



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Los pacientes mexicanos con adenocarcinoma gástrico
presentan variantes genéticas distintivas que se encuentran
asociadas a su histología tumoral y edad al momento del
diagnóstico”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. DENNIS ALEXANDER CERRATO IZAGUIRRE

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Directores de la tesis:

DR. FRANCISCO JAVIER CAMACHO ARROYO

DRA. YESENNIA SÁNCHEZ PÉREZ

Ciudad de México, Noviembre 2022

Agradecimientos

Este trabajo se realizó gracias al apoyo del Consejo Mexicano de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico de beca de doctorado (484195). De igual forma, este trabajo fue realizado con el financiamiento del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (FOSISS: A3-S-41131) coordinado por la Dra. Yesennia Sánchez Pérez.

Contenido

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCION.....	3
I.- BASES MOLECULARES DEL CÁNCER.....	3
I.I- BASES MOLECULARES DEL CÁNCER	3
I.II- GENÓMICA DEL CÁNCER	5
I.III- INESTABILIDAD GENÓMICA EN CÁNCER	6
I.IV- IDIOSINCRASIA GENÓMICA MEXICANA Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER	8
II.- ASPECTOS BÁSICOS DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO	9
II.I-ANATOMÍA Y FISIOLÓGIA DEL ESTÓMAGO.....	9
II.II-FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO ..	10
II.III-HISTOPATOLOGIA DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO	12
II.IV-EPIDEMIOLOGIA DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO EN EL MUNDO y MÉXICO	13
III.- ASPECTOS MOLECULARES DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.....	15
III.I- PANORAMA MUTACIONAL DE LAS LESIONES PRENEOPLÁSICAS DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO	15
III.II- PANORAMA MUTACIONAL DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO EN EL MUNDO.....	17
III.III- PANORAMA MUTACIONAL DEL ADENOCARCINOMA GASTRICO EN MEXICO	20
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
METODOLOGÍA.....	24
I.- DISEÑO DEL ESTUDIO.....	24
II.- POBLACION DE ESTUDIO, CRITERIOS DE INCLUSION Y DE EXLUSION	24
III.- RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN CLÍNICA.....	24
IV.- RECOLECCION DE MUESTRAS DE TEJIDO TUMORAL Y ADYACENTE	25
V.- EXTRACCION Y EVALUACION DE LA INTEGRIDAD DEL DNA.....	25
VI.- DETERMINACION DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	25
VII. DETERMINACIÓN DE VIRUS DE EPSTEIN-BARR.....	26
VII.- PREPARACIÓN DE BIBLIOTECA, CAPTURA DE REGIÓN DE INTERÉS	26
VIII.- SECUENCIACIÓN DEL EXOMA.....	27

IX.- FILTRADO, LLAMADO Y ANOTADO DE VARIANTES SOMÁTICAS	27
X.- IDENTIFICACIÓN DE CARGA MUTACIONAL TUMORAL	29
XI.- ANALISIS DE SOBRRERREPRESENTACIÓN.....	29
XII.- ANALISIS DE DIVERSIDAD CLONAL	30
XIII.- COMPARACIÓN DE VARIANTES CON OTRAS POBLACIONES	30
XIV.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
RESULTADOS	32
I.- CARACTERISTICAS CLINICOPATOLOGICAS DE LOS PACIENTES	32
II.- IDENTIFICACIÓN DE <i>H. PYLORY</i> Y EBV	34
III.- CALIDAD DE LA SECUENCIACIÓN	35
III. CARGA MUTACIONAL TUMORAL E HISTOLOGÍA TUMORAL.....	35
IV.- PANORAMA MUTACIONAL DE LOS PACIENTES MEXICANOS	38
IV.I.- VARIANTES SOMÁTICAS E HISTOLOGÍA TUMORAL.....	38
IV.II VARIANTES SOMÁTICAS E INFECCIÓN POR PATÓGENOS	40
IV.III VÍAS DE SEÑALIZACIÓN AFECTADAS POR MUTACIONES CONDUCTORAS	41
IV.IV VARIANTES ESTRUCTURALES	42
IV.V. - VARIANTES ESTRUCTURALES E INFECCIÓN POR PATÓGENOS	45
V. - PROCESOS MUTACIONALES Y SUS ASOCIACIONES CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	47
V. - COMPARACIÓN DE GENES AFECTADOS POR VARIANTES SOMÁTICAS Y VARIACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS ENTRE PACIENTES MEXICANOS Y OTRAS COHORTES	49
IV.VI. - DIVERSIDAD CLONAL Y SU ASOCIACIÓN CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	50
DISCUSIÓN.....	52
CONCLUSIÓN.....	57
PERSPECTIVAS	58
BIBLIOGRAFÍA.....	59

RESUMEN

Los pacientes mexicanos e hispanos, en comparación con otros grupos étnicos, se han asociado a un fenotipo de cáncer gástrico más agresivo con mayor frecuencia de adenocarcinoma gástrico de tipo difuso y una edad más temprana al momento del diagnóstico; esto podría estar relacionado con el panorama mutacional somático del adenocarcinoma gástrico en estos pacientes. Mediante la secuenciación del exoma completo, buscamos elucidar el panorama mutacional del adenocarcinoma gástrico de pacientes mexicanos que fueron tratados en el Instituto Nacional de Cancerología entre 2019 y 2020. Realizamos un análisis estadístico integral para explorar la relación de las variantes somática, variaciones en número de copias edad al momento de diagnóstico y las características clinicopatológicas de los pacientes como histología del tumor y presencia de células en anillo de sello, además de infección por *Helicobacter pylori* y virus de Epstein-Barr. Describimos un panorama mutacional potencialmente diferente entre el adenocarcinoma gástrico difuso e intestinal en pacientes mexicanos. Los pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal tendieron a presentar una mayor frecuencia de mutaciones en *NOTCH1*, aumentos en el número de copias en las citobandas 13.14, 10q23.33 y 12q25.1 y pérdidas en el número de copias en las citobandas 7p12, 14q24.2 y 11q13.1; mientras que los pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo difuso tendieron a presentar una alta frecuencia de mutaciones de *CDH1* y ganancias de número de copias en las citobandas 20q13.33 y 22q11.21. Los pacientes con una edad temprana al momento del diagnóstico presentaron una alta frecuencia mutacional en *CDH1* y ganancias en las citobandas 15q22.2, 12q24.3 y 13q21.2 Estas diferencias podrían explicar la mayor frecuencia de adenocarcinoma gástrico de tipo difuso y una edad temprana al momento del diagnóstico en los pacientes mexicanos. Esta es la primera descripción de un panorama mutacional del adenocarcinoma gástrico en pacientes mexicanos para comprender mejor la tumorigénesis en pacientes hispanos y sentar las bases para descubrir posibles biomarcadores y dianas terapéuticas.

ABSTRACT

Mexican and Hispanic patients, compared to other ethnic groups, have been associated with a more aggressive gastric cancer phenotype with a higher frequency of diffuse-type gastric adenocarcinoma and an early age of disease onset; this could be related to the somatic mutational panorama of gastric adenocarcinoma in these patients. Through whole exome sequencing, we sought to elucidate the mutational landscape of gastric adenocarcinoma from Mexican patients who were treated at the Instituto Nacional de Cancerología between 2019 and 2020. We performed a comprehensive statistical analysis to explore the relationship of somatic variants, variations in the number of copies and the clinicopathological characteristics of the patients, such as tumor histology, age of disease onset and the presence of signet ring cells, as well as *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus infection. We describe a potentially different mutational landscape between diffuse- and intestinal-type gastric adenocarcinoma in Mexican patients. Patients with intestinal-type gastric adenocarcinoma tended to have a higher frequency of affected *NOTCH1*, copy number increases in cytobands 13.14, 10q23.33, and 12q25.1, and copy number losses in cytobands 7p12, 14q24.2 and 11q13.1; while patients with diffuse-type gastric adenocarcinoma tended to have a high frequency of *CDH1* transmission and copy number gains in cytobands 20q13.33 and 22q11.21. Patients with early onset of the disease showed a high frequency of *CDH1* mutations and CNV gains in cytobands 15q22.2, 12q24.3 y 13q21.2. These differences could explain the higher frequency of diffuse-type gastric adenocarcinoma and the early onset of the disease in Mexican patients. This is the first description of a mutational landscape of gastric adenocarcinoma in Mexican patients to better understand tumorigenesis in Hispanic patients and lay the groundwork for discovering potential biomarkers and therapeutic targets.

INTRODUCCION

I.- BASES MOLECULARES DEL CÁNCER

I.I- BASES MOLECULARES DEL CÁNCER

El cáncer es un término que engloba un conjunto de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento descontrolado más allá de los límites del tejido, pudiendo invadir tejidos adyacentes y diseminarse a órganos distantes. Es un proceso que etiológicamente comprende mutaciones o modificaciones epigenéticas en diferentes genes, lo que puede favorecer la proliferación celular y el crecimiento del tejido tumoral (1, 2). Se les conoce como proto-oncogenes a los genes que si llegan a mutarse pueden estimular la proliferación celular, en cambio, se conoce como genes supresores de tumores a aquellos genes que transcriben a proteínas que inhiben la proliferación celular y alteran los procesos de división celular.

En los años 80 se demostró el papel de la proteína ras como oncogén, alentando la búsqueda de las bases moleculares del cáncer (3). Primeramente, *RAS* fue identificado como un gen presente en retrovirus que podía conferir malignidad a células humanas, sin embargo, posteriormente se identificó que mutaciones activadoras de ras pueden conferir las mismas características malignas (3). Así se inició la búsqueda de genes cuyas mutaciones producidas por agentes ambientales, podrían desencadenar proliferación celular, llamándoles protooncogenes (4). Diferentes trabajos llegaron a identificar que las mutaciones en protooncogenes no son el único mecanismo molecular que confiere malignidad a las células y que propicia el desarrollo del cáncer. En el año 2000 Hanahan y Weinberg agruparon estos diferentes mecanismos basándose en 6 características principales, o *Hallmarks* (5). Los cambios moleculares que sufren las células y los tumores se pueden agrupar en diferentes características que generan la malignidad de las neoplasias, estas incluyen:

- Evasión de la apoptosis,
- Autosuficiencia para las señales de proliferación celular
- Insensibilidad a señales supresoras de la proliferación celular
- Angiogénesis sostenida
- Ilimitado potencial de replicación celular

- Invasión de tejidos y metástasis

En años posteriores y con el avance del conocimiento sobre las bases moleculares del cáncer, sumado con el avance de las ciencias ómicas y las técnicas de secuenciación de alta resolución, estas características principales se han rediseñado, incluyendo nuevas dimensiones que abarcan desde la desregulación del metabolismo celular, hasta la inestabilidad genómica y mutacional. También se incluyen *Hallmarks* externos a la célula neoplásica que pueden afectar el microambiente tumoral como lo son un polimorfismo en el microbioma y la respuesta inflamatoria (6, 7). La lista completa de características principales del cáncer se puede observar en la **Figura 1**, extraída de la nueva conceptualización de los *Hallmarks* del cáncer (6).

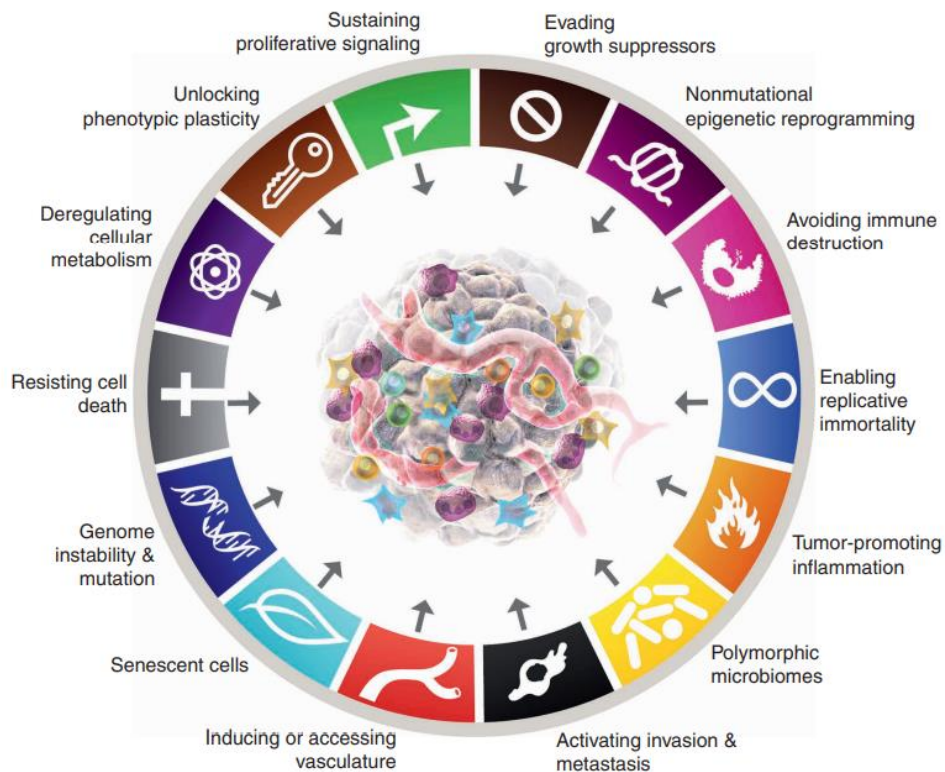


Figura 1. *Hallmarks* del cáncer. Se describen las características principales del cáncer que rigen el desarrollo de esta enfermedad. Adaptado de: Hanahan y Weinberg, *Cancer Discovery* (2022) (6)

I.II- GENÓMICA DEL CÁNCER

Desde la elucidación del genoma humano en el año 2001 (8, 9), las diferentes tecnologías de secuenciación y capacidad bioinformática han permitido revolucionar nuestro entendimiento de las bases moleculares y genéticas del cáncer (10). La genómica implica el estudio de la secuencia del DNA en su totalidad, permitiendo evaluar las diferencias entre el DNA de las células tumorales y las normales. El objetivo del estudio de la genómica del cáncer es identificar las bases genéticas de la iniciación y la evolución celular del cáncer con base en los patrones mutacionales identificados, esto con el fin de desarrollar biomarcadores de utilidad diagnóstica o terapéutica (10, 11) para el manejo de esta enfermedad.

Las mutaciones somáticas se encuentran en todas las células y son consecuencia de diferentes procesos mutacionales que generan combinaciones únicas de variaciones en la secuencia de DNA y son conocidas como firmas mutacionales (12). El espectro mutacional del cáncer es la suma de diferentes procesos o firmas mutacionales que presentan una influencia variable al momento de generar la neoplasia (**Figura 2**). Las mutaciones somáticas pueden ocurrir por pequeñas variaciones espontáneas durante el proceso de replicación, por exposición endógena o exógena a mutágenos, por modificación enzimática del DNA o por mecanismos de reparación alterados (13). Cada tipo de cáncer presenta patrones mutacionales distintos con predominancia o aportación distintiva de diferentes tipos de firmas mutacionales. Se han descrito firmas mutacionales para sustituciones de un solo nucleótido, para sustituciones dobles de nucleótidos y para pequeñas inserciones y deleciones (12). Las firmas asociadas a las sustituciones de un nucleótido (SBS: *single base substitution*) son las más comúnmente descritas y conllevan a seis posibles sustituciones: C>A, C>G, C>T, T>A, T>C y T>G; pero, tomando el contexto de las 2 bases adyacentes a la sustitución, nos da la posibilidad de 96 diferentes firmas. Algunas firmas mutacionales SBS se encuentran asociadas a algún agente etiológico como la firma 1 que se asocia al envejecimiento. Esta firma se genera endógenamente por desaminación espontánea o enzimática de la 5-metil citocina que se transforma en timina (C>T), lo que genera apareamientos erróneos (C:T) a lo largo de la doble cadena del DNA. Esta es una firma muy común

en todos los tipos de cáncer y tiende a correlacionarse con la edad del paciente. Otro ejemplo, es la firma 4 que se asocia al tabaquismo y a hidrocarburos aromáticos policíclicos como el benzo[a]pireno, que se caracterizan por sustituciones de citocinas por adeninas (C>A).

I.III- INESTABILIDAD GENÓMICA EN CÁNCER

Cada vez que una célula se divide y replica su material genético, se encuentra propenso a cometer errores que se traducen en mutaciones que pueden pasar a las células hijas (14). En células normales muchos de estos errores son reparados por diferentes mecanismos de reparación del DNA, sin embargo, en las células cancerosas estos mecanismos tienden a encontrarse comprometidos (15).

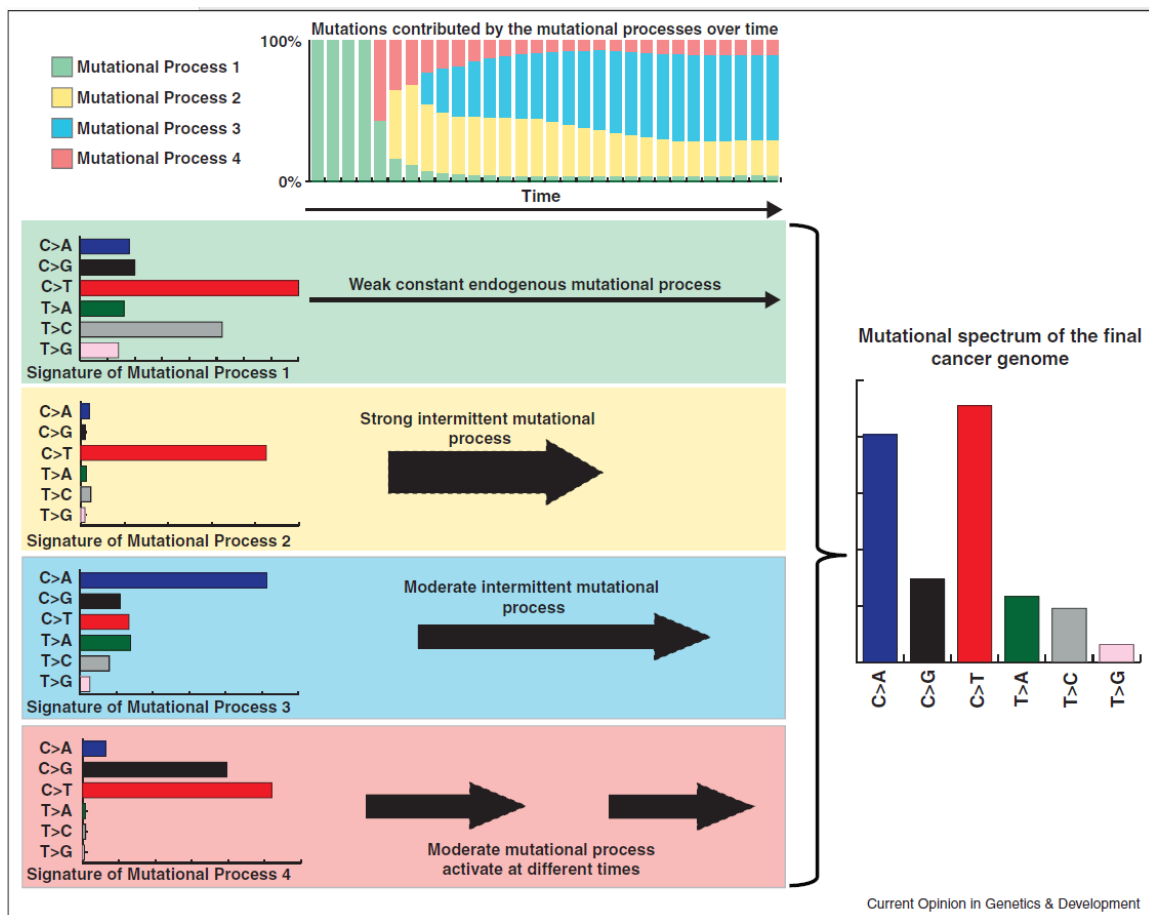


Figura 2. Proceso mutacional del cáncer. Se describe cómo al momento de evaluar el exoma de un tumor, se pueden identificar patrones mutaciones características de procesos mutacionales diferentes, teniendo cada proceso una contribución en mayor o

menor medida al desarrollo del tumor. Adaptado de Alexandrov et al. *Current opinion in Genetics and Development* (2014) (13).

El cáncer evoluciona en un proceso reiterativo de expansión clonal, diversificación genética y selección clonal, dentro del panorama adaptativo del microambiente del tejido tumoral. La inestabilidad genómica es el principal resultado de este proceso, y se da por la diversidad de subpoblaciones celulares dentro del tumor, así como por la heterogeneidad de los tumores en los sitios de metástasis (16). La inestabilidad genómica incluye pequeñas variaciones estructurales conocidas como InDels (*Insertions and Deletions*) y mutaciones puntuales conocidas como SNV (*Single nucleotide variations*). También puede incluir variaciones en el número y la estructura de los cromosomas (14).

Un aumento excesivo en la frecuencia de mutaciones puntuales e InDels puede derivar en un estado conocido como Inestabilidad microsatelital (MSI: *Microsatellite instable*). Los microsatélites son pequeñas secuencias repetidas que pueden ir de 1 a 6 nucleótidos y que se encuentran dispersos por todo el genoma (17). Esta alta frecuencia de mutaciones en los microsatélites se encuentra principalmente atribuida a mutaciones en genes relacionados con el mecanismo de reparación de bases mal apareadas, entre ellos: *MSH1-6*, *MLH1*, *MLH3*, *PMS1* y *PMS2*. El sistema de reparación de bases mal apareadas, opera removiendo las lesiones en las bases del DNA que se pueden generar por agentes externos y pueden llegar a producir desaminación, metilación u oxidación del genoma (18). Si bien, la alta tasa mutacional que presentan los tumores con MSI parecieran presentar un pronóstico desalentador, los pacientes con este fenotipo presentan un mejor pronóstico que aquellos denominados microsatélite estable (MSS: *Microsatellite Stable*), esto se ha observado en diferentes tipos de tumores sólidos, incluyendo el cáncer gástrico (19, 20).

Otro evento asociado a la inestabilidad genómica es la inestabilidad cromosómica (CIN: *Chromosome Instable*). Esta se describe como un incremento en el número de reordenamientos que presentan los cromosomas durante la mitosis (21). Los

reordenamientos pueden conllevar a incremento en la ploidía de la célula, variaciones en el número de copias de los genes (CNV: *Copy Number Variations*), pérdida de heterocigosidad (LOH: *loss of heterozygosity*), además de traslocaciones y fusiones de genes. Mutaciones en algunas proteínas de la familia de Bub y Mad, además de Shogushin, Aurora B, Plk1, y PP2A que controlan y monitorean el huso mitótico se han asociado a CIN (22). Los pacientes con tumores con CIN, generalmente se asocian con mayor frecuencia al desarrollo de metástasis, resistencia a la quimioterapia y a un mal pronóstico (23).

I.IV- IDIOSINCRASIA GENÓMICA MEXICANA Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER

La mayoría de la población mexicana, al igual que otras poblaciones en Latinoamérica, es considerada mestiza. Esto debido a los acontecimientos históricos de colonización que se suscitaron en la región y que condujeron a la mezcla genética entre poblaciones nativo-americanas, europeas y africanas, principalmente. Así pues, al evaluarse la subestructura genética nativo americana en México, se reportan variaciones genéticas asociadas a las regiones geográficas del país. En la región norte impera la ascendencia europea sobre la Nativo americana (Tarahumara y Seri). En cambio, en el centro sur predomina la ascendencia nativo-americana (Nahuas y Zapotecas), al igual que en la península de Yucatán (Maya) (24, 25).

Esta mezcla genética conlleva a una idiosincrasia de la población mexicana que puede desencadenar el desarrollo de enfermedades o diferente respuesta a los tratamientos. En cuanto al desarrollo de enfermedades, se han identificado mutaciones fundadoras en población mexicana, principalmente de la región centro-sur del país, que incrementan el riesgo a desarrollar diferentes padecimientos. Por ejemplo, la variante p.Ile269Asn que disminuye la presencia del receptor a melanocortina 4 (*MC4R*) en la superficie celular, se ha reportado como mutación fundadora en la población mexicana. Esta mutación contribuye a la alta incidencia de obesidad en el país y además se encuentra asociada con un riesgo 2 veces mayor de presentar Diabetes Mellitus tipo II (26, 27). De igual forma se han estudiado las variantes de diferentes proteínas de importancia en farmacogenómica incluyendo citocromos, transportadores y enzimas de fase II (28-30), presentando

la población mestiza mexicana mayor variabilidad en estas proteínas que la población nativo mexicana (31).

Pensando en esta idiosincrasia genética, se han realizado diferentes estudios para comprender como se comporta la biología de tumores neoplásicos de pacientes mexicanos en comparación a otros grupos étnicos. Así se identificó a la delección del exón 9 al 12 *BRCA1* como variante fundadora para población mexicana. Esta es la mutación de *BRCA1* más frecuentemente encontrada en pacientes mexicanas diagnosticadas con cáncer de ovario, presentándose entre 28.2% y 43% de los casos (32). En el caso de cáncer de seno, se ha asociado al tipo más agresivo, el triple negativo (33). De igual forma, al comparar la influencia de la ancestría sobre las variantes somáticas encontradas en el cáncer de pulmón, se ha identificado una correlación inversamente significativa entre la ancestría nativo americana (mexicana y colombiana) y la carga mutacional del tumor. También se identificó una correlación positiva con mutaciones en *EGFR*, específicamente mutaciones conductoras, y una correlación negativa con *KRAS* y *STK11* (34). De igual forma, en mexicanos se han reportado variantes somáticas inéditas del gen *CDH1* en pacientes con cáncer gástrico, mayor frecuencia de genes farmacológicamente accionables en cáncer de seno, y nuevas mutaciones mitocondriales en cáncer de próstata (35-40).

Con base en los diferentes estudios realizados en pacientes mexicanos se ha demostrado que la idiosincrasia genética si juega un papel importante en la biología de las neoplasias, pudiendo influenciar aspectos clínicos como su diagnóstico y tratamiento. Sin embargo, el panorama de esta interacción aún no es clara en algunas neoplasias, por lo que es necesario continuar con los esfuerzos para elucidarlo.

II.- ASPECTOS BÁSICOS DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

II.I-ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL ESTÓMAGO

El estómago forma parte del sistema gastrointestinal. Se encuentra conectado al esófago en su parte superior mediante la unión esofagogástrica y con el intestino delgado en su parte inferior mediante el píloro (41). Inmediatamente después de la

unión esofagogástrica, se encuentra el *cardias*, en la parte superior se encuentra el fondo, seguido por el cuerpo, con su curvatura mayor y menor. Posteriormente sigue el antro hasta llegar al píloro (41).

La mucosa gástrica cuenta con 3 principales tipos de glándulas. Las glándulas cardiacas, encontradas en el *cardias* y que contienen células foveolares que producen moco. También se encuentran las células oxínticas que se encuentran en la parte del fondo y el cuerpo del estómago, estas incluyen células parietales y zimógenas que son las encargadas de la producción de ácido clorhídrico y pepsinógeno, respectivamente. Por último, encontramos a las glándulas pilóricas que contienen células secretoras de moco y a células entero-endócrinas G que son las encargadas de producir gastrina (42).

II.II-FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

Diferentes son los factores de riesgo que se han asociado al desarrollo del adenocarcinoma gástrico (43). La bacteria *Helicobacter pylori* (*H. Pylori*) fue uno de los primeros patógenos asociados al desarrollo del adenocarcinoma gástrico (44). En 1994, el *H. Pylori* fue declarado por la agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC: *International agency for research on cancer*) como un carcinógeno tipo I, con base a los estudios epidemiológicos en los que encontraron una relación causal directa entre la infección por *H. pylori* y cáncer gástrico. El *H. pylori* es una bacteria gram negativa flagelada que se encuentra normalmente en alimentos mal conservados (45). Este patógeno infecta la mucosa gástrica, colonizando principalmente las regiones distales del estómago generando lesiones pre-neoplásicas que pueden progresar a adenocarcinoma gástrico (46). Se han identificado 2 factores patogénicos principales del *H. pylori*, CagA (*Cytotoxin-associated gene A*) y VacA (*Vacuolating cytotoxin gen*). Al ingresar el factor de virulencia CagA a las células de la mucosa gástrica, este es fosforilado por proteínas de la familia Src lo que lleva a su interacción y unión a SHP2. CagA-SHP2 activan la vía de señalización de Erk-MAP de manera dependiente e independiente de Ras. De igual forma, se ha visto que este dímero, activa de forma directa la vía de β -catenina al interactuar con MET y la vía de señalización de PI3K-AKT (47, 48). La activación de estas vías de señalización promueve la proliferación celular

(Figura 3). En el caso de VacA, este factor se ha asociado a diferentes procesos como la vacuolización, formación de canales de membrana, apoptosis, respuesta inflamatoria, entre otros. VacA también activa la vía de β -catenina de forma dependiente de la vía de señalización de PI3K-AKT favoreciendo la proliferación celular y la respuesta inflamatoria (47). La presencia y patogenicidad de estos factores varían dependiendo de la cepa de *H. pylori*, por lo tanto, no todos los pacientes infectados con esta bacteria desarrollan adenocarcinoma gástrico (49, 50). De hecho, se ha reportado que la infección por *H. pylori* de cepas patógenas puede incrementar hasta 6 veces el riesgo de desarrollar adenocarcinoma gástrico dentro de los 10 años después del diagnóstico de la infección (43).

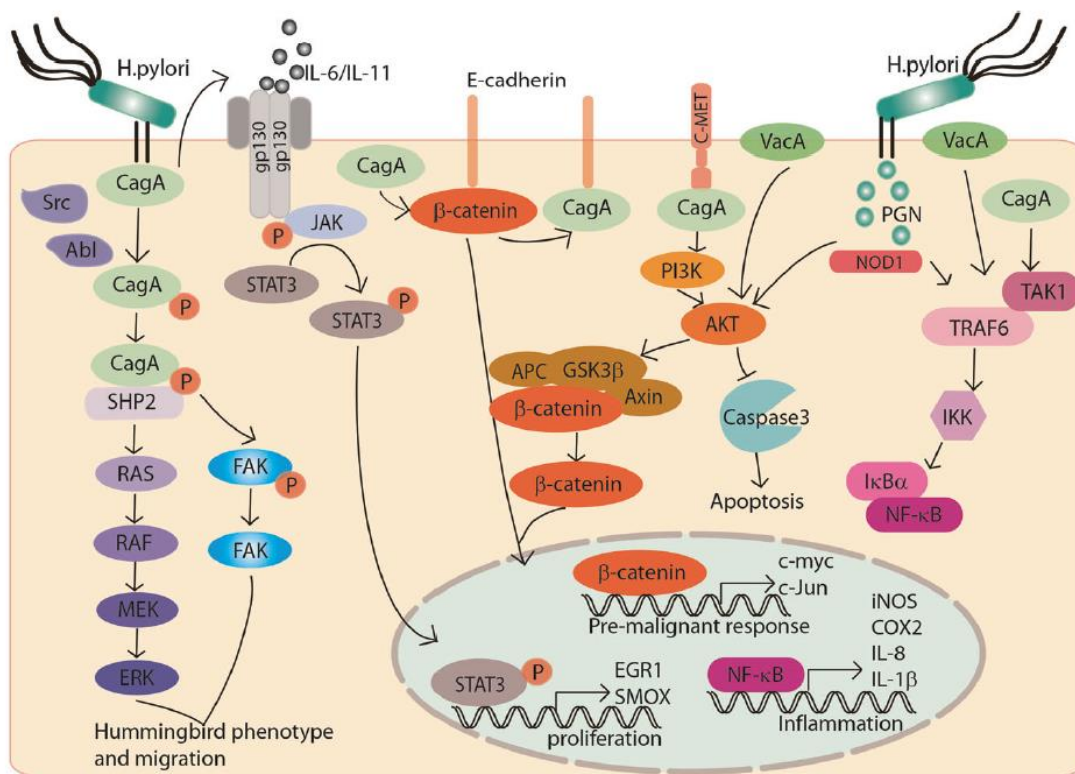


Figura 3. Mecanismo molecular de patogénesis del *Helicobacter pylori*. Vías de señalización activadas por los factores patogénicos CagA y VacA que estimulan la proliferación celular y la inflamación del tejido gástrico. Adaptado de Zhao Y. et al. *Oncogene* 2020 (47).

Otro factor de riesgo en el desarrollo del cáncer gástrico es el virus del Epstein Barr (EBV: *Epstein-Barr Virus*). El EBV es un virus de doble cadena de DNA que pertenece a la familia de los gamma herpes virus que predominantemente establece una infección latente en linfocitos B y células epiteliales (51). El EBV se ha asociado con varios tipos de neoplasias, incluido el cáncer gástrico (51). Al colonizar las células epiteliales, el EBV introduce su material genético en el genoma del huésped para producir diferentes proteínas virales, entre ellas la proteína latente de membrana (LMP1), LMP1, activa diferentes metiltransferasas como las DNMT's 1, 3a y 3b lo que produce un patrón de metilación del genoma que ayuda al virus a esconderse de las células de la respuesta inmune del huésped (51, 52). En México, al igual que en otros países se reporta que aproximadamente el 10 % de los pacientes con adenocarcinoma gástrico, presentan infección positiva a EBV (53). De hecho, los pacientes con adenocarcinoma gástrico con infección a EBV presentan características moleculares muy particulares como alta frecuencia de mutaciones en *PIK3CA*, así como frecuente sobreexpresión de JAK2 y PD-L1 (54).

El tabaquismo es otro factor de riesgo que se ha asociado al desarrollo de múltiples tipos de cáncer, incluyendo el adenocarcinoma gástrico. El 11% de los casos de adenocarcinoma gástrico se ha asociado al tabaquismo, sin embargo, en regiones como Europa, estos valores ascienden hasta un 17% (43). Múltiples son los mecanismos moleculares descritos que explican cómo el humo del tabaco podría desencadenar un proceso cancerígeno, ya sea por activación del receptor de compuestos aromáticos o por generación directa de aductos en el DNA que pueden alterar la replicación de las células (55, 56). La exposición al humo de tabaco genera un patrón mutacional característico de sustituciones sencillas C>A, las cuales generan la firma mutacional SBS04. Un patrón similar se produce con los hidrocarburos aromáticos y los componentes del tabaco como el benzo[a]pireno. Deleciones simples de citocinas y sustituciones dobles tipo CC>AA también se han asociado a la exposición al humo de tabaco (12).

II.III-HISTOPATOLOGIA DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

En 1965 el patólogo sueco Laurén propuso la primera clasificación histopatológica del adenocarcinoma gástrico. Basándose en las características morfológicas del

tejido lo clasificó en adenocarcinoma intestinal, difuso y mixto (57). El primero se denomina así, debido a su semejanza con el tejido intestinal, ya que el tejido neoplásico presenta una forma ciliar. El adenocarcinoma gástrico tipo difuso, se debe a su celularidad, a lo poco diferenciado del tejido original que se suele encontrar en el tejido neoplásico y a la dispersión celular que se observa (58). Este tipo también se asocia con mayor presencia de formaciones celulares que asemejan a anillos de sello, esto debido a que las células presentan gran cantidad de mucina en su citoplasma, lo que desplaza el núcleo hacia la periferia, cercano a la membrana celular (59). El último tipo de adenocarcinoma gástrico denominado mixto, presenta características de ambos tipos de adenocarcinoma o aquellos de los que no se puede hacer una distinción precisa. Hasta la fecha esta clasificación sigue vigente y sigue utilizándose en la práctica clínica.

II.IV-EPIDEMIOLOGIA DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO EN EL MUNDO y MÉXICO

Actualmente el adenocarcinoma gástrico se encuentra a nivel mundial en la sexta posición de las neoplasias más comunes con una incidencia promedio de 11.1 pacientes por 100 000 habitantes, y en mortalidad se encuentra en el quinto lugar con 7.7 muertes por cada 100 000 habitantes. Además, es la segunda neoplasia del sistema digestivo de mayor incidencia, justo por debajo del cáncer colorrectal. Son los países asiáticos los que encabezan la lista en cuanto a la incidencia; Mongolia, Japón, la República de Corea, Tayikistán y China se encuentra en los primeros 5 lugares. Después de Asia, Latinoamérica es la región que reporta más casos de esta neoplasia, con un promedio de incidencia de 8.3 pacientes por cada 100 000 habitantes. Perú, Haití, Chile, Colombia y Costa Rica encabezan la lista como los países con mayor incidencia de adenocarcinoma gástrico en Latinoamérica (60).

A nivel mundial, de 1980 a 2018, se ha reportado un descenso neto en la incidencia de esta neoplasia, sin embargo, se reporta un aumento de incidencia en pacientes jóvenes menores de 40 años (61, 62). Datos del programa de vigilancia, epidemiología y resultados finales (SEER, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos, recolectados entre el 2007 y 2015 identificaron un aumento en los casos de cáncer gástrico de la región distal en pacientes menores de 50 años (63).

La disminución en la incidencia del cáncer gástrico se ha atribuido a diferentes factores, incluyendo el control de la infección por *Helicobacter pylori* debido a un mayor cuidado en los procesos de conservación de los alimentos (64, 65) y al tratamiento farmacológico ampliamente utilizado a nivel mundial (66). Se estima que la erradicación del *Helicobacter pylori* disminuye la incidencia del cáncer gástrico entre 33 y 47 % (44, 49). De igual forma, cambios en hábitos alimenticios y estilos de vida más saludables que se han adoptado en los últimos años, pueden tener un impacto en la disminución de la incidencia global de cáncer gástrico, especialmente en el adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal.

De acuerdo con un reporte reciente de la organización mundial para la salud, la prevalencia del tabaquismo ha disminuido de un 33.5 % en el año 2000 a 29.3 % en el 2015, y se estima que en el 2027 será de 27.7 % (67, 68). Por lo que se espera que esta disminución en la prevalencia del tabaquismo tenga una repercusión positiva en incidencia del adenocarcinoma gástrico

El elevado consumo de sal es otro factor de riesgo asociado al desarrollo de adenocarcinoma gástrico, países como China, Japón, UK entre otros, están tomando medidas para reducir el consumo de sal en sus poblaciones (68, 69). Por ejemplo, China reportó un descenso del 22 % de consumo de sal en su población entre el 2000 y el 2011 (70).

En México, sin embargo, se reportó que el consumo de sal se mantuvo constante entre el 2006 y 2016 (71). De acuerdo con el estudio SALMEX, el consumo de sal promedio de la población mexicana fue de 3.5 g al día, un exceso de 75 % sobre los 2 g diarios recomendados (72). En cuanto al tabaquismo, en México se reportó una reducción del 11 % en la prevalencia de fumadores entre el 2002 y 2016 (73). Finalmente, también se ha observado un descenso en cuanto a la incidencia de infección por *H. pylori* en población mexicana. En el cuarto censo mexicano sobre la prevalencia de *Helicobacter pylori* reporta una disminución de hasta un 20 %, principalmente en adultos jóvenes y niños (74). Modificaciones en la prevalencia de los diferentes factores de riesgo, pueden influir en la incidencia del adenocarcinoma

gástrico, desafortunadamente, al no contar México con un registro oficial de pacientes con cáncer, estos cambios pueden pasar desapercibidos.

Diferentes estudios epidemiológicos realizados en población mexicana han reportado el comportamiento del cáncer gástrico en México. Instituciones de tercer nivel de la Ciudad de México que incluyen el Hospital General de México, el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, el Hospital Español y el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, han reportado un descenso de hasta un 20 % en la incidencia del cáncer gástrico entre los años 1978 y 2012 (75). Por otro lado, en el estado de Veracruz se ha observado un aumento en la frecuencia anual proyectando un incremento de casos del 7.22 % al 2025 (76). En el estado de Chiapas, también se ha reportado un incremento en el número de pacientes diagnosticados con cáncer gástrico entre los años 2007 y 2014 (77). De hecho, se ha reportado una distribución desigual de su incidencia del adenocarcinoma gástrico afectando principalmente a estados de la región centro sur del país especialmente en los estados de Chiapas, Oaxaca y Guerrero (78).

Cabe resaltar que en México se ha reportado una alta incidencia de adenocarcinoma de tipo difuso. Un estudio retrospectivo en el que se evaluaron los registros de pacientes con adenocarcinoma gástrico atendidos en el Hospital Juárez de la Ciudad de México entre los años 2003 y 2012, identificó que el 55.2 % de los pacientes tratados presentaron una histología de adenocarcinoma gástrico tipo difusa, en comparación al 28.2 % que presentaron histología de tipo intestinal. El resto de pacientes presentaron histología mixta o indeterminada (79).

III.- ASPECTOS MOLECULARES DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

III.I- PANORAMA MUTACIONAL DE LAS LESIONES PRENEOPLÁSICAS DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

Caracterizar las lesiones precancerosas en sus etapas más tempranas es uno de los pilares principales para comprender los procesos moleculares relacionados con la iniciación y el desarrollo del cáncer. El análisis de lesiones premalignas del adenocarcinoma gástrico revela un panorama mutacional totalmente distinto al relacionado con el adenocarcinoma. Mutaciones en *APC* se encontraron presentes

en todos los pacientes con lesiones preneoplásicas evaluados independientemente de su fenotipo MSI, sin embargo, mutaciones en *ARID2* fueron similares a las muestras de adenoma con fenotipo MSI (80). En el 24 % de los pacientes con lesiones premalignas de tipo intestinal (displasia/neoplasia intraepitelial) se identificaron mutaciones en *ARID2*. Las lesiones en *ARID2* siempre son concurrente con mutaciones *APC* (las más frecuentes en el 76 % de los pacientes). Sin embargo, estas mutaciones concurrentes entre *ARID2* y *APC* son mutuamente excluyentes con las mutaciones de *TP53*. Los pacientes con displasia de alto grado/neoplasia intraepitelial y con mutaciones en *TP53*, presentaron más probabilidad de que la lesión evolucionaran a carcinoma (81).

Algunas diferencias genómicas entre el adenocarcinoma gástrico y la metaplasia intestinal incluyen menor frecuencia de genes supresores de tumores comúnmente mutados (*TP53*, *ARID1A* y *FBXW7*), amplificación del cromosoma 8 y acortamiento de los telómeros (82). Por otro lado, un análisis de diversidad clonal de lesiones sincrónicas de adenoma y adenocarcinoma mostró que no todas las lesiones de adenoma evolucionan a adenocarcinoma gástrico, de hecho, ambas tienen un ancestro común con divergencia temprana y evolución paralela, lo que impulsa la idea de que la concomitancia de lesiones de adenoma y carcinoma en un tumor, no implica que el adenoma evolucione a carcinoma (83).

El *H. pylori* es un patógeno fuertemente asociado al desarrollo del adenocarcinoma gástrico. La secuenciación del exoma de la gastritis precancerosa por *H. pylori* revela el predominio de la firma mutacional C:G>T:A en las muestras independientemente de su estado de microsatélite. Se encontró que los procesos de adhesión celular, metabolismo, endocitosis y la organización de la estructura extracelular son las vías de señalización mutadas con mayor frecuencia en este tipo de lesiones (84). Curiosamente, un riesgo reducido de infección por *H. pylori* (OR = 0,80; IC 95 %: 0,66-0,96), gastritis atrófica crónica (OR = 0,66; IC 95 %: 0,45-0,97) y metaplasia intestinal (OR = 0,57; 95 % CI: 0,36-0,90) se observó en pacientes chinos con polimorfismo *TLR1* rs4833095 (85).

III.II- PANORAMA MUTACIONAL DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO EN EL MUNDO

Un proceso mutacional organizado por etapas como el que presenta el cáncer de colon aún no ha sido caracterizado para el adenocarcinoma gástrico, pero los esfuerzos apuntan en esa dirección. Al comparar el genoma de pacientes en etapa temprana y avanzada no se han encontrado diferencias significativas entre las firmas mutacionales C > T y G > A, sin embargo, se encontró una mayor frecuencia de mutaciones C > G en el tipo GA intestinal (86). Al evaluar mutaciones no sinónimas, los pacientes en etapa temprana muestran menor número de mutaciones en comparación con la etapa avanzada, además de mutaciones exclusivas en los genes *DYRK3*, *GPR116*, *MCM10*, *PCDH17*, *PCDHB1*, *RDH5* y *UNC5C* (86).

Los tumores de adenocarcinoma gástrico tipo difuso en etapas tempranas o tardías muestran tasas de mutación promedio similares de 69.7 frente a 74.3 mutaciones/mb. En las etapas tempranas se observan enriquecidas con las vías señalización asociadas a la adhesión celular, los genes relacionados con el transporte de solutos y, curiosamente, los genes relacionados con el neurodesarrollo (87). Importantly, el adenocarcinoma gástrico tipo difuso más invasivo, a menudo se encuentra asociado a las poblaciones hispanas, sin embargo, los estudios genómicos se han realizado en poblaciones caucásicas o asiáticas.

El adenocarcinoma gástrico esporádico de tipo difuso de inicio temprano presenta una frecuencia significativamente mayor de mutaciones en *CDH1*, *TGFB* y una frecuencia más baja mutaciones en *RHOA* en comparación con el inicio tardío; encontrándose mutaciones de *TGFBR1* específicas en las mujeres (88). Vale la pena resaltar que la expresión diferencial de *RHOA* a lo largo de las etapas de la enfermedad se observó entre los pacientes asiáticos, pero no en la población caucásica (89). De hecho, solo el 3,9 % de los pacientes centroeuropeos resultaron positivos para las mutaciones de *RHOA*, en contraste con el 23,33 % de los pacientes japoneses (90, 91). En términos de CNV, una amplificación focal recurrente en 10.q26.13, donde se encuentra el gen *FGFR2*, y la delección de 3p21.1, que alberga 161 genes, fueron asociadas significativamente en pacientes

con adenocarcinoma gástrico esporádico de tipo difuso de inicio temprano (88). Importantemente, no se encontró ninguna influencia étnica del desequilibrio alélico 3p (pérdida y ganancia) entre las muestras de pacientes caucásicos americanos e hispanos mexicanos (92).

La secuenciación del exoma del adenocarcinoma gástrico con clasificación Borrmann tipo IV o *linitis plástica*, comúnmente asociado al adenocarcinoma gástrico de tipo difuso, reveló un panorama mutacional asociado al cáncer de tipo difuso con *TP53*, *ARID1A* y *RHOA* como genes frecuentemente mutados. Las mutaciones recurrentes en el sitio de *splicing* de *CDH1* (L214R) y el oncogén *RAS* fueron frecuentes en estos pacientes (93). Otro gen fuertemente mutado y asociado con el adenocarcinoma gástrico de tipo difuso es el gen *RHOA*, que se encuentra mutado en casi el 25.3% de los pacientes japoneses con *hotspots* en Tyr42, Arg5 y Gly17 (91). En una cohorte estadounidense con adenocarcinoma gástrico de tipo difuso, el gen que se encontró más mutado en esta cohorte fue el *KMT2C* (41 %). Este gen relacionado con la lisina metiltransferasa se asoció con la invasión linfática, vascular y neural, así como con el estado TNM: los pacientes con expresión de *KMT2C* tuvieron menos invasión, menor estado TNM, supervivencia libre de recurrencia y mejor supervivencia general que los pacientes con baja expresión de *KMT2C*. No se encontró asociación en esta cohorte con cáncer gástrico tipo intestinal (94).

Al realizar un análisis mutacional diferencial entre el adenocarcinoma gástrico de tipo difuso e intestinal, se observó un menor número de variaciones de un solo nucleótido en el adenocarcinoma gástrico tipo difuso y una mayor frecuencia de variaciones estructurales, como duplicaciones, deleciones y fusiones en tándem en tipo adenocarcinoma gástrico tipo intestinal (95). El análisis de secuenciación del genoma completo reveló un aumento común de zonas de deleción en los cromosomas 17, 18, 19, 20, 21, 22 y especialmente en el cromosoma 16 donde se ubica el gen *CDH1*; por otro lado, los cromosomas 3, 7, 8 y 13 mostraron un mayor número de duplicaciones (55, 56) en pacientes con adenocarcinoma gástrico, independientemente de su histopatología (96, 97).

La formación de células en anillo de sello es una disposición histológica que se encuentra comúnmente asociada al adenocarcinoma gástrico de tipo difuso y que se relaciona con una baja supervivencia global. Un análisis de secuenciación del exoma completo de pacientes con alta presencia de formaciones de anillo de sello (> 80 %) encontró que la pérdida de la copia del gen *FHIT* estaba presente en el 46.9% de los pacientes, además de ser *TP53* el gen mutado con mayor frecuencia (98) . Otra peculiaridad molecular que se encuentra comúnmente en formaciones de células en anillo de sello son las fusiones *CLDN18-ARHGAP26/6*, que tienden a estar presentes junto con mutaciones en *ARHGEF* o *ARHGAP* y parecen ser mutuamente excluyentes con mutaciones en *CDH1* (98). También se encontró que la fusión de *CLDN18-ARHGAP26/6* estuvo presente en una cohorte china, especialmente en pacientes del sexo femenino, comparado con la cohorte de la TCGA (98). La distribución de células en anillo de sello entre los grupos étnicos no está clara. Si bien, estudios asiáticos reportan una prevalencia de 6 a 15 % de células en anillo de sello en contraste con el 20 % a 30 % reportado por estudios caucásicos americanos/europeos (99). Además, deleciones en 9p y amplificaciones en 20q se encuentran relacionadas con la formación de células en anillo de sello (100); de igual forma, mutaciones exclusivas del adenocarcinoma gástrico de tipo difuso en los genes *KMT2C* y *TAF1* son dos veces más frecuentes en formaciones de células en anillo de sello que en tejidos sin este fenotipo (100).

Con respecto al fenotipo MSI la exploración del panorama mutacional mostró que las transiciones C > A eran comunes en el 42 % de los tumores MSS, mientras que las transiciones C > T eran prominentes en el 51 % de los tumores MSI. *TP53* y *PIK3CA* fueron los únicos genes que se encontraron mutados en ambas condiciones (101). Adicionalmente, las mutaciones en el gen *TP53* se encontraron significativamente más altas entre los pacientes afroamericanos que entre los asiáticos, hispanos y caucásicos, independientemente del estado del microsatélite (102). El panorama mutacional parece estar influenciado por el fenotipo MSI de los pacientes. Los pacientes MSI presentaron altamente mutados los genes: *ZNF167*, *FAT4*, *APC*, *ARID1AD*, *CDH1*, *CTNNB1* y *SMAD4* (101). Además, se encontró que

las alteraciones en la vía PI3K estaban altamente asociadas con MSI que no se identificaron en pacientes MSS (103).

Al evaluar los ganglios afectados en pacientes con adenocarcinoma gástrico con fenotipo MSI o MSS, la firma molecular SBS06, relacionada con la mecanismo de reparación de DNA de bases mal apareadas, se expresó más en los ganglios positivos de los pacientes con MSI, en cambio la firma SBS01 (relacionada con el proceso de envejecimiento), se expresó con mayor frecuencia en los ganglios positivos de los pacientes con MSS (104). El análisis sub clonal del tejido primario y las mutaciones de los ganglios linfáticos mostró una arquitectura conservada en gran medida en ambos tejidos, lo que sugiere que las células de metástasis pueden provenir de subclones homogéneos del tejido primario (104).

III.III- PANORAMA MUTACIONAL DEL ADENOCARCINOMA GASTRICO EN MEXICO

El panorama mutacional actual del adenocarcinoma gástrico en México se ha basado en estudios enfocados en identificar variantes germinales puntuales tanto patogénicas como de riesgo.

La mayor frecuencia de casos de adenocarcinoma de tipo difuso reportados en el país ha atraído especial atención en la identificación de variantes patogénicas asociadas al gen *CDH1* que codifica para la proteína E-cadherina. Algunas variantes germinales se asocian con el desarrollo de adenocarcinoma gástrico hereditario de tipo difuso. En población mexicana se han identificado 2 variantes germinales patogénicas en su región promotora (c.160C>A, c.347GInsGA y c-472DelA) (105-107). y una delección en la región codificante (c.377Del) (108) que se encuentran asociada a una disminución en su transcripción por ende a un aumento en el riesgo a desarrollar adenocarcinoma gástrico. En pacientes de Guadalajara con cáncer gástrico de inicio temprano (< 50 años), se evaluó la presencia de variantes germinales de *CDH1*, y se encontraron 12 variantes polimórficas de las cuales la variante del exón 13 (c.2076T>C) y del intrón 15 (c.2439+177DelT) fueron las más frecuentes (109).

En pacientes con adenocarcinoma de tipo difuso y mixto se han reportado 17 variantes somáticas diferentes de *CDH1*, dentro de estas, cuatro que no se han reportado en otras poblaciones, las variantes incluyen c.-137C>A localizada en la región promotora, c.1138-92 DelA y c.1138-75 InsA encontrada en el intrón 8 y c.1221insC en el exón 9 (36).

En población mexicana, también se han estudiado variantes germinales que pueden aumentar o influir en el efecto de factores de riesgo y desencadenar el proceso neoplásico. Estas variantes germinales asociadas a la respuesta inflamatoria que afectan algunas citocinas se encuentran IL-4 (c.-590 C > T), IL-6 (c.573 G > C), IL-10 (c.-1082 A > G, c.-819 C > T y c.-592 C > A) e INF- γ (c.-1615 C > T). Sin embargo, de las variantes estudiadas solamente la variante IL-10 c.-819C<T presentó un efecto asociado a la disminución del riesgo de desarrollar adenocarcinoma gástrico, las otras variantes no modificaron el riesgo de desarrollar adenocarcinoma gástrico (110).

A través de un estudio de casos y controles con pacientes con adenocarcinoma gástrico de Puebla, Ciudad de México y Yucatán se evaluó la asociación de riesgo a desarrollar cáncer gástrico con las variantes de *IL1RN VNTR* (*variable number of tandem repeats*), IL1 β (c.-31C>T y c.+3954C>T) y IL10 (c.-592C>A). Se encontró un elevado aumento en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico tipo intestinal en pacientes con infección de *H. pylori* CagA positivo y los genotipos IL1 β c-31 CC y IL10 c.-592 CC. Cuando la cohorte fue estratificada por la infección, no se encontró asociación de los demás genotipos con la modificación del riesgo a desarrollar cáncer gástrico (111).

También se han estudiado, las variantes germinales de algunos oncogenes y su participación en el riesgo de desarrollar adenocarcinoma gástrico. Variantes en la región promotora de *EGFR* (c.-216G>T, c.-191C>A) (112) al igual que variantes intrónicas de *ERBB2* (c.-18+1514C>T, c.-18+3073G>T, c.3418C>T) (113) se asociaron a un mayor riesgo de desarrollar adenocarcinoma gástrico. De igual forma, el genotipo Arg/Arg del codón 72 de *TP53* se asoció con un aumento en el riesgo a desarrollar adenocarcinoma gástrico distal, haciéndose más notorio al

hacer la corrección por sexo, edad y presencia de *H.pylori* (114). En contraste, la variante de TGF- β (c.-509 C<T) que produce un incremento en sus concentraciones plasmáticas, se ha asociado con una reducción en el riesgo (110).

Previamente, nuestro grupo de investigación exploró la asociación del índice nutricional, el panorama mutacional y la sobrevida de pacientes mexicanos con adenocarcinoma gástrico (115). El índice nutricional y el índice de masa corporal se identificaron como factores pronósticos independientes de la sobrevida de los pacientes. En cuanto al panorama mutacional; *NOTCH1*, *GNAS*, *FBXW7* and *IDH2* fueron los genes más frecuentemente mutados, difiriendo de los resultados encontrados en otras poblaciones donde *TP53*, *PIK3CA*, *ARID1A* y *CDH1* son los genes más frecuentemente mutados (116). También evaluamos las firmas mutacionales de sustitución de una base y se identificaron como frecuentes las firmas asociadas al envejecimiento (SBS01), asociada al cáncer de hígado (SBS23) y la asociada a defectos en el sistema de reparación de bases mal apareadas (SBS06).

El adenocarcinoma gástrico tipo difuso se presenta con mayor frecuencia en población mexicana, a diferencia de otras poblaciones como la caucásica. Si bien, se han realizado esfuerzo por conocer algunos cambios mutacionales que pueden suceder en pacientes mexicanos con adenocarcinoma gástrico, los estudios realizados se han enfocado en algunos genes aislados y no en el panorama mutacional completo. El conocer las diferencias genéticas entre ambos tipos de adenocarcinoma gástrico no solo nos permitirá entender la biología tumoral, si no también poder ofrecer un tratamiento integral para cada uno de los tipos de tumores, con bases también en las características clínico-patológicas de los pacientes.

HIPÓTESIS

Existen variantes genéticas diferentes entre los tipos de adenocarcinoma gástrico difuso e intestinal, que se encuentran relacionadas a parámetros clínico-patológicos como la histología tumoral y la edad al momento del diagnóstico de pacientes mexicanos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las variantes genéticas distintivas que se encuentran asociadas a la histología tumoral, edad al momento del diagnóstico y otras características clínico-patológicas en pacientes mexicanos atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Elucidar el panorama genómico del adenocarcinoma gástrico en pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología.
2. Contrastar la frecuencia de mutaciones somáticas con las características clínico-patológicas en pacientes con adenocarcinoma gástrico, incluyendo la histología tumoral y edad al momento del diagnóstico.
3. Identificar las vías de señalización afectadas en los pacientes de acuerdo con su histología tumoral.
4. Comparar la frecuencia de variaciones en el número de copias de las citobandas y su asociación con características clínico-patológicas en pacientes con adenocarcinoma gástrico, incluyendo la histología tumoral y edad al momento del diagnóstico.
5. Analizar los procesos mutacionales implicados en la carcinogénesis del adenocarcinoma gástrico, evaluando su asociación con las características clinicopatológicas de los pacientes.
6. Inferir la arquitectura clonal asociada a la evolución de los tumores de adenocarcinoma gástrico de los tipos difuso e intestinal.

METODOLOGÍA

I.- DISEÑO DEL ESTUDIO

Este es un estudio piloto observacional descriptivo transversal, que forma parte de un estudio mayor enfocado a identificar biomarcadores de utilidad clínica en el tratamiento del adenocarcinoma gástrico: Este proyecto se encuentra aprobado por el Comité de Investigación (018/048/IBI) y el Comité de Ética en Investigación (CEI/1314/18) del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) de la Ciudad de México.

II.- POBLACION DE ESTUDIO, CRITERIOS DE INCLUSION Y DE EXLUSION

En este proyecto se incluyeron pacientes que aceptaron su participación voluntaria en el estudio registrado y que firmaron el consentimiento informado (aprobado por los comités del INCan). A cada paciente se le explicó el objetivo del proyecto, los riesgos y beneficios directos o indirectos que obtendría del presente estudio para que tomara una decisión informada.

Los criterios de inclusión fueron: Ser mayor de 18 años y tener un diagnóstico positivo de adenocarcinoma gástrico primario, confirmado por el servicio de patología del INCan. En cambio, se excluyeron las biopsias de aquellos pacientes con adenocarcinoma gástrico que fuera de un tumor segundo primario o secundario a otro proceso neoplásico, también se excluyeron pacientes a los cuales se les administró quimioterapia previa a la toma de muestra y que tuvieran deshabilitada o incompleta su historia clínica.

III.- RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN CLÍNICA

La información clínica de cada paciente se obtuvo a través del expediente clínico electrónico del INCan (INCanet). Se colectaron las siguientes variables: Edad al momento de diagnóstico, Índice de masa corporal, Sexo, Estadio Clínico, Impresión diagnóstica (tipo de lesión observada durante la endoscopia de acuerdo con la clasificación Borrmann que identificó el endoscopista), Histología tumoral (Tipo de tumor de acuerdo con la clasificación de Lauren que describe el patólogo), y presencia de células en anillo de sello.

IV.- RECOLECCION DE MUESTRAS DE TEJIDO TUMORAL Y ADYACENTE

Con el apoyo de 2 endoscopistas experimentados del servicio de endoscopia del INCan, se tomaron muestras de tejido gástrico tumoral y de tejido adyacente por cada paciente, se utilizó un fórceps para recolectar los tejidos durante el procedimiento. El tejido adyacente se recolectó de la región estomacal más alejada del tumor con una distancia no menor a 5 cm entre tejido tumoral y tejido adyacente. Para evitar contaminación, se tomaron primero las muestras de tejido adyacente y después las de tejido tumoral. La presencia de lesión tumoral se confirmó por el servicio de patología del INCan. Una vez colectadas las muestras, estas se colocaron en la solución amortiguadora *RNAlater* (Invitrogene, AM7021), se etiquetaron debidamente y se almacenaron a 4 °C durante 24 horas, posteriormente se les retiró el *RNAlater* y se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su procesamiento.

V.- EXTRACCION Y EVALUACION DE LA INTEGRIDAD DEL DNA

Las muestras de tejido tumoral y de tejido adyacente se homogenizaron utilizando un motor mecánico (Merck, Z359971) y las columnas QIAshredder (QIAGEN, 79654) para obtener un lisado homogéneo. Posteriormente, para extraer DNA genómico de alta calidad, se utilizó el kit AllPrep® DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN, 80204) siguiendo el protocolo de Peña-Llopis *et al.* (117). La pureza del DNA extraído se evaluó con el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, ND-2000). La cantidad y el estado de fragmentación del DNA se evaluó mediante el sistema Agilent 2200 TapeStation utilizando el ensayo genómico DNA ScreenTape (Agilent, 5067-5365) y así se obtuvo el número de integridad del DNA (DIN: *DNA integrity number*). Para realizar la secuenciación del exoma, la identificación de infección por *H. pylori* y del EBV, se seleccionaron las muestras que contaban con un DIN de 6 a 10 y una concentración mínima de 20 ng/μL.

VI.- DETERMINACION DE *HELICOBACTER PYLORI*

La presencia de *H. pylori* se evaluó tanto en tejido tumoral como en tejido adyacente utilizando 100 ng de DNA. La evaluación se hizo por PCR en tiempo real Step One Plus (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*), y se utilizaron los *primers* HP-

16S (5'-TCGGAATCACTGGGCGTAA-3' y 5'-TTCTATGGTTAAGCCATAGGATTTACAC-3'). La reacción se realizó de la siguiente manera: un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 15 minutos seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 segundos y reconocimiento a 60 °C por 1 minuto. La curva de hibridación fue como sigue: 95 °C (15 s), 60 °C (1 min) y 95 °C (35 s). Una muestra positiva a *H. pylori* fue utilizada como control positivo. El análisis de la PCR se realizó mediante el umbral del ciclo y una curva de hibridación. Las muestras que amplificaron antes de 30 ciclos se consideraron como positivas. Un paciente se consideró positivo a infección por *H. pylori* si al menos uno de los 2 tejidos (tumoral o adyacente) amplificó para el patógeno.

VII. DETERMINACIÓN DE VIRUS DE EPSTEIN-BARR

La presencia de EBV en tejido tumoral se evaluó mediante hibridación *in situ* para el ARN codificado por EBV (EBER1). Siguiendo los procedimientos descritos anteriormente (118) se fijaron los tejidos tumorales a un portaobjetos y se expusieron a una sonda de EBER1. Un tumor se consideró EBV negativo si la tinción con EBER1 no se detectó o solo se expresó en células linfoides con apariencia benigna. Un tumor se consideró positivo si se observaba tinción con EBER1 en el núcleo de las células malignas.

VII.- PREPARACIÓN DE BIBLIOTECA, CAPTURA DE REGIÓN DE INTERÉS

La preparación de la biblioteca, la captura de los híbridos y la secuenciación del exoma las realizó la empresa Novogene Inc como sigue: Un total de 1.0 µg de DNA extraído de los tejidos tumoral y adyacente utilizando el kit Agilent *SureSelect Human All Exon V6* (Agilent, 5190-8865) de acuerdo con las instrucciones del fabricante se utilizó para preparar las bibliotecas de secuenciación, estas fueron generadas seccionado en fragmentos de 180 a 280 pares de bases (bp: *base pair*), los salientes restantes se convirtieron en extremos romos mediante enzimas exonucleasa y polimerasa, posteriormente las enzimas fueron eliminadas. Posteriormente, los fragmentos fueron poliadenilados en su terminal 3' y fueron ligados con adaptadores. Los fragmentos de DNA con adaptadores en ambos lados fueron amplificados por PCR. Para la captura de los exones los fragmentos

amplificados se mezclaron con sondas marcadas con biotina y perlas magnéticas recubiertas de estreptomina. Los fragmentos fueron purificados utilizando el sistema AMPure XP (Beckman Coulter, A63882) que remueve los fragmentos y adaptadores no ligados y capturados. Finalmente, las bibliotecas capturadas fueron amplificadas nuevamente mediante PCR, marcadas para prepararlas para hibridación y cuantificadas utilizando el sistema Agilent Bioanalyzer 2100.

VIII.- SECUENCIACIÓN DEL EXOMA

Los fragmentos se secuenciaron utilizando un equipo Illumina Novaseq 6000 que utiliza un mecanismo de secuenciación por síntesis. Una vez en el equipo, los fragmentos hibridados de cada muestra son amplificados, y secuenciados. La secuenciación se realiza mediante nucleótidos marcados con un fluoróforo; y cada vez que un nucleótido se une a la cadena, se emite una señal y esta es captada por el equipo. Todas estas señales son recolectadas y utilizadas para generar archivos en formato FASTA, los cuales se utilizaron para hacer el análisis bioinformático posterior.

IX.- FILTRADO, LLAMADO Y ANOTADO DE VARIANTES SOMÁTICAS

A partir de los archivos de secuenciación, se realizaron filtrados para eliminar la información de los adaptadores y las lecturas de baja calidad. Las lecturas de cada segmento fueron descartadas si presentaban cualquiera de las siguientes características: una lectura se encontraba contaminada con adaptadores, más del 10% de las bases eran inciertas o si la proporción de baja calidad de las bases era superior al 50%.

Se utilizó el programa Burrows-Wheeler Aligner (BWA-MEM) (versión [v] 0.7.8-r455) para alinear las lecturas al genoma de referencia humano GRCh37 (hg19). Este programa permite alinear y ordenar las lecturas de cada segmento secuenciado frente a un genoma de referencia, para así inferir el genoma de las muestras secuenciadas (119). Este programa cuenta con 3 algoritmos diferentes; BWA-backstrap que fue diseñado para lecturas de segmentos de hasta 100 pb, mientras que los otros 2, BWA-SW y BWA-MEM pueden trabajar con segmentos de entre 70

y 1000 bp (119). Utilizamos el algoritmo BWA-MEM ya que es el más nuevo, el más eficiente y permite trabajar con el tamaño de segmentos que realizamos.

Se utilizó SAMtools (v1.0), para generar los archivos BAM y Picard (v1.111) (21) para marcar y eliminar lecturas duplicadas. Picard es parte del conjunto de herramientas de análisis genómico (GATK: *Genomic Analysis Toolkit*) generadas por el Broad Institute que permite obtener variantes de alta calidad, debido a que se realizan realineamientos y recalibraciones en segmentos del genoma propensos a errores de alineamiento, por ejemplo, los sitios colindantes con inserciones y deleciones o sitios con variaciones estructurales (120, 121). GATK permite reajustar los resultados obtenidos con BWA-MEM.

Las variantes de un solo nucleótido (SNV: *Single nucleotide variant*) se identificaron utilizando tres programas de llamado de variantes: MuTect (v1.1.4) (122), VarScan2 (v4.1) (123) y MuTect2 (v4.2) (124). El programa MuTect fue creado por el *Broad Institute* y permite hacer un llamado de variantes SNV con alta sensibilidad y especificidad. Utiliza un modelo bayesiano que permite hacer el llamado de variantes de baja frecuencia con una fracción alélica de variante (VAF: *variant allele fraction*) de hasta 0.1, y solo se seleccionaron los SNV identificados por dos o más programas. Se identificaron pequeñas inserciones y eliminaciones (InDels: *small Insertions and Deletions*) con Strelka (v1.0.13) (64), VarScan2 y MuTect2. Se seleccionaron InDels identificados por dos o más llamadores de variantes. Para eliminar los posibles polimorfismos germinales de los SNV e InDels somáticos, se filtraron las variantes que presentaron una frecuencia de alelo menor (MAF: *minor allele frequency*) del 1 % o superior utilizando gnomAD (v2.0.1). Además, eliminamos las variantes con VAF inferior a 0.05 y superior a 0.7. Además, para evitar cualquier contaminación con variantes de la línea germinal, realizamos un análisis pareado para cada paciente filtrando todas las mutaciones compartidas por los tejidos adyacentes y tumorales, quedando únicamente las mutaciones encontradas en el tejido tumoral con genotipo 0/1 en los archivos finales de VCF.

La relevancia biológica y clínica de los SNV se obtuvo utilizando la interfase web *The Cancer Genome Interpreter* (CGI) (65). Para predecir las mutaciones

impulsoras, se seleccionó un modelo específico de tejido (adenocarcinoma de estómago) en el CGI. Este modelo utiliza un algoritmo de aprendizaje automático denominado BoostDM para anotar y predecir la relevancia clínica y biológica de las variantes somáticas con una puntuación de BoostDM de 0,5 con una precisión para predecir mutaciones impulsoras (puntuación F_{50}) superior a 0,9 (66).

Se utilizó el programa Control-FREEC (v11.4) (24) para el llamado de variantes para identificar variaciones en el número de copias (CNV: *copy number variations*) de las citobandas. Esta es una herramienta creada por el Institut Curie que permite identificar cambios en el número de copias y desbalances alélicos en muestras pareadas discriminando entre eventos somáticos y germinales (125). Los segmentos con \log_2 mayor a 0.2 fueron clasificados como ganancias CNV y los segmentos con \log_2 menor a -0.235 fueron pérdidas CNV.

X.- IDENTIFICACIÓN DE CARGA MUTACIONAL TUMORAL

Para cada muestra, se calculó su carga mutacional tumoral (TMB: *Tumor mutational burden*), para esto se utilizó únicamente el número de variantes somáticas que se encuentran en la región codificante del genoma dividido entre el tamaño de la región blanco que es cubierta por el kit de captura, que en este caso fue de 60 Mb. De acuerdo con el estudio de Chalmers *et al.* 2017, en el cual se identificó la TMB de 100,000 muestras de pacientes con diferentes tipos de cáncer, incluido el cáncer gástrico, los pacientes con cáncer gástrico fueron considerados con TMB alta si presentaban valores superiores a 5 mutaciones/Mb (126) por lo cual, se consideró este punto de cohorte para categorizar a las muestras con TMB alta o TMB baja.

XI.- ANALISIS DE SOBRRERREPRESENTACIÓN

Se utilizó la interfase web *Cancer Genome Interpreter* (CGI) para clasificar las variantes somáticas en conductoras y pasajeras (127). Debido a que las variantes conductoras son las que tienden a dirigir el crecimiento y evolución del tumor, se decidió realizar el análisis de sobrerrepresentación solamente con estas variantes.

Se utilizó la interfase web WebGestalt para el análisis de sobrerrepresentación de las variantes conductoras. WebGestalt es una herramienta web que permite realizar diferentes tipos de análisis de enriquecimiento (127). El análisis de

sobrerrepresentación es un análisis estadístico que determina si genes predefinidos en vías de señalización de bases de datos de referencia se encuentran representados o presentes en un *data set* experimental (128). En WebGestalt, se seleccionaron como bases de datos funcionales de referencia *Reactome pathway* y *Panther pathway*, y se consideraron como enriquecidas las vías con una tasa de descubrimiento falso (FDR: False Discovery Rate) < 0.05 .

XII.- ANALISIS DE DIVERSIDAD CLONAL

Se identificó la diversidad clonal de cada muestra utilizando el paquete SciClone (129). Una consecuencia de la expansión tumoral es la acumulación de variantes somáticas, que según el modelo de expansión clonal, las variantes con mayor frecuencia alélica son aquellas que se encuentran en el clon original y a medida que este se va expandiendo se van integrando otras variantes y se van generando subclones, lo que conlleva a generar diversidad intra-tumoral (130). El programa SciClone, utiliza la VAF para generar un modelo bayesiano y estimar el número de subclones que presenta la muestra. Para optimizar la detección de los subclones, este programa solamente utiliza las variantes somáticas que no se ven afectadas por CNV (129). Se incluyeron solamente las variantes somáticas que presentaron una cobertura de secuenciación superior a 50X y se identificó el número de subclones que presentaba cada muestra. Una vez identificado el número de subclones se procedió a categorizar las muestras en alta o baja clonalidad de acuerdo con la mediana, las muestras con 2 o más subclones se consideraron como muestras con alta diversidad clonal.

XIII.- COMPARACIÓN DE VARIANTES CON OTRAS POBLACIONES

Se utilizó el sitio web c-Bioportal para acceder a los datos genómicos de TCGA y OncoSG (31, 32). Se seleccionaron muestras de los estudios *Stomach Adenocarcinoma* (TCGA, *Firehouse legacy*) (131) y OncoSG (132). Se obtuvieron datos de los genes afectados por variantes somáticas y CNV para comparar su frecuencia entre las tres cohortes.

XIV.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se evaluaron asociaciones entre características clínicas como: histología tumoral y presencia de células en anillo de sello, *H. pylori* y EBV con la presencia de variaciones somáticas y CNV. Los pacientes fueron agrupados de acuerdo con sus características clínicas y luego se comparó la frecuencia de las variantes entre los grupos mediante la prueba exacta de Fisher. Los valores de p se ajustaron mediante el procedimiento de Benjamini-Hochberg. También se evaluó la asociación de los valores brutos de TMB con las características clínicas de los pacientes mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Se categorizó la contribución positiva de las firmas mutacionales y se comparó con las características clínicas de los pacientes. Se analizó la independencia de las tablas de contingencia mediante la prueba de chi-cuadrada con la corrección de Yates. La significación estadística se fijó en $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software R (<https://cran.r-project.org>).

RESULTADOS

I.- CARACTERISTICAS CLINICOPATOLOGICAS DE LOS PACIENTES

Se analizaron muestras de 50 pacientes mexicanos diagnosticados con adenocarcinoma gástrico que fueron atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología de México (INCan) entre enero de 2019 y enero de 2020. La edad media de los pacientes fue de 54.94 años (desviación estándar [DE]: 15.49 años), con una ligera predominancia de pacientes masculinos (58 %). En casi la mitad de los pacientes (42 %), se encontró que el tumor se había diseminado dentro de dos o más sitios del estómago.

Los tumores localizados en fondo y cuerpo fueron los más frecuentes (36 %), seguidos de los localizados en antro y píloro (22 %). En cuanto a la histología tumoral, el adenocarcinoma gástrico de tipo difuso se observó en el 62 % de las muestras, seguido por una histología de tipo intestinal en el 32 %, y una histología de tipo mixto en el 6 % restante de las muestras. Además, el 68 % de los pacientes presentó células en anillo de sello. Las características clínicas de los pacientes incluidos se presentan en la Tabla 1.

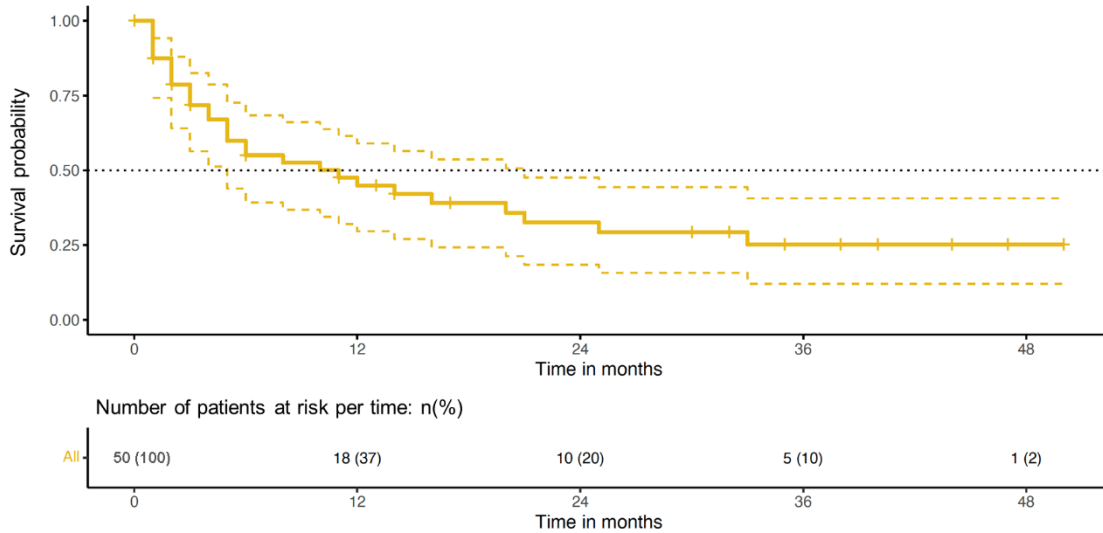
El 94% de los pacientes incluidos en este estudio presentaron un estadio clínico avanzado. Se realizó un seguimiento de 2 años de los pacientes y observamos una mediana de supervivencia global de 11 meses (Figura 4a). Adicionalmente, se comparó si existía diferencia entre la supervivencia de pacientes con adenocarcinoma gástrico al ser agrupados de acuerdo con su histología tumoral en difusa o intestinal. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la supervivencia de ambos grupos (Figura 4b).

Tabla 1. Características clínico-patológicas de pacientes tratados en el Instituto Nacional de Cancerología entre enero 2019 y enero 2020 (N = 50).

Variable	Media	DE
Edad (años)	54.94	15.49
IMC (Kg/m ²)	23.60	5.18
Seguimiento (meses)	12.53	14.17
Variable	n	%
Sexo		
Femenino	21	42.00
Estadio clínico		
I–II	3	6.00
III–IV	47	94.00
Localización del tumor		
Antro-píloro	11	22.00
Cardias	0	0.00
Cuerpo y Fondo	18	36.00
Dos o más sitios	21	42.00
Impresión diagnóstica¹		
I	1	2.00
II	3	6.00
III	15	30.00
IV	22	44.00
V	6	12.00
No Reportado	3	6.00
Histología tumoral²		
Intestinal	16	32.00
Difuso	31	62.00
Mixto	3	6.00
Diferenciación tumoral		
Bien diferenciado	0	0.00
Moderadamente diferenciado	8	16.00
Pobremente diferenciado	42	84.00
Células en anillo de sello		
Positivo	34	68.00
<i>H. pylori</i>		
Positivo	21	42.00
EBV		
Positivo	6	12.00

DE: desviación estándar; **IMC:** índice de masa corporal; **EBV:** Virus de Epstein Barr. ¹Impresión diagnóstica es de acuerdo con la escala Borrmann. ²Histología tumoral es de acuerdo con la clasificación de Lauren.

a.



b.

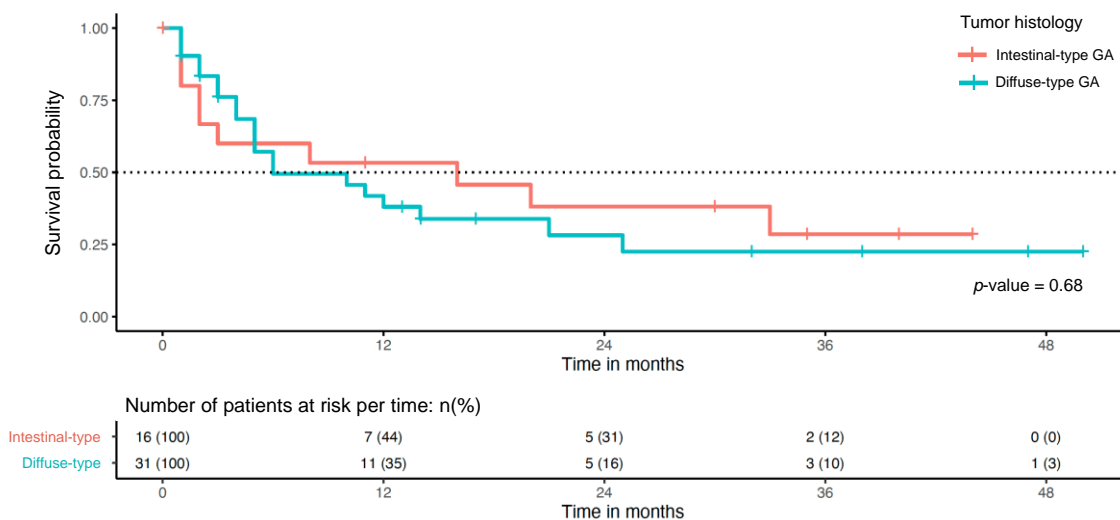


Figure 4. Probabilidad de supervivencia general de pacientes con adenocarcinoma gástrico tratados en el Instituto Nacional de Cancerología entre enero de 2019 y enero de 2020 (N=50). a) Sobrevida general de todos los pacientes incluidos en el estudio. b) Sobrevida general de los pacientes incluidos en el estudio, agrupados de acuerdo con el tipo histológico.

II.- IDENTIFICACIÓN DE *H. PYLORY* Y EBV

Una infección positiva para *H. pylori* se identificó en el 42% de los pacientes, mientras que EBV se presentó en el 12 % de los pacientes. Además, se evaluó infección concomitante entre ambos patógenos, sin embargo, y esto solo se encontró en 8% de los pacientes. No se observó asociación entre la presencia de *H. pylori* (p -value = 0.69) o EBV (p -value = 0.673) con la histología del tumor. La

presencia de células en anillo de sello tampoco se asoció con la presencia de *H. pylori* (p -value = 0.40) o con EBV (p -value = 0.15).

III.- CALIDAD DE LA SECUENCIACIÓN

La secuenciación del exoma completo (WES) se realizó en las muestras de 50 pacientes, y solo una de las muestras falló en el proceso de secuenciación. La profundidad de secuenciación promedio fue de 186.90X, con una cobertura mínima del 99.5 % de la región objetivo. Las muestras mostraron una media de 94,86 % de calidad Q30 en las bases secuenciadas. Se identificaron un total de 119744 variantes somáticas en todas las muestras. Incluyendo SNV e InDels. Las muestras presentaron una mediana de 237 mutaciones por muestra (variando entre 40 y 31 299). En la figura 5 se observa la profundidad promedio y profundidad acumulada de secuenciación para todas las lecturas de cada muestra.

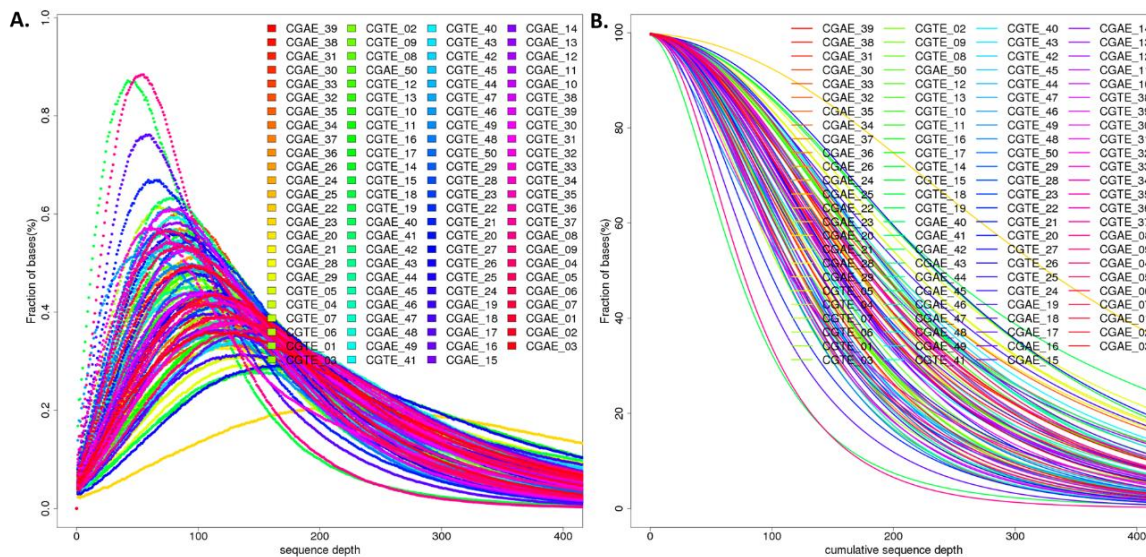


Figura 5. Profundidad de secuenciación de las muestras. a) Profundidad de secuenciación de cada muestra por fracción de total de bases. b) Profundidad acumulada de la secuenciación de las muestras por fracción de total de bases.

III. CARGA MUTACIONAL TUMORAL E HISTOLOGÍA TUMORAL

Se calculó la carga mutacional tumoral (TMB: *tumor mutational burden*) de cada paciente, utilizando todas las mutaciones presentes en la región codificante o exoma del genoma. Los valores de TMB oscilaron entre 0.16 y 158.35 mutaciones/ Mega

base (Mb). Los valores de TMB superiores o iguales a 10 mutaciones/Mb se consideraron como TMB alto y los valores inferiores a dicho valor, se consideraron como TMB bajo. Evaluamos si el estado de TMB de los pacientes se asociaba con supervivencia global (Figura 6), sin embargo, dentro de este tiempo de seguimiento temprano, no se identificaron diferencias entre los grupos (p -value = 0.78)

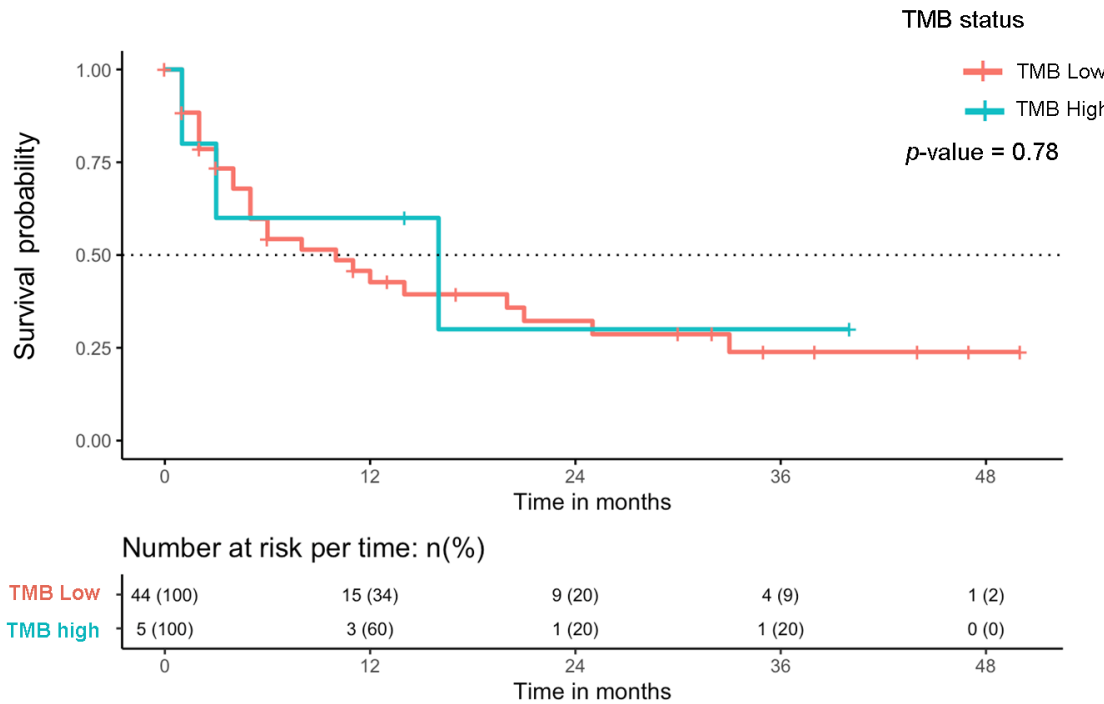


Figura 6. Probabilidad de supervivencia global según el estado de carga tumoral mutacional (TMB) que presentan los pacientes con adenocarcinoma gástrico atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología entre enero de 2019 y enero de 2020 (n=49). El panel inferior indica el número de pacientes en riesgo en diferentes momentos, agrupados por estado de TMB

Al agrupar a los pacientes según su estado de TMB, observamos en que 10 % de los pacientes presentaba TMB alta (Figura 7a). Al explorar más profundamente a los pacientes con TMB alto, observamos que estos pacientes presentaban mutaciones en genes relacionados con el sistema de reparación de bases mal apareadas. Sin embargo, CGTE_14 fue el único paciente con una mutación conductora a nivel de exoma en *MSH6*, mientras que los demás pacientes con TMB alto, presentaron mutaciones pasajeras a nivel de intrones en *MSH6* (CGTE_26,

CGTE_18, CGTE_40), *MSH2* (CGTE_40, CGTE_28) y *MLH1* (CGTE_18). Se exploró la posible relación entre los valores de TMB y las características clínicas.

Se categorizaron los pacientes de acuerdo con su estado de TMB en TMB altos y TMB bajos. Cuando se categorizaron a los pacientes, no se observó asociación alguna entre histología tumoral (p -value = 0.21), presencia de células en anillo de sello (p -value = 0.38), infección por *H. pylori* (p -value = 0.54) o EBV (p -value = 0.87). Sin embargo, al evaluar los valores crudos de TMB, identificamos que los pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal (p -value = 0,026) y ausencia de células en anillo de sello (p -value = 0,015) presentaban mayores valores de TMB (Figura 7b, c).

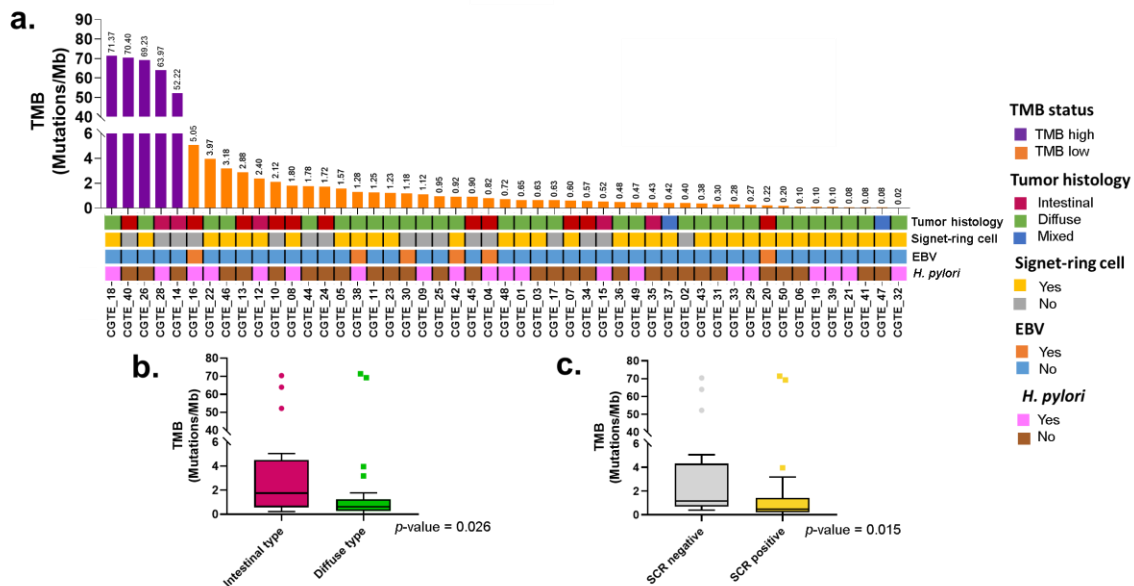


Figura 7. Carga tumoral mutacional de pacientes con adenocarcinoma gástrico atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología de México entre enero de 2019 y enero de 2020 (n=49). a) Carga mutacional tumoral (TMB) en las muestras secuenciadas. El TMB se calculó con todas las variantes que afectan a la región codificante. Las barras moradas indican TMB alto y las barras naranjas indican TMB bajo. TMB \geq 10 mutaciones/Mb se consideró como TMB alto. El panel inferior representa las características clínicas de los pacientes, incluyendo la histología tumoral, la presencia de células en anillo de sello, la presencia del virus de Epstein-Barr (EBV) y la infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). b) Comparación del valor de TMB según la histología tumoral. c) Comparación del valor de TMB según la presencia de células en anillo de sello. Los valores de p se calcularon utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.

La presencia de *H. pylori* (p -value = 0.54) y la infección por EBV (p -value = 0.87) no se asociaron con los valores de TMB (Figura 8).

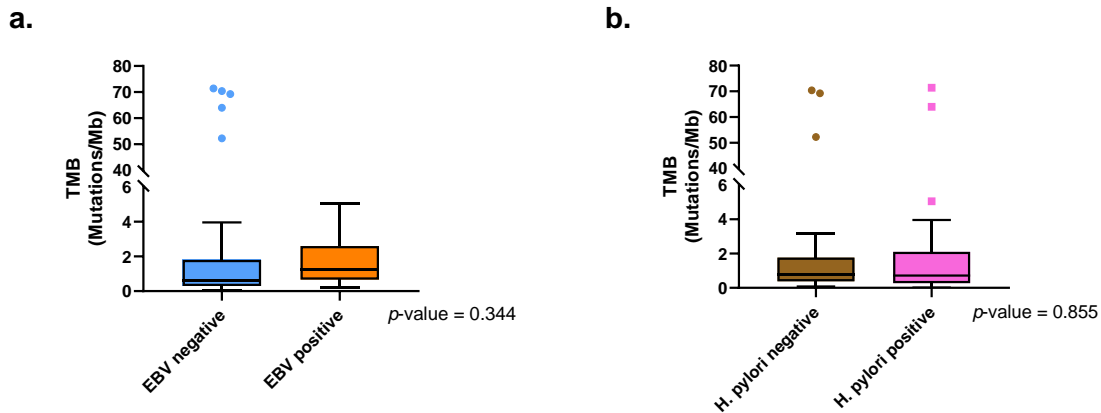


Figura 8. *Helicobacter pylori*, EBV y TMB. a) Comparación del valor de carga mutacional tumoral (TMB) según la presencia del Virus de Epstein-Barr (EBV). b) Comparación del valor de TMB según la presencia de *H. pylori*. Los valores de p se calcularon utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.

IV.- PANORAMA MUTACIONAL DE LOS PACIENTES MEXICANOS

IV.I.- VARIANTES SOMÁTICAS E HISTOLOGÍA TUMORAL

Una vez identificadas las variantes somáticas, estas se clasificaron como conductoras o pasajeras. Para las posteriores comparaciones, decidimos utilizar solamente las variantes conductoras debido a que estas se asocian con la malignidad de los tumores

Ocho muestras no presentaron variantes conductoras. El gen supresor de tumores *TP53* fue el gen mutado con mayor frecuencia, alterado en el 41 % de los pacientes. *CDH1* y *ARID1A* también se identificaron como genes frecuentemente mutados en esta cohorte. Dentro del tipo de mutaciones, las variantes sin sentido fueron las más comúnmente observadas en esta cohorte. La figura 9 presenta los genes que se encontraron mutados en el 7 % o más de los pacientes.

Los pacientes se clasificaron según la histología del tumor y se evaluó la frecuencia de genes mutados entre GA de tipo difuso e intestinal (Figura 10a). Las variantes somáticas de *NOTCH1* se encontraron exclusivamente en pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal (p -value = 0.03, tasa de descubrimiento

falso [FDR: *False Discovery Rate*] = 0.57). Por otro lado, los pacientes con histología de tipo difusa tienden a asociarse con variantes somáticas en *CDH1* (p -value = 0.08, FDR = 0.57). Adicionalmente, se observó que las mutaciones en *RHOA* (p -value = 0.26, FDR = 0.57) y *CDKN2A* (p -value = 0.26, FDR = 0.57) estaban presentes solo en pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo difuso.

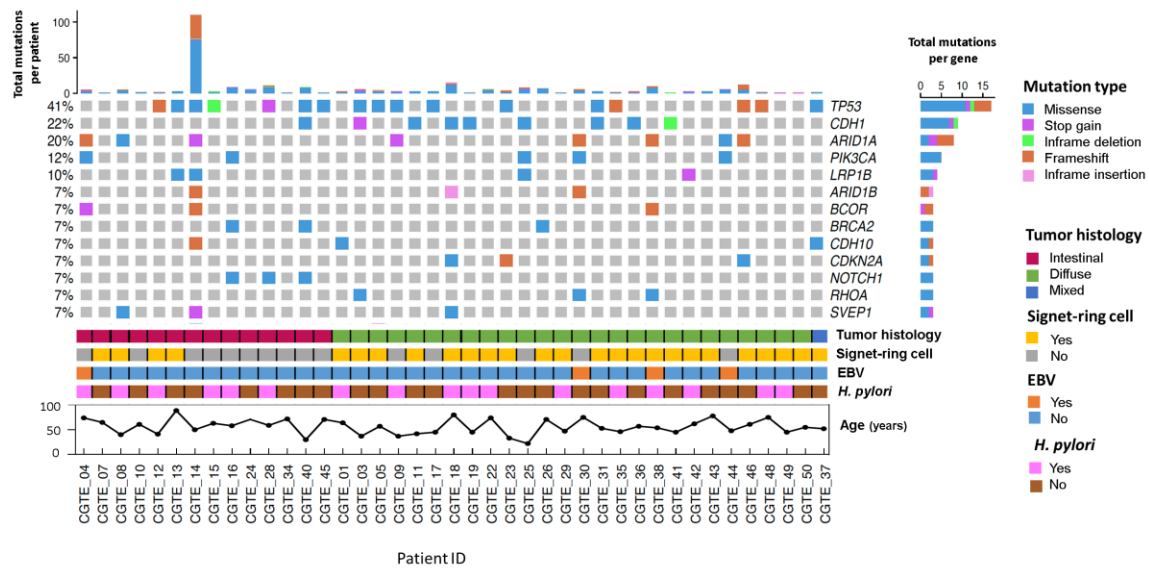


Figura 9. Mutaciones somáticas conductoras y características clínicas de los pacientes con adenocarcinoma gástrico atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología entre enero de 2019 y enero de 2020 (n=41). Oncoprint, ordenado por histología tumoral de los pacientes, que representa los genes afectados por variantes somáticas conductoras (incluyendo SNV, InDels) en el 7 % o más de las muestras. Las variantes se representan según el tipo de mutación, cada una descrita en el panel de color derecho. El gráfico de barras superior representa el número de variantes somáticas conductoras por paciente, y el gráfico de barras de la derecha representa el número de variantes somáticas conductoras por gen. El panel inferior representa la histología del tumor, la presencia de células en anillo de sello, virus de Epstein-Barr (EBV), *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) y la edad por paciente

Al comparar la presencia de células en anillo de sello y la frecuencia de variantes somáticas (Figura 10b), las mutaciones en *PIK3CA* (p -value < 0.01, FDR = 0.46) y *NOTCH1* (p -value = 0.03, FDR = 0.50) estuvieron presentes exclusivamente en pacientes sin células en anillo de sello. Las variantes somáticas en *ARID1A* (p -value = 0.05, FDR = 0.50) también tienden a estar presentes en pacientes sin células en anillo de sello. Adicionalmente, variantes somáticas en *CDH1* también se

encontraron asociadas a una edad al momento de diagnóstico menor a 50 años (p -value < 0.01, FDR = 0.625) (Figura 10c).

IV.II VARIANTES SOMÁTICAS E INFECCIÓN POR PATÓGENOS

Se evaluó la frecuencia de mutaciones conductoras somáticas en los pacientes agrupándolos de acuerdo con su estatus de infección por EBV o *H. pylori*. No se encontraron asociaciones entre la presencia de infección por *H. Pylori* y la frecuencia de variantes somáticas (Figura 11a).

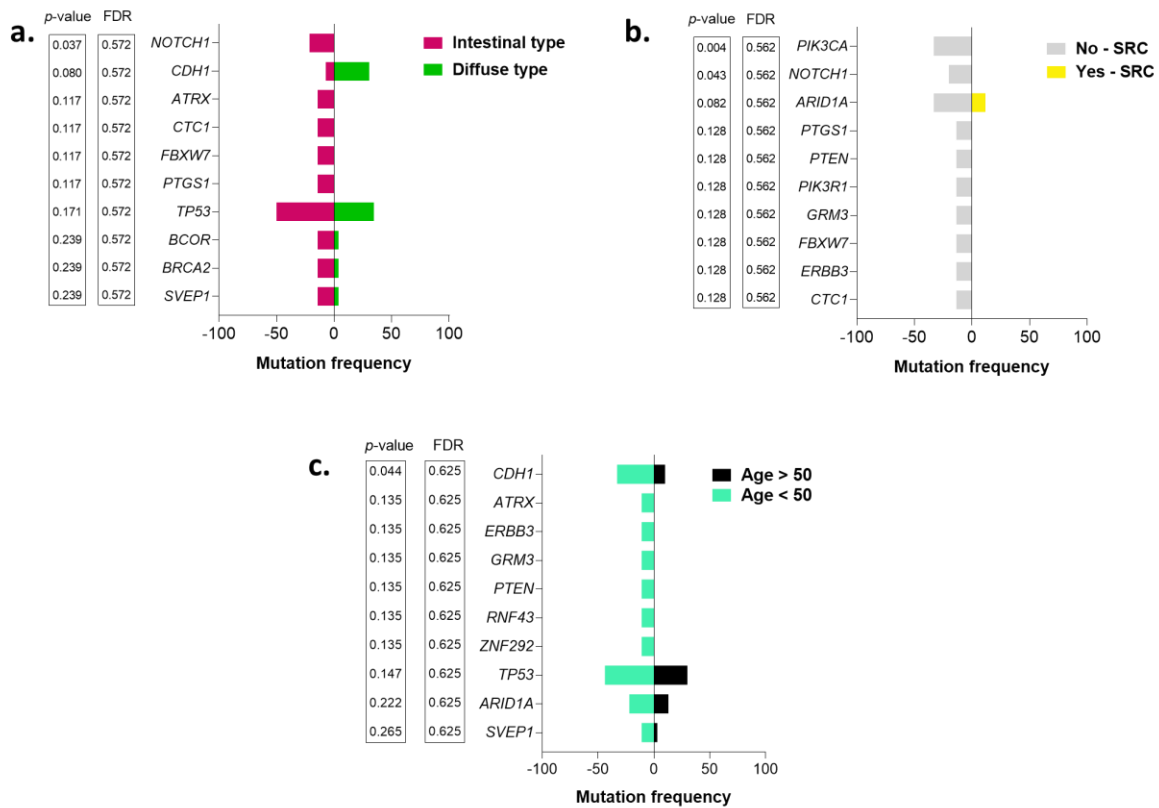


Figura 10. Histología tumoral, células en anillo de sello y frecuencia de mutaciones conductoras. Los 10 genes con más mutaciones diferenciales se ordenan a partir del valor p de la prueba exacta de Fisher más pequeño. a) Comparación de la frecuencia de genes con mutaciones conductoras según la histología del tumor. b) Comparación de la frecuencia de genes con mutaciones conductoras según la presencia de células en anillo de sello (SRC) c) Comparación de la frecuencia de genes con mutaciones conductoras según la edad de los pacientes.

Los pacientes con EBV positivo se asociaron con una mayor frecuencia de variantes somáticas en *PIK3CA* (p -value < 0.01, FDR = 0.04), *ARID1A* (p -value < 0.01, FDR

= 0.31), *SMAD4* (p -value = 0.01, FDR = 0.82), *BCOR* (p -value = 0.03, FDR = 0.87) y *RHOA* (p -value = 0.03, FDR = 0.87) (Figura 11b).

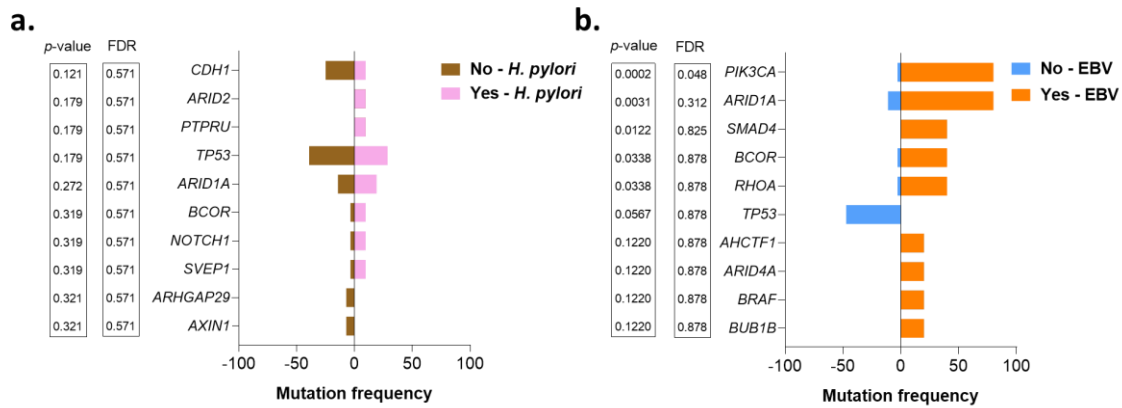


Figura 11. *Helicobacter pylori*, EBV y frecuencia de mutaciones conductoras. Los 10 genes con más mutaciones se ordenan de forma ascendente a partir del valor p de la prueba exacta de Fisher. a) Comparación de frecuencia de mutación conductora según la presencia de *H. pylori*. b) Comparación de la frecuencia de mutación del controlador según la presencia del virus de Epstein Barr (EBV).

IV.III VÍAS DE SEÑALIZACIÓN AFECTADAS POR MUTACIONES CONDUCTORAS

Los pacientes se agruparon según su histología tumoral para observar las diferencias en las vías de señalización enriquecidas que se ven afectadas por mutaciones conductoras. Utilizando el conjunto de datos PANTHER como referencia (133), la respuesta de hipoxia a través de la activación de HIF fue la vía de señalización más enriquecida en el adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal (proporción de enriquecimiento [ER: *Enrichment ratio*] = 33 %, FDR < 0.01) y el adenocarcinoma gástrico de tipo difuso (ER = 29.89, FDR < 0.01). El enriquecimiento de las vías relacionadas con p53, así como las vías de señalización de insulina/IGF y VEGF se compartieron entre los adenocarcinoma gástrico de tipo difuso e intestinal. Sin embargo, la vía de señalización JAK/STAT y la guía del Axón mediada por Netrina tendieron a estar más enriquecidas en el adenocarcinoma gástrico de tipo difuso (Figura 12a).

Los procesos biológicos afectados por variantes somáticas fueron diferentes en pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo difuso e intestinal. Se utilizó como referencia la base de datos de *Gene Ontology* para identificar estos procesos. La

Figura 12b muestra los procesos biológicos afectados por variantes somáticas. El mecanismo de reparación de bases mal apareadas (ER = 42,80, FDR < 0.01) fue el proceso biológico más afectado en pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal, mientras que el proceso de biosíntesis del fosfatidilinositol (ER = 18.58, FDR < 0.01) se vio afectada en pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo difuso.

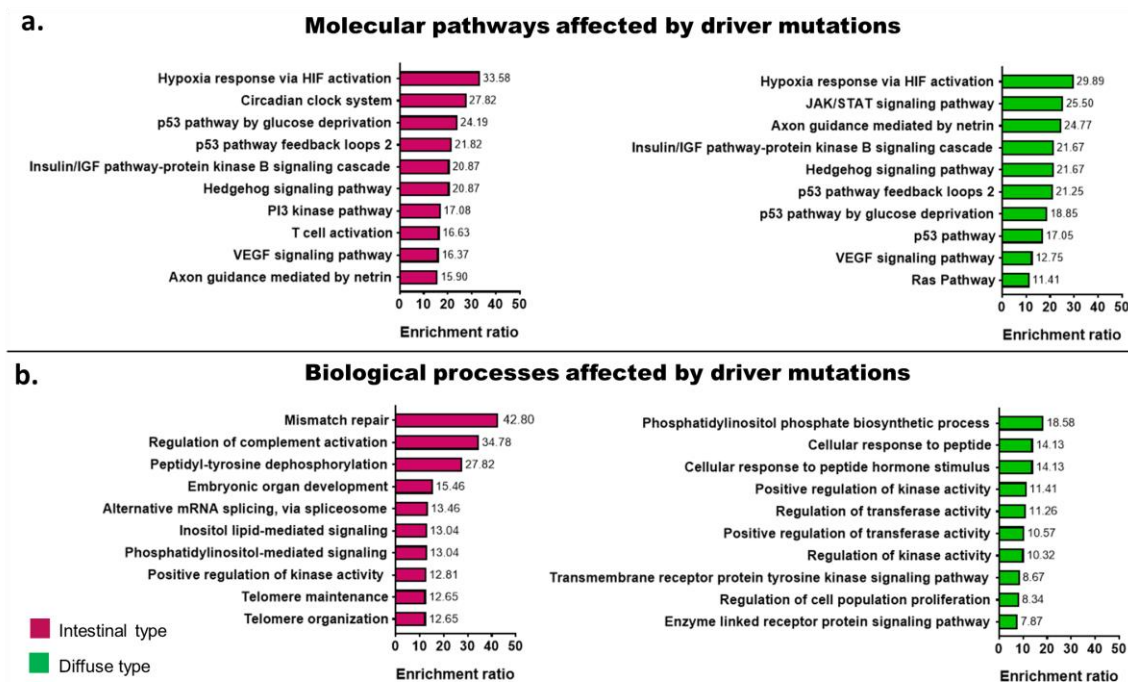


Figura 12. Vías de señalización afectadas por variantes somáticas conductoras de pacientes con adenocarcinoma gástrico atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología de México entre enero de 2019 y enero de 2020, agrupados según su histología tumoral. (a) Gráfico de barras que representa las vías moleculares afectadas por las variantes somáticas del controlador utilizando PANTHER como conjunto de datos de referencia. (b) Gráfico de barras que representa los procesos biológicos afectados por las variantes somáticas del conductor utilizando como referencia el conjunto de datos de *Gene Ontology*. Las barras verdes representan las vías de señalización afectadas en muestras con una histología de tipo difuso, en cambio las barras de color rosa representan las muestras con histología de tipo intestinal.

IV.IV VARIANTES ESTRUCTURALES

Como variaciones estructurales, se identificaron las variaciones en el número de copias (CNV: *copy number variations*) para diferentes regiones del genoma que afectan a pacientes con adenocarcinoma gástrico. Ganancias de CNV fue la

variación estructural más comúnmente encontrada en los pacientes (Figura 13). Los cromosomas 2, 7, 8 y 20 se vieron afectados casi por completo por ganancias de CNV, mientras que los cromosomas 4 y 17 presentaron pérdidas de CNV casi en su totalidad. A pesar de que las CNV parecen afectar grandes regiones del genoma, nuestra cohorte muestra áreas de alta densidad donde las CNV tienden a ocurrir con mayor frecuencia (Figura 14a).

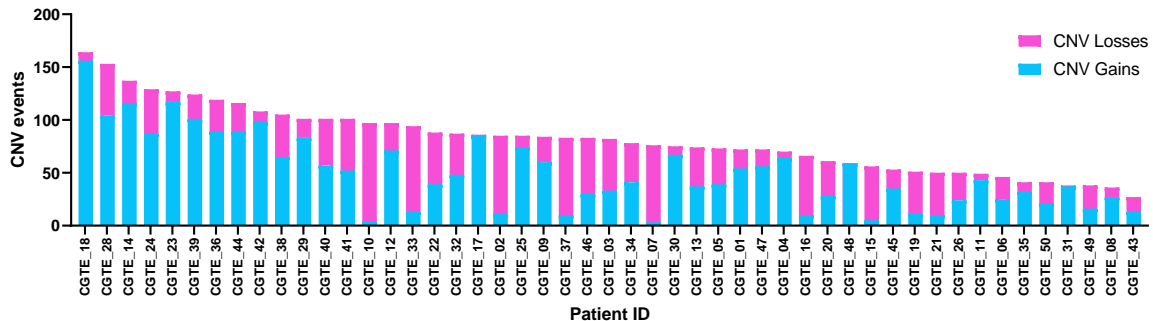


Figura 13. Distribución de eventos de variaciones en el número de copias (CNV) presentados por pacientes con adenocarcinoma gástrico atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología entre enero de 2019 y enero de 2020 (n=49). El color rosa indica pérdidas de CNV y el color azul indica ganancias de CNV.

Los cromosomas 2, 7, 8 y 20 se vieron afectados casi por completo por ganancias de CNV, mientras que los cromosomas 4 y 17 presentaron pérdidas de CNV casi en su totalidad. A pesar de que las CNV parecen afectar grandes regiones del genoma, nuestra cohorte muestra áreas de alta densidad donde las CNV tienden a ocurrir con mayor frecuencia (Figura 14a). La citobanda 20q13.33 fue la más frecuentemente afectada, alterada en el 73.46 % de los pacientes. Esta citobanda alberga diferentes genes, incluido *LAMA5*, que codifica para la subunidad alfa de la laminina 5. *LAMA5* fue el gen afectado con mayor frecuencia por CNV, con pérdidas de CNV en el 61.11 % de los casos. *SYCP2*, también presente en 20q13.33, codifica una proteína del complejo sinaptoninémico y se vio afectado por las ganancias de CNV en el 93.75 % de los casos. Adicionalmente, *NOTCH1*, alojado en la citobanda 9q34.4, presentó pérdidas de CNV en el 71 % de los casos, mientras que *JAG2*, que es un ligando de *NOTCH1* y está codificado en la citobanda 14q32.33, se vio afectado por pérdidas de CNV en el 78.57 % de los casos.

Al agrupar a los pacientes según la histología de su tumor (Figura 14b), los pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo difuso tienden a tener ganancias en 20q13.33 (p -value = 0.01, FDR = 1) y 22q11.21 (p -value = 0.04, FDR = 1) mientras que los pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal presentaron mayor frecuencia de pérdidas de CNV en las citobandas 7p12 (p -value < 0.01, FDR = 0.27), 14q24.2 (p -value = 0.01, FDR = 0.66) y 11q13.1 (p -value = 0.02, FDR = 0.66).

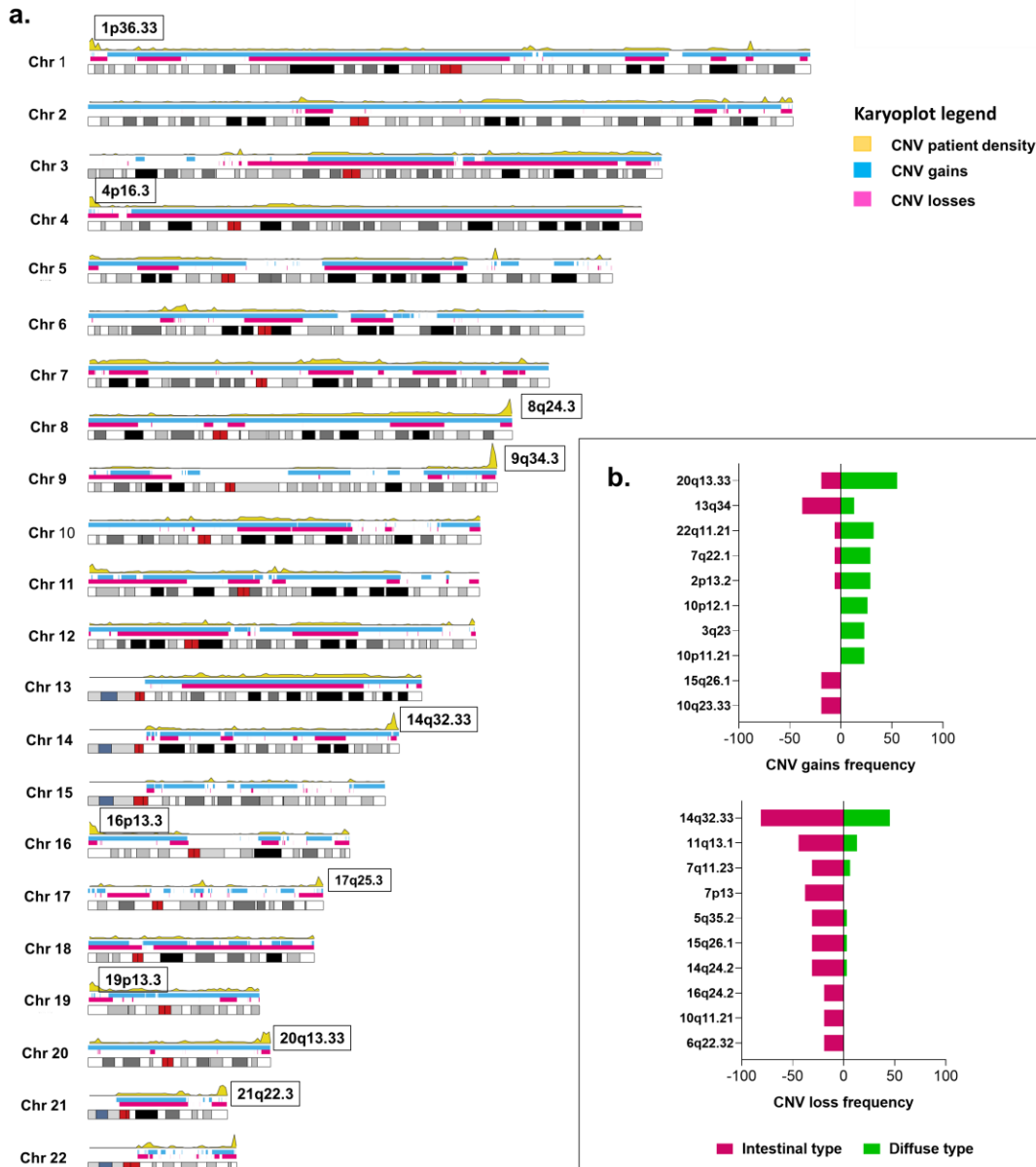


Figura 14. Variaciones en el número de copias (CNV) presentes en pacientes con adenocarcinoma gástrico atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología entre enero de 2019 y enero de 2020 (n=49). (a) Karyotplot que representa las regiones genómicas afectadas por las CNV en todos los pacientes (n = 49). El color azul representa las ganancias de CNV y el rosa las pérdidas de CNV. El diagrama de densidad amarillo representa la frecuencia de pacientes afectados por CNV en todo el genoma. Las diez citobandas más frecuentemente afectadas en todas las muestras se muestran en un recuadro en negrita. (b) Gráfico de barras divergentes que muestra la comparación entre las citobandas afectadas en pacientes con cáncer gástrico de tipo difuso e intestinal.

Los pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal también mostraron una alta frecuencia de ganancias de CNV en las citobandas 13.q14 (p -value = 0.04, FDR = 1), 10q23.33 (p -value = 0.03, FDR = 1) y 15q25.1 (p -value = 0.03, FDR = 1). Además, la presencia de células en anillo de sello se asoció con ganancias de CNV en las citobandas 6p22.2 (p -value = 0.02, FDR = 0.67) y 1q21.3 (p -value = 0.07, FDR = 0.67) (Figura 15a). Las pérdidas de CNV en la citobanda 4p16.33 se asociaron con la ausencia de células en anillo de sello (p -value = 0,03, FDR = 0,67) (Figura 15b). En cuanto a la edad de los pacientes, ganancias de CNV en las citobandas 15q22.2 (p -value < 0.01, FDR = 0.625), 12q24.3 (p -value = 0.01, FDR = 0.625) y 13q21.2 (p -value = 0.01, FDR = 0.625) se encontraron exclusivamente afectadas en pacientes con una edad de diagnóstico menor a 50 años (Figura 15c), en cambio pérdidas en las citobandas 7q36.1 (p -value < 0.01, FDR = 0.625), 15q26.1 (p -value = 0.02, FDR = 0.625), y 5q35.2 (p -value = 0.02, FDR = 0.625) se asociaron a una edad de diagnóstico mayor a los 50 años (Figura 15d).

IV.V. - VARIANTES ESTRUCTURALES E INFECCIÓN POR PATÓGENOS

Al agrupar a los pacientes según la presencia de agentes patógenos, observamos que los pacientes con *H. pylori* presentan una mayor frecuencia de ganancias de CNV en las citobandas 17q21.2 (p -value = 0.02, FDR = 0.57), 10q26.3 (p -value = 0.02, FDR = 0.57) y 10q25.3 (p -value = 0.02, FDR = 0.57). Adicionalmente, pérdidas de CNV en 12q12 (p -value = 0.01, FDR = 0.57) también fueron comunes en pacientes con infección por *H. pylori*.

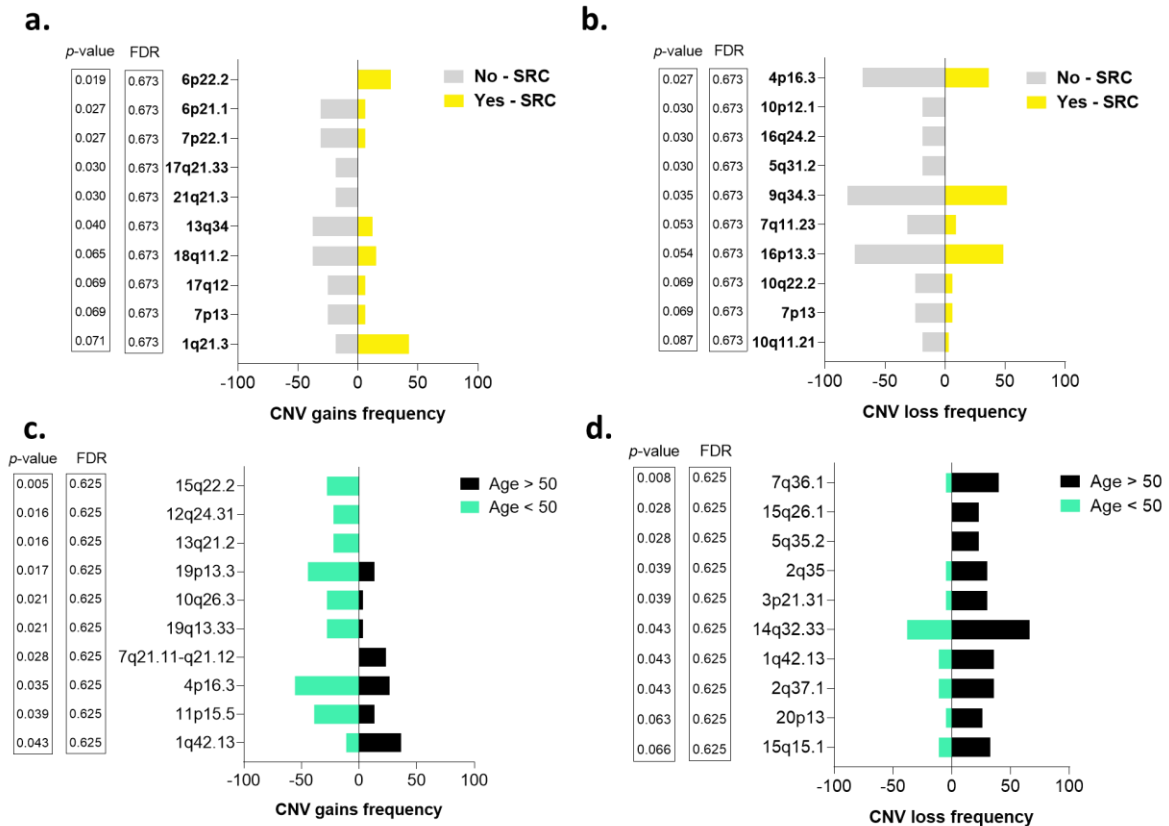


Figura 15. Células en anillo de sello y frecuencia de variantes estructurales. Los 10 genes principales afectados por las variaciones del número de copias (CNV) se ordenan de forma ascendente a partir del valor p de la prueba exacta de Fisher. a) Comparación de las ganancias de frecuencia de la CNV según la presencia de células en anillo de sello (SRC). b) Comparación de frecuencia de pérdidas CNV según presencia de SRC. c) Comparación de frecuencia de ganancia de CNV según la edad de los pacientes. d) Comparación de la frecuencia de pérdidas de CNV según la edad de los pacientes.

En cuanto a la presencia de EBV, observamos que los pacientes con infección positiva tienden a presentar una alta frecuencia de ganancias de CNV en las citobandas 19q13.42 (p -value = 0.01, FDR = 0.87), 18q22.2 (p -value = 0.01, FDR = 0.67) y 2p25.1 (p -value = 0.01, FDR = 0.67). No se encontraron diferencias en las pérdidas de CNV entre los pacientes con y sin infección por EBV (Figura 16).

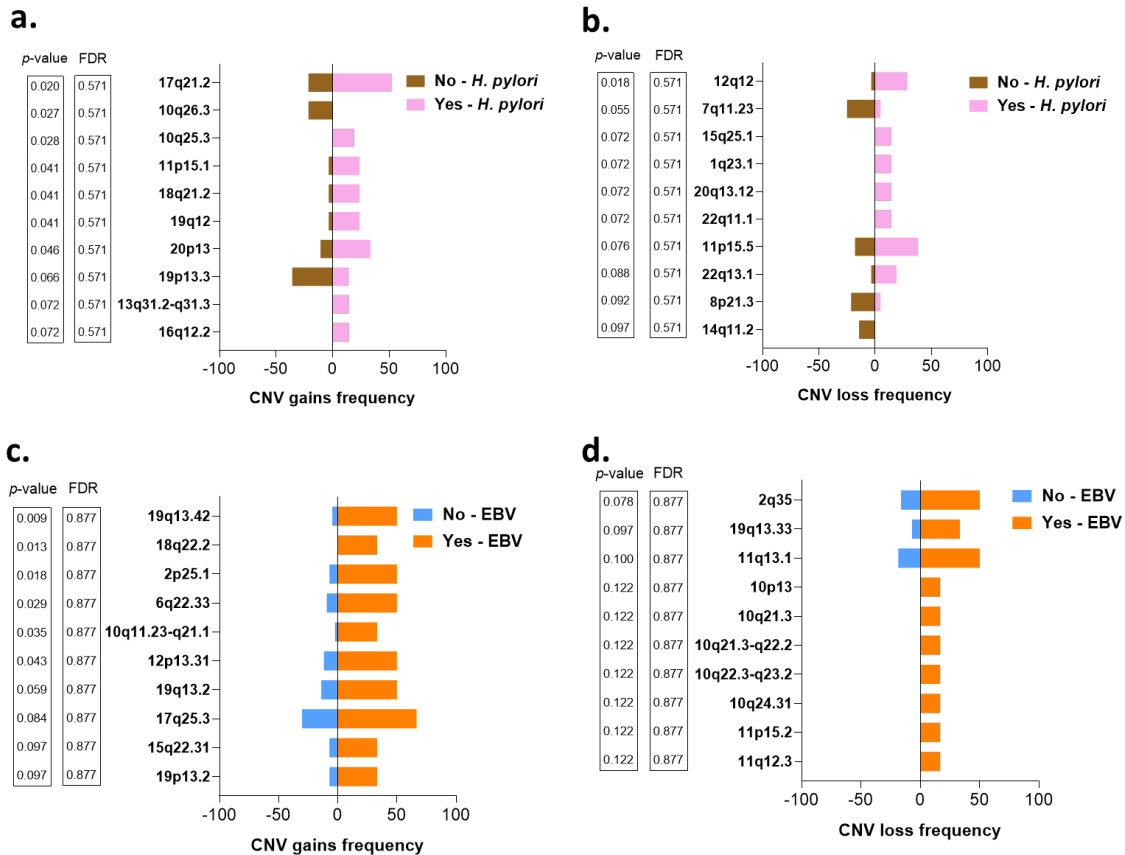


Figura 16. *Helicobacter pylori*, EBV y frecuencia de variantes estructurales. Los 10 genes principales afectados de manera más diferencial por las variaciones del número de copias (CNV) se ordenan a partir del valor *p* más pequeño identificado en la prueba exacta de Fisher. a) Comparación de las ganancias de frecuencia de la CNV según la presencia de *H. pylori*. b) Comparación de frecuencia de pérdidas de CNV según presencia de *H. pylori*. c) Comparación de las ganancias de frecuencia de la CNV según la presencia del virus de Epstein-Barr (EBV). d) Comparación de frecuencia de pérdidas de CNV según presencia de EBV.

V. - PROCESOS MUTACIONALES Y SUS ASOCIACIONES CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Los procesos mutacionales implicados en la carcinogénesis por adenocarcinoma gástrico de los pacientes se cuantificaron mediante un análisis de firmas mutacionales para identificar la contribución de las firmas de sustitución de una base (SBS: *single base substitution signature*). El SBS16 relacionado con el cáncer de hígado y la alta tasa de mutación debido a una actividad ineficiente de la vía de reparación por escisión de nucleótidos fue la firma más común, presente en el 33 % de los pacientes que mostraron una contribución superior a 0.2 (Figura 17), seguido

por el SBS1 relacionado con el proceso de envejecimiento, que se encontró en un 28 %.

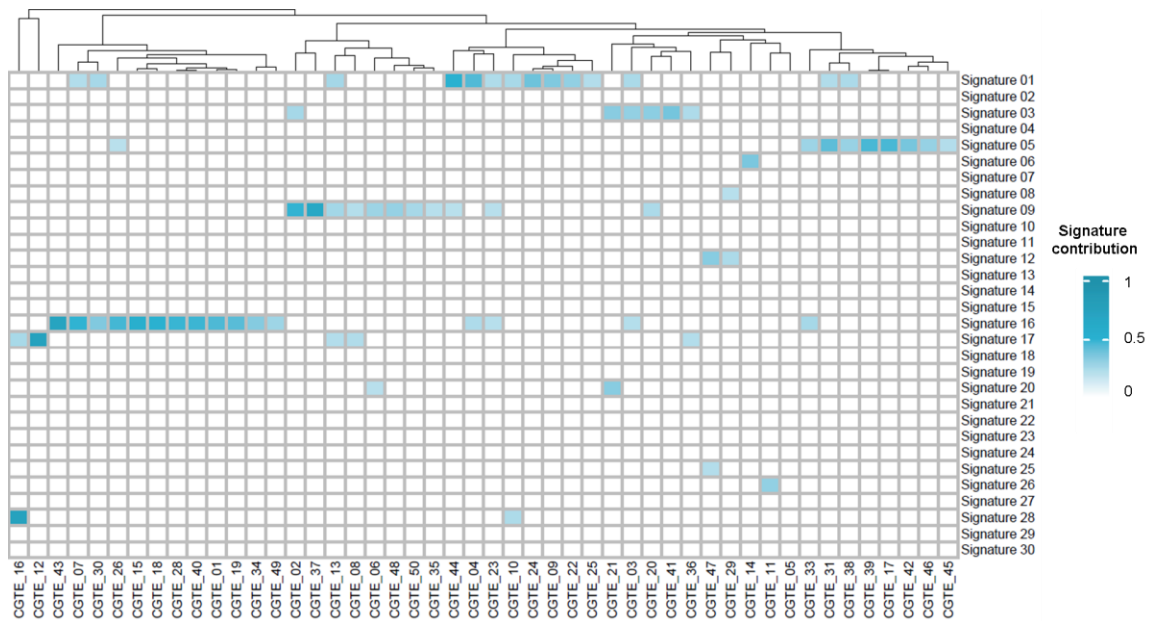


Figura 17. Firmas mutacionales estuvieron presentes en pacientes con adenocarcinoma gástrico tratados en el Instituto Nacional de Cancerología entre enero de 2019 y enero de 2020. Mapa de calor que presenta las firmas mutacionales agrupadas por el método de correlación de Pearson. La contribución de la firma se representa como un degradado de color.

Los pacientes se clasificaron según las similitudes en el patrón de las contribuciones de SBS; sin embargo, no se encontraron asociaciones. Al comparar la contribución de SBS con las características clínicas de los pacientes, identificamos que los tumores con alto TMB tenían una mayor contribución de SBS16 (Figura 18a), los pacientes con células en anillo de sello presentaron una menor contribución de SBS01 (Figura 18b) y los pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal presentaron una mayor contribución de SBS17 (Figura 18c).

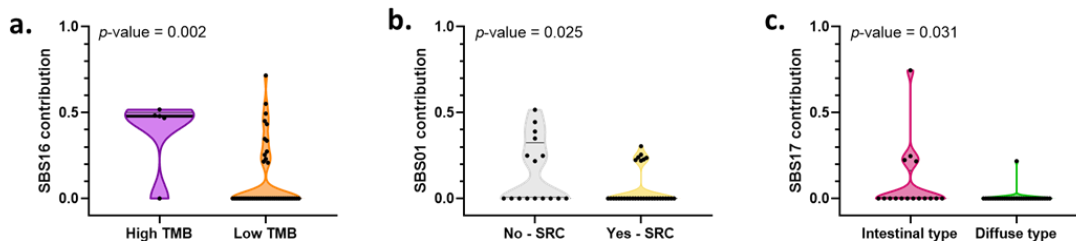


Figura 18. Procesos mutacionales asociados a las características clínico-patológicas de pacientes con adenocarcinoma gástrico atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología entre enero de 2019 y enero de 2020 (n = 49). a) Diagrama de violín que representa la asociación entre la contribución de la firma de sustitución de base única (SBS) 16 y el estado de carga mutacional tumoral (TMB) de los pacientes. b) Gráfico de violín que representa la asociación entre la contribución de SBS01 y la presencia de células en anillo de sello (SRS). c) Gráfico de violín que representa la asociación entre la contribución de SBS17 y la histología del tumor.

V. - COMPARACIÓN DE GENES AFECTADOS POR VARIANTES SOMÁTICAS Y VARIACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS ENTRE PACIENTES MEXICANOS Y OTRAS COHORTES

Uno de los objetivos de este trabajo es determinar si existen diferencias genéticas entre la población mexicana y otras poblaciones, por lo que para identificar las similitudes y/o diferencias entre el panorama mutacional de pacientes mexicanos y los genes mutados informados por pacientes de ascendencia europea y asiáticos, comparamos esta cohorte con otras dos cohortes. Comparamos los pacientes incluidos en este estudio (la cohorte INCan) con la cohorte del estudio de adenocarcinoma gástrico TCGA (116) y la cohorte OncoSG (132). La cohorte TCGA incluye pacientes asiáticos y de ascendencia europea, la cohorte OncoSG incluye pacientes asiáticos y la cohorte INCan incluye pacientes mexicanos. Las tres cohortes compartieron un total de 14 296 genes afectados por variantes somáticas y 10 521 genes afectados por CNV (Figura 19a). Sin embargo, alrededor de 5000 genes mutados eran exclusivos de la cohorte INCan. *TP53* fue el gen mutado con mayor frecuencia en todas las cohortes. *CDH1* se encontró más frecuentemente mutado con en la cohorte INCan (Figura 19b). Además, los genes codificados en la citobanda 1p36.33: *AGRN*, *MEGF6*, *TNFRSF18* y *TNFRSF4* parecían estar más afectados por las CNV en la cohorte INCan; y se vieron afectados por las pérdidas de la CNV. *WDR90* y *ABCA2*, que están codificados dentro de las citobandas 16p13.3 y 9q34.4, respectivamente, también se vieron afectados por las pérdidas de CNV.

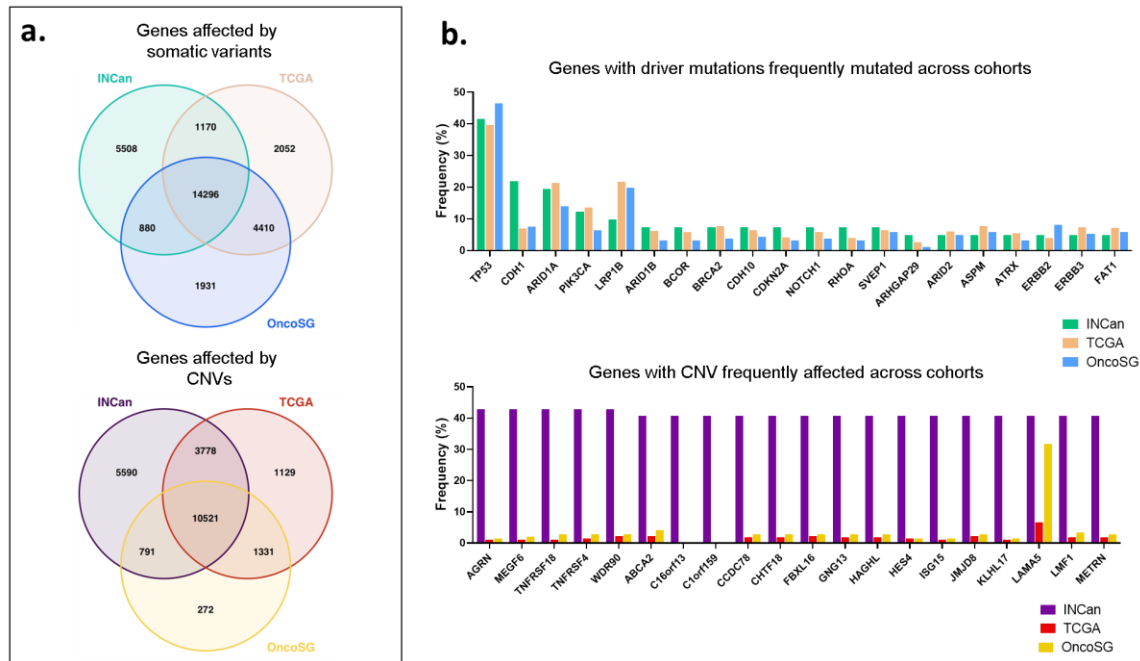


Figura 19. Genes afectados por variantes somáticas y variaciones en el número de copias en pacientes con adenocarcinoma gástrico entre tres cohortes diferentes. a) Diagrama de Venn que representa el número de variantes somáticas y estructurales compartidas entre los pacientes del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), el legado de la estación de bomberos de adenocarcinoma de estómago del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) y las cohortes de OncoSG. b) Gráfico de barras que presenta los 20 genes afectados con mayor frecuencia por mutaciones impulsoras y variaciones del número de copias (CNV) que se encuentran en nuestro análisis (cohorte INCan) y su frecuencia encontrada en las cohortes TCGA y OncoSG.

IV.VI. - DIVERSIDAD CLONAL Y SU ASOCIACIÓN CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Para inferir la diversidad intra tumoral de cada paciente, identificamos el número de subclones presentes en cada muestra. Dentro del análisis de diversidad clonal se identificó una variabilidad desde 1 hasta 5 subclones por muestra, con una mediana de 2 subclones (Figura 20). Las muestras se categorizaron de acuerdo con el número de subclones; las muestras con 2 o más subclones se consideraron como muestras con alta diversidad clonal. Identificamos que una alta diversidad clonal se asoció con tumores de histología difusa (p -value = 0.03). Se evaluó la posible relación entre la diversidad clonal otras variables cliniopatológicas como: edad \leq 45 años al momento del diagnóstico (p -value = 0.54), grado del tumor (p -value = 0.05)

y células en anillo de sello (p -value = 0.22) infección por *H. pylori* (p -value = 0.15) y por EBV (p -value = 0.75), pero no se encontraron asociaciones.

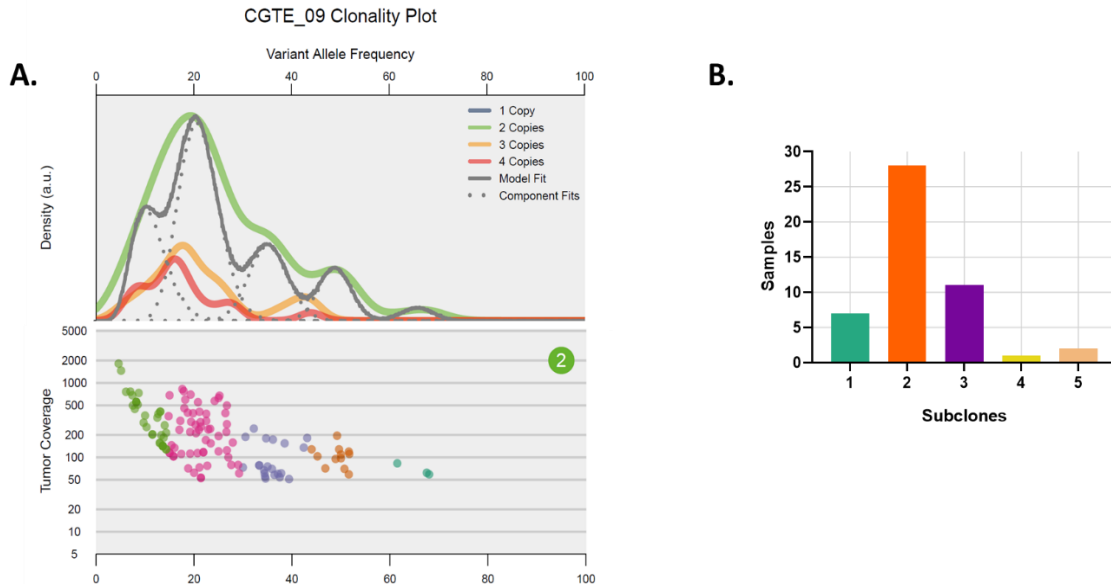


Figura 20 Diversidad clonal presente en pacientes con adenocarcinoma gástrico atendidos en el Instituto Nacional del Cáncer (N=29) entre enero de 2019 y enero de 2020. A) Gráfico de clonalidad de las muestras provenientes del paciente CGTE_09 que ejemplifica como es el resultado que genera el programa Sciclone al inferir la clonalidad de cada muestra. B) Gráfico de barra que representa la distribución de subclones presentes cada una de las muestras.

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio capaz de describir un panorama mutacional del adenocarcinoma gástrico en una cohorte de pacientes mexicanos utilizando muestras de tejido fresco. Aquí analizamos las variantes somáticas y las CNV usando secuenciación de exoma completo e identificamos un panorama mutacional para pacientes mexicanos con adenocarcinoma gástrico. Encontramos un panorama mutacional potencialmente diferente entre el adenocarcinoma gástrico de tipo difuso y el tipo intestinal en pacientes mexicanos. Los pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal presentan una mayor frecuencia de mutaciones en *NOTCH1*, ganancias de CNV en las citobandas 13.14, 10q23.33 y 12q25.1 y pérdidas de CNV en las citobandas 7p12, 14q24.2 y 11q13.1; mientras que los pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo difuso tendieron a presentar una mayor frecuencia de mutaciones de *CDH1* y ganancias de CNV en las citobandas 20q13.33 y 22q11.21. Los pacientes con una edad temprana al momento del diagnóstico presentaron una alta frecuencia mutacional en *CDH1* y ganancias en las citobandas 15q22.2, 12q24.3 y 13q21.2.

Esta cohorte mostró características clinicopatológicas similares a las reportadas para otros pacientes mexicanos e hispanos con adenocarcinoma gástrico. Los pacientes de este estudio presentaron una mayor proporción de adenocarcinoma gástrico de tipo difuso, un estado clínico III-IV y una baja proporción de infección por EBV. Estas características se alinean con las reportadas en otros estudios que utilizaron cohortes más grandes de pacientes mexicanos (134, 135), incluido un estudio previo de nuestro equipo (115), que también mencionó un predominio de adenocarcinoma gástrico de tipo difuso.

Similar a las cohortes asiáticas en las que se ha propuesto la TMB como biomarcador de supervivencia y uso de inmunoterapia, identificamos que el 10 % de los pacientes con adenocarcinoma gástrico tenían una TMB alta (136, 137). Comúnmente, la TMB alta se ha asociado con el adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal (138). En ese sentido, nosotros reportamos que los pacientes mexicanos con valores brutos de TMB más altos también se asociaron con el adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal. Parece que los pacientes mexicanos se comportan de

manera similar a los pacientes asiáticos en función a la TMB. Encontramos asociación entre una mayor contribución de SBS16 y valores elevados de TMB. Sin embargo, no se encontró evidencia de mutaciones somáticas en genes asociados con la vía de reparación de bases mal apareadas, un evento relacionado con la TMB alta de los pacientes con el fenotipo MSI (139). En pacientes afroamericanos con carcinoma de células escamosas de esófago, se atribuyó una asociación prominente entre SBS16 y TMB alta atribuida a defectos en la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER) de los pacientes con TMB alta (140, 141). Son necesarios otros estudios para exponer las implicaciones de los defectos en la vía NER en pacientes mexicanos con TMB alta.

Los estudios de secuenciación del exoma completo realizados en poblaciones de ascendencia asiática y europea han identificado un conjunto de mutaciones y genes con el potencial de impulsar la medicina personalizada en el cáncer gástrico (142-144), sin embargo, en estos estudios no se han incluido pacientes hispanos. Los pacientes mexicanos incluidos en esta cohorte exhibieron variantes somáticas en genes conocidos relacionados con el cáncer, como *TP53*, *CDH1* y *ARID1A*. Estudios realizados en la población hispana, observan una alta frecuencia de mutaciones de *CDH1*, especialmente en pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo difuso (145). La alta frecuencia de *CDH1* podría deberse al mayor número de pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo difuso incluidos en esta cohorte. *CDH1* codifica para la proteína de adhesión E-cadherina. Las mutaciones somáticas en *CDH1* se han asociado con la transición epitelial-mesenquimatoso en las células tumorales, lo que da como resultado un fenotipo tumoral más agresivo (146, 147). Las mutaciones de *CDH1* se asocian comúnmente con adenocarcinoma gástrico de tipo difuso, y aquí observamos esa misma tendencia.

Debido a la alta frecuencia del adenocarcinoma gástrico de tipo difuso reportada en pacientes hispanos, así como en población mexicana (134, 145), decidimos comparar el patrón mutacional de los pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo difuso e intestinal. Los pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo difuso mostraron mutaciones en *CDH1*, *RHOA* y *CDKN2A*. *RHOA* codifica para el pequeño

miembro de la familia GTPasa Rho. Las mutaciones de *RHOA* se han asociado con la supervivencia y la migración celulares a través de la inactivación de ROCK (148). En pacientes con linfoma, las mutaciones de *RHOA* se han evaluado como un biomarcador potencial de mal pronóstico (149), y las mutaciones de ganancia de función se han estudiado como un posible objetivo terapéutico para el cáncer gástrico (150). Todas las mutaciones de *RHOA* identificadas en este estudio fueron mutaciones sin sentido; sin embargo, debido a la alta frecuencia de adenocarcinoma gástrico de tipo difuso en la población mexicana, se requieren más estudios para identificar su utilidad tanto como biomarcador pronóstico; así como blanco terapéutico en pacientes mexicanos.

Las amplificaciones de citobanda 20q13.33 se asociaron con el adenocarcinoma gástrico de tipo difuso. En el cáncer colorrectal, las amplificaciones en la citobanda 20q13.33 se han asociado con estadios tumorales tempranos y mutaciones en *APC* y *KRAS* (151). *LAMA5*, que codifica para la subunidad 5 alfa de la laminina fue el gen afectado con mayor frecuencia dentro de la citobanda 20q13.33 en esta cohorte. En el cáncer colorrectal, la sobreexpresión de *LAMA5* se ha relacionado con metástasis hepática, angiogénesis e inhibición de la vía NOTCH1 (152). En el cáncer de ovario, la sobreexpresión de *LAMA5* se asoció con un buen pronóstico (153). No se han encontrado estudios sobre el uso potencial de *LAMA5* como biomarcador para el pronóstico del cáncer gástrico. *PSMA7* y *GID8* son dos genes que también se encuentran codificados en 20q13.33, se describieron como posibles blancos genéticos en el cáncer gástrico (154). La sobreexpresión de *PSMA7* se asoció con un mal pronóstico en pacientes con cáncer gástrico (155). Identificar si 20q13.33 se ve afectado en las primeras etapas del adenocarcinoma gástrico en pacientes mexicanos, o qué genes se ven afectados por las CNV en esta citobanda, requiere de la realización de más estudios.

Los pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal se asociaron con mutaciones en *NOTCH1*. La señalización de NOTCH se ha analizado ampliamente en la tumorigénesis del cáncer gástrico (156-158). En el cáncer colorrectal, el aumento de la expresión de *NOTCH1* se relaciona con una mayor infiltración de

células inmunitarias, volumen tumoral e invasión profunda (156, 159). En el cáncer de cuello uterino, se reportó que la pérdida de NOTCH1 a nivel nuclear es un predictor independiente de malignidad (160). Identificamos que *NOTCH1* y *JAG2* se vieron afectados exclusivamente por mutaciones deletéreas y principalmente por pérdidas de CNV. Con base en nuestros resultados, sugerimos que la vía de señalización de NOTCH podría ser poco activa en el adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal; sin embargo, las implicaciones clínicas de estas variantes genómicas aún deben estudiadas.

Una limitación de este estudio es el número de pacientes incluidos en esta cohorte, esto podría restringir el poder estadístico del análisis y dificultar la frecuencia de las variantes genómicas identificadas. De igual forma, un pequeño número de pacientes restringiría la representación del verdadero panorama molecular del adenocarcinoma gástrico de los pacientes mexicanos y podría limitar el poder estadístico para comparar el comportamiento molecular de nuestra cohorte con otras cohortes más grandes. Sin embargo, en este primer estudio que utilizó muestras frescas de una cohorte mexicana prospectiva, reportamos el panorama mutacional del adenocarcinoma gástrico y logramos identificar asociaciones entre variantes genómicas y características clinicopatológicas, como histología tumoral, morfología de células en anillo de sello y la presencia de *H. pylori* y EBV, que podría guiarnos en el diseño de estudios adicionales que incluyan una cohorte más grande para probar algunas de las variantes identificadas como biomarcadores de pronóstico para pacientes tratados con inhibidores de puntos de control inmunitarios u otras terapias.

Un punto importante para analizar en este trabajo es determinar la importancia del origen étnico de los pacientes y si esto puede influir en las alteraciones mutacionales del adenocarcinoma gástrico. Por ejemplo, se ha reportado que los pacientes afroamericanos tienden a presentar más variantes somáticas de *TP53* que los pacientes asiáticos, de ascendencia europea e hispanos (102); los pacientes de ascendencia europea tienden a presentar delecciones del gen de la fosfatasa *PTPRD* con más frecuencia que los pacientes asiáticos (161); y se ha encontrado una alta

frecuencia de variantes somáticas de *APC*, *ARID1A*, *KMT2A*, *PIK3CA* y *PTEN* en pacientes asiáticos en comparación con pacientes de ascendencia europea (162). Los hispanos son uno de los grupos étnicos con mayor diversidad genética (163, 164); y son el segundo grupo poblacional con mayor incidencia de cáncer gástrico; sin embargo, las variantes somáticas y estructurales de adenocarcinoma gástrico en este grupo étnico no se han explorado a fondo. Una revisión reciente publicada por nuestro equipo presentó el panorama mutacional de los pacientes hispanos con adenocarcinoma gástrico, identificando una distribución diferencial de las variantes según los países (165). Por lo tanto, los hispanos no deben considerarse un grupo étnico genéticamente homogéneo en la investigación del adenocarcinoma gástrico. Aquí, presentamos un panorama mutacional para adenocarcinoma gástrico en pacientes mexicanos para comprender mejor la tumorigénesis en pacientes de etnia hispana y así sentar precedentes que sirvan para el desarrollo de biomarcadores potenciales de cáncer gástrico; así como la búsqueda de blancos terapéuticos.

CONCLUSIÓN

Los pacientes mexicanos con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal tendieron a presentar una alta frecuencia de mutaciones en *NOTCH1*, ganancias de CNV en las citobandas 13.14, 10q23.33 y 12q25.1 y pérdidas de CNV en las citobandas 7p12, 14q24.2 y 11q13.1; mientras que los pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo difuso tendieron a presentar una alta frecuencia de mutaciones de *CDH1* y ganancias de CNV en las citobandas 20q13.33 y 22q11.21. Los pacientes con una edad temprana al momento del diagnóstico presentaron una alta frecuencia mutacional en *CDH1* y ganancias en las citobandas 15q22.2, 12q24.3 y 13q21.2. Se requiere más investigación para determinar si las alteraciones observadas en esta cohorte son recurrentes en población mexicana, lo cual permitiría no solo conocer el panorama mutacional del adenocarcinoma gástrico en población mexicana, si no proponer medicina personalizada para estos pacientes y así mejora su calidad de vida y sobrevivencia.

PERSPECTIVAS

Es necesario continuar con el estudio de las alteraciones genéticas en la población mexicana, para ello, es necesario realizar el estudio de replicación y validación para encontrar la frecuencia de los genes mutados aquí reportados en pacientes mexicanos. Posteriormente se debe de analizar el DNA circulante en sangre, para tratar de identificar estas alteraciones en sangre periférica, y así poder encontrar marcadores de esta neoplasia en etapas tempranas de la enfermedad o su asociación con algún desenlace pronóstico del adenocarcinoma gástrico, así como potenciales blancos terapéuticos.

A través de diferentes estudios hospitalarios en México, se ha observado una tendencia que sugiere que los pacientes mexicanos presentan mayor frecuencia de adenocarcinoma gástrico de tipo difuso; el tipo histológico más agresivo por presentar menor sobrevida, más capacidad metastásica y mayor resistencia al tratamiento de quimioterapia. Por lo tanto, contar con biomarcadores que ayuden a predecir el desenlace de la enfermedad, a seleccionar el tratamiento más adecuado o ayuden a su diagnóstico temprano, podrían ayudar a disminuir la mortalidad de estos pacientes. Es necesario realizar un estudio de validación con un numero de muestras mayor para confirmar la frecuencia de estos genes mutados. Una vez validados, se debe de identificar la presencia de estas mutaciones en sangre periférica realizando estudios de biopsia líquida para identifica DNA circulante y así poder estudiar marcadores de etapas tempranas de la enfermedad o su asociación con algún desenlace pronóstico del adenocarcinoma gástrico.

BIBLIOGRAFÍA

1. N Kontomanolis E, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Kalagasidou S, Pagkalos A, et al. Basic principles of molecular biology of cancer cell-Molecular cancer indicators. J BUON. 2021;26(5):1723-34.
2. Institute NC. What is cancer? [Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>].
3. Cox AD, Der CJ. Ras history: The saga continues. Small GTPases. 2010;1(1):2-27.
4. Reynolds SH, Anna CK, Brown KC, Wiest JS, Beattie EJ, Pero RW, et al. Activated protooncogenes in human lung tumors from smokers. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(4):1085-9.
5. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. Cell. 2000;100(1):57-70.
6. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discovery. 2022;12(1):31-46.
7. Hanahan D, Weinberg Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 2011;144(5):646-74.
8. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 2001;409(6822):860-921.
9. Venter JC, Adams Mark D, Myers Eugene W, Li Peter W, Mural Richard J, Sutton Granger G, et al. The Sequence of the Human Genome. Science. 2001;291(5507):1304-51.
10. Berger MF, Mardis ER. The emerging clinical relevance of genomics in cancer medicine. Nat Rev Clin Oncol. 2018;15(6):353-65.
11. Shen T, Pajaro-Van de Stadt SH, Yeat NC, Lin JC. Clinical applications of next generation sequencing in cancer: from panels, to exomes, to genomes. Front Genet. 2015;6:215.
12. Alexandrov LB, Kim J, Haradhvala NJ, Huang MN, Tian Ng AW, Wu Y, et al. The repertoire of mutational signatures in human cancer. Nature. 2020;578(7793):94-101.
13. Alexandrov LB, Stratton MR. Mutational signatures: the patterns of somatic mutations hidden in cancer genomes. Curr Opin Genet Dev. 2014;24:52-60.
14. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2010;11(3):220-8.
15. Torgovnick A, Schumacher B. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. Front Genet. 2015;6:157.

16. Maley CC, Galipeau PC, Li X, Sanchez CA, Paulson TG, Blount PL, et al. The combination of genetic instability and clonal expansion predicts progression to esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2004;64(20):7629-33.
17. Li K, Luo H, Huang L, Zhu X. Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer Cell Int.* 2020;20:16.
18. Yao Y, Dai W. Genomic Instability and Cancer. *J Carcinog Mutagen.* 2014;5.
19. Akagi K, Oki E, Taniguchi H, Nakatani K, Aoki D, Kuwata T, et al. The real-world data on microsatellite instability status in various unresectable or metastatic solid tumors. *Cancer Sci.* 2021.
20. Zhu L, Li Z, Wang Y, Zhang C, Liu Y, Qu X. Microsatellite instability and survival in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Mol Clin Oncol.* 2015;3(3):699-705.
21. Hoevenaer WHM, Janssen A, Quirindongo AI, Ma H, Klaasen SJ, Teixeira A, et al. Degree and site of chromosomal instability define its oncogenic potential. *Nat Commun.* 2020;11(1):1501.
22. Drews RM, Hernando B, Tarabichi M, Haase K, Lesluyes T, Smith PS, et al. A pan-cancer compendium of chromosomal instability. *Nature.* 2022;606(7916):976-83.
23. Sansregret L, Vanhaesebroeck B, Swanton C. Determinants and clinical implications of chromosomal instability in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(3):139-50.
24. Romero-Hidalgo S, Ochoa-Leyva A, Garcíarrubio A, Acuña-Alonzo V, Antúnez-Argüelles E, Balcazar-Quintero M, et al. Demographic history and biologically relevant genetic variation of Native Mexicans inferred from whole-genome sequencing. *Nature Communications.* 2017;8(1):1005.
25. Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Fernández-López JC, Zakharia F, Sikora M, Contreras AV, et al. Human genetics. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science.* 2014;344(6189):1280-5.
26. Vázquez-Moreno M, Zeng H, Locia-Morales D, Peralta-Romero J, Asif H, Maharaj A, et al. The Melanocortin 4 Receptor p.Ile269Asn Mutation Is Associated with Childhood and Adult Obesity in Mexicans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(4).
27. Vázquez-Moreno M, Locia-Morales D, Valladares-Salgado A, Sharma T, Perez-Herrera A, Gonzalez-Dzib R, et al. The MC4R p.Ile269Asn mutation confers a high risk for type 2 diabetes in the Mexican population via obesity dependent and independent effects. *Sci Rep.* 2021;11(1):3097.
28. Martínez-Magaña JJ, Genis-Mendoza AD, Villatoro Velázquez JA, Camarena B, Martín Del Campo Sanchez R, Fleiz Bautista C, et al. The Identification of Admixture

Patterns Could Refine Pharmacogenetic Counseling: Analysis of a Population-Based Sample in Mexico. *Front Pharmacol.* 2020;11:324.

29. Marsh S, King CR, Van Booven DJ, Revollo JY, Gilman RH, McLeod HL. Pharmacogenomic assessment of Mexican and Peruvian populations. *Pharmacogenomics.* 2015;16(5):441-8.

30. Castelán-Martínez OD, Hoyo-Vadillo C, Sandoval-García E, Sandoval-Ramírez L, González-Ibarra M, Solano-Solano G, et al. Allele frequency distribution of CYP2C9 2 and CYP2C9 3 polymorphisms in six Mexican populations. *Gene.* 2013;523(2):167-72.

31. Gonzalez-Covarrubias V, Morales-Franco M, Cruz-Correa OF, Martínez-Hernández A, García-Ortíz H, Barajas-Olmos F, et al. Variation in Actionable Pharmacogenetic Markers in Natives and Mestizos From Mexico. *Front Pharmacol.* 2019;10:1169.

32. Gallardo-Rincón D, Álvarez-Gómez RM, Montes-Servín E, Toledo-Leyva A, Michel-Tello D, Alamilla-García G, et al. Clinical Evaluation of BRCA1/2 Mutation in Mexican Ovarian Cancer Patients. *Transl Oncol.* 2020;13(2):212-20.

33. Fragoso-Ontiveros V, Velázquez-Aragón JA, Nuñez-Martínez PM, de la Luz Mejía-Aguayo M, Vidal-Millán S, Pedroza-Torres A, et al. Mexican BRCA1 founder mutation: Shortening the gap in genetic assessment for hereditary breast and ovarian cancer patients. *PloS one.* 2019;14(9):e0222709-e.

34. Carrot-Zhang J, Soca-Chafre G, Patterson N, Thorner AR, Nag A, Watson J, et al. Genetic Ancestry Contributes to Somatic Mutations in Lung Cancers from Admixed Latin American Populations. *Cancer Discov.* 2021;11(3):591-8.

35. Hernández-Pedro N, Soca-Chafre G, Alaez-Versón C, Carrillo-Sánchez K, Avilés-Salas A, Vergara E, et al. Mutational profile by targeted next generation sequencing of non-small cell lung cancer in the Mexican population. *Salud Publica Mex.* 2019;61(3):308-17.

36. Bustos-Carpinteyro AR, Oliveira C, Sousa A, Oliveira P, Pinheiro H, Carvalho J, et al. CDH1 somatic alterations in Mexican patients with diffuse and mixed sporadic gastric cancer. *BMC Cancer.* 2019;19(1):69.

37. Gimbrone NT, Sarcar B, Gordian ER, Rivera JI, Lopez C, Yoder SJ, et al. Somatic Mutations and Ancestry Markers in Hispanic Lung Cancer Patients. *J Thorac Oncol.* 2017;12(12):1851-6.

38. Romero-Cordoba SL, Salido-Guadarrama I, Rebollar-Vega R, Bautista-Piña V, Dominguez-Reyes C, Tenorio-Torres A, et al. Comprehensive omic characterization of breast cancer in Mexican-Hispanic women. *Nat Commun.* 2021;12(1):2245.

39. Schneider BG, Hilsenbeck SG, Hensel CH, Pekkel V, Shelton CH, Rodríguez-Martínez HA, et al. p53 mutations in gastric and colorectal cancers in Texas Hispanics versus Anglos. *Virchows Arch.* 1994;424(2):187-93.
40. Campos-García V, Vázquez-Morfín C, Alvarado-Núñez I, Ramírez-Noguera P, Montiel-Sosa F. Mutaciones y poliformismos mitocondriales en un paciente mexicano con cáncer de próstata. *Rev Mex Urol.* 2017;77(1):61-70.
41. Soybel DI. Anatomy and Physiology of the Stomach. *Surgical Clinics of North America.* 2005;85(5):875-94.
42. Hunt RH, Camilleri M, Crowe SE, El-Omar EM, Fox JG, Kuipers EJ, et al. The stomach in health and disease. *Gut.* 2015;64(10):1650-68.
43. Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Prz Gastroenterol.* 2019;14(1):26-38.
44. Lee YC, Chiang TH, Chou CK, Tu YK, Liao WC, Wu MS, et al. Association Between *Helicobacter pylori* Eradication and Gastric Cancer Incidence: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology.* 2016;150(5):1113-24.e5.
45. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1994;61:1-241.
46. Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 2007;133(2):659-72.
47. Zhao Y, Zhang J, Cheng ASL, Yu J, To KF, Kang W. Gastric cancer: genome damaged by bugs. *Oncogene.* 2020;39(17):3427-42.
48. Ansari S, Yamaoka Y. Virulence Factor Cytotoxin-Associated Gene A (CagA)-Mediated Gastric Pathogenicity. *Int J Mol Sci.* 2020;21(19).
49. Ford AC, Forman D, Hunt RH, Yuan Y, Moayyedi P. *Helicobacter pylori* eradication therapy to prevent gastric cancer in healthy asymptomatic infected individuals: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ.* 2014;348:g3174.
50. Guillermo Espinoza-Contreras J, Idalia Torres-Ruiz M, Ariel Waller-González L, De Jesús Ramírez-García J, Torres-López J, Ventura-Juárez J, et al. Immunological markers and *Helicobacter pylori* in patients with stomach cancer: Expression and correlation. *Biomedical reports.* 2020;12(5):233-43.
51. Poreba E, Broniarczyk JK, Gozdzicka-Jozefiak A. Epigenetic mechanisms in virus-induced tumorigenesis. *Clin Epigenetics.* 2011;2(2):233-47.

52. Figueiredo C, Camargo MC, Leite M, Fuentes-Pananá EM, Rabkin CS, Machado JC. Pathogenesis of Gastric Cancer: Genetics and Molecular Classification. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017;400:277-304.
53. Naseem M, Barzi A, Brezden-Masley C, Puccini A, Berger MD, Tokunaga R, et al. Outlooks on Epstein-Barr virus associated gastric cancer. *Cancer Treat Rev.* 2018;66:15-22.
54. Yang J, Liu Z, Zeng B, Hu G, Gan R. Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: A distinct subtype. *Cancer Lett.* 2020;495:191-9.
55. Stading R, Gastelum G, Chu C, Jiang W, Moorthy B. Molecular mechanisms of pulmonary carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Implications for human lung cancer. *Semin Cancer Biol.* 2021;76:3-16.
56. Wang GZ, Zhang L, Zhao XC, Gao SH, Qu LW, Yu H, et al. The Aryl hydrocarbon receptor mediates tobacco-induced PD-L1 expression and is associated with response to immunotherapy. *Nat Commun.* 2019;10(1):1125.
57. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965;64:31-49.
58. Luo W, Fedda F, Lynch P, Tan D. CDH1 Gene and Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: Molecular and Histological Alterations and Implications for Diagnosis And Treatment. *Frontiers in pharmacology.* 2018;9:1421-.
59. Hass HG, Smith U, Jäger C, Schäffer M, Wellhäuber U, Hehr T, et al. Signet ring cell carcinoma of the stomach is significantly associated with poor prognosis and diffuse gastric cancer (Lauren's): single-center experience of 160 cases. *Onkologie.* 2011;34(12):682-6.
60. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2021;71(3):209-49.
61. Wong MCS, Huang J, Chan PSF, Choi P, Lao XQ, Chan SM, et al. Global Incidence and Mortality of Gastric Cancer, 1980-2018. *JAMA Netw Open.* 2021;4(7):e2118457.
62. Collaborators GSC. The global, regional, and national burden of stomach cancer in 195 countries, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5(1):42-54.
63. Holowatyj AN, Ulrich CM, Lewis MA. Racial/Ethnic Patterns of Young-Onset Noncardia Gastric Cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* 2019;12(11):771-80.

64. La Vecchia C, Negri E, D'Avanzo B, Franceschi S. Electric refrigerator use and gastric cancer risk. *Br J Cancer*. 1990;62(1):136-7.
65. Coggon D, Barker DJ, Cole RB, Nelson M. Stomach cancer and food storage. *J Natl Cancer Inst*. 1989;81(15):1178-82.
66. Leung WK, Wong IOL, Cheung KS, Yeung KF, Chan EW, Wong AYS, et al. Effects of *Helicobacter pylori* Treatment on Incidence of Gastric Cancer in Older Individuals. *Gastroenterology*. 2018;155(1):67-75.
67. WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking [Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/156262/9789241564922_eng.pdf].
68. He FJ, MacGregor GA. Reducing population salt intake-time for global action. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2015;17(1):10-3.
69. Tsuchihashi T, Ishimitsu T, Ando K, Kusaka M, Ichihara A, Miura K, et al. JSH Statement: Tokyo declaration promoting salt reduction by the Japanese Society of Hypertension-the JSH Tokyo declaration. *Hypertens Res*. 2020;43(11):1133-4.
70. Hipgrave DB, Chang S, Li X, Wu Y. Salt and Sodium Intake in China. *JAMA*. 2016;315(7):703-5.
71. Pérez-Tepayo S, Rodríguez-Ramírez S, Unar-Munguía M, Shamah-Levy T. Trends in the dietary patterns of Mexican adults by sociodemographic characteristics. *Nutr J*. 2020;19(1):51.
72. Vega-Vega O, Fonseca-Correa JI, Mendoza-De la Garza A, Rincón-Pedrero R, Espinosa-Cuevas A, Baeza-Arias Y, et al. Contemporary Dietary Intake: Too Much Sodium, Not Enough Potassium, yet Sufficient Iodine: The SALMEX Cohort Results. *Nutrients*. 2018;10(7):816.
73. Zavala-Arciniega L, Reynales-Shigematsu LM, Levy DT, Lau YK, Meza R, Gutiérrez-Torres DS, et al. Smoking trends in Mexico, 2002–2016: before and after the ratification of the WHO's Framework Convention on Tobacco Control. *Tobacco Control*. 2020;29(6):687-91.
74. Bosques-Padilla FJ, Remes-Troche JM, González-Huezo MS, Pérez-Pérez G, Torres-López J, Abdo-Francis JM, et al. IV consenso mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Revista de Gastroenterología de México*. 2018;83(3):325-41.
75. Villalobos Pérez JdJ, Bournon MT, Loaeza del Castillo A, Torres Villalobos G. Variaciones en la frecuencia de cáncer del aparato digestivo en el transcurso de 35 años

en cuatro instituciones de la Ciudad de México de distinto nivel socioeconómico. *Gaceta Médica de México*. 2014;150:49-57.

76. Roesch-Dietlen F, Ortuño-García KJ, González-Santés M, Grube-Pagola P, Remes-Troche JM, Díaz-Roesch F, et al. Cancer of the digestive system in Veracruz. The magnitude of the problem by 2025. *Rev Gastroenterol Mex (Engl Ed)*. 2020;85(2):145-50.

77. Canseco-Ávila LM, Zamudio-Castellanos FY, Sánchez-González RA, Trujillo-Vizuet MG, Domínguez-Arrebillaga S, López-López CA. Gastric cancer epidemiology in tertiary healthcare in Chiapas. *Rev Gastroenterol Mex (Engl Ed)*. 2019;84(3):310-6.

78. Gómez-Dantés H, Lamadrid-Figueroa H, Cahuana-Hurtado L, Silverman-Retana O, Montero P, González-Robledo MC, et al. The burden of cancer in Mexico, 1990-2013. *Salud Publica Mex*. 2016;58(2):118-31.

79. Martínez-Galindo MG, Zamarripa-Dorsey F, Carmona-Castañeda A, Angeles-Labra A, Peñavera-Hernández R, Ugarte-Briones C, et al. Histopathologic characteristics of gastric adenocarcinoma in Mexican patients: A 10-year experience at the Hospital Juárez de México. *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*. 2015;80(1):21-6.

80. Lim CH, Cho YK, Kim SW, Choi MG, Rhee JK, Chung YJ, et al. The chronological sequence of somatic mutations in early gastric carcinogenesis inferred from multiregion sequencing of gastric adenomas. *Oncotarget*. 2016;7(26):39758-67.

81. Rokutan H, Abe H, Nakamura H, Ushiku T, Arakawa E, Hosoda F, et al. Initial and crucial genetic events in intestinal-type gastric intramucosal neoplasia. *J Pathol*. 2019;247(4):494-504.

82. Huang KK, Ramnarayanan K, Zhu F, Srivastava S, Xu C, Tan ALK, et al. Genomic and Epigenomic Profiling of High-Risk Intestinal Metaplasia Reveals Molecular Determinants of Progression to Gastric Cancer. *Cancer Cell*. 2018;33(1):137-50.e5.

83. Jung SH, Kim SY, An CH, Lee SH, Jung ES, Park HC, et al. Clonal Structures of Regionally Synchronous Gastric Adenomas and Carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2018;24(19):4715-25.

84. Shimizu T, Marusawa H, Matsumoto Y, Inuzuka T, Ikeda A, Fujii Y, et al. Accumulation of somatic mutations in TP53 in gastric epithelium with *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 2014;147(2):407-17.e3.

85. Tang FB, Li ZX, Wang YM, Zhang L, Ma JL, Zhou T, et al. Toll-like receptor 1 and 10 polymorphisms, *Helicobacter pylori* susceptibility and risk of gastric lesions in a high-risk Chinese population. *Infect Genet Evol*. 2015;31:263-9.

86. Kang G, Hwang WC, Do IG, Wang K, Kang SY, Lee J, et al. Exome sequencing identifies early gastric carcinoma as an early stage of advanced gastric cancer. *PLoS One*. 2013;8(12):e82770.
87. Choi JH, Kim YB, Ahn JM, Kim MJ, Bae WJ, Han SU, et al. Identification of genomic aberrations associated with lymph node metastasis in diffuse-type gastric cancer. *Exp Mol Med*. 2018;50(4):6.
88. Cho SY, Park JW, Liu Y, Park YS, Kim JH, Yang H, et al. Sporadic Early-Onset Diffuse Gastric Cancers Have High Frequency of Somatic CDH1 Alterations, but Low Frequency of Somatic RHOA Mutations Compared With Late-Onset Cancers. *Gastroenterology*. 2017;153(2):536-49.e26.
89. Chang HR, Nam S, Lee J, Kim JH, Jung HR, Park HS, et al. Systematic approach identifies RHOA as a potential biomarker therapeutic target for Asian gastric cancer. *Oncotarget*. 2016;7(49):81435-51.
90. Röcken C, Behrens H-M, Böger C, Krüger S. Clinicopathological characteristics of *RHOA* mutations in a Central European gastric cancer cohort. *Journal of Clinical Pathology*. 2016;69(1):70.
91. Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, et al. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat Genet*. 2014;46(6):583-7.
92. Schneider BG, Pulitzer DR, Brown RD, Prihoda TJ, Bostwick DG, Saldivar V, et al. Allelic imbalance in gastric cancer: an affected site on chromosome arm 3p. *Genes Chromosomes Cancer*. 1995;13(4):263-71.
93. Yasumoto M, Sakamoto E, Ogasawara S, Isobe T, Kizaki J, Sumi A, et al. Muscle RAS oncogene homolog (MRAS) recurrent mutation in Borrmann type IV gastric cancer. *Cancer Med*. 2017;6(1):235-44.
94. Cho SJ, Yoon C, Lee JH, Chang KK, Lin JX, Kim YH, et al. Mutations in Diffuse-Type Gastric Adenocarcinoma Promote Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Clin Cancer Res*. 2018;24(24):6556-69.
95. Wong SS, Kim KM, Ting JC, Yu K, Fu J, Liu S, et al. Genomic landscape and genetic heterogeneity in gastric adenocarcinoma revealed by whole-genome sequencing. *Nat Commun*. 2014;5:5477.
96. Lee YS, Cho YS, Lee GK, Lee S, Kim YW, Jho S, et al. Genomic profile analysis of diffuse-type gastric cancers. *Genome Biol*. 2014;15(4):R55.

97. Xing R, Zhou Y, Yu J, Yu Y, Nie Y, Luo W, et al. Whole-genome sequencing reveals novel tandem-duplication hotspots and a prognostic mutational signature in gastric cancer. *Nature Communications*. 2019;10(1):2037.
98. Shu Y, Zhang W, Hou Q, Zhao L, Zhang S, Zhou J, et al. Prognostic significance of frequent CLDN18-ARHGAP26/6 fusion in gastric signet-ring cell cancer. *Nat Commun*. 2018;9(1):2447.
99. Pernot S, Voron T, Perkins G, Lagorce-Pages C, Berger A, Taieb J. Signet-ring cell carcinoma of the stomach: Impact on prognosis and specific therapeutic challenge. *World J Gastroenterol*. 2015;21(40):11428-38.
100. Wang R, Song S, Harada K, Ghazanfari Amlashi F, Badgwell B, Pizzi MP, et al. Multiplex profiling of peritoneal metastases from gastric adenocarcinoma identified novel targets and molecular subtypes that predict treatment response. *Gut*. 2020;69(1):18-31.
101. Liu J, McClelland M, Stawiski EW, Gnad F, Mayba O, Haverty PM, et al. Integrated exome and transcriptome sequencing reveals ZAK isoform usage in gastric cancer. *Nat Commun*. 2014;5:3830.
102. van Beek EJAH, Hernandez JM, Goldman DA, Davis JL, McLaughlin K, Ripley RT, et al. Rates of TP53 Mutation are Significantly Elevated in African American Patients with Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2018;25(7):2027-33.
103. Wang K, Yuen ST, Xu J, Lee SP, Yan HH, Shi ST, et al. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet*. 2014;46(6):573-82.
104. Lee HH, Kim SY, Jung ES, Yoo J, Kim TM. Mutation heterogeneity between primary gastric cancers and their matched lymph node metastases. *Gastric Cancer*. 2019;22(2):323-34.
105. Bustos-Carpinteyro AR, Delgado-Figueroa N, Santiago-Luna E, Magaña-Torres MT, Sánchez-López JY. Association between the CDH1-472delA and -160C>A polymorphisms and diffuse and intestinal gastric cancer in a Mexican population. *Genet Mol Res*. 2016;15(3).
106. Medina-Franco H, Medina AR-DI, Vizcaino G, Medina-Franco JL. Single Nucleotide Polymorphisms in the Promoter Region of the E-cadherin Gene in Gastric Cancer: Case-Control Study in a Young Mexican Population. *Annals of Surgical Oncology*. 2007;14(8):2246-9.

107. Ramos-de la Medina A, More H, Medina-Franco H, Humar B, Gamboa A, Ortiz LJ, et al. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) at CDH1 promoter region in familial gastric cancer. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 2006;98:36-41.
108. Martínez Valenzuela C, Castelán-Maldonado EE, Carvajal-Zarrabal O, Calderón-Garcidueñas AL. First report of a Mexican family with mutation in the CDH1 gene. *Mol Genet Genomic Med*. 2020;8(11):e1208.
109. García-Ruvalcaba A, Rizo de la Torre LDC, Magaña-Torres MT, Prado-Montes-de-Oca E, Ruiz-Ramírez AV, Rangel-Villalobos H, et al. Predicting Pathogenicity of CDH1 Gene Variants in Patients with Early-onset Diffuse Gastric Cancer from Western Mexico. *Rev Invest Clin*. 2021.
110. Martínez-Campos C, Torres-Poveda K, Camorlinga-Ponce M, Flores-Luna L, Maldonado-Bernal C, Madrid-Marina V, et al. Polymorphisms in IL-10 and TGF- β gene promoter are associated with lower risk to gastric cancer in a Mexican population. *BMC Cancer*. 2019;19(1):453.
111. Sicinschi LA, Lopez-Carrillo L, Camargo MC, Correa P, Sierra RA, Henry RR, et al. Gastric cancer risk in a Mexican population: Role of *Helicobacter pylori* CagA positive infection and polymorphisms in interleukin-1 and -10 genes. *International Journal of Cancer*. 2006;118(3):649-57.
112. Torres-Jasso JH, Marín ME, Santiago-Luna E, Leoner JC, Torres J, Magaña-Torres MT, et al. EGFR gene polymorphisms -216G>T and -191C>A are risk markers for gastric cancer in Mexican population. *Genet Mol Res*. 2015;14(1):1802-7.
113. Vázquez-Ibarra KC, Bustos-Carpinteyro AR, García-Ruvalcaba A, Magaña-Torres MT, Gutiérrez-Aguilar R, Marín-Contreras ME, et al. The ERBB2 gene polymorphisms rs2643194, rs2934971, and rs1058808 are associated with increased risk of gastric cancer. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2019;52(5):e8379-e.
114. Pérez-Pérez GI, Bosques-Padilla FJ, Crosatti ML, Tijerina-Menchaca R, Garza-González E. Role of p53 codon 72 polymorphism in the risk of development of distal gastric cancer. *Scand J Gastroenterol*. 2005;40(1):56-60.
115. Sánchez Y, Vaca-Paniagua F, Herrera L, Oñate L, Herrera-Goepfert R, Navarro-Martínez G, et al. Nutritional Indexes as Predictors of Survival and Their Genomic Implications in Gastric Cancer Patients. *Nutr Cancer*. 2020:1-11.
116. Network CGAR. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517):202-9.

117. Peña-Llopis S, Brugarolas J. Simultaneous isolation of high-quality DNA, RNA, miRNA and proteins from tissues for genomic applications. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2240-55.
118. Chang KL, Chen Y-Y, Shibata D, Weiss LM. Description of an In Situ Hybridization Methodology for Detection of Epstein-Barr Virus RNA in Paraffin-Embedded Tissues, with a Survey of Normal and Neoplastic Tissues. *Diagnostic Molecular Pathology.* 1992;1(4).
119. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2010;26(5):589-95.
120. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297-303.
121. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. From FastQ Data to High-Confidence Variant Calls: The Genome Analysis Toolkit Best Practices Pipeline. *Current Protocols in Bioinformatics.* 2013;43(1):11.0.1-.0.33.
122. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol.* 2013;31(3):213-9.
123. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* 2012;22(3):568-76.
124. Benjamin D, Sato T, Cibulskis K, Getz G, Stewart C, Lichtenstein L. Calling Somatic SNVs and Indels with Mutect2. *bioRxiv.* 2019:861054.
125. Boeva V, Popova T, Bleakley K, Chiche P, Cappo J, Schleiermacher G, et al. Control-FREEC: a tool for assessing copy number and allelic content using next-generation sequencing data. *Bioinformatics.* 2012;28(3):423-5.
126. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, Gay L, Ali SM, Ennis R, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med.* 2017;9(1):34.
127. Tamborero D, Rubio-Perez C, Deu-Pons J, Schroeder MP, Vivancos A, Rovira A, et al. Cancer Genome Interpreter annotates the biological and clinical relevance of tumor alterations. *Genome Med.* 2018;10(1):25.
128. Maleki F, Ovens K, Hogan DJ, Kusalik AJ. Gene Set Analysis: Challenges, Opportunities, and Future Research. *Front Genet.* 2020;11:654.

129. Miller CA, White BS, Dees ND, Griffith M, Welch JS, Griffith OL, et al. SciClone: inferring clonal architecture and tracking the spatial and temporal patterns of tumor evolution. *PLoS Comput Biol*. 2014;10(8):e1003665.
130. Laganà A. Computational Approaches for the Investigation of Intra-tumor Heterogeneity and Clonal Evolution from Bulk Sequencing Data in Precision Oncology Applications. In: Laganà A, editor. *Computational Methods for Precision Oncology*. Cham: Springer International Publishing; 2022. p. 101-18.
131. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517):202-9.
132. Guo YA, Chang MM, Huang W, Ooi WF, Xing M, Tan P, et al. Mutation hotspots at CTCF binding sites coupled to chromosomal instability in gastrointestinal cancers. *Nat Commun*. 2018;9(1):1520.
133. Mi H, Ebert D, Muruganujan A, Mills C, Albou LP, Mushayamaha T, et al. PANTHER version 16: a revised family classification, tree-based classification tool, enhancer regions and extensive API. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D394-D403.
134. Martínez-Galindo MG, Zamarripa-Dorsey F, Carmona-Castañeda A, Angeles-Labra A, Peñavera-Hernández R, Ugarte-Briones C, et al. Histopathologic characteristics of gastric adenocarcinoma in Mexican patients: a 10-year experience at the Hospital Juárez of Mexico. *Rev Gastroenterol Mex*. 2015;80(1):21-6.
135. Trujillo Rivera A, Sampieri CL, Morales Romero J, Montero H, Acosta Mesa HG, Cruz Ramírez N, et al. Risk factors associated with gastric cancer in Mexico: education, breakfast and chili. *Rev Esp Enferm Dig*. 2018;110(6):372-9.
136. Kim J, Kim B, Kang SY, Heo YJ, Park SH, Kim ST, et al. Tumor Mutational Burden Determined by Panel Sequencing Predicts Survival After Immunotherapy in Patients With Advanced Gastric Cancer. *Front Oncol*. 2020;10:314.
137. Folprecht G. Tumor mutational burden as a new biomarker for PD-1 antibody treatment in gastric cancer. *Cancer Commun (Lond)*. 2019;39(1):74.
138. Cai H, Jing C, Chang X, Ding D, Han T, Yang J, et al. Mutational landscape of gastric cancer and clinical application of genomic profiling based on target next-generation sequencing. *J Transl Med*. 2019;17(1):189.
139. Zhang L, Wang Y, Li Z, Lin D, Liu Y, Zhou L, et al. Clinicopathological features of tumor mutation burden, Epstein-Barr virus infection, microsatellite instability and PD-L1 status in Chinese patients with gastric cancer. *Diagn Pathol*. 2021;16(1):38.

140. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415-21.
141. Erkizan HV, Sukhadia S, Natarajan TG, Marino G, Notario V, Lichy JH, et al. Exome sequencing identifies novel somatic variants in African American esophageal squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 2021;11(1):14814.
142. Cai H, Jing C, Chang X, Ding D, Han T, Yang J, et al. Mutational landscape of gastric cancer and clinical application of genomic profiling based on target next-generation sequencing. *Journal of Translational Medicine*. 2019;17(1):189.
143. Nemtsova MV, Kalinkin AI, Kuznetsova EB, Bure IV, Alekseeva EA, Bykov II, et al. Clinical relevance of somatic mutations in main driver genes detected in gastric cancer patients by next-generation DNA sequencing. *Sci Rep*. 2020;10(1):504.
144. Pan X, Ji X, Zhang R, Zhou Z, Zhong Y, Peng W, et al. Landscape of somatic mutations in gastric cancer assessed using next-generation sequencing analysis. *Oncol Lett*. 2018;16(4):4863-70.
145. Wang SC, Yeu Y, Hammer STG, Xiao S, Zhu M, Hong C, et al. Hispanic/Latino Patients with Gastric Adenocarcinoma Have Distinct Molecular Profiles Including a High Rate of Germline. *Cancer Res*. 2020;80(11):2114-24.
146. Zhao H, Hu H, Chen B, Xu W, Zhao J, Huang C, et al. Overview on the Role of E-Cadherin in Gastric Cancer: Dysregulation and Clinical Implications. *Front Mol Biosci*. 2021;8:689139.
147. Shenoy S. CDH1 (E-Cadherin) Mutation and Gastric Cancer: Genetics, Molecular Mechanisms and Guidelines for Management. *Cancer management and research*. 2019;11:10477-86.
148. Nam S, Kim JH, Lee DH. RHOA in Gastric Cancer: Functional Roles and Therapeutic Potential. *Front Genet*. 2019;10:438.
149. Lage LAdPC, Barreto GC, Culler HF, Cavalcanti JB, Alves LdO, Nardinelli L, et al. Rhoa Mutation Is a Potential Biomarker Associated with Adverse Prognosis and High-Tumor Burden in Patients with Nodal Peripheral Lymphomas with T-Helper Follicular Phenotype (nPTCL-Thf): Data from a Brazilian Retrospective Cohort of Nodal PTCL. *Blood*. 2021;138(Supplement 1):4482-.
150. Kim JH, Park S, Lim SM, Eom HJ, Balch C, Lee J, et al. Rational design of small molecule RHOA inhibitors for gastric cancer. *Pharmacogenomics J*. 2020;20(4):601-12.

151. Bui VM, Mettling C, Jou J, Sun HS. Genomic amplification of chromosome 20q13.33 is the early biomarker for the development of sporadic colorectal carcinoma. *BMC Med Genomics*. 2020;13(Suppl 10):149.
152. Gordon-Weeks A, Lim SY, Yuzhalin A, Lucotti S, Vermeer JA, Jones K, et al. Tumour-Derived Laminin α 5 (LAMA5) Promotes Colorectal Liver Metastasis Growth, Branching Angiogenesis and Notch Pathway Inhibition. *Cancers*. 2019;11(5).
153. Diao B, Yang P. Comprehensive Analysis of the Expression and Prognosis for Laminin Genes in Ovarian Cancer. *Pathol Oncol Res*. 2021;27:1609855.
154. Cheng L, Wang P, Yang S, Yang Y, Zhang Q, Zhang W, et al. Identification of genes with a correlation between copy number and expression in gastric cancer. *BMC Med Genomics*. 2012;5:14.
155. Xia S, Tang Q, Wang X, Zhang L, Jia L, Wu D, et al. Overexpression of PSMA7 predicts poor prognosis in patients with gastric cancer. *Oncol Lett*. 2019;18(5):5341-9.
156. Yao Y, Ni Y, Zhang J, Wang H, Shao S. The role of Notch signaling in gastric carcinoma: molecular pathogenesis and novel therapeutic targets. *Oncotarget*. 2017;8(32):53839-53.
157. Katoh M. Precision medicine for human cancers with Notch signaling dysregulation (Review). *Int J Mol Med*. 2020;45(2):279-97.
158. Du X, Cheng Z, Wang YH, Guo ZH, Zhang SQ, Hu JK, et al. Role of Notch signaling pathway in gastric cancer: a meta-analysis of the literature. *World J Gastroenterol*. 2014;20(27):9191-9.
159. Hu J, Yu J, Gan J, Song N, Shi L, Liu J, et al. Notch1/2/3/4 are prognostic biomarker and correlated with immune infiltrates in gastric cancer. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(3):2595-609.
160. Vázquez-Ulloa E, Ramos-Cruz AC, Prada D, Avilés-Salas A, Chávez-Blanco AD, Herrera LA, et al. Loss of nuclear NOTCH1, but not its negative regulator NUMB, is an independent predictor of cervical malignancy. *Oncotarget*; Vol 9, No 27. 2018.
161. Schumacher SE, Shim BY, Corso G, Ryu MH, Kang YK, Roviello F, et al. Somatic copy number alterations in gastric adenocarcinomas among Asian and Western patients. *PLoS One*. 2017;12(4):e0176045.
162. Jia F, Teer JK, Knepper TC, Lee JK, Zhou HH, He YJ, et al. Discordance of Somatic Mutations Between Asian and Caucasian Patient Populations with Gastric Cancer. *Mol Diagn Ther*. 2017;21(2):179-85.

163. Conomos MP, Laurie CA, Stilp AM, Gogarten SM, McHugh CP, Nelson SC, et al. Genetic Diversity and Association Studies in US Hispanic/Latino Populations: Applications in the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos. *Am J Hum Genet.* 2016;98(1):165-84.
164. González Burchard E, Borrell LN, Choudhry S, Naqvi M, Tsai H-J, Rodriguez-Santana JR, et al. Latino Populations: A Unique Opportunity for the Study of Race, Genetics, and Social Environment in Epidemiological Research. *American Journal of Public Health.* 2005;95(12):2161-8.
165. Cerrato-Izaguirre D, Chirino YI, García-Cuellar CM, Santibáñez-Andrade M, Prada D, Hernández-Guerrero A, et al. Mutational landscape of gastric adenocarcinoma in Latin America: A genetic approach for precision medicine. *Genes Dis.* 2022;9(4):928-40.