Pablo Barrio Lera ¹ and Vicente Martín ^{1,6}

- ¹ Grupo de Investigación en Interacciones Gen-Ambiente y Salud (GIIGAS)/Instituto de Biomedicina (IBIOMED), Universidad de León, 24071 León, Spain; fvits@unileon.es (F.V.S.); ajmolt@unileon.es (A.J.M.); vasilirous@gmail.com (V.R.); mrubig02@estudiantes.unileon.es (M.R.-G.); jpbarl@unileon.es (J.P.B.L.); vicente.martin@unileon.es (V.M.)
 - ² Unit of Nutrition and Cancer, Cancer Epidemiology Research Programme, Catalan Institute of Oncology (ICO), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), 08908 L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona), Spain; raulzamoraros@gmail.com
 - ³ Instituto de Investigación Sanitaria Illes Balears (IdISBa), Spain; dora.romaguera@isglobal.org
 - ⁴ Instituto de Salud Global de Barcelona (ISGlobal), 08003 Barcelona, Spain; manolis.kogevinas@isglobal.org
 - ⁵ CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), 28029 Madrid, Spain
 - ⁶ Consortium for Biomedical Research in Epidemiology & Public Health (CIBER en Epidemiología y Salud Pública-CIBERESP), 28029 Madrid, Spain; nuria.aragones@salud.madrid.org (N.A.); mobon@iconcologia.net (M.O.-S.); mp.guevara.eslava@navarra.es (M.G.); ines.gomez@uncan.es (I.G.A.); gftardon@uniovi.es (G.F.-T.); rocioolmedo@ugr.es (R.O.-R.); mdolores.chirlaque@carm.es (M.D.C.); bperez@isciii.es (B.P.-G.); v.moreno@iconcologia.net (V.M.); jcastilc@navarra.es (J.C.); mpollan@isciii.es (M.P.)
 - ⁷ Cancer Epidemiology Section, Public Health Division, Department of Health of Madrid, 28035 Madrid, Spain
 - ⁸ Oncology Data Analytics Program (ODAP), Catalan Institute of Oncology (ICO), L'Hospitalet del Llobregat, 08003 Barcelona, Spain
 - ⁹ ONCOBELL Program, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Spain
 - ¹⁰ Public Health Institute of Navarra-IDISNA, 31003 Pamplona, Spain
 - ¹¹ University of Cantabria-IDIVAL, Santander, Spain
 - ¹² Cancer and Public Health Area, FISABIO-Public Health, 46020 Valencia, Spain; molina_anabar@gva.es
 - ¹³ Department of Preventive Medicine and Public Health, University of Granada, 18071 Granada, Spain
 - ¹⁴ Centro de Investigación en Recursos Naturales, Salud, y Medio Ambiente (RENSMA), Universidad de Huelva, 21071 Huelva, Spain; rocio.capelo@dbasp.uhu.es
 - ¹⁵ Department of Epidemiology, Regional Health Council, IMIB-Arrixaca, Murcia University, 30007 Murcia, Spain
 - ¹⁶ Department of Epidemiology of Chronic Diseases, National Centre for Epidemiology, Carlos III Institute of Health, 28029 Madrid, Spain
 - ¹⁷ Oncology Data Analytics Program (ODAP), Catalan Institute of Oncology (ICO), L'Hospitalet del Llobregat, 08908 Barcelona, Spain
 - ¹⁸ ONCOBELL Program, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, 08908 Barcelona, Spain
 - ¹⁹ Department of Clinical Sciences, Faculty of Medicine, University of Barcelona, 08907 Barcelona, Spain
 - ²⁰ IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), 08003 Barcelona, Spain
 - ²¹ Universitat Pompeu Fabra (UPF), Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, 08002 Barcelona, Spain
- * Correspondence: tferv@unileon.es; Tel.: +34-987291000-5034

Received: 16 March 2019; Accepted: 24 April 2019; Published: 27 April 2019



Abstract: Several epidemiological studies have investigated the association between the dietary flavonoid intake and gastric cancer (GC) risk; however, the results remain inconclusive. Investigating the relationship between the different classes of flavonoids and the histological types and origin of GC can be of interest to the research community. We used data from a population-based multi-case control study (MCC-Spain) obtained from 12 different regions of Spain. 2700 controls and 329 GC cases were included in this study. Odds ratios (ORs) were calculated using the mixed effects logistic regression considering quartiles of flavonoid intakes and log₂. Flavonoid intake was associated with a lower GC risk (ORlog₂ = 0.76; 95% CI = 0.65–0.89; ORq_{4vsq1} = 0.60; 95%CI = 0.40–0.89; ptrend = 0.007). Inverse and statistically significant associations were observed with anthocyanidins, chalcones, dihydroflavonols and flavan-3-ols. The isoflavonoid intake was positively associated with higher cancer risk, but without reaching a statistical significance. In general, no differences were observed in the GC risk according to the location and histological type. The flavonoid intake seems to be a protective factor against GC within the MCC-study. This effect may vary depending on the flavonoid class but not by the histological type and location of the tumor. Broader studies with larger sample size and greater geographical variability are necessary.

Keywords: flavonoids; intake; gastric cancer; case-control study; MCC-Spain

1. Introduction

Gastric cancer (GC) is one of the most relevant malignancies. It is the fifth most common cancer and the third in the mortality ranking world [1,2]. In many countries, a survival of five years after diagnosis is under 30% [3]. Incidence rates show a great geographical variability, probably caused by dietary patterns, genetic differences and exposure to carcinogens (e.g., *Helicobacter pylori* infection, smoking or processed meats) [1].

The intake of fruits and vegetables has been shown to be inversely related to cancer risk [4–6] and a high intake of fruits and vegetables is recommended for cancer prevention [7]. One of these beneficial effects has been partially attributed to the high flavonoids content of these foods [8]. In the case of GC, these evidences are limited.

Flavonoids are secondary metabolites present in a wide variety of plants, involved in photosynthesis, and in the defense against both pathogens and ultraviolet radiation. The flavonoids cannot be produced by the human body, so they must be ingested by eating different plant-based foods (such as fruits and vegetables). These compounds have been shown to present preventive properties for a wide variety of diseases, such as cancer, cardiovascular diseases [9] or osteoporosis [10]. Accordingly, flavonoids consumption could reduce the risk of cancer development through various mechanisms [11–13], such as protection against DNA damage [14], blocking specific carcinogen pathways [15], inducing apoptosis [16], modulating cellular proliferation, antioxidant properties, anti-inflammatory [17], inhibiting angiogenesis [18], and suppressing matrix metalloproteinases secretion and tumor invasive behavior [19]. In addition, some flavonoids have antimicrobial effects, inhibiting the growth of *H. pylori* [20,21].

Although several studies have evaluated the inverse relation between the flavonoid intake and the digestive tract cancer risk [8,22–25], the epidemiological evidence is still insufficient [8]. A recent meta-analysis concluded that dietary flavonoids could reduce the risk of GC in the European population but not in the US or Asia [23]. This difference between the studies in Asia, America and Europe, suggest that the heterogeneity between the results could be partially explained by the geographical variability of food consumption.

One of the possible causes of the lack of consistency in the results between populations could be the several flavonoid subclasses by GC subtype. There are differences among GC risk factors by the anatomical and histological subtype [26,27]. According to their chemical structure, flavonoids can be

classified into six principal subclasses: Flavonols, flavones, flavanones, flavan-3-ols, anthocyanins and isoflavones [17,28].

We hypothesize that the intake of flavonoids is associated with different effects on gastric cancer according to the subclass of the flavonoid intake analyzed and the histological type or location of gastric cancer.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

The MCC-Spain is a large population-based multi-case control study evaluating environmental exposures and genetic factors of common tumors in Spain [29]. Clinical and epidemiological data from cases of histologically confirmed gastric tumors were collected from 2008 to 2013 in public hospitals. The subjects were previously informed about the study, and those who volunteered signed an informed consent for their participation. In the present study, we included 329 cases of GC and 2700 matched controls, Figure 1. The MCC-Spain study has been approved by the ethics committee of each area, and it also follows the Declaration of Helsinki and the Spanish Data Protection Act 1999 [30].

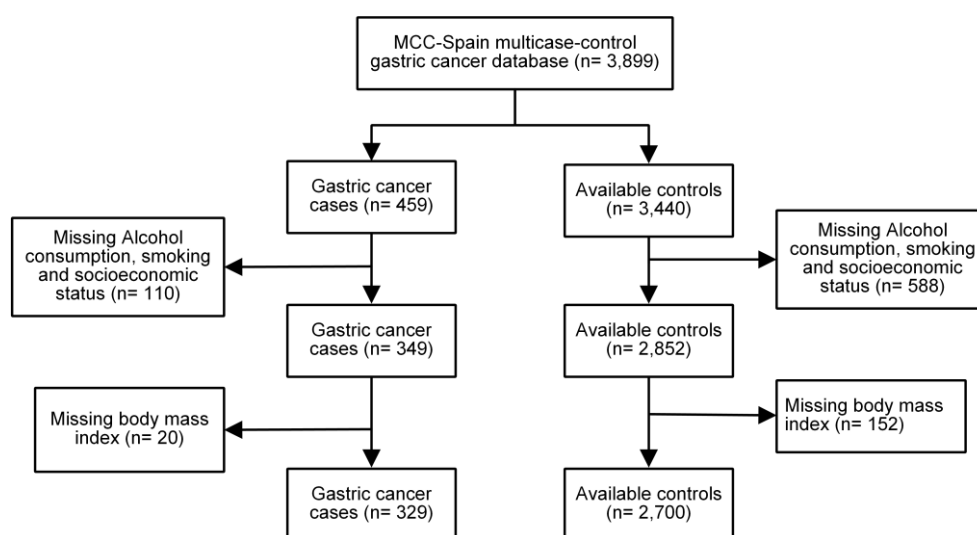


Figure 1. Algorithm for selection of controls and cases.

The inclusion criteria for cases were the following: Living for at least six months in the same area, and being 20–85 years old. Controls were selected randomly from lists of the primary care area from cases and they were matched by the age and area.

2.2. Variables and Data Collection

Cases and controls were interviewed by trained personnel, to collect information on sociodemographic factors, health behaviors (such as type, frequency and duration of physical activity, or smoking), medical conditions, previous treatments received, and personal and family history of cancer. In addition, a validated food frequency questionnaire (FFQ) [31] to collect dietary habits and past alcohol consumption (from 30 to 40 years old) was used. Data regarding the histological subtype (intestinal and diffuse) and anatomical location of the gastric tumors (cardia and non-cardia) were collected by qualified personnel.

2.3. Ethics Approval and Consent to Participate

The protocol of the MCC-Spain study was approved by the ethics committees of the participating centres. All participants were informed about the study objectives and signed an informed consent

form. Confidentiality of the data was secured by removing personal identifiers in the datasets, (Ley orgánica 3/2018, de 5 de diciembre de Protección de datos personales y garantía de los derechos digitales). The database was registered in the Spanish Agency for Data Protection, number 2102672171. Permission to use the study database will be granted to researchers outside the study group, after revision and approval of each request by the Steering Committee. More details on the organization of the project can be found online at <http://www.mccspain.org>. More detailed information can be found in a previous article published by the MCC-Spain project research group [29]. The MCC-Spain study has been approved by the ethics committee of each area, and it also follows the Declaration of Helsinki.

2.4. Assessment of Flavonoid Intake

The validated MCC-Spain FFQ [31,32] included questions about the frequency of consumption of foods grouped under ten food categories with 140 item questionnaire: (1) Meat products (including items of poultry and eggs, pork, beef, lamb, fish and seafood, and precooked meat-derived food), (2) vegetables and legumes, (3) fruits and nuts, (4) dairy products, (5) cereals (including bread and pasta), (6) sauces and seasonings, (7) oils and fats, (8) sweets and snacks, (9) vitamins and mineral supplements, (10) alcoholic and other beverages.

The amount of each food consumed daily was estimated based on reference tables of servings of food. Similarly to other studies, if a given food was a mixture of several others (e.g., “gazpacho” or vegetable puree) the recipe was calculated, i.e., the contribution of each ingredient to the total content [33]. Total energy intake, as well as the consumption of the each food as mentioned above were also estimated. Moreover, some questions about general dietary habits were included in the questionnaire and were used to adjust the responses to the FFQ following the methodology described in Calvert et al. [34]

2.5. Analysis of Flavonoid Intake

The flavonoid subclasses considered in the present study (hereinafter referred to as ‘flavonoids’ if not otherwise stated) were anthocyanidins, chalcones, dihydrochalcones, dihydroflavonols, flavan-3-ols (also called flavanol monomers), flavanones, flavones, flavonols, isoflavonoids, and proanthocyanidins (also called flavanol oligomers and polymers).

A subset of 58 foods from the MCC-Spain FFQ were considered for analysis of the flavonoids intake, including vegetables and legumes, fruits, cereals, sweets and snacks, and alcoholic and other beverages. The dietary intake of flavonoids, expressed as aglycones, was estimated using the Phenol-Explorer database [35], except for proanthocyanidins, which were estimated using the most recent US Department of Agriculture (USDA) database on proanthocyanidins [36]. We have used aglycone equivalents for the flavonoid intake estimation, instead of considering the amount of all individual chemical flavonoid species (glucosides, glucuronides, etc.) reported in the food. The rationale behind this decision was to standardize data from the results of different analytical methods to facilitate cross-study comparisons [37].

Briefly, the process used to estimate the flavonoid contents involved looking for concordance among the food subset used and the foods included in the Phenol-Explorer database, and obtaining the aglycone equivalents for each flavonoid subclass and food. The flavonoid intake was calculated in milligrams per day, using the food consumption data from the FFQ and the aglycone flavonoid content of each food referred in the Phenol-Explorer database. No retention factors were applied in the calculation of the amount of flavonoids ingested. The data from Phenol-Explorer contain information on the flavonoid concentration obtained from both chromatography and chromatography after hydrolysis analytic methods.

Chromatography is the most used technique to estimate the concentration of polyphenols in foods, and their results are expressed as glycosides, which can be expressed in aglycones with a simple calculation. On the other hand, we find chromatography after hydrolysis, a less used method that expresses the result in aglycones [38].

The number of foods with flavonoid content obtained by the chromatography method is higher than chromatography after hydrolysis, but even so there are some foods or flavonoid classes of which we only have information by chromatography after hydrolysis. In order not to lose information from them, we complete it with chromatography after hydrolysis when there is no information of chromatography. To avoid having the content of flavonoids expressed in two different units (glycoside and aglycone) we have transformed the glycoside values obtained from chromatography to aglycone, through the following equation (Ec.1). Given that the chromatography method does not provide information on the flavonoid content for all foods, this information was completed with data from chromatography after hydrolysis.

$$P \text{ aglycone } \frac{\text{mg}}{100\text{mg}} = \left(\frac{[\text{glycoside}]}{Pm \text{ glycoside}} \right) \times Pm \text{ aglycone} \text{ (Ec.1)} \quad (1)$$

Flavonoid intakes were adjusted for the total energy intake [39] to obtain a measure concerning the isocaloric intake of flavonoids. The residues were added to the flavonoid consumption preset for an energy intake corresponding to the average intake between the control subjects stratified by gender.

Intakes concerning flavonoid quartiles were established according to the distribution among controls stratified by gender, and the lowest category of consumption was used as a reference.

2.6. Statistical Analysis

Descriptive statistics of the characteristics of the participants were obtained for controls and cases by both the tumor specific location and histology. The consumption of flavonoids were \log_2 -transformed as data was right-skewed [40]. On the other hand, its interpretation is simpler, given that the odds ratio (OR) indicates the risk of GC when duplicating the intake. The flavonoid intake was analyzed both as categorical (grouping the intake of flavonoids into quartiles of their distribution among controls) and continuous (transformed to \log_2).

ORs of GC and the corresponding 95% CI were adjusted using multivariate mixed logistic regression models to assess the association between the flavonoid intake and risk of cancer, including the study area as a random effect term. Other variables included in the model were age, socioeconomic status, alcohol consumption, smoking status, salt intake, body mass index (BMI), physical activity as metabolic equivalent task (MET), first-degree family history, red meat intake, vegetables intake, and total energy intake. The Stata statistical software release 13 [41] was used for the mixed effects logistic regression, as well as the Python version 3.14 [42] and R version 3.6 [43] for the extraction of Phenol-Explorer web data on the polyphenol content in foods, and for the calculation of the flavonoid consumption by the individuals, respectively.

3. Results

The current study includes 329 GC cases and 2700 controls. The characteristics of cases and controls are shown in Table 1. The proportion of cases with the first-degree family history of GC (16.1%) was higher than controls (6.3%). Cases were more likely to have a higher intake of alcohol and salt. The daily amount of flavonoids ingested by all subjects is presented in Table 2, and no significant differences between controls and cases were found. We found a similar proportion of flavonoid-containing foods consumed in both controls and cases, with the lower overall intake of each flavonoid subclass in cases.

Table 1. Characteristics of the study subjects.

Variables	Controls (%) (n = 2 700)	Cases (%)					
		Total (n = 329)	By Anatomical Subtypes		By Histological Subtypes		
			Cardia (n = 84)	Non-Cardia (n = 238)	Intestinal (n = 122)	Diffuse (n = 75)	
Age mean ± SD	63.53 ± 0.21	65.40 ± 0.68	63.37 ± 1.26	66.06 ± 0.82	69.49 ± 0.96	61.79 (1.56)	
Gender (men, %)	56.2	72.6	91.6	65.5	70.4	60.0	
Socioeconomic status	High (%)	448 (16.59)	27 (8.21)	9 (10.71)	18 (7.56)	8 (6.56)	8 (10.67)
	Medium (%)	1 361 (50.41)	146 (44.38)	38 (45.24)	103 (43.28)	49 (40.16)	34 (45.33)
	Low (%)	891 (33.00)	156 (47.42)	37 (44.05)	117(49.16)	65 (53.28)	33 (44.00)
Smoking status (%)	yes	1 531 (56.70)	201 (61.09)	65 (77.38)	130 (54.62)	60 (49.18)	45 (60.00)
	no	1 169 (43.30)	128 (38.91)	19 (22.62)	108 (45.38)	62 (50.82)	30 (40.00)
GC family history (%)	yes	170 (6.30)	53 (16.11)	11 (13.0)	40 (16.81)	27 (22.13)	13 (17.33)
	no	2 530 (93.70)	276 (83.89)	73 (86.90)	198 (83.19)	95 (77.87)	62 (82.67)
Physical activity (METS*h/week)	<8	1 374 (50.89)	201 (61.09)	50 (59.52)	147 (61.76)	66 (54.10)	48 (64.00)
	≥8	1 326 (49.11)	128 (38.91)	34 (40.48)	91 (38.24)	56 (45.90)	27 (36.00)
Body mass index (kg/m ²)	≤25	1 026 (38.00)	103 (31.31)	21 (25)	80 (33.61)	41 (33.61)	32 (42.67)
	>25–30	1 129 (41.81)	150 (45.59)	37 (44.05)	110 (46.22)	59 (48.36)	31 (41.33)
	≥30	545 (20.19)	76 (23.10)	26 (30.95)	48 (20.17)	22 (18.03)	12 (16.00)
Alcohol consumption (g/day)	0	418 (15.48)	47 (14.29)	8 (9.52)	39 (16.39)	22 (18.03)	13 (17.33)
	<12	1 179 (43.67)	103 (31.31)	16 (19.05)	84 (35.29)	40 (32.79)	27 (36.00)
	12–47	787 (29.15)	101 (30.70)	34 (40.48)	66 (27.73)	30 (24.59)	22 (29.33)
	>47	316 (11.70)	78 (23.71)	26 (30.95)	49 (20.59)	30 (24.59)	13 (17.33)
Vegetables total intake (g/day), mean ± SD	191.32 ± 2.42	180.80 ± 6.95	184.76 ± 18.32	177.88 ± 7.04	189.25 ± 9.7	185.63 ± 13.87	
Red meat intake (g/day), mean ± SD	64.02 (0.76)	84.35 (2.94)	97.50 (6.54)	80.10 (3.28)	84.63 (4.58)	73.12 (5.19)	
Sodium intake (mg/day), mean ± SD	3 008.64 (24.04)	3 529.30 (86.26)	3 758.56 (200.71)	3443.85 (94.85)	3 403.23 (144.63)	3 821.43 (187.65)	
Total flavonoid intake (mg/day), mean ± SD	371.25 (3.72)	358.48 (9.88)	371.15 (18.63)	351.18 (11.69)	367.16 (14.72)	362.48 (24.51)	

Table 2. Average flavonoid consumption (mg/day) and percentage of total flavonoid subclass daily intake in all subjects of the study sorted by the three most consumed foods.

Flavonoids Subclass	Flavonoid Intake mg/day \pm SD	Most Consumed Foods by Flavonoid Subclass Content-Gastric Cancer-All Controls					
		First (%)		Second (%)		Third (%)	
Anthocyanins	22.3 \pm 0.35	Wine [Red]	31.3	Sweet cherry	24.7	Strawberry	15.9
Chalcones	0.004 \pm 0.0001	Beer [Regular]	98.2	Beer [Alcohol free]	1.8	-	-
Dihydrochalcones	1.15 \pm 0.023	Apple	95.3	Non-orange pure juice	5.5	-	-
Dihydroflavonols	1.87 \pm 0.06	Wine [Red]	97.8	Wine [Rosé/White]	2.2	-	-
Flavan-3-ols	26.94 \pm 0.33	Apple	33.4	Wine [Red]	20.55	Broad bean seed	13.64
Flavanones	43.81 \pm 0.69	Orange/Tangerine	75.1	Orange pure juice	21.1	Tomato	1.48
Flavones	3.88 \pm 0.08	Globe artichoke	24.7	Orange pure juice	18.0	Olives	16.16
Flavonols	23.75 \pm 0.28	Swiss chard	34.2	Lentils/Chickpea/Common bean	15.9	Wine [Red]	10.7
Isoflavonoids	1.35 \pm 0.11	Soy milk	95.3	Lentils	4.3	Nuts	0.27
Proanthocyanidins	200.99 \pm 2.16	Beans	32.5	Apple	23.3	Wine [Red]	11.1

The results presented in Figure 2 are indicative of a statistically significant dose-dependent inverse association of flavonoids intake and GC risk ($OR_{log_2} = 0.76$; 95%CI = 0.65–0.89. $OR_{q4vq1} = 0.60$; 95%CI = 0.40–0.89; $p_{trend} = 0.007$). A statistically significant inverse association was observed with the intake of anthocyanidins ($OR_{log_2} = 0.88$; 95%CI = 0.80–0.96. $OR_{q4vq1} = 0.68$; 95%CI = 0.46–1.01; $p_{trend} = 0.019$); chalcones ($OR_{log_2} = 0.89$; 95%CI = 0.83–0.95. $OR_{q4vq1} = 0.54$; 95%CI = 0.36–0.81; $p_{trend} = 0.001$); dihydroflavonols ($OR_{log_2} = 0.89$; 95%CI = 0.84–0.95. $OR_{q4vq1} = 0.50$; 95%CI = 0.34–0.75; $p_{trend} = 0.001$) and flavan-3-ols ($OR_{log_2} = 0.82$; 95%CI = 0.73–0.92. $OR_{q4vq1} = 0.56$; 95%CI = 0.36–0.88; $p_{trend} = 0.01$). An inverse association was also observed with the intake of proanthocyanidins although the effect was only statistically significant when using the log_2 transformation of the flavonoid intake ($OR_{log_2} = 0.82$; 95%CI = 0.71–0.94) but not in the Q4 compared to Q1 analysis ($OR_{q4vq1} = 0.91$; 95%CI = 0.59–1.39; $p_{trend} = 0.821$). Dihydrochalcones intake was statistically significant positively associated with GC risk when was evaluated in quartiles, but not as a log_2 ($OR_{log_2} = 1.02$; 95%CI = 0.95–1.11. $OR_{q4vq1} = 1.52$; 95%CI = 1.02–2.28; $p_{trend} = 0.02$).

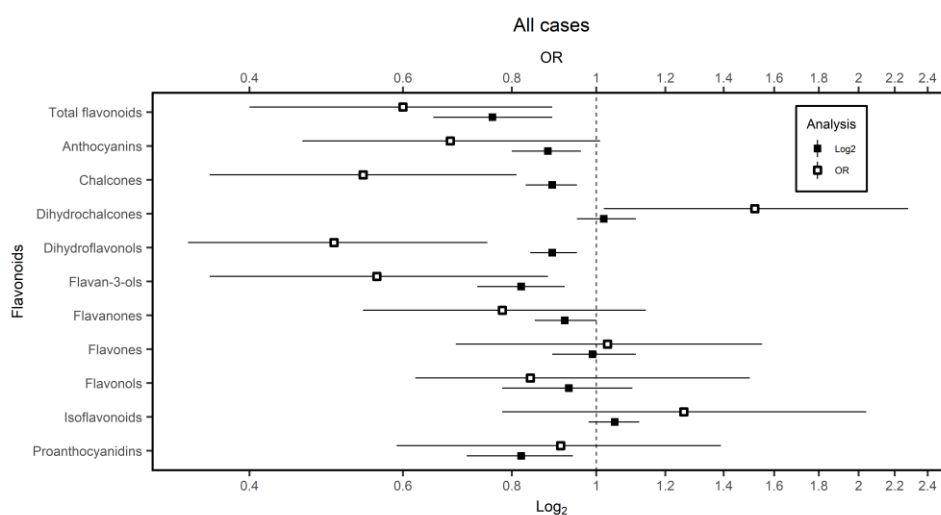


Figure 2. Gastric cancer (GC) risk according to flavonoids intakes in the multi-case control (MCC-Spain) study.

Adjusted ORs and 95% confidence intervals (CI) of GC according to the flavonoid intake. ORs were adjusted for age, gender, socioeconomic status, area of residence, GC family history, body mass index, smoking, physical activity, energy, sodium, red meat, vegetables and past alcohol intake.

No statistically significant differences have been observed in the behavior of the total intake of flavonoids and their respective subclasses for the different GC locations or histological subtypes (see Table S1). Likewise, no statistically significant differences were observed in the behavior of the total intake of flavonoids and their respective subclasses for men and women separately but it has been observed that the differences are statistically significant only in men (see Table S2).

4. Discussion

Several reviews have been published summarizing the epidemiological evidence on the inverse association between the dietary polyphenol intake and cancer risk, suggesting many biological benefits [24,44,45]. These benefits of flavonoids consumption could be related to lower GC risk through various mechanisms such as the antioxidant effect, blocking carcinogen pathways, inducing apoptosis, and inhibiting the growth of *H. pylori* [20,21]. Even low amounts of polyphenols can be continually absorbed and significantly increase the concentrations both at the plasma and cellular level [46]. Further, it has been observed that some classes of flavonoid can have an effect on cells even in μ molar concentrations and can interact on many molecular targets [47].

A case-control study conducted in Italy [25] mentions that the protective effect of fruit and vegetables on GC risk were attributable to a high consumption of flavonoids.

Our results suggest that the intake of total flavonoids could act as a protective factor in the development of GC, reducing the risk between 24% (\log_2) and 40% (Q4vsQ1). A meta-analysis on the flavonoid intake and GC has shown clear protective effects from the total intake of flavonoid [23] for the European population. Among the studies included, two of them found a significant protective effect of the flavonoid intake on all GC cases, regardless of histological type and location [22,48], by reducing the risk 19% (\log_2) in the Zamora-Ros' study [22] and 51% (Q3vsQ1) in the Woo' study [48].

In the analysis of the effect of the flavonoid intake by subclasses we have observed three different behaviors: Protective effect, null effect, and risk effect. Flavonoid subclasses with the protective effect include chalcones, dihydroflavonols, proanthocyanidins, anthocyanins, flavan-3-ols, flavanones.

This is the first study analyzing the effect of chalcones and dihydroflavonols on all cases of GC. A compound of chalcones, xanthumol, induced the cell death by the apoptosis and S phase cell cycle arrest [49,50], which could explain the protective effect of chalcones. But nowadays, there are no studies analyzing the effect of dihydroflavonols on GC *in vivo*, *in vitro* or in epidemiological trials. In the case of proanthocyanidins, we found a protective effect like in the Rossi et al. study [25]. An *in vitro* study indicated that proanthocyanidins are strong antioxidants with low cytotoxicity, which could play a relevant role in inducing the cancer cell apoptosis and cell cycle arrest [51].

Regarding the anthocyanins, a protective trend was reported in the study carried out by Woo et al. [48]. Among anthocyanins, delphinidin has been shown to have strong anticancer activities, possibly due to the suppression of the NF- κ B pathway [52,53]. A study found that delphinidin significantly suppressed invasion and metastasis of lung cancer cells by downregulating the matrix metalloproteinase [54].

In the Woo et al. study, the flavonoid subclass flavan-3-ols showed a protective effect in all cases of GC, similar to the one described in our results. Flavan-3-ols have the most complex structures among subclasses of flavonoids. It has been found that several GC cell lines were sensitive to epicatechingallate (EGCG), a well-studied flavan-3-ol, by inducing apoptosis due to the inhibition of an anti-apoptotic protein [55]. Many signaling pathways might be affected by the EGCG treatment and it has been shown that EGCG exerts anti-proliferative effects in the GC cell by preventing the b-catenin oncogenic signaling pathway [56].

The results on flavanones obtained by Woo et al., agree with the results obtained in our study, indicating a protective effect of this subclass for all cases of GC. Concerning the flavanones class, a statistically significant effect was found in the GC cells with naringenin, by inhibiting the cancer cell proliferation and migration, and inducing apoptosis, which might be related to its inhibition of the Akt signaling pathway [57]. Another study in colon cancer cells suggested that the pro-apoptotic activity of naringenin was mediated by the p38-dependent pathway [58]. Zhang et al., indicated that another treatment with flavanone, hesperetin, decreased cell proliferation and induced apoptosis through promoting the intracellular ROS accumulation [59].

On the other hand, our study shows that the flavonoid subclass called flavones seems to have no effect on GC. These results are not in line with other published articles such as Woo et al., whose study found a protective effect of this subclass; or Chen et al., whose study observed apoptotic effects of flavones in human GC cells in their *in vitro*. Referring to flavones, only one *in vitro* study has observed apoptotic effects in GC [60].

However, isoflavonoids and dihydrochalcones, were associated with an increased risk of GC. A study about the effect of the isoflavonoid intake and GC risk in Japan observed that this flavonoid subclass was not a significant risk factor of the GC risk in either men or woman [61]. On the contrary, in the Takayama study [62], their results show a non-significant effect of the isoflavonoid intake and GC risk in men, but showed statistically significant protective effects in women. The present study had a limited number of women diagnosed with GC, which did not allow us to draw conclusions. Furthermore, the differences in isoflavonoid intakes are outstanding: 1.4 mg/day in our study and

72.6 mg/day in the Japanese study. The results of the present study reveal an increased GC risk with increased dihydrochalcones intake, but no previous studies have evaluated this association. Therefore, results have to be interpreted with caution.

We did not find relevant differences in the effect on the different histological subtypes or localization of GC according to the intake of the different subclasses of flavonoids. Although the subtypes of GC have different risk factors [26], they share the probable protective effect of the intake of fruits and vegetables [27], which may explain our results. Nevertheless, the effect of flavonoids as a chemopreventive agent (that inhibits tumor promotion by inducing cell cycle arrest and by promoting apoptotic cell death) could protect all GC subtypes. The analyses carried out by the CUP [1] taking into account 24 studies on the consumption of fruits and vegetables in relation to the risk of developing GC indicate that a high consumption decreases the risk, without observing differences in the protection between anatomical subtypes. These results may be related to the protective effects of flavonoids, present in fruits and vegetables [1].

Contrary to our results, a Swiss study of the flavonol compound (quercetin) indicates a statistically significant protective effect in all GC and GC subtypes [63]. This difference in the results could be explained by the use of a different number of flavonols. In the present study we included all compounds of flavonols, whereas Ekstrom's et al. study only included quercetin [63]. The EPIC study [22], reports the isoflavonoid intake similar to our data, suggesting a risk trend between the intestinal GC subtype for isoflavonoid. The lack of studies that analyze all cases, all flavonoid classes by location and histological subtype make the comparison difficult.

The evaluation of the effects of the flavonoids intake and cancer risk may be hindered by a number of underlying factors, including the difficulty to assess the bioavailability of flavonoids, differences in the estimation of their content in foods between database sources (USDA compared to Phenol-Explorer), the use of retention factors to take into account the cooking losses or the accuracy of FFQs. All these effects contribute to limit the accuracy of epidemiological studies. Furthermore, flavonoids are extensively metabolized within the human body after ingestion, both at the hepatic and colonic level, after interaction with the gut [64,65], which varies widely among individuals and could affect the response of the flavonoid consumption. We must take into account that a part of the variability between the results from different studies could be attributable to the heterogeneity of the dietary pattern of each country, since the flavonoid content in food can vary according to the different plants species, and environmental, geographic and storage conditions [64].

Regarding the tests of the effect of flavonoids *in vivo* and *in vitro*, these also have their limitations, and we only resort to these types of studies when we do not find epidemiological studies to discuss results. *In vitro* studies there are also numerous factors that are not contemplated, such as the effects of the microbiota on the "restructuring of polyphenols", as well as their interaction on the ABC type transporters [66], the synergistic or antagonistic effects between the classes of flavonoids, since not only one class of flavonoid is consumed at the same time and, the interpersonal variation of the bioavailability of the flavonoids [67]. For these reasons, the results of *in vivo*, *in vitro* and epidemiological studies should be moderate in their conclusions since they all have their limitations, and explain the different results between studies.

The main sources of some flavonoids subclasses, such as chalcones, dihydrochalcones and dihydroflavonoids come from alcoholic beverages (wine and beer). According to some reports, reactive metabolites of alcohol are carcinogenic to humans [68]. This increased risk could be also explained by the production of prostaglandins, generation of oxygen radical species and lipid peroxidation. In addition, alcohol interferes with retinoid metabolism which could affect cellular growth, cellular differentiation and apoptosis. The WCRE/CUP found a statistically significant risk effect of 45 grams of alcohol consumed per day [1]. In our database, near 85% of individuals are below this value. Since the present study is based on a case-control study design, it is possible that the cases are applied as a lower consumption of alcohol than the real one, as a consequence these flavonoids appear as protective facts [69].

There are differences in the incidence of GC by gender, probably due to hormonal factors and life styles [26]. Even though no statistically significant differences were observed in the behavior of the total intake of flavonoids and their subclasses for men and women separately, we only found statistically significant results for men, probably due to the small number of female cancer cases included within this study.

Our study shares certain limitations known to other epidemiological studies related to the accuracy of the data inferred from indirect food intake reporting methods such as FFQs. Moreover, the aglycone flavonoids content in food was estimated without considering the retention factors, which could explain the losses during cooking. However, this information is not available for most of the individual flavonoids and further research is needed to fill the gaps within the databases.

On the contrary, this is the first study reporting the effect of dihydrochalcones and dihydroflavonols subclasses on GC stratifying by the anatomic and histological GC subtypes for men and women. The inclusion of the vegetable intake in the final-adjusted model could have also decreased the potential to find significant protective effects of flavonoids. Our models are over-adjusted by the energy intake, resulting in more restrictive outcomes, making it sometimes difficult to obtain significant associations between the flavonoid intake and GC. A complete database has been automatically generated including all available information on the flavonoid content in Phenol-Explorer, together with the mixing of data extracted from chromatography and chromatography after hydrolysis, the food ponderations of FFQ, and the high number of case and control records with all variables related with GC, resulting in an increased accuracy from the viewpoint of nutritional epidemiology. In addition, in this study, the information has been obtained in a similar way for cases and controls. We used a comprehensive methodology to evaluate the flavonoids intake, obtaining similar results to other case-control studies. Overall, our data on the total intake of flavonoid in the Spanish population sampled by the MCC-Spain study is consistent with previous reports [70].

Our results are in accordance with the recommendations made by CUP, which suggest that a low intake of fruit increases the risk of stomach cancer [1]. In this sense, one of the possible strategies to follow to reduce the risk of gastric cancer, and according to our results, is an increase in the consumption of fruits and vegetables rich in flavonoids.

5. Conclusions

As conclusion, results of this study suggest that the intake of flavonoids could influence the development of GC by lowering the risk, independently of the anatomic and histological subtypes of GC. We observed an inverse association between the flavonoid intake and risk of GC in men, but not in women, probably due to the insufficient sample size.

Further studies related to this research should consider a larger sample size, which could help identify more clearly the preventive role of the flavonoid intake on GC and elucidate the mechanisms underlying its etiology.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/11/5/967/s1>, Table S1: Log₂ (95% CIs) of all gastric cancer cases according to flavonoids intakes in the MCC-Spain study by the anatomical site and histological type; Table S2: Log₂ (95% CIs) of all gastric cancer cases according to flavonoids intakes in the MCC-Spain study by sex; Table S3: Quartiles distribution of all gastric cancer cases according to flavonoids intakes in the MCC-Spain study by the anatomical site and histological type; Table S4: Quartiles distribution of all gastric cancer cases according to flavonoids intakes in the MCC-Spain study by sex.

Author Contributions: F.V.-S. wrote the draft of the manuscript; F.V.-S., A.J.M., R.Z.-R. and T.F.-V. were responsible for data analysis; V.M. (Vicente Martín) and J.P.B.-L. were responsible for conception and design. All co-authors revised the manuscript critically for important intellectual content, approved the final version to be published, and were responsible for data acquisition.

Funding: The study was partially funded by the “Acción Transversal del Cáncer”, approved on the Spanish Ministry Council on 11 October 2007, by the Instituto de Salud Carlos III-FEDER (PI08/1770, PI08/0533, PI08/1359, PS09/00773-Cantabria, PS09/01286-León, PS09/01903-Valencia, PS09/02078-Huelva, PS09/01662-Granada, PI11/01403, PI11/01889-FEDER, PI11/00226, PI11/01810, PI11/02213, PI12/00488, PI12/00265, PI12/01270, PI12/00715, PI12/00150, PI14/01219, PI14/0613, PI15/00069, PI15/00914, PI15/01032, PI17CIII/00034), by the Fundación Marqués

de Valdecilla (API 10/09), by the ICGC International Cancer Genome Consortium CLL (The ICGC CLL-Genome Project is funded by Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) through the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and Red Temática de Investigación del Cáncer (RTICC) del ISCIII (RD12/0036/0036)), by the Junta de Castilla y León (LE22A10-2), by the Consejería de Salud of the Junta de Andalucía (PI-0571-2009, PI-0306-2011, salud201200057018tra), by the Conselleria de Sanitat of the Generalitat Valenciana (AP_061/10), by the Recercaixa (2010ACUP 00310), by the Regional Government of the Basque Country, by the Consejería de Sanidad de la Región de Murcia, by the European Commission grants FOOD-CT-2006-036224-HIWATE, by the Spanish Association Against Cancer (AECC) Scientific Foundation – grant GCTRA18022MORE, by the Catalan Government- Agency for Management of University and Research Grants (AGAUR) grants 2017SGR723 and 2014SGR850, by the Fundación Caja de Ahorros de Asturias and by the University of Oviedo. ISGlobal is a member of the CERCA Programme, Generalitat de Catalunya.

Acknowledgments: Mireia Obón-Santacana received a post-doctoral fellow from “Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC)”. Raul Zamora-Ros would like to thank the “Miguel Servet” program (CP15/00100) from the Institute of Health Carlos III and European Social Fund (ESF).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Diet, Nutrition, Physical Activity and Cancer: A Global Perspective. Available online: <https://www.wcrf.org/sites/default/files/Summary-third-expert-report.pdf> (accessed on 24 December 2018).
2. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J. Clin.* **2019**, *69*, 7–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Allemani, C.; Matsuda, T.; Di Carlo, V.; Harewood, R.; Matz, M.; Niksic, M.; Bonaventure, A.; Valkov, M.; Johnson, C.J.; Esteve, J.; et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (concord-3): Analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet* **2018**, *391*, 1023–1075. [[CrossRef](#)]
4. Turati, F.; Rossi, M.; Pelucchi, C.; Levi, F.; La Vecchia, C. Fruit and vegetables and cancer risk: A review of southern european studies. *Br. J. Nutr.* **2015**, *113*, S102–S110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. van Duijnhoven, F.J.; Bueno-De-Mesquita, H.B.; Ferrari, P.; Jenab, M.; Boshuizen, H.C.; Ros, M.M.; Casagrande, C.; Tjonneland, A.; Olsen, A.; Overvad, K.; et al. Fruit, vegetables, and colorectal cancer risk: The european prospective investigation into cancer and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *89*, 1441–1452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Key, T.J. Fruit and vegetables and cancer risk. *Br. J. Cancer* **2011**, *104*, 6–11. [[CrossRef](#)]
7. Norat, T.; Aune, D.; Chan, D.; Romaguera, D. Fruits and vegetables: Updating the epidemiologic evidence for the wcrf/aicr lifestyle recommendations for cancer prevention. *Cancer Treat. Res.* **2014**, *159*, 35–50.
8. Petrick, J.L.; Steck, S.E.; Bradshaw, P.T.; Trivers, K.F.; Abrahamson, P.E.; Engel, L.S.; He, K.; Chow, W.H.; Mayne, S.T.; Risch, H.A.; et al. Dietary intake of flavonoids and oesophageal and gastric cancer: Incidence and survival in the united states of america (USA). *Br. J. Cancer* **2015**, *112*, 1291–1300. [[CrossRef](#)]
9. Terao, J. Factors modulating bioavailability of quercetin-related flavonoids and the consequences of their vascular function. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *139*, 15–23. [[CrossRef](#)]
10. Cheng, J.; Zhou, L.; Liu, Q.; Tickner, J.; Tan, Z.; Li, X.; Liu, M.; Lin, X.; Wang, T.; Pavlos, N.J.; et al. Cyanidin chloride inhibits ovariectomy-induced osteoporosis by suppressing rankl-mediated osteoclastogenesis and associated signaling pathways. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 2502–2512. [[CrossRef](#)]
11. Niedzwiecki, A.; Roomi, M.W.; Kalinovsky, T.; Rath, M. Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. *Nutrients* **2016**, *8*, 552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Liu, R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *J. Nutr.* **2004**, *134*, S3479–S3485. [[CrossRef](#)]
13. Martinez-Perez, C.; Ward, C.; Cook, G.; Mullen, P.; McPhail, D.; Harrison, D.J.; Langdon, S.P. Novel flavonoids as anti-cancer agents: Mechanisms of action and promise for their potential application in breast cancer. *Biochem. Soc. Trans.* **2014**, *42*, 1017–1023. [[CrossRef](#)]
14. Azqueta, A.; Collins, A. Polyphenols and DNA damage: A mixed blessing. *Nutrients* **2016**, *8*, 785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ramos, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J. Nutr. Biochem.* **2007**, *18*, 427–442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Oh, J.; Hlatky, L.; Jeong, Y.S.; Kim, D. Therapeutic effectiveness of anticancer phytochemicals on cancer stem cells. *Toxins* **2016**, *8*, 199. [CrossRef] [PubMed]
17. Sznarkowska, A.; Kostecka, A.; Meller, K.; Bielawski, K.P. Inhibition of cancer antioxidant defense by natural compounds. *Oncotarget* **2017**, *8*, 15996–16016. [CrossRef]
18. Khalid, E.B.; Ayman, E.E.; Rahman, H.; Abdelkarim, G.; Najda, A. Natural products against cancer angiogenesis. *Tumour Boil.* **2016**, *37*, 14513–14536. [CrossRef]
19. Kandaswami, C.; Lee, L.T.; Lee, P.P.; Hwang, J.J.; Ke, F.C.; Huang, Y.T.; Lee, M.T. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo* **2005**, *19*, 895–909.
20. Baltas, N.; Karaoglu, S.A.; Tarakci, C.; Kolayli, S. Effect of propolis in gastric disorders: Inhibition studies on the growth of helicobacter pylori and production of its urease. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 46–50. [CrossRef]
21. Harsha, C.; Banik, K.; Bordoloi, D.; Kunnumakkara, A.B. Antiulcer properties of fruits and vegetables: A mechanism based perspective. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *108*, 104–119. [CrossRef]
22. Zamora-Ros, R.; Agudo, A.; Lujan-Barroso, L.; Romieu, I.; Ferrari, P.; Knaze, V.; Bueno-de-Mesquita, H.B.; Leenders, M.; Travis, R.C.; Navarro, C.; et al. Dietary flavonoid and lignan intake and gastric adenocarcinoma risk in the european prospective investigation into cancer and nutrition (epic) study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *96*, 1398–1408. [CrossRef] [PubMed]
23. Bo, Y.; Sun, J.; Wang, M.; Ding, J.; Lu, Q.; Yuan, L. Dietary flavonoid intake and the risk of digestive tract cancers: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24836. [CrossRef]
24. Xie, Y.; Huang, S.; Su, Y. Dietary flavonols intake and risk of esophageal and gastric cancer: A meta-analysis of epidemiological studies. *Nutrients* **2016**, *8*, 91. [CrossRef] [PubMed]
25. Rossi, M.; Rosato, V.; Bosetti, C.; Lagioui, P.; Parpinel, M.; Bertuccio, P.; Negri, E.; La Vecchia, C. Flavonoids, proanthocyanidins, and the risk of stomach cancer. *Cancer Causes Control* **2010**, *21*, 1597–1604. [CrossRef] [PubMed]
26. Colquhoun, A.; Arnold, M.; Ferlay, J.; Goodman, K.J.; Forman, D.; Soerjomataram, I. Global patterns of cardia and non-cardia gastric cancer incidence in 2012. *Gut* **2015**, *64*, 1881–1888. [CrossRef] [PubMed]
27. Lunet, N.; Valbuena, C.; Vieira, A.L.; Lopes, C.; Lopes, C.; David, L.; Carneiro, F.; Barros, H. Fruit and vegetable consumption and gastric cancer by location and histological type: Case-control and meta-analysis. *Eur. J. Cancer Prev.* **2007**, *16*, 312–327. [CrossRef] [PubMed]
28. Metere, A.; Giacomelli, L. Absorption, metabolism and protective role of fruits and vegetables polyphenols against gastric cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2017**, *21*, 5850–5858.
29. Castano-Vinyals, G.; Aragones, N.; Perez-Gomez, B.; Martin, V.; Llorca, J.; Moreno, V.; Altzibar, J.M.; Ardanaz, E.; de Sanjose, S.; Jimenez-Moleon, J.J.; et al. Population-based multicase-control study in common tumors in spain (mcc-spain): Rationale and study design. *Gac. Sanit.* **2015**, *29*, 308–315. [CrossRef]
30. Ley orgánica 15/1999 de protección de datos de carácter personal. Available online: http://noticias.juridicas.com/base_datos/Admin/lo15-1999.html (accessed on 19 December 2018).
31. Garcia-Closas, R.; Garcia-Closas, M.; Kogevinas, M.; Malats, N.; Silverman, D.; Serra, C.; Tardon, A.; Carrato, A.; Castano-Vinyals, G.; Dosemeci, M.; et al. Food, nutrient and heterocyclic amine intake and the risk of bladder cancer. *Eur. J. Cancer* **2007**, *43*, 1731–1740. [CrossRef]
32. Mcc-spain Questionnaires. Available online: http://www.mccspain.org/wp-content/uploads/2016/07/Quest_MCCSpain.pdf (accessed on 9 December 2018).
33. Zamora-Ros, R.; Knaze, V.; Lujan-Barroso, L.; Romieu, I.; Scalbert, A.; Slimani, N.; Hjartaker, A.; Engeset, D.; Skeie, G.; Overvad, K. Differences in dietary intakes, food sources and determinants of total flavonoids between mediterranean and non-mediterranean countries participating in the european prospective investigation into cancer and nutrition (epic) study. *Br. J. Nutr.* **2013**, *109*, 1498–1507. [CrossRef]
34. Calvert, C.; Cade, J.; Barrett, J.H.; Woodhouse, A. Using cross-check questions to address the problem of mis-reporting of specific food groups on food frequency questionnaires. Ukwcs steering group. United Kingdom women’s cohort study steering group. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1997**, *51*, 708–712. [CrossRef] [PubMed]
35. Neveu, V.; Perez-Jimenez, J.; Vos, F.; Crespy, V.; du Chaffaut, L.; Mennen, L.; Knox, C.; Eisner, R.; Cruz, J.; Wishart, D. Phenol-explorer: An online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database* **2010**. [CrossRef] [PubMed]

36. Usda Database for the Proanthocyanidin Content of Selected Foods-2004. Available online: <https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md-bhnrc/beltsville-human-nutrition-research-center/nutrient-data-laboratory/docs/usda-database-for-the-proanthocyanidin-content-of-selected-foods-2004/> (accessed on 10 December 2018).
37. Balentine, D.A.; Dwyer, J.T.; Erdman, J.W., Jr.; Ferruzzi, M.G.; Gaine, P.C.; Harnly, J.M.; Kwik-Urbe, C.L. Recommendations on reporting requirements for flavonoids in research. *Am. J. Clin. Nutr.* **2015**, *101*, 1113–1125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Methods Used to Create Phenol-Explorer. Available online: http://phenol-explorer.eu/methods_used (accessed on 23 September 2018).
39. Willett, W.C.; Howe, G.R.; Kushi, L.H. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **1997**, *65*, S1220–S1228. [[CrossRef](#)]
40. Zumel, N.M. *Practical Data Science with R*; Manning Publications Co.: Shelter Island, NY, USA, 2014.
41. StataCorp. *Stata Statistical Software: Release 13*; StataCorp LP: College Station, TX, USA, 2013.
42. The Python Language Reference. Available online: <https://docs.python.org/3/reference/> (accessed on 28 September 2018).
43. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Available online: <http://softlibre.unizar.es/manuales/Aplicaciones/r/fullrefman.pdf> (accessed on 3 September 2018).
44. Bertuccio, P.; Rosato, V.; Andreano, A.; Ferraroni, M.; Decarli, A.; Edefonti, V.; La Vecchia, C. Dietary patterns and gastric cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Ann. Oncol.* **2013**, *24*, 1450–1458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Grosso, G.; Godos, J.; Lamuela-Raventos, R.; Ray, S.; Micek, A.; Pajak, A.; Sciacca, S.; D’Orazio, N.; Del Rio, D.; Galvano, F. A comprehensive meta-analysis on dietary flavonoid and lignan intake and cancer risk: Level of evidence and limitations. *Mol. Nutr. Food Res.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, *130*, S2073–S2085. [[CrossRef](#)]
47. Zhuang, C.; Zhang, W.; Sheng, C.; Zhang, W.; Xing, C.; Miao, Z. Chalcone: A privileged structure in medicinal chemistry. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7762–7810. [[CrossRef](#)]
48. Woo, H.D.; Lee, J.; Choi, I.J.; Kim, C.G.; Lee, J.Y.; Kwon, O.; Kim, J. Dietary flavonoids and gastric cancer risk in a korean population. *Nutrients* **2014**, *6*, 4961–4973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Yong, W.K.; Abd Malek, S.N. Xanthohumol induces growth inhibition and apoptosis in ca ski human cervical cancer cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2015**, *2015*, 921306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Yong, W.K.; Ho, Y.F.; Malek, S.N. Xanthohumol induces apoptosis and s phase cell cycle arrest in a549 non-small cell lung cancer cells. *Pharmacog. Mag.* **2015**, *11*, S275–S283.
51. Yu, R.J.; Liu, H.B.; Yu, Y.; Liang, L.; Xu, R.; Liang, C.; Tang, J.S.; Yao, X.S. Anticancer activities of proanthocyanidins from the plant *Urceola huaitingii* and their synergistic effects in combination with chemotherapeutics. *Fitoterapia* **2016**, *112*, 175–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Yun, J.M.; Afaq, F.; Khan, N.; Mukhtar, H. Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, induces apoptosis and cell cycle arrest in human colon cancer hct116 cells. *Mol. Carcinog.* **2009**, *48*, 260–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Bin Hafeez, B.; Asim, M.; Siddiqui, I.A.; Adhami, V.M.; Murtaza, I.; Mukhtar, H. Delphinidin, a dietary anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables: A new weapon to blunt prostate cancer growth. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 3320–3326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Ho, M.L.; Chen, P.N.; Chu, S.C.; Kuo, D.Y.; Kuo, W.H.; Chen, J.Y.; Hsieh, Y.S. Peonidin 3-glucoside inhibits lung cancer metastasis by downregulation of proteinases activities and mapk pathway. *Nutr. Cancer* **2010**, *62*, 505–516. [[CrossRef](#)]
55. Onoda, C.; Kuribayashi, K.; Nirasawa, S.; Tsuji, N.; Tanaka, M.; Kobayashi, D.; Watanabe, N. (-)-epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in gastric cancer cell lines by down-regulating survivin expression. *Int. J. Oncol.* **2011**, *38*, 1403–1408. [[PubMed](#)]
56. Tanaka, T.; Ishii, T.; Mizuno, D.; Mori, T.; Yamaji, R.; Nakamura, Y.; Kumazawa, S.; Nakayama, T.; Akagawa, M. (-)-epigallocatechin-3-gallate suppresses growth of az521 human gastric cancer cells by targeting the dead-box rna helicase p68. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *50*, 1324–1335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]












57. Bao, L.; Liu, F.; Guo, H.B.; Li, Y.; Tan, B.B.; Zhang, W.X.; Peng, Y.H. Naringenin inhibits proliferation, migration, and invasion as well as induces apoptosis of gastric cancer sgc7901 cell line by downregulation of akt pathway. *Tumour Biol.* **2016**, *37*, 11365–11374. [[CrossRef](#)]
58. Song, H.; Bao, J.; Wei, Y.; Chen, Y.; Mao, X.; Li, J.; Yang, Z.; Xue, Y. Kaempferol inhibits gastric cancer tumor growth: An in vitro and in vivo study. *Oncol. Rep.* **2015**, *33*, 868–874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Zhang, J.; Wu, D.; Vikash; Song, J.; Wang, J.; Yi, J.; Dong, W. Hesperetin induces the apoptosis of gastric cancer cells via activating mitochondrial pathway by increasing reactive oxygen species. *Dig. Dis. Sci.* **2015**, *60*, 2985–2995. [[CrossRef](#)]
60. Chen, J.; Chen, J.; Li, Z.; Liu, C.; Yin, L. The apoptotic effect of apigenin on human gastric carcinoma cells through mitochondrial signal pathway. *Tumour Biol.* **2014**, *35*, 7719–7726. [[CrossRef](#)]
61. Hara, A.; Sasazuki, S.; Inoue, M.; Iwasaki, M.; Shimazu, T.; Sawada, N.; Yamaji, T.; Tsugane, S.; Japan Public Health Center-based Prospective Study Group. Isoflavone intake and risk of gastric cancer: A population-based prospective cohort study in japan. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *95*, 147–154. [[CrossRef](#)]
62. Wada, K.; Tsuji, M.; Tamura, T.; Konishi, K.; Kawachi, T.; Hori, A.; Tanabashi, S.; Matsushita, S.; Tokimitsu, N.; Nagata, C. Soy isoflavone intake and stomach cancer risk in japan: From the takayama study. *Int. J. Cancer* **2015**, *137*, 885–892. [[CrossRef](#)]
63. Ekstrom, A.M.; Serafini, M.; Nyren, O.; Wolk, A.; Bosetti, C.; Bellocco, R. Dietary quercetin intake and risk of gastric cancer: Results from a population-based study in Sweden. *Ann. Oncol.* **2011**, *22*, 438–443. [[CrossRef](#)]
64. Grosso, G.; Bella, F.; Godos, J.; Sciacca, S.; Del Rio, D.; Ray, S.; Galvano, F.; Giovannucci, E.L. Possible role of diet in cancer: Systematic review and multiple meta-analyses of dietary patterns, lifestyle factors, and cancer risk. *Nutr. Rev.* **2017**, *75*, 405–419. [[CrossRef](#)]
65. Lampe, J.W. Interindividual differences in response to plant-based diets: Implications for cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *89*, S1553–S1557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Li, Y.; Paxton, J.W. The effects of flavonoids on the abc transporters: Consequences for the pharmacokinetics of substrate drugs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2013**, *9*, 267–285. [[CrossRef](#)]
67. D'Archivio, M.; Filesi, C.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; Masella, R. Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 1321–1342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Alcohol consumption and ethyl carbamate. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* **2010**, *96*, 3–1383.
69. Knott, C.S.; Coombs, N.; Stamatakis, E.; Biddulph, J.P. All cause mortality and the case for age specific alcohol consumption guidelines: Pooled analyses of up to 10 population based cohorts. *BMJ* **2015**, *350*, h384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Zamora-Ros, R.; Knaze, V.; Rothwell, J.A.; Hemon, B.; Moskal, A.; Overvad, K.; Tjonneland, A.; Kyro, C.; Fagherazzi, G.; Boutron-Ruault, M.C.; et al. Dietary polyphenol intake in europe: The european prospective investigation into cancer and nutrition (epic) study. *Eur. J. Nutr.* **2016**, *55*, 1359–1375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



ANEXO IV

Article

Polyphenol Intake and Gastric Cancer Risk: Findings from the Stomach Cancer Pooling Project (StoP)

Facundo Vitelli-Storelli ¹, Marta Rossi ², Claudio Pelucchi ², Matteo Rota ³, Domenico Palli ⁴, Monica Ferraroni ², Nuno Lunet ^{5,6}, Samantha Morais ⁵, Lizbeth López-Carrillo ⁷, David Georgievich Zaridze ⁸, Dmitry Maximovich ⁸, María Rubín García ¹, Gemma Castaño-Vinyals ^{9,10,11,12}, Nuria Aragonés ^{9,13}, Manuela Garcia de la Hera ^{9,14}, Raúl Ulises Hernández-Ramírez ¹⁵, Eva Negri ¹⁶, Rosella Bonzi ², Mary H. Ward ¹⁷, Areti Lagioui ¹⁸, Pagona Lagioui ^{19,20}, Malaquías López-Cervantes ²¹, Paolo Boffetta ^{22,23}, M. Constanza Camargo ¹⁷, Maria Paula Curado ²⁴, Zuo-Feng Zhang ²⁵, Jesus Vioque ^{9,14,*}, Carlo La Vecchia ² and Vicente Martín Sánchez ^{1,9}

- ¹ Research Group in Gene-Environment Interactions and Health, Instituto de Biomedicina (IBIOMED), University of León, 24071 León, Spain; fvits@unileon.es (F.V.-S.); mrubig@unileon.es (M.R.G.); vmars@unileon.es (V.M.S.)
- ² Department of Clinical Sciences and Community Health, University of Milan, 20122 Milan, Italy; marta.rossi@unimi.it (M.R.); claudio.pelucchi@unimi.it (C.P.); monica.ferraroni@unimi.it (M.F.); rossella.bonzi@unimi.it (R.B.); carlo.lavecchia@unimi.it (C.L.V.)
- ³ Department of Molecular and Translational Medicine, University of Brescia, 25121 Brescia, Italy; matteo.rota@unibs.it
- ⁴ Cancer Risk Factors and Life-Style Epidemiology Unit, Institute for Cancer Research, Prevention and Clinical Network, ISPRO, 08518 Florence, Italy; d.palli@ispro.toscana.it
- ⁵ Department of Epidemiology, EPIUnit—Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto, 4050-091 Porto, Portugal; nlunet@med.up.pt (N.L.); samantha.morais@ispup.up.pt (S.M.)
- ⁶ Departamento de Ciências da Saúde Pública e Forenses e Educação Médica, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 4200-319 Porto, Portugal
- ⁷ Mexico National Institute of Public Health, Morelos 62100, Mexico; lizbeth@insp.mx
- ⁸ Department of Epidemiology and Prevention, Russian N.N. Blokhin Cancer Research Center, 115478 Moscow, Russia; dgzaridze@crc.umos.ru (D.G.Z.); dmax@crc.umos.ru (D.M.)
- ⁹ Consortium for Biomedical Research in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), 28029 Madrid, Spain; gemma.castano@isglobal.org (G.C.-V.); nuria.aragones@salud.madrid.org (N.A.); manoli@umh.es (M.G.d.l.H.)
- ¹⁰ IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), 08003 Barcelona, Spain
- ¹¹ Department of Public health, Universitat Pompeu Fabra (UPF), 08002 Barcelona, Spain
- ¹² Barcelona Institute for Global Health—ISGlobal, 08036 Barcelona, Spain
- ¹³ Cancer Epidemiology Section, Public Health Division, Department of Health of Madrid, 28035 Madrid, Spain
- ¹⁴ Department of Public Health, Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante, ISABIAL-UMH, 46020 Alicante, Spain
- ¹⁵ Department of Biostatistics, Yale School of Public Health, New Haven, CT 06520, USA; raul.hernandezramirez@yale.edu
- ¹⁶ Department of Biomedical and Clinical Sciences, University of Milan, 20157 Milan, Italy; eva.negri@unimi.it
- ¹⁷ Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Rockville, MD 20850, USA; wardm@exchange.nih.gov (M.H.W.); maria.camargo@nih.gov (M.C.C.)
- ¹⁸ Department of Public and Community Health, School of Health Sciences, University of West Attica, 11521 Athens, Greece; lagioui@uniwa.gr
- ¹⁹ Department of Hygiene, Epidemiology and Medical Statistics, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, 10561 Athens, Greece; plagiou@hsph.harvard.edu
- ²⁰ Department of Epidemiology, Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, MA 02115, USA
- ²¹ Department of Public Health, Facultad de Medicina, UNAM, Coyoacán 04810, Mexico; mlopezcervantes@unam.mx
- ²² Stony Brook Cancer Center, Stony Brook University, Stony Brook, NY 11794, USA; paolo.boffetta@mssm.edu
- ²³ Department of Medical and Surgical Sciences, University of Bologna, 40126 Bologna, Italy

²⁴ Centro Internacional de Pesquisa, A. C. Camargo Cancer Center, Sao Paulo 01508-010, Brazil; mp.curado@cipe.accamargo.org.br

²⁵ Department of Epidemiology, UCLA Fielding School of Public Health and Jonsson, Comprehensive Cancer Center, Los Angeles, CA 90095-6900, USA; zfzhang@ucla.edu

* Correspondence: vioque@umh.es

Received: 1 October 2020; Accepted: 12 October 2020; Published: 20 October 2020



Simple Summary: Gastric cancer (GC) has the fifth highest incidence of any cancer type worldwide and the third highest mortality rate, so its prevention is very important. Among dietary factors, the consumption of fruit and vegetables has been inversely related to GC risk. Phenolic compounds may exert a favorable effect on the risk of several cancer types, including gastric cancer. However, selected polyphenol classes have not been adequately investigated in relation to GC. There is, however, no comprehensive analysis of polyphenols and GC risk methods to date. In order to provide a detailed evaluation of the relationship between dietary intake of polyphenols and GC risk, we analyzed data from the Stomach cancer Pooling (StoP) Project consortium.

Abstract: Phenolic compounds may exert a favorable effect on the risk of several cancer types, including gastric cancer (GC). However, selected polyphenol classes have not been adequately investigated in relation to GC. The aim of this study is to evaluate the association between the intake of polyphenols in relation to GC risk. We used data from the Stomach cancer Pooling (StoP) Project, including 10 studies from six countries (3471 GC cases and 8344 controls). We carried out an individual participant data pooled analysis using a two-stage approach. The summary odds ratios (ORs) of GC for each compound, and the corresponding 95% confidence intervals (95% CI), were computed by pooling study specific ORs obtained through multivariate logistic regression, using random effect models. Inverse associations with GC emerged for total polyphenols (OR = 0.67, 95% CI = 0.54–0.81, for the highest versus lowest quartile of intake), total flavonoids (OR = 0.73, 95% CI = 0.55–0.90), anthocyanidins (OR = 0.74, 95% CI = 0.56–0.92), flavanols (OR = 0.77, 95% CI = 0.66–0.88), flavanones (OR = 0.57, 95% CI = 0.44–0.69), total phenolic acids (OR = 0.75, 95% CI = 0.55–0.94), and hydroxybenzoic acids (OR = 0.73, 95% CI = 0.57–0.89). Results were consistent across strata of age, sex, social class, and smoking habit. Suggestive inverse associations were also found for flavonols (OR = 0.76, 95% CI = 0.51–1.01) and hydroxycinnamic acids (OR = 0.82, 95% CI = 0.58–1.06). Further investigations from longitudinal data are needed to confirm this association.

Keywords: diet; epidemiology; flavonoids; gastric cancer; polyphenols

1. Introduction

The incidence rates of gastric cancer (GC) show a wide geographical variability, which has been attributed to different exposures, including *Helicobacter pylori* infection, smoking, diet, and nutrition, besides genetic factors [1–3]. Among dietary factors, the consumption of fruit and vegetables has been inversely related to GC risk [4–6]. This inverse relationship has been attributed to the intake of nutrients, micronutrients, and other food compounds, including polyphenols [7].

Polyphenols are secondary phenolic metabolites present in a wide variety of vegetables fruits, cereals, dry legumes, chocolate, and spices. They can be classified into five classes, flavonoids, phenolic acids, stilbenes, lignans, and other polyphenols. Most studies have focused on the relation between flavonoids and GC, with inconclusive results [8–10]. A case–control study from Greece [9] found that flavanone intake was inversely related to GC. Another case–control study, from Spain, reported an inverse association for the intakes of flavonoids, anthocyanidins, and flavanols [10]. A meta-analysis based on six studies, three case–control and three cohort studies from Europe, Asia, and USA, showed

that dietary total flavonoids intake was inversely associated with the risk of GC in the European population, but not in US or Asia [11]. As far as we know only one study in Mexico has analyzed the effect of total polyphenol intake and a few classes of polyphenols in relation to GC risk, showing a higher risk of GC among those with a low total polyphenol intake and a high intake of nitrites, and an approximately double risk among those with lower intakes of cinnamic acids, secoisolariciresinol, and coumestrol [12]. However, a comprehensive analysis of the effect of total polyphenol intake and all the specific classes of polyphenol on GC risk is still lacking. In order to provide a detailed evaluation of the relationship between dietary intake of polyphenols and GC risk, we analyzed data from the Stomach cancer Pooling (StoP) Project consortium [13].

2. Materials and Methods

2.1. Participant Studies, Data Collection, and Harmonization

The StoP Project is a consortium of epidemiological studies on GC (www.stop-project.org). Details of the aims and methods of the consortium have been provided elsewhere [13]. Briefly, data for the current analysis were based on the second release of the combined database, including 31 GC studies worldwide. Data sets of the original studies were centrally collected, validated [14], and harmonized according to a specified format [13]. For these analyses, 10 studies from six countries, including a total of 3471 cases and 8344 controls, were selected based on availability of data to calculate polyphenols consumption (Table 1). Two studies were from Italy [15,16], one from Greece [17], one from Russia [18], one from Portugal [19], two from Spain [20,21], and three from Mexico [12,22,23]. Investigators who agreed to participate signed a Data Transfer Agreement and, transferred a copy of the complete original data set of the study. The University of Milan Institutional Review Board provided the ethical approval for the StoP Project (reference 19/15—01 April 2015).

Table 1. Distribution of 3471 gastric cancer cases and 8344 controls of each study included in the StoP (Stomach cancer Pooling) Project (version 2.0).

Study	Study Type	StoP Project Country ¹	Cases (%)	Control (%)	Total ² (%)
La Vecchia et al. [15]	Hospital-based	Italy 1	223 (29.2)	541 (70.8)	764 (6.4)
Ferraroni et al. [16]	Population-based	Italy 2	1001 (46.6)	1145 (53.3)	2146 (18)
Trichopoulos et al. [9]	Hospital-based	Greece	105 (51.7)	98 (48.2)	203 (1.7)
Zaridze et al. [18]	Hospital-based	Russia	361 (43.2)	474 (56.8)	835 (7)
Lunet et al. [19]	Population-based	Portugal	577 (26.8)	1578 (73.2)	2155 (18.0)
Aragonés;Martín et al. [20]	Population-based	Spain 1	329 (10.9)	2700 (89.1)	3029 (25.3)
Vioque et al. [21]	Hospital-based	Spain 2	317 (44.5)	396 (55.5)	713 (7.2)
Lopez-Carrillo et al. [12]	Population-based	Mexico 1	248 (34.2)	478 (65.8)	726 (6)
Lopez-Carrillo et al. [22]	Population-based	Mexico 2	220 (22.6)	752 (77.4)	972 (8.1)
Lopez-Carrillo et al. [23]	Hospital-based	Mexico 3	90 (33.3)	182 (66.7)	272 (2.3)
Total	–	–	3471 (100)	8344 (100)	11,815 (100)

¹ Number of studies from each country. ² Number of cases and controls of each study.

2.2. Analysis of Polyphenols Intake

All the included studies assessed the participants' dietary habits using their own specific food frequency questionnaires (FFQ) focusing on usual diet before diagnosis (for cases), onset of disease or hospital admission (for hospital-based controls), or recruitment (for population-based controls). The FFQ foods that were included in the assessment of polyphenol intake included vegetables and legumes, fruits, sweets, cereals, alcohol, juices, and other beverages. The dietary intake of polyphenols was estimated using the Phenol-Explorer (<http://phenol-explorer.eu/>) and expressed as aglycone from both chromatography and chromatography after hydrolysis analytic methods [24]. We used aglycone equivalents in order to standardize data from the results of different analytical methods and to

facilitate cross-study comparisons [25]. The estimation of polyphenols content in foods included in the Phenol-Explorer expressed as aglycones were calculated through the following equation (Equation (1)).

$$P\ aglycone\ \frac{mg}{100\ mg} = \left(\frac{[glucoside]}{Pm\ glucoside} \right) \times Pm\ aglycone \quad (1)$$

These values were used to compute the polyphenols intakes in milligrams per day from the FFQ information per each subject. No retention factors were applied in the calculation of the amount of polyphenols ingested.

2.3. Analysis of Polyphenols Intake

We carried out an individual participant data pooled analysis using a two-stage approach [26]. First, we assessed the relationship between polyphenols intake and GC by computing, for each study, the odds ratios (ORs) and the corresponding 95% confidence intervals (CIs) using multivariable unconditional logistic regression models. The models used in this study were adjusted for age, social class (low, intermediate, high), GC family history, body mass index, sex, smoking status (never, former, current low, current intermediate, current high), consumption of salt, and alcohol intake (never, ≤ 12 , $>12 \leq 47$, >47 g/day). Furthermore, phenolic compounds intake was adjusted for total energy using the residuals method [27], and posteriorly categorized in quartiles according to its distribution among controls. In the second stage, summary (pooled) ORs and the corresponding 95% CIs were estimated using a random-effect model [28]. Heterogeneity between studies was assessed by using the Q test and I^2 statistic. Moreover, a number of stratified analyses were performed, according to sex, age group (≤ 60 , >60 years), social class (low, intermediate or high), and smoking status (never smokers, ever smokers). Stata software release 14 [29] was used for mixed effects logistic regression, as well as Python version 3.14 [30] and R version 3.6 [31] for the extraction of Phenol Explorer data on polyphenol content in aliment, and for the estimation of the polyphenol intake by the individuals, respectively.

3. Results

The pooled ORs and the corresponding 95% CI for total polyphenols, total flavonoids and total phenolic acids according to their quartiles of intake, as well as using continuous variables of intake, are shown in Table 2.

For most polyphenols, the ORs were lower in the highest quartile intake, as compared to preceding ones, though in the absence of a linear trend. The ORs for the highest vs. the lowest quartile were 0.67 (95% CI = 0.54–0.81) for total polyphenols, 0.75 (95% CI = 0.55–0.94) for total phenolic acids, and 0.73 (95% CI = 0.55–0.90) for total flavonoids. Regarding flavonoid subclasses, the ORs for highest vs. the lowest quartile were 0.74 (95% CI = 0.56–0.92) for anthocyanidins, (0.77, 95% CI = 0.66–0.88) for flavanols, and 0.57 (95% CI = 0.44–0.69) for flavanones. With reference to total phenolic acids classes, the OR was 0.73 (95% CI = 0.57–0.89) for hydroxybenzoic acids. The ORs were 0.76 (95% CI = 0.51–1.01) for flavonols and 0.82 (95% CI = 0.58–1.06) for hydroxycinnamic acids. Continuous ORs, computed for an increase of 1 standard deviation of each polyphenol, ranged between 0.84 (95% CI = 0.78–0.90) for flavanones and 0.93 for anthocyanidins (95% CI = 0.86–1.01), flavanols (95% CI = 0.85–1.00), total phenolic acids (95% CI = 0.81–1.04), and hydroxycinnamic acids (95% CI = 0.82–1.05).

Figure 1 presents the study specific ORs for the highest vs. lowest quartile of polyphenols in each study. Despite appreciable heterogeneity, most study specific ORs were below 1. The pooled ORs for the highest vs. the lowest quartile of each polyphenol are also summarized in Figure 2.

Table 2. Distribution of 3471 gastric cancer cases and 8344 controls according to quartile of intake of selected polyphenols and corresponding odds ratio (ORs) and 95% confidence intervals (CI).

Polyphenol Class	Variables	Quartile of Polyphenols Intake ^b				OR Continuous ^c
		1 ^d	2	3	4	
Total polyphenols	Mean intake (mg/day) ^a	285.6	402.6	534.2	853.0	
	Cases	991	809	846	825	0.88 (0.78–0.97)
	OR (95% CI)	1	0.73 (0.59–0.88)	0.72 (0.54–0.89)	0.67 (0.54–0.81)	
Total flavonoids	Mean intake (mg/day) ^a	123.7	184.1	256.4	415.0	
	Cases	942	814	830	885	0.90 (0.82–0.98)
	OR (95% CI)	1	0.78 (0.67–0.88)	0.76 (0.58–0.94)	0.73 (0.55–0.90)	
Anthocyanidins	Mean intake (mg/day) ^a	12.8	21.9	36.9	79.3	
	Cases	951	779	857	884	0.93 (0.86–1.01)
	OR (95% CI)	1	0.65 (0.52–0.85)	0.78 (0.62–0.93)	0.74 (0.56–0.92)	
Flavanols	Mean intake (mg/day) ^a	33.9	54.0	90.6	179.6	
	Cases	903	841	837	891	0.93 (0.85–1.00)
	OR (95% CI)	1	0.84 (0.73–0.95)	0.73 (0.67–0.88)	0.77 (0.66–0.88)	
Flavonols	Mean intake (mg/day) ^a	19.6	30.2	36.7	61.2	
	Cases	982	818	798	873	0.90 (0.80–1.00)
	OR (95% CI)	1	0.75 (0.62–0.88)	0.70 (0.49–0.91)	0.76 (0.51–1.01)	
Flavanones	Mean intake (mg/day) ^a	7.1	19.9	34.8	59.0	
	Cases	1173	934	716	648	0.84 (0.78–0.90)
	OR (95% CI)	1	0.73 (0.55–0.92)	0.60 (0.40–0.79)	0.57 (0.44–0.69)	
Total phenolic acids	Mean intake (mg/day) ^a	126.5	191.2	269.9	474.5	
	Cases	1023	843	822	783	0.93 (0.81–1.04)
	OR (95% CI)	1	0.76 (0.60–0.92)	0.78 (0.68–0.88)	0.75 (0.55–0.94)	
Hydroxybenzoic acids	Mean intake (mg/day) ^a	16.3	20.4	27.6	64.3	
	Cases	959	875	813	824	0.91 (0.85–0.98)
	OR (95% CI)	1	0.87 (0.73–1.02)	0.73 (0.55–0.91)	0.73 (0.57–0.89)	
Hydroxycinnamic acids	Mean intake (mg/day) ^a	102.7	163.3	239.0	425.0	
	Cases	1004	866	794	807	0.93 (0.82–1.05)
	OR (95% CI)	1	0.81 (0.63–0.99)	0.75 (0.65–0.85)	0.82 (0.58–1.06)	

^a Computed according the distributions among controls. ^b Estimated by two-stage meta-analysis using unconditional logistic regression models adjusted for age, sex, social class, alcohol consumption, body mass index, family history of gastric cancer, smoking status, consumption of salt, and according to the residual model. ^c Estimated for an increment of intake equal to 1 standard deviation (computed according the distributions among controls).

^d Reference category.

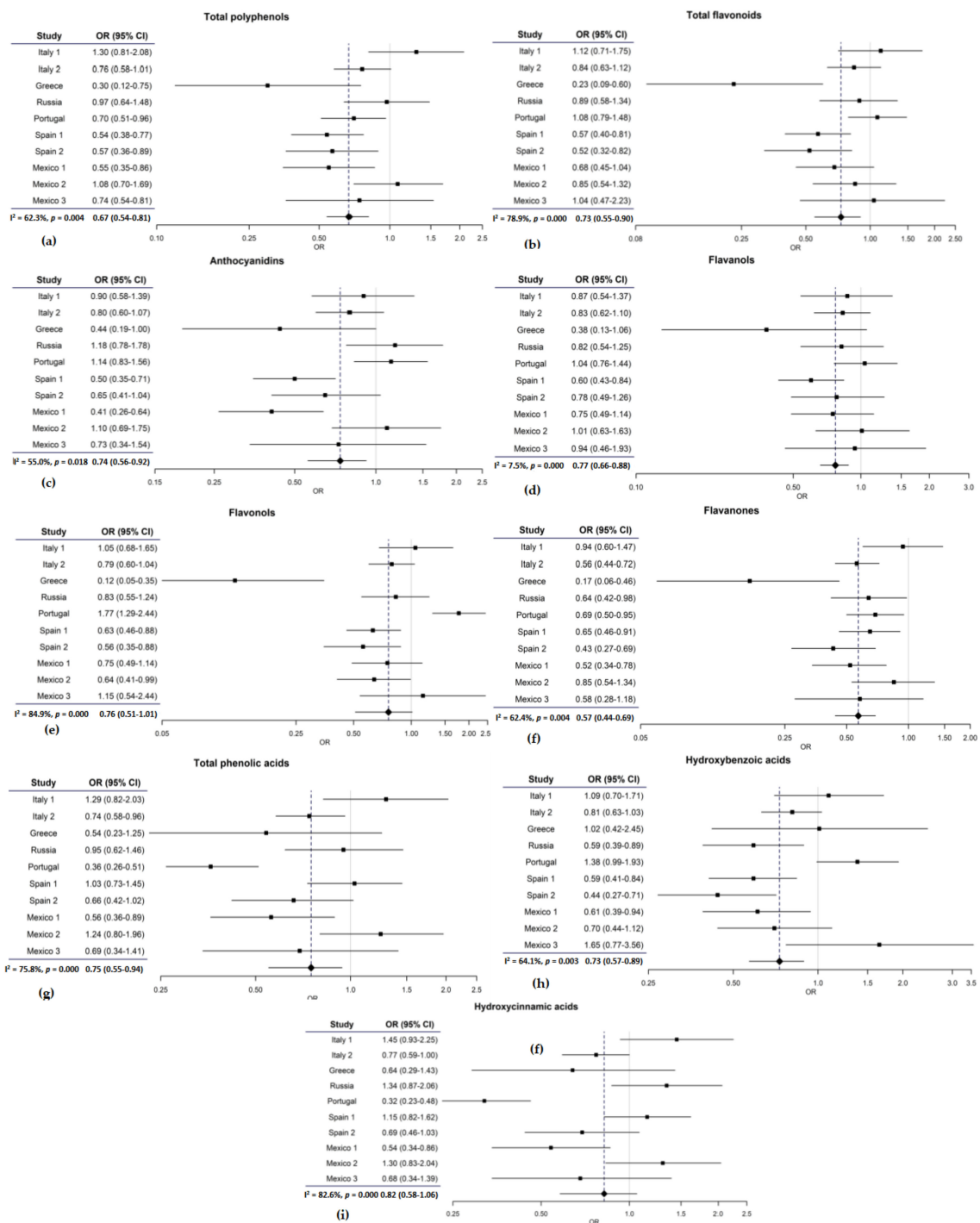


Figure 1. Study specific and pooled odds ratios (OR) and their 95% confidence intervals (CI) for quartile 4 vs. quartile 1 of polyphenol intake; (a) pooled analysis of polyphenols; (b) pooled analysis of flavonoids; (c) pooled analysis of anthocyanidins; (d) pooled analysis of flavanols; (e) pooled analysis of flavonols; (f) pooled analysis of flavanones; (g) pooled analysis of phenolic acids; (h) pooled analysis of hydroxybenzoic acids; (i) pooled analysis of hydroxycinnamic acids.

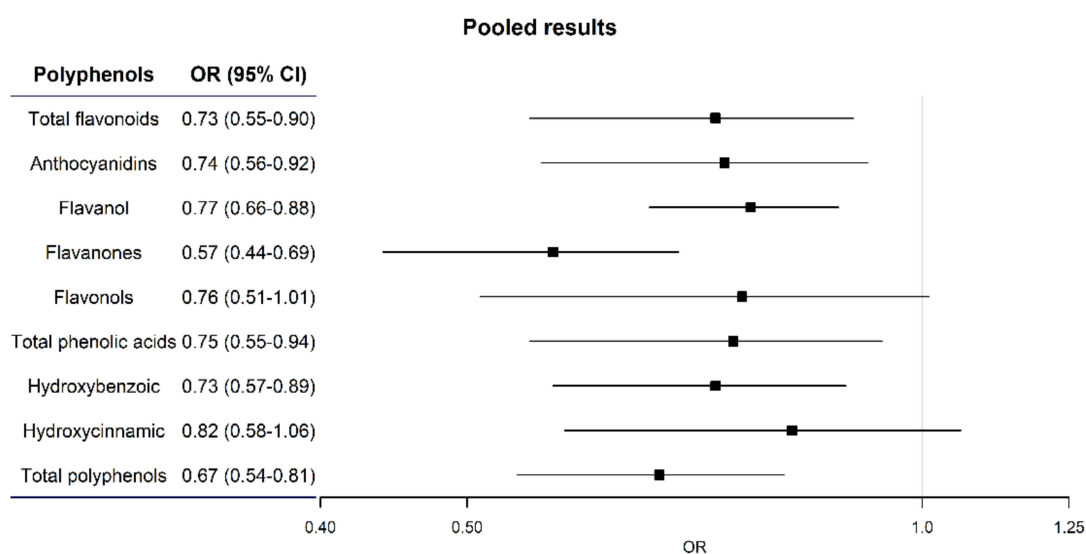


Figure 2. Pooled OR and 95% CI of selected polyphenols intake.

Table 3 gives the ORs for the highest vs. the lowest quartile of intake of polyphenols in strata of sex, age, social class indicators, and smoking status. All the inverse associations were consistent across strata of the covariates considered.

Table 3. Pooled odds ratio (OR) and corresponding 95% confidence interval (CI) of gastric cancer for the highest compared to the lowest study-specific quartile of the distribution of polyphenols classes intake, according to strata of selected variables.

Variable	OR (CI 95%) ^a							
	Sex		Age		Social Class		Smoking Status	
	Men	Women	≤60 years	>60 years	Low	Medium-High	Never Smoker	Smoker
Total polyphenols	0.61 (0.44–0.78)	0.67 (0.52–0.83)	0.71 (0.56–0.87)	0.60 (0.43–0.77)	0.59 (0.46–0.73)	0.71 (0.54–0.88)	0.64 (0.48–0.80)	0.62 (0.45–0.78)
Total flavonoids	0.65 (0.45–0.86)	0.74 (0.56–0.92)	0.67 (0.49–0.85)	0.74 (0.51–0.96)	0.65 (0.42–0.88)	0.73 (0.58–0.89)	0.65 (0.48–0.83)	0.63 (0.44–0.82)
Anthocyanidins	0.68 (0.46–0.90)	0.79 (0.60–0.98)	0.66 (0.52–0.81)	0.78 (0.56–1.00)	0.63 (0.44–0.81)	0.74 (0.56–0.93)	0.78 (0.56–1.00)	0.64 (0.47–0.81)
Flavanols	0.76 (0.59–0.92)	0.72 (0.54–0.90)	0.80 (0.62–0.97)	0.70 (0.53–0.88)	0.72 (0.55–0.89)	0.77 (0.61–0.93)	0.65 (0.49–0.80)	0.78 (0.63–0.93)
Flavonols	0.66 (0.43–0.89)	0.75 (0.48–1.01)	0.71 (0.55–0.87)	0.74 (0.43–1.04)	0.77 (0.44–1.11)	0.66 (0.53–0.79)	0.73 (0.57–0.89)	0.67 (0.52–0.82)
Flavanones	0.55 (0.39–0.71)	0.56 (0.43–0.68)	0.48 (0.35–0.61)	0.59 (0.43–0.74)	0.51 (0.31–0.71)	0.61 (0.48–0.73)	0.56 (0.42–0.70)	0.52 (0.37–0.67)
Total phenolic acids	0.66 (0.46–0.86)	0.65 (0.45–0.84)	0.78 (0.50–1.06)	0.62 (0.43–0.81)	0.55 (0.39–0.71)	0.74 (0.50–0.97)	0.68 (0.46–0.91)	0.67 (0.50–0.84)
Hydroxybenzoic acids	0.65 (0.49–0.80)	0.81 (0.48–1.14)	0.72 (0.53–0.92)	0.59 (0.40–0.78)	0.77 (0.53–1.00)	0.62 (0.39–0.84)	0.77 (0.48–1.06)	0.67 (0.55–0.80)
Hydroxycinnamic acids	0.74 (0.48–1.00)	0.67 (0.45–0.90)	0.87 (0.55–1.18)	0.69 (0.45–0.93)	0.56 (0.35–0.76)	0.86 (0.56–1.16)	0.69 (0.44–0.93)	0.75 (0.52–0.99)

^a Estimated by two-stage meta-analysis using unconditional logistic regression models including terms for age, sex, social class, alcohol consumption, body mass index, family history of gastric cancer, smoking status, consumption of salt, and energy residuals model.

4. Discussion

This uniquely large collaborative pooled analysis of original data indicates an inverse association between the intake of total polyphenols, total flavonoids, and total phenolic acids and GC risk. Among flavonoids, we found a reduced risk of GC associated with higher intake of anthocyanidins, flavanols, and flavanones; among phenolic acids, hydroxybenzoic acids intake was inversely related to GC risk.

Our collaborative reanalysis is therefore consistent with some, though not all, previous evidence. However, no study investigated the association between total polyphenols and the GC risk to date. With

reference to flavonoids, an inverse association between the total intake of their subclasses and GC risk was found in a case–control study from Spain including 354 cases [32]. Furthermore, a meta-analysis on total flavonoids and digestive tract cancers found that flavonoids were inversely related to the risk of GC in the European population but not in the US or in Asia [11]. Prospective studies, two from Finland including 111 and 74 GC cases [33,34], and two from the USA including 248 and 1297 cases [7,35], did not find any association with total flavonoids. However, the European Prospective Investigation into Cancer (EPIC) [36] study found an inverse association for total flavonoids among women, but not among men.

With reference to flavonoid subclasses, a number of studies indicated an inverse relation between the intake of flavanol and GC, in line with our results [37–39]. A case–control study from Italy, including 230 GC cases, reported an inverse association between proanthocyanidins, a subclass of flavanols, and GC risk [37]. In a case–control study from Korea, including 334 GC cases, inverse associations were observed for flavan-3-ols, which is part of flavanols, besides total dietary flavonoids [38]. In another case–control study conducted in Spain on 329 GC cases, an inverse relationship for the intake of flavan-3-ols, as well as total flavonoids (estimated as aglycones) was found [10]. A meta-analysis of epidemiologic studies on flavan-3-ols and cancer risk also revealed an inverse association with GC risk among women, but not men [39].

With reference to anthocyanidins, the already cited EPIC study, including 683 incident GC cases, reported an inverse association with GC risk in women [36], but a subsequent meta-analysis on anthocyanidins and GC risk revealed no association [40].

A case–control study from Greece including 110 cases of GC found inverse associations with flavanones and flavonols [9]. Another Swedish population-based case–control study including 505 GC cases reported an inverse association with the flavonol quercetin [41]. Likewise, a meta-analysis involving 4593 cases supported the evidence of an inverse association between flavonols and GC risk [42].

With reference to phenolic acids, only one case–control study from Mexico on 248 cases investigated them in relation to the GC risk [12], suggesting an inverse association with cinnamic acid, a derivative from hydroxycinnamic acids.

Our pooled study is the first to consider the association between hydroxybenzoic acids and total polyphenols and GC risk. In addition, the present study is the largest to date on polyphenols and GC and has therefore adequate power to quantify the associations considered. For the purpose of this work, a database was generated including all available information on polyphenols content from Phenol-Explorer, together with the mixing of data extracted from chromatography after hydrolysis and chromatography and the food ponderations from FFQ. Aglycones can be absorbed from the small intestine, but most polyphenols are present in the form of glycosides, polymers or esters, that cannot be absorbed in native form [43], needing a transformation by microbiota to aglycones to be absorbed. Thus, estimating polyphenols as aglycones is another strength of this investigation, as this allowed to obtain a more accurate approximation to real consumption of the bioactive structures [44], to reduce the overestimation of the polyphenols and to take advantage of the most complete food composition tables.

A limitation of our collaborative re-analysis is related to the variable accuracy of each study FFQ, with different levels of details and completeness of information. Moreover, the total polyphenols intake was calculated including all classes of polyphenols with the exception of lignans. In addition, the aglycone polyphenols content in food was estimated without taking into account the retention factors. However, this data was not available for most individual polyphenols. Furthermore, the metabolization of polyphenols occurs after ingestion, both at hepatic and colonic level [45,46], and varies among individuals. Part of the variability between the results from studies can be attributed to the heterogeneity of dietary pattern of each country [47], since the polyphenols content in foods varies according to the different factors related with the climate stress, geography, and storage conditions [45,48]. For example, culinary preparation strongly influences the polyphenol availability of foods, quercetin can be reduced by up to 80% from boiling [48]. More detailed information on the

main sources and availability of polyphenol classes can be found elsewhere [49]. A decreased risk of GC was found for all polyphenols, with a levelling in the ORs from the second quartile of intake onwards. The type of inverse association observed, therefore, tended to indicate an excess risk of GC for subjects with lowest (inadequate) intake.

The inverse associations observed may partially be due to an effect of a diet rich in fruit and vegetable on GC risk [4,19,50], rather than being specifically attributable to polyphenols intake. Fruits and vegetables are a good source of polyphenols but also for other antioxidant nutrients such as vitamin C which have been also related to a lower risk of GC. Interactions between polyphenol and other nutrients cannot be ruled out and should be explored in more depth in further studies. In particular, there is evidence of an inverse association of citrus fruits [51], which are the major food sources of flavanones. Additionally, consumption of tea, an important contributor of flavanols and hydroxybenzoic acids, could partially explain the inverse association, since numerous studies reported a protective effect of this beverage on GC risk [52].

Polyphenols have several anticarcinogenic properties including antioxidant [44,53] and anti-inflammatory effects [54–56], and some of them have shown antimicrobial effects, inhibiting the growth of *Helicobacter pylori* [57,58], a risk factor for GC. In addition, flavonoids interact with a wide range of molecules involved in apoptosis and cell proliferation pathways by affecting their expression or activity [59]. In particular, epigallocatechin-3-gallate, a compound of flavanols, can induce apoptosis of GC cells lines [60]. Naringenin, a compound of flavanones, inhibits the cancer cells proliferation and migration and induces apoptosis in GC [61]; anthocyanidins can induce autophagy and apoptosis on human GC cells [62]; gallic acid, a hydroxybenzoic acid, can act as a metastasis inhibitor of GC specific cell lines [63].

5. Conclusions

In conclusion, our study suggests that the higher intake of polyphenols (total and specific types) may be associated with a lower GC risk. The mechanisms for a protective effect of polyphenols could be related to their antioxidant, antimicrobial, and pro-apoptotic effects. The relation of dietary polyphenols and GC risk should be further investigated in longitudinal studies.

Author Contributions: Conceptualization, V.M.S. and J.V.; methodology, M.R. (Marta Rossi), C.P., F.V.-S.; software, F.V.-S.; validation, C.L.V.; formal analysis, F.V.-S.; investigation, F.V.-S.; data curation, R.B., C.P.; writing—original draft preparation, F.V.-S.; writing—review and editing, F.V.-S., M.R. (Marta Rossi), C.P., C.L.V., M.R. (Matteo Rota), D.P., M.F., N.L., S.M., L.L.-C., D.G.Z., D.M., M.R.G., G.C.-V., N.A., M.G.d.I.H., R.U.H.-R., E.N., R.B., M.H.W., A.L., P.L., M.L.-C., P.B., M.C.C., M.P.C., Z.-F.Z.; supervision, C.P., M.R. (Marta Rossi), C.L.V., V.M.S., J.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC), Project no. 21378 (Investigator Grant) and by the Italian League for the Fight Against Cancer (LILT). The Unidade de Investigação em Epidemiologia—Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto (EPIUnit) (UIDB/04750/2020) was funded by the Foundation for Science and Technology—FCT (Portuguese Ministry of Science, Technology and Higher Education). SM was also funded by the project “NEON-PC—Neuro-oncological complications of prostate cancer: longitudinal study of cognitive decline” (POCI-01-0145-FEDER-032358; ref. PTDC/SAU-EPI/32358/2017), which is funded by FEDER through the Operational Programme competitiveness and Internationalization, and national funding from FCT.

Acknowledgments: The authors thank the European Cancer Prevention (ECP) Organization for providing support for the StoP meetings. We also thank all MCC-Spain study collaborators (CIBERESP, ISCIII, ISGlobal, ICO, University of Huelva, University of Oviedo, University of Cantabria, University of León, ibs. Granada, Instituto Salud Pública de Navarra, FISABIO, Murcia Regional Health Authority and cols).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Yusefi, A.R.; Bagheri Lankarani, K.; Bastani, P.; Radinmanesh, M.; Kavosi, Z. Risk Factors for Gastric Cancer: A Systematic Review. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2018**, *19*, 591–603. [\[CrossRef\]](#)
2. de Martel, C.; Forman, D.; Plummer, M. Gastric cancer: Epidemiology and risk factors. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **2013**, *42*, 219–240. [\[CrossRef\]](#)
3. Stadtlander, C.T.; Waterbor, J.W. Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 2195–2208. [\[CrossRef\]](#)
4. Turati, F.; Rossi, M.; Pelucchi, C.; Levi, F.; La Vecchia, C. Fruit and vegetables and cancer risk: A review of southern European studies. *Br. J. Nutr.* **2015**, *113* (Suppl. 2), S102–S110. [\[CrossRef\]](#)
5. van Duynhoven, F.J.; Bueno-De-Mesquita, H.B.; Ferrari, P.; Jenab, M.; Boshuizen, H.C.; Ros, M.M.; Casagrande, C.; Tjonneland, A.; Olsen, A.; Overvad, K.; et al. Fruit, vegetables, and colorectal cancer risk: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *89*, 1441–1452. [\[CrossRef\]](#)
6. Key, T.J. Fruit and vegetables and cancer risk. *Br. J. Cancer* **2011**, *104*, 6–11. [\[CrossRef\]](#)
7. Petrick, J.L.; Steck, S.E.; Bradshaw, P.T.; Trivers, K.F.; Abrahamson, P.E.; Engel, L.S.; He, K.; Chow, W.H.; Mayne, S.T.; Risch, H.A.; et al. Dietary intake of flavonoids and oesophageal and gastric cancer: Incidence and survival in the United States of America (USA). *Br. J. Cancer* **2015**, *112*, 1291–1300. [\[CrossRef\]](#)
8. Grosso, G.; Godos, J.; Lamuela-Raventos, R.; Ray, S.; Micek, A.; Pajak, A.; Sciacca, S.; D’Orazio, N.; Del Rio, D.; Galvano, F. A comprehensive meta-analysis on dietary flavonoid and lignan intake and cancer risk: Level of evidence and limitations. *Mol. Nutr. Food Res.* **2017**, *61*. [\[CrossRef\]](#)
9. Lagiou, P.; Samoli, E.; Lagiou, A.; Peterson, J.; Tzonou, A.; Dwyer, J.; Trichopoulos, D. Flavonoids, vitamin C and adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Causes Control* **2004**, *15*, 67–72. [\[CrossRef\]](#)
10. Vitelli Storelli, F.; Molina, A.J.; Zamora-Ros, R.; Fernandez-Villa, T.; Roussou, V.; Romaguera, D.; Aragones, N.; Obon-Santacana, M.; Guevara, M.; Gomez-Acebo, I.; et al. Flavonoids and the Risk of Gastric Cancer: An Exploratory Case-Control Study in the MCC-Spain Study. *Nutrients* **2019**, *11*, 967. [\[CrossRef\]](#)
11. Bo, Y.; Sun, J.; Wang, M.; Ding, J.; Lu, Q.; Yuan, L. Dietary flavonoid intake and the risk of digestive tract cancers: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24836. [\[CrossRef\]](#)
12. Hernandez-Ramirez, R.U.; Galvan-Portillo, M.V.; Ward, M.H.; Agudo, A.; Gonzalez, C.A.; Onate-Ocana, L.F.; Herrera-Goepfert, R.; Palma-Coca, O.; Lopez-Carrillo, L. Dietary intake of polyphenols, nitrate and nitrite and gastric cancer risk in Mexico City. *Int. J. Cancer* **2009**, *125*, 1424–1430. [\[CrossRef\]](#)
13. Pelucchi, C.; Lunet, N.; Boccia, S.; Zhang, Z.F.; Praud, D.; Boffetta, P.; Levi, F.; Matsuo, K.; Ito, H.; Hu, J.; et al. The stomach cancer pooling (StoP) project: Study design and presentation. *Eur. J. Cancer Prev.* **2015**, *24*, 16–23. [\[CrossRef\]](#)
14. Ferro, A.; Costa, A.R.; Morais, S.; Bertuccio, P.; Rota, M.; Pelucchi, C.; Hu, J.; Johnson, K.C.; Zhang, Z.F.; Palli, D.; et al. Fruits and vegetables intake and gastric cancer risk: A pooled analysis within the Stomach cancer Pooling Project. *Int. J. Cancer* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
15. Lucenteforte, E.; Scita, V.; Bosetti, C.; Bertuccio, P.; Negri, E.; La Vecchia, C. Food groups and alcoholic beverages and the risk of stomach cancer: A case-control study in Italy. *Nutr. Cancer* **2008**, *60*, 577–584. [\[CrossRef\]](#)
16. Buiatti, E.; Palli, D.; Decarli, A.; Amadori, D.; Avellini, C.; Bianchi, S.; Biserni, R.; Cipriani, F.; Cocco, P.; Giacosa, A.; et al. A case-control study of gastric cancer and diet in Italy. *Int. J. Cancer* **1989**, *44*, 611–616. [\[CrossRef\]](#)
17. Lagiou, P.; Trichopoulos, D. Parental family structure, Helicobacter pylori, and gastric adenocarcinoma. *PLoS Med.* **2007**, *4*, e25. [\[CrossRef\]](#)
18. Zaridze, D.; Borisova, E.; Maximovitch, D.; Chkhikvadze, V. Aspirin protects against gastric cancer: Results of a case-control study from Moscow, Russia. *Int. J. Cancer* **1999**, *82*, 473–476. [\[CrossRef\]](#)
19. Lunet, N.; Valbuena, C.; Vieira, A.L.; Lopes, C.; Lopes, C.; David, L.; Carneiro, F.; Barros, H. Fruit and vegetable consumption and gastric cancer by location and histological type: Case-control and meta-analysis. *Eur. J. Cancer Prev.* **2007**, *16*, 312–327. [\[CrossRef\]](#)
20. Castano-Vinyals, G.; Aragones, N.; Perez-Gomez, B.; Martin, V.; Llorca, J.; Moreno, V.; Altzibar, J.M.; Ardanaz, E.; de Sanjose, S.; Jimenez-Moleon, J.J.; et al. Population-based multicase-control study in common tumors in Spain (MCC-Spain): Rationale and study design. *Gac. Sanit.* **2015**, *29*, 308–315. [\[CrossRef\]](#)
21. Santibanez, M.; Alguacil, J.; de la Hera, M.G.; Navarrete-Munoz, E.M.; Llorca, J.; Aragones, N.; Kauppinen, T.; Vioque, J.; Group, P.S. Occupational exposures and risk of stomach cancer by histological type. *Occup. Environ. Med.* **2012**, *69*, 268–275. [\[CrossRef\]](#)

22. Lopez-Carrillo, L.; Hernandez Avila, M.; Dubrow, R. Chili pepper consumption and gastric cancer in Mexico: A case-control study. *Am. J. Epidemiol.* **1994**, *139*, 263–271. [[CrossRef](#)]
23. Lopez-Carrillo, L.; Lopez-Cervantes, M.; Robles-Diaz, G.; Ramirez-Espitia, A.; Mohar-Betancourt, A.; Meneses-Garcia, A.; Lopez-Vidal, Y.; Blair, A. Capsaicin consumption, Helicobacter pylori positivity and gastric cancer in Mexico. *Int. J. Cancer* **2003**, *106*, 277–282. [[CrossRef](#)]
24. Rothwell, J.A.; Perez-Jimenez, J.; Neveu, V.; Medina-Remon, A.; M'Hiri, N.; Garcia-Lobato, P.; Manach, C.; Knox, C.; Eisner, R.; Wishart, D.S.; et al. Phenol-Explorer 3.0: A major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database* **2013**, *2013*, bat070. [[CrossRef](#)]
25. Balentine, D.A.; Dwyer, J.T.; Erdman, J.W., Jr.; Ferruzzi, M.G.; Gaine, P.C.; Harnly, J.M.; Kwik-Urbe, C.L. Recommendations on reporting requirements for flavonoids in research. *Am. J. Clin. Nutr.* **2015**, *101*, 1113–1125. [[CrossRef](#)]
26. Smith-Warner, S.A.; Spiegelman, D.; Ritz, J.; Albanes, D.; Beeson, W.L.; Bernstein, L.; Berrino, F.; van den Brandt, P.A.; Buring, J.E.; Cho, E.; et al. Methods for pooling results of epidemiologic studies: The Pooling Project of Prospective Studies of Diet and Cancer. *Am. J. Epidemiol.* **2006**, *163*, 1053–1064. [[CrossRef](#)]
27. Willett, W.C.; Howe, G.R.; Kushi, L.H. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **1997**, *65*, 1220S–1228S. [[CrossRef](#)]
28. DerSimonian, R.; Laird, N. Meta-analysis in clinical trials revisited. *Contemp. Clin. Trials* **2015**, *45*, 139–145. [[CrossRef](#)]
29. StataCorp. *Stata Statistical Software: Release 13*; StataCorp LP: College Station, TX, USA, 2013.
30. Python Software Foundation. *Python Language Reference*, Version 3.6.5; Available online: <http://www.python.org> (accessed on 19 July 2019).
31. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2017; Version 3.6, R; Available online: <http://www.R-project.org/> (accessed on 26 December 2018).
32. Garcia-Closas, R.; Gonzalez, C.A.; Agudo, A.; Riboli, E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control* **1999**, *10*, 71–75. [[CrossRef](#)]
33. Knekt, P.; Kumpulainen, J.; Jarvinen, R.; Rissanen, H.; Heliövaara, M.; Reunanen, A.; Hakulinen, T.; Aromaa, A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 560–568. [[CrossRef](#)]
34. Hirvonen, T.; Virtamo, J.; Korhonen, P.; Albanes, D.; Pietinen, P. Flavonol and flavone intake and the risk of cancer in male smokers (Finland). *Cancer Causes Control* **2001**, *12*, 789–796. [[CrossRef](#)]
35. Sun, L.; Subar, A.F.; Bosire, C.; Dawsey, S.M.; Kahle, L.L.; Zimmerman, T.P.; Abnet, C.C.; Heller, R.; Graubard, B.I.; Cook, M.B.; et al. Dietary Flavonoid Intake Reduces the Risk of Head and Neck but Not Esophageal or Gastric Cancer in US Men and Women. *J. Nutr.* **2017**, *147*, 1729–1738. [[CrossRef](#)]
36. Zamora-Ros, R.; Agudo, A.; Lujan-Barroso, L.; Romieu, I.; Ferrari, P.; Knaze, V.; Bueno-de-Mesquita, H.B.; Leenders, M.; Travis, R.C.; Navarro, C.; et al. Dietary flavonoid and lignan intake and gastric adenocarcinoma risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *96*, 1398–1408. [[CrossRef](#)]
37. Rossi, M.; Rosato, V.; Bosetti, C.; Lagiou, P.; Parpinel, M.; Bertuccio, P.; Negri, E.; La Vecchia, C. Flavonoids, proanthocyanidins, and the risk of stomach cancer. *Cancer Causes Control* **2010**, *21*, 1597–1604. [[CrossRef](#)]
38. Woo, H.D.; Lee, J.; Choi, I.J.; Kim, C.G.; Lee, J.Y.; Kwon, O.; Kim, J. Dietary flavonoids and gastric cancer risk in a Korean population. *Nutrients* **2014**, *6*, 4961–4973. [[CrossRef](#)]
39. Lei, L.; Yang, Y.; He, H.; Chen, E.; Du, L.; Dong, J.; Yang, J. Flavan-3-ols consumption and cancer risk: A meta-analysis of epidemiologic studies. *Oncotarget* **2016**, *7*, 73573–73592. [[CrossRef](#)]
40. Yang, D.; Wang, X.; Yuan, W.; Chen, Z. Intake of Anthocyanins and Gastric Cancer Risk: A Comprehensive Meta-Analysis on Cohort and Case-Control Studies. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2019**, *65*, 72–81. [[CrossRef](#)]
41. Ekstrom, A.M.; Serafini, M.; Nyren, O.; Wolk, A.; Bosetti, C.; Bellocco, R. Dietary quercetin intake and risk of gastric cancer: Results from a population-based study in Sweden. *Ann. Oncol.* **2011**, *22*, 438–443. [[CrossRef](#)]
42. Xie, Y.; Huang, S.; Su, Y. Dietary Flavonols Intake and Risk of Esophageal and Gastric Cancer: A Meta-Analysis of Epidemiological Studies. *Nutrients* **2016**, *8*, 91. [[CrossRef](#)]
43. Bohn, T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutr. Rev.* **2014**, *72*, 429–452. [[CrossRef](#)]
44. Pandey, K.B.; Rizvi, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2009**, *2*, 270–278. [[CrossRef](#)]

45. Grosso, G.; Bella, F.; Godos, J.; Sciacca, S.; Del Rio, D.; Ray, S.; Galvano, F.; Giovannucci, E.L. Possible role of diet in cancer: Systematic review and multiple meta-analyses of dietary patterns, lifestyle factors, and cancer risk. *Nutr. Rev.* **2017**, *75*, 405–419. [[CrossRef](#)]
46. Lampe, J.W. Interindividual differences in response to plant-based diets: Implications for cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *89*, 1553S–1557S. [[CrossRef](#)]
47. Rodriguez-Garcia, C.; Sanchez-Quesada, C.; Gaforio, J.J. Dietary Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents: An Updated Review of Human Studies. *Antioxidants* **2019**, *8*, 137. [[CrossRef](#)]
48. Cory, H.; Passarelli, S.; Szeto, J.; Tamez, M.; Mattei, J. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Front. Nutr.* **2018**, *5*, 87. [[CrossRef](#)]
49. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727–747. [[CrossRef](#)]
50. Metere, A.; Giacomelli, L. Absorption, metabolism and protective role of fruits and vegetables polyphenols against gastric cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2017**, *21*, 5850–5858. [[CrossRef](#)]
51. Bertuccio, P.; Alicandro, G.; Rota, M.; Pelucchi, C.; Bonzi, R.; Galeone, C.; Bravi, F.; Johnson, K.C.; Hu, J.; Palli, D.; et al. Citrus fruit intake and gastric cancer: The stomach cancer pooling (StoP) project consortium. *Int. J. Cancer* **2019**, *144*, 2936–2944. [[CrossRef](#)]
52. Huang, Y.; Chen, H.; Zhou, L.; Li, G.; Yi, D.; Zhang, Y.; Wu, Y.; Liu, X.; Wu, X.; Song, Q.; et al. Association between green tea intake and risk of gastric cancer: A systematic review and dose-response meta-analysis of observational studies. *Public Health Nutr.* **2017**, *20*, 3183–3192. [[CrossRef](#)]
53. Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 572–584. [[CrossRef](#)]
54. Sznarkowska, A.; Kostecka, A.; Meller, K.; Bielawski, K.P. Inhibition of cancer antioxidant defense by natural compounds. *Oncotarget* **2017**, *8*, 15996–16016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Kaulmann, A.; Bohn, T. Bioactivity of Polyphenols: Preventive and Adjuvant Strategies toward Reducing Inflammatory Bowel Diseases-Promises, Perspectives, and Pitfalls. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 9346470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Serafini, M.; Peluso, I.; Raguzzini, A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc. Nutr. Soc.* **2010**, *69*, 273–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Baltas, N.; Karaoglu, S.A.; Tarakci, C.; Kolayli, S. Effect of propolis in gastric disorders: Inhibition studies on the growth of *Helicobacter pylori* and production of its urease. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 46–50. [[CrossRef](#)]
58. Harsha, C.; Banik, K.; Bordoloi, D.; Kunnumakkara, A.B. Antiulcer properties of fruits and vegetables: A mechanism based perspective. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *108*, 104–119. [[CrossRef](#)]
59. Ramos, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J. Nutr. Biochem.* **2007**, *18*, 427–442. [[CrossRef](#)]
60. Onoda, C.; Kuribayashi, K.; Nirasawa, S.; Tsuji, N.; Tanaka, M.; Kobayashi, D.; Watanabe, N. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in gastric cancer cell lines by down-regulating survivin expression. *Int. J. Oncol.* **2011**, *38*, 1403–1408. [[CrossRef](#)]
61. Bao, L.; Liu, F.; Guo, H.B.; Li, Y.; Tan, B.B.; Zhang, W.X.; Peng, Y.H. Naringenin inhibits proliferation, migration, and invasion as well as induces apoptosis of gastric cancer SGC7901 cell line by downregulation of AKT pathway. *Tumour Biol.* **2016**, *37*, 11365–11374. [[CrossRef](#)]
62. Zhang, L.; Zhou, J.; Luo, J.; Wang, Q.; Liu, J.; Zeng, Q.Q. Study on Mulberry Anthocyanins Induced Autophagy and Apoptosis of Human Gastric Cancer SGC-7901 Cell Autophagy. *Zhong Yao Cai* **2016**, *39*, 1134–1138.
63. Aragones, N.; Izarzugaza, M.I.; Ramos, M.; Chirlaque, M.D.; Almar, E.; Martinez, C.; Oesophago-gastric Cancer Working Group. Trends in oesophago-gastric cancer incidence in Spain: Analysis by subsite and histology. *Ann. Oncol.* **2010**, *21* (Suppl. 3), iii69–iii75. [[CrossRef](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ANEXO V

Estudio MCC-Spain

Hoja de información

Introducción

Solicitamos su participación en un estudio destinado a investigar el efecto que determinados factores ambientales, laborales, alimentarios y tratamientos médicos tienen sobre la salud. El estudio se está llevando a cabo en éste y otros centros sanitarios de España, y está coordinado desde el Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Su participación en el estudio es voluntaria. Puede rechazar participar y puede retirarse en cualquier momento sin que esto afecte su atención médica posterior.

Por favor, lea atentamente este documento y haga tantas preguntas como crea necesarias.

Explicación de los procedimientos

Si acepta participar en el estudio, su aportación consistirá en responder a las preguntas de un cuestionario, donar una muestra de sangre/saliva, donar una muestra de pelo y una muestra de uña del pie y dar permiso para recoger información de su historial clínico. El cuestionario consta de dos partes. Una parte consiste en preguntas sobre sus hábitos de vida e historial clínico mediante una entrevista personal de unos 50 minutos. La otra parte es el cuestionario de dieta el cual le será entregado para que usted lo conteste y nos lo devuelva completado. Una enfermera extraerá una muestra de sangre (30 ml). La entrevistadora o la enfermera le proporcionarán un recipiente para recoger una muestra de saliva. En el caso de que sea intervenido quirúrgicamente, le pedimos permiso para obtener muestras de tejido. Mediremos la distancia anogenital.

Al final de la entrevista le haremos algunas medidas antropométricas, como la cintura y la cadera y también la longitud de los dedos índice y anular. También le pedimos una muestra de la uña del dedo gordo del pie y una muestra de pelo.

Las muestras recogidas serán utilizadas exclusivamente con fines científicos relacionados con los objetivos del estudio. Las muestras biológicas serán identificadas con un código para no ser identificables con el participante. Estas muestras se guardarán en congeladores o almacenes adecuados hasta su análisis. En caso de retirada del consentimiento del participante, serán destruidas. Con las muestras de sangre, saliva, uñas, pelo y tejido se realizarán análisis genéticos, bioquímicos y celulares que pueden estar asociados con la salud y la enfermedad. Le entregaremos una hoja informativa adicional para el consentimiento en los análisis genéticos.

Por último, desearíamos poder contactar en el futuro con usted o alguno de sus familiares para recabar información adicional que no se ha recogido en esta entrevista.

Beneficios potenciales

Usted no se beneficiará directamente de este estudio, pero su participación es muy importante ya que contribuirá a aumentar el conocimiento de los efectos de factores ambientales y genéticos sobre la salud. En caso de que los resultados de los análisis mostraran algún hallazgo importante para su salud, su médico sería informado para que se lo comunicara.

Riesgos

Es poco probable que, al hacer la extracción de sangre, le salga un hematoma ("morado").

Confidencialidad

La información obtenida en el estudio será confidencial, y almacenada en un fichero de datos automatizados, de acuerdo con lo que establece la Ley Orgánica 15/99 de Protección de datos de Carácter Personal (LOPD). Nadie, excepto los miembros del estudio y el Comité Ético de Investigación Clínica, tendrá acceso a su información. Los resultados obtenidos sólo se podrán publicar de forma anónima y nunca de forma individual.

Consentimiento informado

He leído este documento, he hecho todas las preguntas que creía necesarias y estoy de acuerdo en participar en las siguientes partes del estudio:

	SÍ	NO
Entrevista	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Medidas antropométricas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Recogida de muestra de sangre/saliva	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Recogida de muestra de uña	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Recogida de muestra de pelo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Acceso al historial clínico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Acceso a las mamografías (mujeres)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Recogida de las muestras de tejido	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Contacto en el futuro	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Nombre y apellidos del participante

Fecha

Firma

Nombre y apellidos del entrevistador/investigador

Fecha

Firma

Apreciamos sinceramente su cooperación en este proyecto de investigación. Si tiene alguna pregunta sobre el estudio, puede llamar al coordinador principal del estudio

Este protocolo ha sido revisado y aprobado por el Comité Ético del IMAS-IMIM y de los centros participantes.

Hoja de información y consentimiento informado – estudio genético

Utilizaremos una parte de la sangre, saliva y tejido para examinar su ADN y ARN (material genético). Nos gustaría realizar análisis exclusivamente con fines científicos de su ADN y ARN que están relacionados con el objetivo del estudio.

Las muestras biológicas serán identificadas con un código para no ser identificables con el participante. Todo el material que no sea utilizado inmediatamente será conservado durante un máximo de 50 años para realizar, posiblemente, posteriores determinaciones. Las muestras se guardarán en el Centre de Regulació Genòmica de Barcelona, programa Genes y Enfermedad. En caso de retirada del consentimiento del participante, serán destruidas.

En un futuro, usted puede solicitar a los investigadores que sus datos y muestras sean retirados del estudio.

En caso de que los resultados de los análisis mostraran algún hallazgo importante para su salud, su médico sería informado para que se lo comunicara.

Confidencialidad

La información obtenida en el estudio será confidencial, de acuerdo con lo que establece la Ley Orgánica 15/99 de Protección de datos de Carácter Personal (LOPD). Nadie, excepto los miembros del estudio y el Comité Ético de Investigación Clínica, tendrá acceso a su información. Los resultados obtenidos sólo se podrán publicar de forma anónima y nunca de forma individual.

- | | SÍ | NO |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 1. Entiendo que una muestra de mi ADN y ARN será almacenada y analizada como una parte de este estudio | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. Acepto que los investigadores almacenen mi ADN y ARN y lo analicen en el futuro. Entiendo que será utilizado específicamente para esta investigación y no será utilizado para otros propósitos. | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Nombre y apellidos del participante

Fecha

Firma

Nombre y apellidos del entrevistador/investigador

Fecha

Firma

Apreciamos sinceramente su cooperación en este proyecto de investigación.

Este protocolo ha sido revisado y aprobado por el Comité Ético del IMAS y de los centros participantes.

Estudio MCC-Spain

Hoja de información

Introducción

Solicitamos su participación en un estudio destinado a investigar el efecto que determinados factores ambientales, laborales, alimentarios y tratamientos médicos tienen sobre la salud. El estudio se está llevando a cabo en éste y otros centros sanitarios de España, y está coordinado desde el Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Su participación en el estudio es voluntaria. Puede rechazar participar y puede retirarse en cualquier momento sin que esto afecte su atención médica posterior.

Por favor, lea atentamente este documento y haga tantas preguntas como crea necesarias.

Explicación de los procedimientos

Si acepta participar en el estudio, su aportación consistirá en responder a las preguntas de un cuestionario, donar una muestra de sangre/saliva, donar una muestra de pelo y una muestra de uña del pie. El cuestionario consta de dos partes. Una parte consiste en preguntas sobre sus hábitos de vida e historial clínico mediante una entrevista personal de unos 60 minutos. La otra parte es el cuestionario de dieta el cual le será entregado para que usted lo conteste y nos lo devuelva completado. Una enfermera extraerá una muestra de sangre (30 ml). La entrevistadora o la enfermera le proporcionará un recipiente para recoger una muestra de saliva.

Al final de la entrevista le haremos algunas medidas antropométricas, como la cintura y la cadera y también la longitud de los dedos índice y anular. También le pedimos una muestra de la uña del dedo gordo del pie y una muestra de pelo.

Las muestras recogidas serán utilizadas exclusivamente con fines científicos relacionados con los objetivos del estudio. Las muestras biológicas serán identificadas con un código para no ser identificables con el participante. Estas muestras se guardarán en congeladores o almacenes adecuados hasta su análisis. En caso de retirada del consentimiento del participante, serán destruidas. Con las muestras de sangre, saliva, uñas y pelo se realizarán análisis genéticos, bioquímicos y celulares que pueden estar asociados con la salud y la enfermedad. Le entregaremos una hoja informativa adicional para el consentimiento en los análisis genéticos.

Por último, deseáramos poder contactar en el futuro con usted o alguno de sus familiares para recabar información adicional que no se ha recogido en esta entrevista.

Beneficios potenciales

Usted no se beneficiará directamente de este estudio, pero su participación es muy importante ya que contribuirá a aumentar el conocimiento de los efectos de factores ambientales y genéticos sobre la salud. En caso de que los resultados de los análisis mostraran algún hallazgo importante para su salud, su médico sería informado para que se lo comunicara.

Riesgos

Es poco probable que, al hacer la extracción de sangre, le salga un hematoma ("morado").

Confidencialidad

La información obtenida en el estudio será confidencial, y almacenada en un fichero de datos automatizados, de acuerdo con lo que establece la Ley Orgánica 15/99 de Protección de datos de Carácter Personal (LOPD). Nadie, excepto los miembros del estudio y el Comité Ético de Investigación Clínica, tendrá acceso a su información. Los resultados obtenidos sólo se podrán publicar de forma anónima y nunca de forma individual.

Consentimiento informado

He leído este documento, he hecho todas las preguntas que creía necesarias y estoy de acuerdo en participar en las siguientes partes del estudio:

	SÍ	NO
Entrevista	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Medidas antropométricas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Recogida de muestra de sangre/saliva	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Recogida de muestra de uña	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Recogida de muestra de pelo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Acceso al historial clínico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Acceso a las mamografías (mujeres)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Contacto en el futuro	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Nombre y apellidos del participante

Fecha

Firma

Nombre y apellidos del entrevistador/investigador

Fecha

Firma

Apreciamos sinceramente su cooperación en este proyecto de investigación. Si tiene alguna pregunta sobre el estudio, puede llamar al coordinador principal del estudio.

Este protocolo ha sido revisado y aprobado por el Comité Ético del IMAS-IMIM y de los centros participantes.

Hoja de información y consentimiento informado – estudio genético

Utilizaremos una parte de la sangre y saliva para examinar su ADN y ARN (material genético). Nos gustaría realizar análisis exclusivamente con fines científicos de su ADN y ARN que están relacionados con el objetivo del estudio.

Las muestras biológicas serán identificadas con un código para no ser identificables con el participante. Todo el material que no sea utilizado inmediatamente será conservado durante un máximo de 50 años para realizar, posiblemente, posteriores determinaciones. En caso de retirada del consentimiento del participante, serán destruidas.

En un futuro, usted puede solicitar a los investigadores que sus datos y muestras sean retirados del estudio.

En caso de que los resultados de los análisis mostraran algún hallazgo importante para su salud, su médico sería informado para que se lo comunicara.

Confidencialidad

La información obtenida en el estudio será confidencial, de acuerdo con lo que establece la Ley Orgánica 15/99 de Protección de datos de Carácter Personal (LOPD). Nadie, excepto los miembros del estudio y el Comité Ético de Investigación Clínica, tendrá acceso a su información. Los resultados obtenidos sólo se podrán publicar de forma anónima y nunca de forma individual.

- | | SÍ | NO |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 1. Entiendo que una muestra de mi ADN y ARN será almacenada y analizada como una parte de este estudio | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. Acepto que los investigadores almacenen mi ADN y ARN y lo analicen en el futuro. Entiendo que será utilizado específicamente para esta investigación y no será utilizado para otros propósitos. | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Nombre y apellidos del participante

Fecha

Firma

Nombre y apellidos del entrevistador/investigador

Fecha

Firma

Apreciamos sinceramente su cooperación en este proyecto de investigación.

Este protocolo ha sido revisado y aprobado por el Comité Ético del IMAS y de los centros participantes.

