



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Tecnología Médica

**Perfiles de expresión génica asociados a pronóstico en
cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología
Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Alvaro De Jesus HUAMANI ORTIZ

ASESORES

Heli Jaime BARRÓN PASTOR

César Alexander ORTIZ ROJAS (Coasesor)

Lima, Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

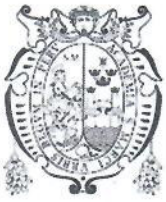
Referencia bibliográfica

Huamani A. Perfiles de expresión génica asociados a pronóstico en cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Tecnología Médica; 2024.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Alvaro De Jesus Huamani Ortiz
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	70265860
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-2025-5575
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Heli Jaime Barrón Pastor
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	09793154
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-4041-4406
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	César Alexander Ortiz Rojas
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	44263698
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-3420-803X
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Yesica Llimpe Mitma de Barrón
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10720210
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Mario Monteghirfo Gomero

Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08795755
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Doris Virginia Huerta Canales de Miranda
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08213401
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.5.4 Tecnologías ómicas y bioinformática aplicadas en salud
Grupo de investigación	Grupo de Investigación y Docencia en Medicina Molecular - MEDMOL
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Proyectos de investigación para Grupos Investigación. A2201065.
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Facultad de medicina San Fernando, Avenida Almirante Miguel Grau, Lima, Lima Metropolitana 15106, Perú Latitud: -12.056643 Longitud: -77.022945
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Octubre 2022 - Enero 2024
URL de disciplinas OCDE	Oncología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.02.21 Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03 Bioinformática https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.02.03



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú, Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Tecnología Médica



UNMSM

Firmado digitalmente por SANDOVAL VEGAS Miguel Hernan FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 11.04.2024 11:35:10 -05:00

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD PRESENCIAL PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO(A) EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN EL ÁREA DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

Conforme a lo estipulado en el Art. 113 inciso C del Estatuto de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (R.R. No. 03013-R-16) y Art. 45.2 de la Ley Universitaria 30220. El Jurado de Sustentación de Tesis nombrado por la Dirección de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, conformado por los siguientes docentes:

Presidente: Dra. Yesica Llimpe Mitma de Barrón
Miembros: Dr. Mario Monteghirfo Gomero
Dra. Doris Virginia Huerta Canales de Miranda
Asesor(a): Dr. Heli Jaime Barrón Pastor



UNMSM

Firmado digitalmente por FERNANDEZ GIUSTI VDA DE PELLA Alicia Jesus FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 15.04.2024 17:34:25 -05:00

Se reunieron en la ciudad de Lima, el día 11 de abril del 2024, siendo las 09:00 horas, procediendo a evaluar la Sustentación de Tesis, titulado **“Perfiles de expresión génica asociados a pronóstico en cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites”**, para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica del Señor:

Alvaro De Jesus Huamani Ortiz

Habiendo obtenido el calificativo de:

.....20.....
(En números)

.....Veinte.....
(En letras)

Que corresponde a la mención de: *Sobresaliente*

Quedando conforme con lo antes expuesto, se disponen a firmar la presente Acta.

.....
Presidente
Dra. Yesica Llimpe Mitma de Barrón
D.N.I: 10720210



.....
Miembro
Dr. Mario Monteghirfo Gomero
D.N.I: 08795755

.....
Miembro
Dra. Doris Virginia Huerta Canales de Miranda
D.N.I: 08213401

.....
Asesor(a) de Tesis
Dr. Heli Jaime Barrón Pastor
D.N.I: 09793154



CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, **Heli Jaime Barrón Pastor**, en mi condición de asesor acreditado con Resolución Decanal N° 004066-2022-D-FM/UNMSM de la tesis, cuyo título es “**Perfiles de expresión génica asociados a pronóstico en cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites**”, presentado por el Bachiller: **Alvaro De Jesus Huamani Ortiz** para optar el título profesional de Licenciado en Tecnología Médica, en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica.

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de **6 %** de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional**.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título profesional de Licenciado en Tecnología Médica, en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica.

Atentamente,



Firmado digitalmente por BARRON
PASTOR Heli Jaime FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 08.04.2024 22:14:21 -05:00

Dr. Heli Jaime Barrón Pastor

DNI: 09793154



Huella digital

Lima, 08 de abril del 2024

Se adjunta: Resultado del Informe del Turnitin

DEDICATORIA

A mis padres, por su amor incondicional y apoyo constante a lo largo de este viaje académico.

A mí mismo, bien hecho por no abandonar esto a mitad de camino. Fue un viaje, pero aquí estamos, celebrando el fin de esta etapa.

AGRADECIMIENTO

Con gratitud infinita, a mis padres, por creer en mí, incluso en los momentos de mayor desafío. Este trabajo no habría sido posible sin su amor y respaldo.

A mi supervisor, Dr. Heli Jaime Barrón Pastor, cuya orientación experta y dedicación fueron fundamentales para el éxito de esta investigación.

Al Dr. Cesar Alexander Ortiz Rojas, cuya invaluable ayuda al inicio de esta tesis fueron esenciales para establecer las bases de esta investigación.

A los jurados de tesis, por sus valiosos comentarios que fueron esenciales para pulir y perfeccionar este trabajo. Aprecio sinceramente su tiempo, los cuales contribuyeron significativamente a mi proceso de aprendizaje.

Al grupo de investigación en Inmunología y Cáncer, por su colaboración, apoyo y contribuciones durante el desarrollo de esta tesis. Trabajar con un equipo tan comprometido y talentoso ha sido inspirador y enriquecedor.

A todos aquellos que, de una forma u otra, contribuyeron a este logro, mi más sincero agradecimiento. Este trabajo no habría sido posible sin su ayuda.

ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES	3
1.2. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN	7
1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	8
1.3.1 OBJETIVO GENERAL	8
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
1.4 BASES TEÓRICAS	9
1.4.1 BASE TEÓRICA	9
1.4.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS	21
1.4.3 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS	23
CAPÍTULO II: MÉTODOS	24
2 DISEÑO METODOLÓGICO	25
2.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	25
2.1.2 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	25
2.1.3 POBLACIÓN	25
2.1.4 MUESTRA Y MUESTREO	26
2.1.4.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	26
2.1.4.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	26
2.1.5 VARIABLES	26
2.1.6 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	27
2.1.7 PROCEDIMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS	28
2.1.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS	31
CAPÍTULO III: RESULTADOS	32
CAPÍTULO: IV. DISCUSIÓN	50
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	56
5.1 CONCLUSIONES	57
5.2 RECOMENDACIONES	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	70

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características clínicas en la cohorte del TCGA según la expresión del gen *MAP4K4*.

Tabla 2. Características clínicas en la cohorte del ACRG según la expresión del gen *MAP4K4*.

Tabla 3. Vías biológicas asociadas con la expresión alta del gen *MAP4K4* en la cohorte del TCGA.

Tabla 4. Vías biológicas asociadas con la expresión alta del gen *MAP4K4* en la cohorte del ACRG.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación histológica y molecular en el cáncer gástrico.

Figura 2. Diferencias en el entorno inmune entre los tumores con inestabilidad de microsatélites alta y tumores con microsatélites estables.

Figura 3. Asociación de los perfiles de expresión génica con la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad en las cohortes del TCGA y ACRG.

Figura 4. Supervivencia global en pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites según la expresión del gen *MAP4K4*.

Figura 5. Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites según la expresión del gen *MAP4K4*.

Figura 6. Capacidad pronóstica del gen *MAP4K4* en pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites mediante la curva ROC según la supervivencia global de 3 años de seguimiento.

Figura 7. Supervivencia global de los pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites según la regresión de Cox.

Figura 8. Supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites según la regresión univariada de Cox.

Figura 9. Supervivencia global entre diferentes subtipos en ambas cohortes según la expresión alta del gen *MAP4K4* según la regresión univariada de Cox.

Figura 10. Comparación entre las etapas clínicas del cáncer gástrico según la expresión del gen *MAP4K4*.

Figura 11. Análisis de mutaciones en la cohorte del TCGA según la expresión del gen *MAP4K4*.

Figura 12. Comparación de muestras pareadas entre tejido normal y tejido tumoral según la expresión del gen *MAP4K4*.

Figura 13. Análisis de redundancia entre las vías asociadas con la expresión alta del gen *MAP4K4*.

Figura 14. Infiltración inmunitaria asociada con la expresión del gen *MAP4K4*.

RESUMEN

Introducción: El cáncer gástrico constituye uno de los tipos de cáncer más agresivos e importantes a nivel global. Ha sido objeto de diversas iniciativas de clasificación a lo largo del tiempo, entre ellos, los estudios del *The Cancer Genome Atlas* y del *Asian Cancer Research Group*. Estos estudios identificaron al subtipo de inestabilidad de microsatélites, que se caracterizan por presentar alteraciones en el sistema de reparación de bases mal pareadas en el ADN y un pronóstico favorable. Sin embargo, algunos pacientes presentan complicaciones. Además, estas clasificaciones moleculares permiten una mejor comprensión de la heterogeneidad del cáncer gástrico a diferencia de los sistemas actuales de clasificación que sólo están centrados en la extensión anatómica. En tiempos de la medicina de precisión, estos sistemas presentan limitaciones y necesitan ser refinados. **Objetivo:** Evaluar e identificar genes cuyos perfiles de expresión se desempeñen como marcadores pronósticos clave en el cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites. **Materiales y métodos:** Datos de clínicos y de transcriptoma de *The Cancer Genome Atlas* (n=68) y *Asian Cancer Research Group* (n=68) obtenidos de los repositorios virtuales del *Firebrowse* y del *Gene Expression Omnibus*, respectivamente. Los pacientes fueron dicotomizados en grupos de expresión génica alta y baja. La asociación con tasas de supervivencia se analizó mediante regresiones de Cox. Asimismo, se utilizó la expresión para predecir el microambiente tumoral y las vías biológicas. **Resultados:** La expresión alta del gen *MAP4K4* está asociada con la supervivencia (HR>1, p<0,05, AUC>0,5). Asimismo, encontramos un enriquecimiento de fibroblastos asociados al cáncer y actividad alta de la respiración mitocondrial. **Conclusiones:** La expresión alta del gen *MAP4K4* se asocia con tasas más bajas de supervivencia global y libre de enfermedad. Además, este perfil de expresión contribuye a la composición del microambiente y altera el estado metabólico del tumor.

Palabras clave: Cáncer gástrico, inestabilidad de microsatélites, transcriptoma, supervivencia, *MAP4K4*.

ABSTRACT

Introduction: Gastric cancer constitutes one of the most aggressive and significant cancer types globally. It has been the subject of various classification initiatives over time, including studies by The Cancer Genome Atlas and the Asian Cancer Research Group. These studies identified the subtype of microsatellite instability, characterized by alterations in the DNA mismatch repair system and a favorable prognosis. However, some patients experience complications. Additionally, these molecular classifications provide a better understanding of gastric cancer heterogeneity compared to current anatomically centered classification systems. In the era of precision medicine, these systems have limitations and need refinement. **Objective:** To evaluate and identify genes whose expression profiles serve as key prognostic markers in microsatellite instability gastric cancer. **Materials and Methods:** Clinical and transcriptome data from The Cancer Genome Atlas (n=68) and the Asian Cancer Research Group (n=68) were obtained from virtual repositories Firebrowse and Gene Expression Omnibus, respectively. Patients were dichotomized into high and low gene expression groups. Association with survival rates was analyzed using Cox regressions. Additionally, gene expression was used to predict the tumor microenvironment and biological pathways. **Results:** High expression of the *MAP4K4* gene is associated with survival (HR>1, p<0.05, AUC>0.5). Furthermore, we observed an enrichment of cancer-associated fibroblasts and high mitochondrial respiratory activity. **Conclusions:** High expression of the *MAP4K4* gene is associated with lower overall and disease-free survival rates. Additionally, this expression profile contributes to the composition of the tumor microenvironment and alters the tumor's metabolic state.

Keywords: Gastric cancer, microsatellite instability, transcriptome, survival, *MAP4K4*.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La intención de esta tesis es responder qué genes presentan perfiles de expresión que se asocian con tasas de supervivencia en pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites. Para lo cual, este trabajo se ha estructurado de la siguiente manera:

El primer capítulo abarca una breve introducción sobre las perspectivas generales y específicas del cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites. De este modo, la importancia de este estudio radica en que algunos pacientes con inestabilidad de microsatélites responden mal al tratamiento y presentan recaídas, señalando la necesidad de biomarcadores más específicos. Asimismo, se necesita un refinamiento de los sistemas de clasificación actuales que no se centran en la heterogeneidad tumoral. Posterior a ello, se exponen los objetivos de esta investigación y sus definiciones teóricas que apoyan el entendimiento de la misma.

El segundo apartado comprende la metodología empleada, que incluye la descripción de la muestra analizada, los criterios de selección, la explicación de las variables: pronóstico y perfiles de expresión génica. Adicionalmente, se detalla la forma de recolección de datos y los diferentes análisis estadísticos del presente estudio, así como el cumplimiento de las normas éticas

El tercer capítulo expone los resultados obtenidos con respecto a la identificación y evaluación de los perfiles de expresión génica que se asocian con el pronóstico en pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites.

El cuarto capítulo compara los resultados obtenidos en este estudio con resultados previos reportados en la literatura, se discuten algunos resultados y también se demuestra similitud entre algunos con respecto al potencial pronóstico del gen *MAP4K4*.

El quinto capítulo muestra las conclusiones siendo la más resaltante la identificación de 3 genes como marcadores pronóstico relacionados con la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad. Finalmente, se muestran las recomendaciones y se

adjuntan las referencias bibliográficas junto con el anexo que indica el flujograma seguido para la evaluación e identificación de genes asociados con el pronóstico.

1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES

El cáncer gástrico es uno de los cánceres agresivos más comunes, siendo el cuarto cáncer relacionado con la mortalidad y el quinto más prevalente (1), con alrededor de 1.1 millones de nuevos casos al año. A pesar de una disminución en las tasas de incidencia y mortalidad en algunas regiones en las últimas décadas, sigue siendo un desafío de salud importante a nivel mundial (2,3). A pesar de mejoras significativas en métodos quirúrgicos, quimioterapia e inmunoterapia para el tratamiento del cáncer gástrico, la supervivencia sigue siendo pobre, especialmente para pacientes en etapas avanzadas (4). Asimismo, las tasas de supervivencia a 5 años varían significativamente según la etapa de la enfermedad, oscilando entre el 5.3% para estadios avanzados y el 68.8% para enfermedades localizadas (5). Curiosamente, aunque las tasas de incidencia han estado disminuyendo en algunas regiones, se proyecta que la carga global de cáncer gástrico aumentará en un 62% para 2040 (2).

Ha habido diferentes sistemas de clasificación propuestos a lo largo del tiempo que han sido muy útiles para fines diagnósticos y pronósticos. Un sistema clásico es la clasificación histológica de Lauren, que divide el cáncer gástrico en dos subtipos principales: tumores intestinales y difusos (6). Los tumores gástricos del subtipo intestinal se caracterizan por formaciones glandulares, mientras que el subtipo difuso tiene un patrón de células poco cohesivas e invasividad alta, relacionado con resultados adversos (7). Otro sistema propuesto es la clasificación de la OMS, que proporciona una categorización más completa y se basa en la apariencia histológica y, en algunos casos, en el perfil de expresión inmunológica de los tumores (8). Adicional a este, el sistema de clasificación TNM, desarrollado por el Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer (AJCC, por sus siglas en inglés) y la Unión para el Control Internacional del Cáncer (UICC, por sus siglas en inglés), se utiliza para diagnosticar el cáncer, guiar decisiones de tratamiento y predecir el pronóstico de tumores sólidos, incluido el cáncer gástrico (9). Ya desde hace algunos años, se han emprendido iniciativas de

secuenciación de alto rendimiento para caracterizar el panorama genómico del cáncer gástrico, lo que ha llevado a una comprensión más profunda de la heterogeneidad entre los pacientes. Una contribución fundamental en este sentido proviene del estudio del TCGA, que caracterizó vías biológicas desreguladas e identificó marcadores en las distintas categorías del cáncer gástrico (10). Esta clasificación estratifica el cáncer gástrico en cuatro subtipos: tumores positivos para el virus de Epstein-Barr (EBV), inestabilidad de microsatélites (MSI o MSI-H), tumores genómicamente estables (GS) y tumores con inestabilidad cromosómica (CIN) (10). Del mismo modo, el estudio del ACRG ha desempeñado un papel crucial al establecer subtipos moleculares clínicamente relevantes mediante análisis de expresión génica y perfil de mutaciones (11). Este sistema clasifica el cáncer gástrico en: inestabilidad de microsatélites (MSI o MSI-H), microsatélites estables con transición epitelial-mesenquimal (MSS/EMT), MSS con mutación del gen *TP53* (MSS/TP53-) y MSS con el gen *TP53* de tipo salvaje o intacto (MSS/TP53+) (11). Estas clasificaciones moleculares integrales contribuyen significativamente a la comprensión de la heterogeneidad del cáncer gástrico, en comparación con los sistemas de clasificación previos (11,12).

Los tumores pertenecientes a la categoría de MSI representan entre el 5 y el 33% de los pacientes con cáncer gástrico, y se caracterizan por una alta tasa de mutación causada por disfunción del MMR (13), un mecanismo celular crítico responsable de mantener la estabilidad genómica. Los genes del MMR, incluidos *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*, desempeñan un papel fundamental en corregir errores que ocurren durante la replicación del ADN (14). La iniciación de la MSI a menudo surge de mutaciones somáticas o alteraciones epigenéticas en los genes del MMR. Por ejemplo, la hipermetilación del promotor, especialmente del gen *MLH1*, actúa como un mecanismo epigenético prominente que lleva al silenciamiento de los genes del MMR y a la subsiguiente MSI (15). Además, se ha implicado en el cáncer gástrico con MSI mutaciones germinales en los genes MMR, aunque estas son menos frecuentes, están presentes (16).

El cáncer gástrico con MSI se considera una categoría de pronóstico favorable, asociada con un diagnóstico temprano (etapas I o II) y un menor riesgo de recurrencia y metástasis (11,17). Así, estos pacientes tratados con procedimientos estándar

muestran una mayor tasa de OS, con más del 70% de pacientes vivos a los 5 años de seguimiento, y una mayor tasa de DFS, con más del 80% de pacientes sin recaídas a los 5 años de seguimiento (18–21). Incluso, aún continúan los esfuerzos por mejorar los tratamientos estándar como el procedimiento quirúrgico, quimioterapia y radioterapia (22). De este modo, nuevas formas de tratamiento, como la inmunoterapia, han comenzado a aplicarse a pacientes con MSI debido a los altos niveles de neoantígenos presentes en este tipo de tumores (23,24).

Aunque todo esto indique un panorama favorable para los pacientes con cáncer gástrico con MSI, también se destaca la existencia de un grupo de estos pacientes que no responden a los tratamientos estándar. Algunos pacientes no logran una remisión completa o recaen después de unos meses de iniciar el tratamiento, lo que señala la complejidad de la biología tumoral en el cáncer gástrico con MSI (25,26). Incluso se ha demostrado que los pacientes con cáncer gástrico con MSI tienen una peor respuesta a la quimioterapia adyuvante en comparación con los pacientes con MSS (19).

En conjunto, esta problemática destaca la necesidad urgente de biomarcadores pronósticos adicionales que ofrezcan una comprensión más profunda de los fundamentos moleculares del cáncer gástrico con MSI de cada paciente, permitiendo planes de tratamiento más personalizados y efectivos.

Los biomarcadores basados en la expresión génica son un arsenal potencial para avanzar en la medicina de precisión. En cáncer gástrico con MSI, se ha propuesto un panel de genes relacionados con el sistema inmunitario, compuesto por *SEMA6A*, *LTBP1* y *BACH2*, estos genes fueron caracterizados como una firma pronóstica ofreciendo nuevos objetivos para el tratamiento personalizado y nuevas miras para la aplicación de la inmunoterapia (27). Adicionalmente, se han propuesto dos subgrupos moleculares dentro del subtipo MSI, MSI-H1 y MSI-H2, basados en la exploración de los transcriptomas del tumor gástrico. Los tumores MSI-H1 han sido asociados con un pronóstico desfavorable y se caracterizan por la expresión de niveles más altos de genes inmunorreguladores junto con el enriquecimiento de vías biológicas inmunosupresoras (28). Por otro lado, un estudio reciente caracterizó la heterogeneidad del TME y encontró una firma relacionada con la transición epitelial-mesenquimal, infiltración de CAFs, linfocitos CD8 y pronóstico adverso, compuesta

por cinco genes, *CALU*, *PCOLCE2*, *PLOD2*, *SGCD* y *THBS2* (29). Desafortunadamente, a pesar de esta evidencia que demuestra la utilidad de la expresión génica como marcadores pronósticos en el cáncer gástrico con MSI, ninguna firma génica se ha estandarizado a nivel mundial ni se ha incluido en la rutina clínica. En realidad, se necesitan firmas más simples, es decir, paneles con menos genes para facilitar su aplicación clínica. En este contexto, los datos de análisis de secuenciación de ARN y *microarrays* disponibles en bases de datos públicas representan una gran oportunidad para explorar nuevos candidatos para el pronóstico en la categoría de MSI (30,31).

En la búsqueda de descubrir firmas génicas vinculadas a resultados pronósticos, este estudio plantea la siguiente pregunta crítica: ¿Qué genes específicos presentan perfiles de expresión que se asocian con tasas de supervivencia en pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites? Esta indagación no solo tiene como objetivo evaluar e identificar biomarcadores vitales dentro de dos cohortes, sino que también busca profundizar la comprensión sobre los fundamentos moleculares que influyen en los resultados de supervivencia en el cáncer gástrico con MSI. Al abordar esta pregunta, se destaca el esfuerzo por contribuir significativamente al campo de la medicina personalizada, potencialmente allanando el camino para estrategias terapéuticas adaptadas basadas en patrones de expresión génica.

1.2. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

La mayoría de los pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites presentan un pronóstico favorable y responden bien a los tratamientos; sin embargo, existe un grupo que no se benefician de estas y tienen recaídas (19, 25, 26). Esto, revela la importancia del estudio de biomarcadores más específicos que permitan explicar el pronóstico y la complejidad biológica de los tumores con inestabilidad de microsatélites.

De esta manera, la exploración de perfiles de expresión génica como nuevos biomarcadores de pronóstico representa un cambio de paradigma en la investigación oncológica debido a las limitaciones de los sistemas actuales de estadificación del

cáncer, que se basan principalmente en la extensión anatómica de la enfermedad. Estos sistemas necesitan ser refinados mediante la incorporación de parámetros biológicos para estratificar mejor a los pacientes para la terapia tumoral o estrategias de vigilancia. Además, con los avances en tecnologías genómicas, transcriptómicas y de *big data*, ahora es posible adentrarse en las características moleculares de los tumores en detalle y determinar su relevancia clínica. Esto ha dado lugar a numerosas firmas génicas pronósticas y predictivas en el cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites (22,27-29). Sin embargo, hasta ahora sólo unas pocas firmas génicas han llegado al escenario de la implementación clínica que no incluye al cáncer gástrico (32).

La presente investigación se sitúa en la vanguardia de una intersección crítica en la investigación del cáncer, ofreciendo información valiosa sobre los factores pronósticos como la edad, sexo, clasificación de Lauren, estadio T, N y M y sitio del tumor primario para discriminar el riesgo en el cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites. Se demuestra el potencial del gen *MAP4K4* como marcador pronóstico, este abre nuevas vías para la medicina personalizada, prospectivamente orientado al desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas. El gen *MAP4K4* ha sido descrito previamente como un gen relacionado con la progresión, invasión y metástasis, impactando negativamente en el pronóstico de los pacientes con cáncer gástrico (33). Sin embargo, se refina este conocimiento al mostrar que la categoría de inestabilidad microsatelital es el único subgrupo molecular de cáncer gástrico donde el gen *MAP4K4* se asocia sólidamente con el pronóstico. Asimismo, los hallazgos sobre la relación entre la expresión del gen *MAP4K4* y la infiltración inmune y vías biológicas en el cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites contribuyen al creciente cuerpo de conocimientos de la heterogeneidad tumoral sobre el microambiente tumoral y metabolismo, que cada vez se reconoce más como factores clave en el desarrollo del cáncer y la respuesta al tratamiento.

1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar e identificar genes cuyos perfiles de expresión se desempeñen como marcadores pronósticos clave en el cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar genes cuyo perfil de expresión está significativamente relacionado con la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites.
- Comparar los perfiles de expresión de los genes asociados con el pronóstico entre tejido sano y tumoral, así como su relación con las etapas clínicas del cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites.
- Analizar la asociación entre los perfiles de expresión de los genes asociados con el pronóstico y variables genéticas y clínicas relevantes en la población estudiada.
- Evaluar la infiltración de células del sistema inmunológico en tumores, basándose en los perfiles de expresión de genes asociados con el pronóstico del cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites.
- Determinar las vías biológicas específicas asociadas con los perfiles de expresión de los genes relacionados con el pronóstico, brindando así información relevante sobre los mecanismos biológicos implicados en la progresión de esta enfermedad.

1.4 BASES TEÓRICAS

1.4.1 BASE TEÓRICA

Definición del cáncer

Según el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, el cáncer es un conjunto de enfermedades en las que ciertas células del cuerpo se dividen sin control y pueden colonizar diferentes tejidos (34). Una definición más completa proviene de Douglas Hanahan, en 2022, quien define el cáncer por un conjunto de características fundamentales conocidas como "Huellas del Cáncer" (35). Inicialmente propuestas en 2000 y posteriormente ampliadas, estas huellas incluyen ocho características principales y dos características habilitadoras. Las características principales abarcan diversos rasgos adquiridos necesarios para el crecimiento y progresión del tumor, como la reprogramación del metabolismo celular y la evasión de la destrucción inmunitaria. Los tumores tienen la capacidad de inducir o acceder a la vasculatura, ya sea a través de la angiogénesis o mediante la captación de vasos sanguíneos existentes, para respaldar su crecimiento. En 2011, se identificó la "inflamación promovida por el tumor" como una segunda característica habilitadora, junto con la "inestabilidad genómica y mutación" (36). Estas dos características desempeñan un papel crucial en la activación de las ocho características principales del cáncer. Los desarrollos recientes en la investigación del cáncer han propuesto huellas emergentes y características habilitadoras adicionales, que incluyen la plasticidad fenotípica, la reprogramación epigenética no mutacional, la influencia de microbiomas polimórficos y el papel de las células senescentes en el proceso canceroso. Esta definición está en constante evolución a medida que se descubren nuevos conocimientos sobre la biología del cáncer (35).

Cáncer gástrico

El cáncer gástrico, también conocido como cáncer de estómago, se origina en las células que recubren el estómago. Esta forma de cáncer es especialmente notable por su alta tasa de mortalidad, siendo la cuarta causa principal de muerte a nivel mundial y el quinto como cáncer diagnosticado con mayor frecuencia (37). Las estrategias de

tratamiento para el cáncer gástrico han evolucionado sustancialmente en los últimos años, abarcando una variedad de modalidades desde cirugía y quimioterapia hasta terapias dirigidas e inmunoterapias. Para el cáncer gástrico resecable, la cirugía radical sigue siendo el tratamiento primario. En estos casos, para reducir el riesgo de recurrencia y mejorar la supervivencia a largo plazo, se establecen varias aproximaciones terapéuticas, que incluyen quimioterapia perioperatoria, quimioterapia adyuvante y quimiorradioterapia adyuvante (38). En enfermedad metastásica, se ha logrado un progreso sustancial en inmunoterapia y terapias dirigidas por biomarcadores, como el trastuzumab, un anticuerpo monoclonal dirigido al Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano o HER2, que fue la primera terapia dirigida aprobada para el cáncer gástrico (38). Además, los PD-1 han demostrado una eficacia impresionante en pacientes con cáncer gástrico metastásico no tratados con MSI-H/dMMR (25). Actualmente, la casuística en curso está investigando el potencial de la inmunoterapia y la terapia dirigida en el tratamiento de pacientes con cáncer gástrico en etapas avanzadas (38).

Al ser el estómago un órgano compuesto por tejido glandular, más del 90% de los tumores son adenocarcinomas (39), los cuales pueden dividirse en varios subtipos. La clasificación más popular del carcinoma gástrico es la clasificación de Lauren, que distingue dos subtipos principales de carcinoma gástrico: intestinal, donde las células adoptan formas de las glándulas gástricas y está asociado con factores de riesgo ambientales y dietéticos, y el difuso, que es más indiferenciado, se manifiesta a edades más tempranas y está asociado con un peor pronóstico (40) (Figura 1). Además de los adenocarcinomas, el estómago también puede desarrollar otros tipos de tumores, como linfomas y tumores mesenquimales. El linfoma gástrico primario es un tumor raro, que representa del 4% al 20% de los linfomas no Hodgkin y alrededor del 5% de los neoplasmas gástricos primarios. El estómago es el sitio extranodal más común de estos linfomas, constituyendo el 30% al 40% de todos los linfomas extranodales y el 55% al 65% de todos los linfomas gastrointestinales (41). En cuanto a los tumores mesenquimales, los más comunes en el estómago son los tumores del estroma gastrointestinal. Estos tumores, que pueden ser benignos o malignos, surgen dentro de la pared del estómago, típicamente en la submucosa o la muscularis propia, y presentan diversas apariencias radiológicas (42). En la quinta edición de la clasificación de la

OMS de tumores del sistema digestivo, publicada en 2019, se han realizado actualizaciones en la descripción de cada tipo histológico (Figura 1) (43).

En los últimos años, el enfoque histopatológico tradicional para clasificar los cánceres gástricos ha sido complementado por clasificaciones moleculares, gracias a los avances en la investigación genómica. Los estudios del TCGA y ACRG han sido fundamentales en esta evolución. El estudio del TCGA ha propuesto un sistema de clasificación molecular ampliamente reconocido que categoriza los cánceres gástricos en cuatro subtipos moleculares basados en firmas genómicas distintas (10). Estos subtipos incluyen el subtipo asociado al EBV, que representa aproximadamente el 9% de los casos. Este subtipo se caracteriza por la presencia del virus en las células cancerosas. El segundo subtipo es la MSI o MSI-H, que representa alrededor del 22% de los casos, marcado por una alta tasa de mutación dentro de los microsatélites. El tercer subtipo, denominado GS, comprende alrededor del 20% de los cánceres gástricos y se caracteriza por una menor tasa de alteraciones genéticas. Por último, el subtipo más prevalente, que representa el 50% de los casos, es el CIN, distinguido por aberraciones cromosómicas generalizadas (10). Similarmente, el estudio del ACRG ha establecido su propio sistema de clasificación molecular, dividiendo también los cánceres gástricos en cuatro subtipos, pero con criterios diferentes. El primer subtipo, MSS/TP53+, se caracteriza por microsatélites estables y un gen *TP53* intacto, representando el 26% de los casos. Este subtipo sugiere la preservación de la función del gen supresor de tumores *TP53*. El segundo subtipo, MSI, es consistente con la clasificación del TCGA, representando el 23% de los casos, y se caracteriza por una inestabilidad alta de microsatélites. El tercer subtipo, MSS/EMT, que constituye el 15% de los cánceres gástricos, se caracteriza por microsatélites estables, pero con la expresión de firmas de transición epitelial-mesenquimal. Este subtipo indica una posible capacidad aumentada para invasión y metástasis. El último subtipo, MSS/TP53-, que involucra el 36% de los casos, se caracteriza por microsatélites estables, pero con mutaciones en el gen *TP53*, sugiriendo una pérdida de función de este gen (11).

Tanto las clasificaciones del TCGA como del ACRG incluyen notablemente el subtipo molecular de MSI, resaltando su importancia en la biología del cáncer gástrico. Estas clasificaciones moleculares representan un paso significativo en la comprensión de la heterogeneidad y tienen importantes implicaciones para enfoques de tratamiento personalizados y pronóstico (Figura 1).

Histológica		Molecular	
Clasificación de Lauren	Clasificación de la OMS	TCGA	ACRG
Subtipo intestinal	Adenocarcinoma Papilar Adenocarcinoma Tubular Adenocarcinoma Mucinoso	EBV Hipermetilación del ADN Mutación del PIK3CA Mutación del ARIADIA Amplificación de PD-L1/PDL2 Silenciamiento de CDKN2A	MSS/TP53+ Infección por EBV con firma de actividad TP53 intacta (CDKN1A, MDM2) Subtipo intestinal Pronóstico intermedio
Subtipo difuso	Pobremente cohesivo Carcinoma en anillo de sello	MSI Hipermutación Silenciamiento del MLH1 Mutación del PIK3CA Pacientes adultos Subtipo intestinal	MSI Pérdida de expresión de MLH1 Elevada de metilación del ADN Hipermutación Mejor pronóstico Subtipo intestinal
Subtipo Indeterminado	Adenocarcinoma mixto Carcinoma adenoescamoso Adenocarcinoma hepatoide Carcinoma con estroma linfoide Coriocarcinoma Carcinosarcoma Carcinoma de células parietales Carcinoma rabdoide maligno Carcinoma mucoepidermoide Carcinoma de células paneth Carcinoma indiferenciado Adenoneuroendocrino mixto Tumor del seno endodérmico Carcinoma embrionario Tumor puro del saco vitelino gástrico Adenocarcinoma oncocítico	GS Mutación del CDH1 and ROHA Fusión CLDN18-ARHGAP Pacientes jóvenes Subtipo difuso	MSS/EMT Pérdida de expresión de CDH1 Menos eventos de mutación Peor pronóstico Subtipo difuso
		CIN Activación del RTK-RAS (ERB2, EGFR, MET, VEGFA, KRAS) Amplificación de de genes celulares (CCNE1, CCND1 y CDK6) Subtipo intestinal	MSS/TP53- Pérdida de la actividad TP53 (CDKN1A, MDM2) Mutación del TP53 Inestabilidad genómica Amplificador de oncogenes Pronóstico intermedio

Figura 1. Clasificación histológica y molecular en el cáncer gástrico. Imagen modificada de Baccili T, et al. 2023 (44). EBV: Virus de Epstein-Barr; MSI: inestabilidad de microsatélites; GS: genómicamente estable; CIN: inestabilidad cromosómica; MSS/TP53+: microsatélites estables con el gen *TP53* de tipo salvaje o gen intacto; MSS/EMT: microsatélites estables con transición epitelio mesénquima; MSS/TP53-: microsatélites estables con mutación en el gen *TP53*.

Durante el desarrollo y la progresión del cáncer gástrico, además de las características genéticas y moleculares de las células tumorales, la interacción entre las células cancerígenas y los componentes del microambiente es crucial para la evolución del tumor y la respuesta al tratamiento (45). El TME se define como el entorno celular en el que viven las células tumorales e incluye elementos celulares y no celulares. Consiste en numerosos tipos celulares estromales, células inmunes y elementos

extracelulares, como citocinas, factores de crecimiento y matriz extracelular, que rodean a las células tumorales y son alimentados por vasos sanguíneos que rodean el tumor (46). Un grupo bien descrito de células que interactúan con las células de cáncer gástrico son los CAFs, definidos como fibroblastos mesenquimales dentro y alrededor del tejido tumoral sólido (47–49). A través de la interacción directa de una variedad de citoquinas y metabolitos, estos fibroblastos pueden promover la proliferación tumoral, la resistencia al tratamiento, la invasión y la metástasis, impactando en el pronóstico de los pacientes con cáncer gástrico (46). Además, el mal pronóstico se centra en el hecho de que este tipo de fibroblastos juegan un papel significativo en la transición epitelial-mesenquimal (49). Otro componente celular común dentro del microambiente tumoral son los TAMs. Se ha diferenciado entre 2 subtipos diferentes de TAMs; los macrófagos M1, que son proinflamatorios; y los macrófagos M2, que son inmunoreguladores y antiinflamatorios (50). Precisamente, la mayoría de los TAMs tienen propiedades funcionales más similares a un fenotipo M2 que a un fenotipo M1 (51). Complementariamente, un metaanálisis en cáncer gástrico identificó que los niveles de infiltración de macrófagos M2 están asociados con una menor tasa de OS. Por el contrario, la infiltración de macrófagos M1 se asoció con una tasa de OS superior (52). Así, la investigación ha destacado la viabilidad de la terapia dirigida a los TAMs como un enfoque novedoso e indirecto para el tratamiento del cáncer (53). Además, la interacción entre CAFs y TAMs dentro del microambiente tumoral es particularmente notable. Están en una relación dinámica y recíproca, capaces de alterar las funciones de cada uno. Esta relación mutua es esencial para la progresión tumoral y la evasión inmune. Comprender estas interacciones es crucial para identificar nuevos objetivos terapéuticos y mejorar la efectividad de las estrategias de tratamiento del cáncer (54).

El origen del cáncer gástrico es complejo y está influenciado por una múltiple cantidad de factores, que van desde elementos ambientales hasta predisposiciones genéticas. El principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico es la infección por *Helicobacter pylori* (55). Esta bacteria, identificada en 1982, es un organismo microaerófilo, flagelado y gram negativo que coloniza el estómago (56). *Helicobacter pylori* contribuye al cáncer gástrico a través de la inflamación crónica y factores de virulencia específicos de la bacteria. Estos factores pueden dañar el ADN

de las células epiteliales gástricas, promoviendo la inestabilidad genómica (57). Tras la infección por *Helicobacter pylori*, hay una reducción significativa en la diversidad de microorganismos en el estómago. Esta disbiosis juega un papel en la carcinogénesis gástrica. A medida que progresan las lesiones gástricas, disminuye el número de *Helicobacter pylori* y aumenta la flora oportunista, lo que afecta la patogénesis del cáncer gástrico. La respuesta inflamatoria a largo plazo inducida por la infección de *Helicobacter pylori* predispone a las células del revestimiento del estómago a volverse cancerosas. Esto está respaldado por hallazgos que sugieren que la mayor expresión de citoquinas, como la interleucina-1 beta, en el estómago puede causar inflamación gástrica y cáncer (58). Lamentablemente, la infección por este agente es prevalente en todo el mundo, afectando aproximadamente a 4.4 mil millones de individuos hasta 2015, con las tasas más altas en África (56). Por otro lado, los factores dietéticos también juegan un papel significativo en el desarrollo del cáncer gástrico. El consumo elevado de sal, alimentos preservados en sal, compuestos N-nitroso, alimentos ahumados y una dieta baja en vitaminas A y C se relacionan con un mayor riesgo de cáncer gástrico (59). Por el contrario, las dietas ricas en verduras y frutas, especialmente las crucíferas, se asocian con un riesgo reducido (60). Adicionalmente, el uso de tabaco es un factor de riesgo significativo para el cáncer gástrico. También, el consumo de alcohol ha demostrado aumentar el riesgo de cáncer de estómago, potencialmente facilitando la absorción de otros compuestos tóxicos en el tracto digestivo superior (61).

Inestabilidad de microsatélites

Los microsatélites son repeticiones en *tandem* de secuencias de ADN pequeñas (de 1 a 6 pares de bases) ubicadas hacia los extremos de los cromosomas (62,63). Pueden encontrarse tanto en áreas codificantes como en áreas intrónicas o no codificantes del genoma (64) y tienen una susceptibilidad a desarrollar mutaciones debido a que se repiten con frecuencia en el genoma (65). La MSI es una forma de inestabilidad genómica asociada con el MMR. Se origina cuando se producen alteraciones en genes de los genes del MMR, lo que lleva a inserciones o eliminaciones de nucleótidos en estas secuencias repetitivas (63). Este sistema está compuesto por 4 proteínas principales: MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, cuya función es la detección inicial de

deleciones o inserciones en la replicación y su reparación (28). De hecho, los complejos MSH2/MSH6 y MSH2/MSH3 se encargan de la identificación inicial de errores de replicación, siendo MSH6 expresado diez veces más que MSH3 (64). Luego, la síntesis de ADN se hace posible después de que el nucleótido o fragmento mal emparejado haya sido eliminado mediante el reclutamiento del complejo MLH1/PMS2 (66). En realidad, la inactivación de los genes del MMR no es un evento transformador en sí mismo, se requieren modificaciones genéticas adicionales para determinar el desarrollo tumoral (67).

La MSI se refiere a la presencia de variaciones en la longitud de secuencias de ADN repetitivas en comparación con las mismas secuencias encontradas en el ADN germinal. Para determinar el estado de MSI en un tumor, se recomiendan tanto la inmunohistoquímica como las pruebas moleculares. Esta primera técnica es recomendada y disponible debido a su bajo costo y adaptabilidad. Detecta la expresión de proteínas MMR utilizando anticuerpos contra las proteínas principales mencionadas anteriormente (68). Es considerado un test indirecto debido al hecho de que el estado depende si la proteína está o no está expresada en el tumor, lo que podría inferirse como una alteración en un gen MMR. Así, la expresión de la proteína del MMR se categoriza como pMMR cuando se detecta una tinción nuclear moderada a fuerte en el tejido tumoral; y dMMR cuando se observa una pérdida completa de la tinción nuclear de una o más proteínas del MMR en el tejido tumoral (69). Cuando se establece la deficiencia del MMR, se asume la presencia de MSI. Otra técnica recomendada para la determinación del estado de MSI, es la prueba molecular. Para esto, el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos propuso el Panel de Bethesda que consiste en realizar una amplificación por PCR de marcadores de microsatélites, dos repeticiones de mononucleótidos (BAT25 y BAT26) y tres repeticiones de dinucleótidos (D2S123, D5S346 y D17S250). Estas amplificaciones se realizan en tejido tumoral y no tumoral, y un marcador se considera positivo cuando el tamaño de un marcador en el ADN tumoral difiere del ADN germinal. A continuación, cuando hay ≥ 2 marcadores positivos, se establece la inestabilidad de microsatélites alta (MSI-H), mientras que cuando hay uno o cualquier marcador positivo, se indican resultados de inestabilidad de microsatélites baja (MSI-L) y microsatélites estables (MSS), respectivamente (70). Solo si el tumor tiene MSI-H, se considerará positivo al estado de MSI, es por eso que

se usan como términos intercambiables. Alternativamente, estudios recientes introdujeron más de 5 marcadores para mejorar la sensibilidad de la prueba (71,72). Como ejemplo, en el proyecto TCGA se realizó un ensayo de PCR de cuatro repeticiones de mononucleótidos (BAT-25, BAT-26, BAT-40 y receptor tipo II del factor de crecimiento transformante) y tres repeticiones de dinucleótidos (D2S123, D5S346 y D17S250) señalando que los tumores con inestabilidad en más del 40% de los marcadores se denominan MSI-H, aquellos con inestabilidad en menos del 40% se denominan MSI-L, y aquellos sin alteración en ninguno de los marcadores se denominan tumores MSS (10). Además, en el proyecto ACRG, se realizó un análisis de PCR pentaplex, y fue necesario observar >3 cambios en los marcadores de microsatélites mononucleotídicos (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 y NR-27) para clasificar un caso como MSI-H (11). En conclusión, hay una alta correlación entre la inmunohistoquímica y PCR en la determinación del estado de MSI en el cáncer gástrico (98%–99%) (10,73).

Cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites

En los años noventa, se implicó que la inestabilidad de microsatélites era uno de los factores responsables de la aparición del cáncer de colon designado como cáncer colorrectal no polipósico hereditario (74). En la misma década, varios estudios señalaron el papel de la inestabilidad microsatelital en otros tumores como el endometrial y el cáncer gástrico (75,76). En la actualidad, la inestabilidad de microsatélites reconoce características clave en un subconjunto de pacientes con cáncer gástrico. Investigaciones realizadas por estudios del TCGA y ACRG han proporcionado información valiosa sobre la prevalencia, características e implicaciones clínicas del cáncer gástrico con MSI (10,11).

Se han recopilado y examinado datos extensos para determinar si la incidencia alta de cáncer gástrico con MSI constituye un subgrupo único con características histopatológicas distintas, comportamiento clínico y respuestas variables a la quimioterapia e inmunoterapia. En primer lugar, su incidencia se informa en un rango del 8 al 33% (26). Además, varios informes ya han mostrado su asociación con el subtipo intestinal de la clasificación de Lauren (77), así como con una mayor prevalencia de pacientes mujeres de edad avanzada (> 64 años) y la ubicación del

tumor en el antro gástrico. Por género, mujeres y hombres son prevalentes en la región distal y proximal del estómago, respectivamente (77,78). En cuanto al estadio tumoral, el cáncer gástrico con MSI está predominantemente asociado con enfermedad no metastásica y sin afectación ganglionar (79). Por lo tanto, los pacientes son diagnosticados con más frecuencia en etapas tempranas de la enfermedad (etapas I y II). Esta mayor prevalencia en etapas tempranas se refleja en la asociación con un mejor pronóstico en comparación con los pacientes con tumores con MSS (80). Además, debido a la deficiencia de proteínas del MMR, los tumores con MSI se caracterizan por una gran carga mutacional, que podría llevar al silenciamiento en el gen *MLH1*, y mutaciones en los genes *KRAS*, *P13K*, *PTEN*, *MTOR*, *ALK* y *ARID1A*, entre otros (17). Un estudio indica que la metilación del promotor del gen *MLH1* y su consecuente silenciamiento parecen impulsar la adquisición dependiente del tiempo de MSI a medida que avanza la tumorigénesis gástrica, ya que este gen es uno de los principales constituyentes del MMR (81). Adicionalmente, como consecuencia de la alta carga mutacional, estas células cancerosas hipermutadas producen neoantígenos numerosos que pueden estimular la activación de linfocitos T y la infiltración de células inmunes, causando la eliminación del tumor a diferencia de los tumores con MSS que tienen una tasa baja de mutaciones. Sin embargo, un mecanismo de compensación de las células cancerosas es exponer moléculas de control inmunitario para bloquear esta respuesta inmunitaria y detener la acción antitumoral (67, 81) (Figura 2).

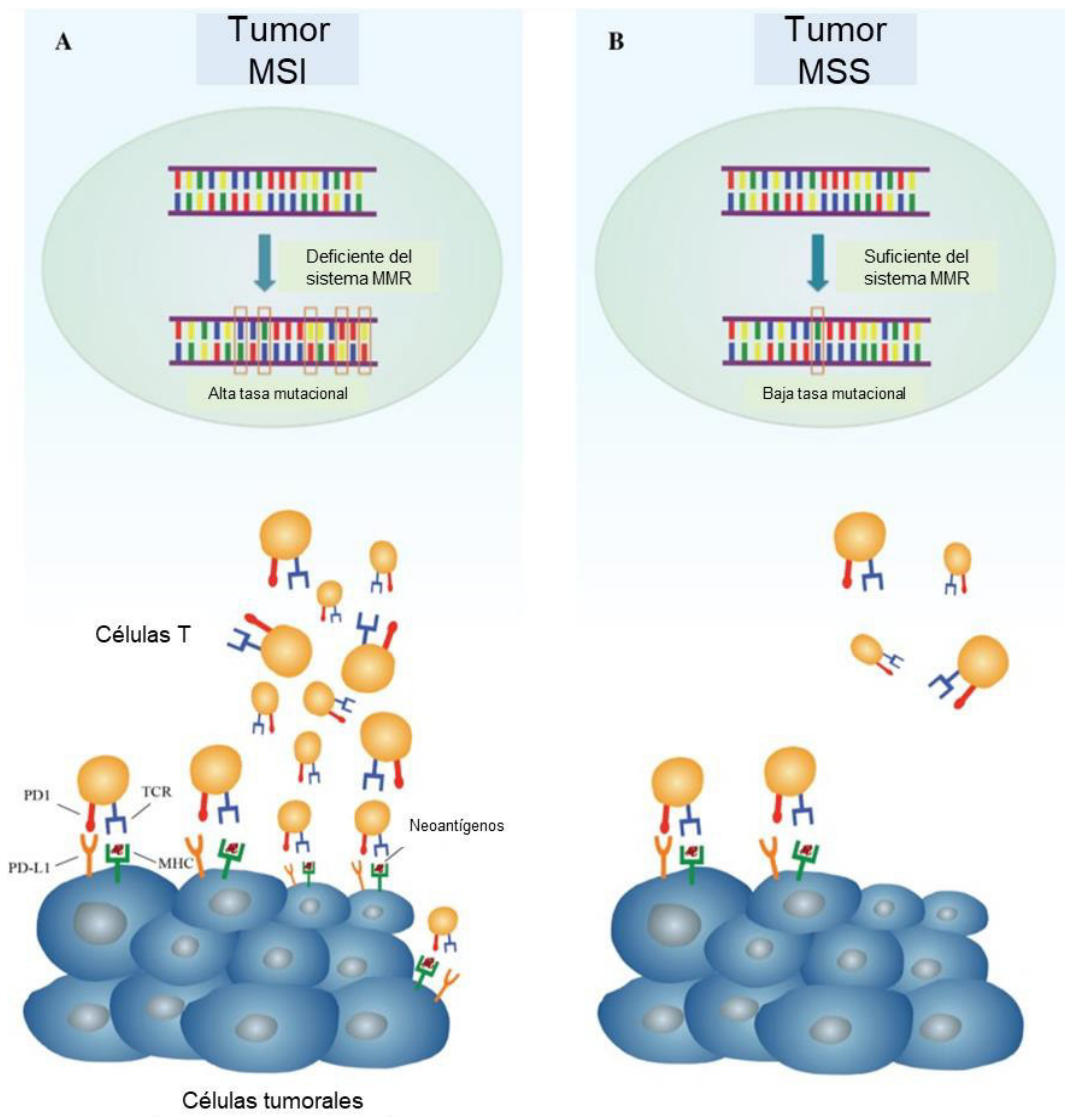


Figura 2. Diferencias en el entorno inmune entre los tumores con inestabilidad de microsatélites alta y tumores con microsatélites estables. A. Los tumores con MSI, acumulan un número alto de mutaciones. Esto resulta en la producción de numerosos neoantígenos, desencadenan una activación robusta de linfocitos T e infiltración de células inmunes en el tumor. Estos tumores, en respuesta, a menudo expresan moléculas de control como PD-L1 para suprimir el ataque inmunitario. B. Por el contrario, los tumores con MSS tienen el MMR funcional, lo que conduce a menos errores de replicación y una carga mutacional más baja. Esto resulta en menos neoantígenos, menos actividad de linfocitos T y niveles más bajos de moléculas de control. Este entorno inmunitario distinto en los tumores con MSI los convierte en candidatos ideales para el tratamiento con inhibidores de puntos de control inmunitario. MHC: complejo principal de histocompatibilidad; TCR: receptor de células T; PD-1: Proteína de muerte celular programada 1; PD-L1: Ligando de muerte programada 1. Imagen modificada de Ratti M. et al. 2018 (67).

Como factor pronóstico, los pacientes con cáncer gástrico con MSI tienen una tasa de supervivencia más alta (18–20,22,73). En realidad, en varios estudios, se ha observado que la proporción de pacientes fallecidos es relativamente menor en el grupo con MSI en comparación con el grupo con MSS. Entre los pacientes con MSS, el 41% experimentó mortalidad, mientras que la tasa de mortalidad en el grupo con MSI fue ligeramente menor, un 38% (22). De esta manera, el grupo con MSI demuestra mayor supervivencia. Complementando lo anterior, la mediana de la OS para pacientes con MSI es mejor que la del grupo con MSS (no alcanzada vs. 53.9 meses, $p=0.014$). Además, se ha observado un HR de 1.678 para el grupo con MSS en comparación al grupo con MSI (19). En otro estudio, se presentaron resultados similares, el grupo con MSI mostró una OS significativamente más prolongada en comparación con aquellos con MSS (17.60 vs. 12.86 meses, $p=0.029$) (20). En un metaanálisis que comparó estos dos grupos, la tasa de OS fue del 77.5% vs. 59.3% y la tasa de DFS fue del 71.8% vs. 52.3%. Estos resultados indican una tasa más alta de DFS y OS en el grupo con inestabilidad microsatelital en comparación con el grupo estable (18). Aunque el estado de MSI puede usarse como un buen pronóstico, no se han reportado beneficios (73), como la falta de beneficio en la quimioterapia adyuvante (18,73,82) y es que en algunos pacientes no se logra la remisión completa o presentan recaída después del tratamiento (26).

Complementariamente, el TME se ha vinculado con cáncer gástrico con MSI. Un estudio reciente en cáncer gástrico, categorizó los puntajes de riesgo para la infiltración de CAFs y se encontró que los tumores con un puntaje de CAFs bajo tienen significativamente un mejor pronóstico y menos casos de progresión tumoral. Dentro de este estudio, los casos de cáncer gástrico con MSI se caracterizaron por tener un puntaje de CAFs bajo. Esto podría implicar que una infiltración baja de estos fibroblastos permite la liberación de neoantígenos que desencadenan una respuesta inmunitaria antitumoral robusta (83). Inclusive, otro estudio encontró un enriquecimiento de macrófagos M2 en pacientes con MSI junto con una alta expresión de PD-L1. Esta presencia de macrófagos M2 con expresión de PD-L1 podría relacionarse con sus características inmunitarias y las posibles respuestas a terapias de inhibición de puntos de control inmunitario (84).

1.4.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

ACRG: Grupo de Investigación del Cáncer Asiático

Adenocarcinoma: Un tipo de cáncer que se origina en células columnares glandulares.

AUC: Área bajo la curva

CAFs: Fibroblastos asociados al cáncer

CIN: Inestabilidad cromosómica.

Clasificación de Lauren: La clasificación histológica según Lauren incluye los tipos intestinal, difuso y mixto.

DFS: Supervivencia libre de enfermedad.

dMMR: Tumor deficiente del sistema MMR

EBV: Virus de Epstein-Barr.

Edad: Edad del paciente en el momento del diagnóstico patológico.

Estadio tumoral: Estadio tumoral según la clasificación TNM. T se refiere al tamaño y extensión del tumor principal. El tumor principal comúnmente se denomina tumor primario. N se refiere a la extensión del cáncer que se ha propagado a ganglios linfáticos cercanos. M se refiere a si el cáncer se ha metastatizado; es decir, si ha tenido metástasis. Esto significa que el cáncer se ha propagado desde el tumor primario a otras partes del cuerpo.

Expresión génica: Se refiere al proceso mediante el cual la información codificada en un gen se utiliza para sintetizar productos génicos funcionales, como proteínas o ARN no codificantes, en una célula o tejido específico.

GS: Genómicamente estable.

GSEA: Este análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes es un método que analiza conjuntos de genes predefinidos, como las vías biológicas, para identificar aquellas que están significativamente asociadas con las diferencias observadas en los perfiles de expresión génica. Esta metodología ayuda a comprender cómo los conjuntos de genes, en lugar de genes individuales, se relacionan con fenotipos específicos como un perfil de expresión en particular.

HR: Hazard ratio.

Inestabilidad de microsatélites: Una condición caracterizada por alteraciones en secuencias de ADN repetitivas llamadas microsatélites, a menudo resultado de defectos en los mecanismos de reparación de ADN desajustado y comúnmente asociada con ciertos tipos de cáncer.

IQR: Rango intercuartílico

Microarray: Se utiliza para analizar simultáneamente la expresión génica. Implica un soporte sólido, típicamente una placa o chip, en el cual se colocan miles de sondas de ADN o ARN complementarias. Estas sondas pueden hibridar específicamente con fragmentos de ADN o ARN presentes en una muestra biológica.

MAP4K4^{alta}: Pacientes con expresión alta de *MAP4K4*.

MAP4K4^{baja}: Pacientes con expresión baja de *MAP4K4*.

Microsatélite: Son secuencias cortas y altamente repetitivas de nucleótidos distribuidas en todo el genoma en regiones codificantes y no codificantes.

MMR: Sistema de reparación de bases mal pareadas en el ADN.

MSI o MSI-H: Inestabilidad de microsatélites.

MSS/EMT: Microsatélites estables con transición epitelio mesénquima.

MSS/TP53-: Microsatélites estables con mutación TP53.

MSS/TP53+: Microsatélites estable con TP53 de tipo salvaje o gen intacto

OMS: Organización Mundial de la Salud

OS: Supervivencia global.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PD-1: Proteína de muerte celular programada 1

PD-L1: Ligando de muerte programada 1

pMMR: Tumor suficiente del sistema MMR.

Pronóstico: Es una estimación de cómo progresará el cáncer y las posibilidades de recuperación.

RNA-seq: Se utiliza para analizar cambios en el transcriptoma. Emplea secuenciación masiva para revelar la presencia y cantidad de ARN en una muestra biológica en un momento dado.

ROC: Curva característica de funcionamiento del receptor.

Sexo: Género del paciente.

Supervivencia global: Tiempo de supervivencia del paciente después del diagnóstico patológico hasta la muerte del paciente.

Supervivencia libre de enfermedad: Tiempo de supervivencia del paciente en el cual los pacientes siguen vivos desde que recibieron el tratamiento primario.

TME: Microambiente tumoral.

TAMs: Macrófagos asociados al tumor.

TCGA: El Atlas del Genoma del Cáncer

Transcriptoma: Se refiere al conjunto completo de ARNm presentes en una célula o tejido en un momento dado, lo que representa la expresión génica total de un organismo y proporciona información sobre los genes activos y sus niveles de transcripción.

1.4.3 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

Se postula que ciertos perfiles de expresión génica están asociados con la supervivencia de pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites.

CAPÍTULO II: MÉTODOS

2 DISEÑO METODOLÓGICO

2.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente estudio adopta un enfoque cuantitativo al analizar la expresión de genes y su relación con el tiempo de supervivencia en pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites, con el objetivo de identificar marcadores con alta capacidad predictiva. Asimismo, tiene un énfasis descriptivo al buscar obtener una visión integral de la asociación individual de todos los genes del transcriptoma con el pronóstico.

2.1.2 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

La investigación sigue un diseño no experimental y observacional al trabajar con datos de acceso público sin aplicar intervenciones directas. Asimismo, se adoptó una orientación retrospectiva al analizar datos de cohortes de pacientes previamente diagnosticados con cáncer gástrico y que presentan inestabilidad de microsatélites.

2.1.3 POBLACIÓN

La población de estudio está conformada por pacientes diagnosticados con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites, cuyos datos clínicos y genéticos fueron obtenidos de los proyectos TCGA y el ACRG, ambos repositorios de acceso público. Esta muestra abarca una diversidad étnica que incluye individuos de ascendencia blanca, asiática, y afroamericana o negra.

2.1.4 MUESTRA Y MUESTREO

El muestreo es no probabilístico por conveniencia, ya que todos los perfiles de expresión génica de pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites se obtuvieron de repositorios virtuales de bases de datos realizados por estudios primarios de los grupos TCGA y ACRG en los años 2014 y 2015, respectivamente (10,11).

2.1.4.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Datos completos de transcriptoma de pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites.

2.1.4.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Datos clínicos incompletos o inadecuados como supervivencia global, edad, sexo, clasificación de Lauren, estadio T, N y M y sitio del tumor primario para el análisis requerido en la investigación de los pacientes adultos con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites.
- Datos de pacientes con diagnóstico de otros tipos de cáncer diferentes al cáncer gástrico.

2.1.5 VARIABLES

Las siguientes variables fueron definidas con el objetivo de evaluar e identificar genes cuyos perfiles de expresión se asocien con el pronóstico en pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites:

Variable	Definición conceptual	Tipo de variable	Definición operacional	Escala de medición	Dimensiones	Indicadores
Pronóstico	Es la probabilidad de evolución de que se presente el evento de interés	Cuantitativa continua	Es la probabilidad de supervivencia o recaída del paciente después del diagnóstico o tratamiento del cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites	Escala de razón	Supervivencia global	Pronóstico desfavorable: HR > 1 Pronóstico favorable: HR < 1
					Supervivencia libre de enfermedad	
Perfiles de expresión génica	Conjunto de todas las lecturas genéticas presentes en una célula	Cuantitativa continua	Niveles continuos de expresión génica en pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites	Escala de razón	Transcritos por millón para RNA-seq	Perfil de expresión alta: Mayor al punto de corte óptimo Perfil de expresión baja: Menor al punto de corte óptimo
					Intensidad de fluorescencia para microarray	

2.1.6 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Para evaluar e identificar genes cuyos perfiles de expresión estén asociados consistentemente con la supervivencia, se analizaron datos de transcriptoma de dos cohortes de pacientes adultos con cáncer gástrico con estabilidad de microsatélites. Para esto, se obtuvo toda la información de la cohorte publicada por el estudio del TCGA que cuenta con pacientes con inestabilidad microsatelital (10). Todos los datos de expresión génica normalizados y los datos clínicos fueron obtenidos del repositorio virtual *Firebrowse* (www.firebrowse.org). Se consideró como segunda cohorte, la

cohorte del ACRG (11), que también incluye pacientes con inestabilidad microsatelital. Los datos clínicos y del transcriptoma se descargaron del *Gene Expression Omnibus* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Los datos del transcriptoma de la cohorte TCGA se generaron utilizando HiSeq 2000 (Illumina) e incluyeron información sobre 20 508 genes. Los datos de ACRG se generaron utilizando Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix), que contenía sondas para 23 520 genes. Toda información de expresión y clínica fue exportada en formato .txt y manipulada con el software R v4.3.1 (Proyecto CRAN, www.r-project.org).

2.1.7 PROCEDIMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

La estrategia utilizada para descubrir los genes asociados con el pronóstico, cuyo flujograma se muestra en el anexo 1, es la siguiente:

Evaluación e identificación de genes asociados al pronóstico.

Para clasificar a los pacientes en grupos con niveles de expresión génica altas o bajas, se dividieron usando el punto de corte óptimo determinado a partir de los datos de supervivencia global utilizando la curva ROC para cada gen. Se utilizó el paquete *cutpointr* de R para aplicar el índice de Youden equilibrando la sensibilidad y la especificidad en el modelo de estudio, lo que indica la precisión de nuestra clasificación al identificar un punto de corte óptimo en la curva ROC para cada gen. Además, para resolver la incertidumbre del punto de corte óptimo, se configuró el parámetro de remuestreo o *bootstrapping* en 50, lo que implica re-muestrear repetidamente los datos para crear múltiples conjuntos de datos y calcular el punto de corte óptimo en cada conjunto remuestreado. Esto ayudó a proporcionar una estimación más robusta. Respecto al tamaño muestral de los grupos de expresión alta/baja, se consideró un valor de corte para preservar al menos el 20% del tamaño muestral total en estos grupos, evitando un posible sobreajuste, grupos con tamaños muestrales pequeños y selección sesgada del valor de corte. Además, si se obtuvieron

múltiples puntos de corte para cada gen, se seleccionó el valor de corte más cercano a la mediana (85).

Después de la dicotomización de los pacientes según su perfil de expresión, se llevó a cabo los análisis de regresión univariado y multivariado de Cox utilizando los paquetes *survival* y *survivalAnalysis* de R. Se ajustó la predicción del pronóstico con los posibles factores de confusión disponibles como la edad, sexo, clasificación de Lauren, estadio T, N y M y sitio del tumor primario. Posteriormente, sólo se consideró genes que generaron un AUC > 0.5, sensibilidad > 0.5 y especificidad > 0.5. Estos análisis se llevaron a cabo para cada gen del transcriptoma y en cada cohorte. Después de fusionar los resultados de las 2 cohortes, se obtuvieron genes asociados con la supervivencia global (pronóstico desfavorable, HR>1; pronóstico favorable, HR<1). Luego, se analizó si estos genes asociados con supervivencia global, también eran capaces de predecir la respuesta al tratamiento mediante la regresión univariada de Cox para la supervivencia libre de enfermedad (pronóstico desfavorable, HR>1; pronóstico favorable, HR<1). Fusionando estos últimos resultados de las 2 cohortes, garantizamos genes asociados consistentemente con el pronóstico.

Análisis estadístico

Se aplicó el paquete *stats* de R para llevar a cabo tanto la prueba exacta de Fisher como la prueba de Mann-Whitney con el fin de comparar las variables clínicas y la expresión génica entre tejido tumoral y tejido normal, respectivamente. Se consideró tejido normal como adyacente al tumor y se realizó una comparación de muestras emparejadas en pacientes de TCGA (n=5) (obtenidos de www.tsvdb.com) y pacientes de ACRG (n=17). Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar la media de la expresión génica entre las cuatro etapas clínicas, seguida por la prueba de comparación múltiple de Dunn solo si el valor de p era significativo, todos los valores de p se ajustaron por defecto en GraphPad. Posteriormente, se evaluó la capacidad pronóstica según la supervivencia global de nuestro gen, para esto, mediante la curva ROC calculamos el AUC hasta un seguimiento de 3 años utilizando el paquete *timeROC* de R. Adicionalmente, se generaron curvas de Kaplan-Meier utilizando los paquetes *survival* y *survminer* de R para analizar los eventos y tasas de supervivencia

de cada cohorte. Asimismo, se ejecutó el test de Log-rank para identificar posibles diferencias significativas.

A partir de los datos de mutación de TCGA (obtenidos de www.cbioportal.org/), se eligió los 19 primeros genes con una tasa de mutación mayor al 45% en pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites para analizar si estaban asociados con la expresión del gen *MAP4K4*, para esto se ejecutó la prueba exacta de Fisher. Las mutaciones en cada gen no eran oncogénicas y debido a la disponibilidad de datos, solo se realizó este análisis para la cohorte del TCGA.

Todos los cálculos se realizaron utilizando el software R v4.3.1 (Proyecto CRAN, www.r-project.org) y GraphPad Prism v8.0.1 (www.graphpad.com/features).

El análisis de enriquecimiento de vías biológicas

Se realizó un GSEA para encontrar las vías biológicas que podrían explicar las diferencias en la supervivencia, para esto llevamos a cabo el análisis de enriquecimiento de vías mediante la Ontología génica utilizando el paquete *goseq* de R Bioconductor (86). Luego, se analizó la redundancia de los términos de ontología génica utilizando el paquete *gogadget* de R (87). Este análisis permite agrupar los términos de ontología génica según sus similitudes al evaluar la cantidad de genes que se superponen entre cada par de términos de ontología génica. Posteriormente, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre cada par de términos de ontología génica, basado en estas cantidades de genes que se superponen. Se realizó un agrupamiento jerárquico para agrupar los términos de ontología génica similares y se generó un mapa de calor.

El análisis de enriquecimiento de firmas celulares

Para predecir la infiltración inmune tumoral, se evaluó las firmas celulares inmunes y estromales a partir de datos transcriptómicos empleando diversos algoritmos: CIBERSORT, una aplicación web de la Universidad de Stanford que estima la abundancia de la composición celular en tejidos (<http://cibersort.stanford.edu>) (88), EPIC, una herramienta analítica que evalúa las proporciones de células inmunes como linfocitos B, CAFs, CD4, CD8, macrófagos y células asesinas naturales

(<http://epic.gfellerlab.org>) (89), xCell, una simulación de enriquecimiento celular in silico que contiene 64 tipos de células inmunes y del estroma en tejidos y células (<https://xcell.ucsf.edu/>) (90), MCP-counter, que consiste en 8 poblaciones celulares inmunes y 2 estromales en tejidos (<http://134.157.229.105:3838/webMCP/>) (91), quanTIseq, que predice la infiltración de 10 poblaciones celulares inmunes en muestras tumorales (<http://icbi.at/quantiseq>) (92). Todos los algoritmos se obtuvieron de la herramienta web TIMER (93), un programa integral para evaluar la firma inmune tumoral (<http://cistrome.org/TIMER>). Para la creación de los volcano plots se usó el paquete *ggrepel* de R, los cambios de pliegue de los $MAP4K4^{alta}/MAP4K4^{baja}$ fue de 1.5 y se cambió al Log2 y el p valor de la prueba Mann-Whitney se cambió a $-\text{Log}2$.

2.1.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS

No se realizó ninguna intervención en los pacientes; sin embargo, este proyecto fue aprobado por el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina "San Fernando" de la Universidad Nacional de San Marcos. Asimismo, se siguieron los principios básicos expresados en la Declaración de Helsinki.

El proyecto recibió financiamiento del Programa de Proyectos de investigación para Grupos Investigación 2022 del Vicerrectorado de Investigación de la UNMSM con Código A22010651.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

Los perfiles de expresión de los genes *MAP4K4*, *ASXL1* y *MACF1* identifican a pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites con pronóstico adverso.

Para identificar genes relacionados con la supervivencia que puedan discriminar entre pacientes con cáncer gástrico con MSI y sus diferentes pronósticos, se analizaron los datos del transcriptoma de dos cohortes: TCGA y ACRG. En el primer paso de nuestro análisis, se categorizó a los pacientes dentro de cada cohorte en dos grupos: pacientes con niveles altos y bajos de transcripción, basados en el perfil de expresión de cada gen en el transcriptoma. Luego, se realizó un análisis univariado y multivariado para cada gen en ambas cohortes. Como resultado, se identificaron con éxito 450 genes asociados con la OS. De estos, la expresión alta de 370 genes se asoció con pronóstico desfavorable o tasas bajas de supervivencia ($HR > 1$) y la expresión alta de 80 con pronóstico favorable tasas o altas de supervivencia ($HR < 1$) (Figura 3, panel superior). Luego, al considerar el cálculo del AUC, que incluyó la evaluación de sensibilidad y especificidad, se logró identificar 18 genes que aún permanecían asociados con la OS. Sin embargo, solo 3 de estos genes, *MAP4K4*, *ASXL1* y *MACF1*, estaban asociados con bajas tasas de supervivencia libre de enfermedad ($HR > 1$) (Figura 3, panel inferior). En consecuencia, se identificó tres genes cuyos niveles elevados de expresión se asocian con un mayor riesgo de muerte y recaída. Dada esta variedad de genes identificados inicialmente, se decidió centrar los esfuerzos de investigación subsiguientes en el gen *MAP4K4*.

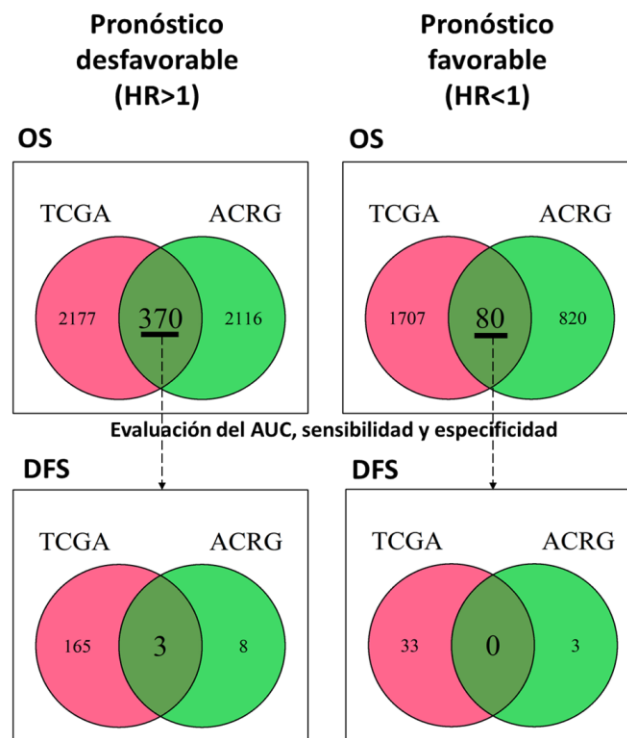


Figura 3. Asociación de los perfiles de expresión génica con la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad en las cohortes del TCGA y ACRG. OS: Supervivencia global; DFS: Supervivencia libre de enfermedad; AUC: Área bajo la curva; HR: Hazard ratio.

Expresión alta del gen *MAP4K4* como un biomarcador pronóstico independiente en el cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites.

Centrado en el gen *MAP4K4*, se clasificó a los pacientes en dos subgrupos basados en el perfil de expresión del gen *MAP4K4* en ambas cohortes (OS, expresión baja, n=43; expresión alta, n=25), se usó esta división para realizar análisis de asociación con el pronóstico y variables clínicas. El gráfico de Kaplan-Meier indicó que las tasas de OS para los *MAP4K4*^{alta} fueron del 14% frente al 77% para los *MAP4K4*^{baja} (Log-Rank, p=0.0017) en la cohorte del TCGA (Figura 4A), y del 37% para los *MAP4K4*^{alta} frente al 72.5% para los *MAP4K4*^{baja} (Log-Rank, p=0.0089) en la cohorte del ACRG (Figura

4B).

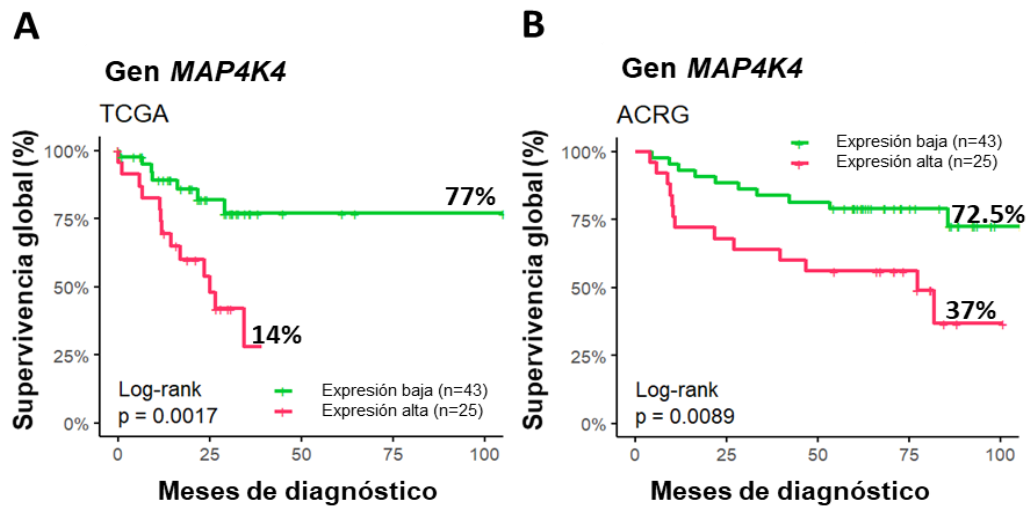


Figura 4. Supervivencia global en pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites según la expresión del gen *MAP4K4*. Análisis realizado en las cohortes del TCGA (A) y ACRG (B).

Luego, se evaluó la asociación del gen *MAP4K4* con recaídas mediante la evaluación de la DFS. Debido a la disponibilidad de datos, para la cohorte del TCGA solo 47 pacientes contaban con información completa sobre de la DFS (expresión baja, n=32; expresión alta, n=15). Las tasas de DFS fueron del 47% para los *MAP4K4*^{alta} frente al 96% para el grupo de *MAP4K4*^{baja} (Log-Rank, p=0.00055) para la cohorte TCGA, mientras que para la cohorte ACRG fueron del 53% en los *MAP4K4*^{alta} frente al 82.6% en los *MAP4K4*^{baja} (Log-Rank, p=0.021) (Figura 5). En resumen, los pacientes con una expresión alta del gen *MAP4K4* tienen tasas significativamente más bajas de supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad que los pacientes con una expresión más baja, se observa esto en ambas cohortes.

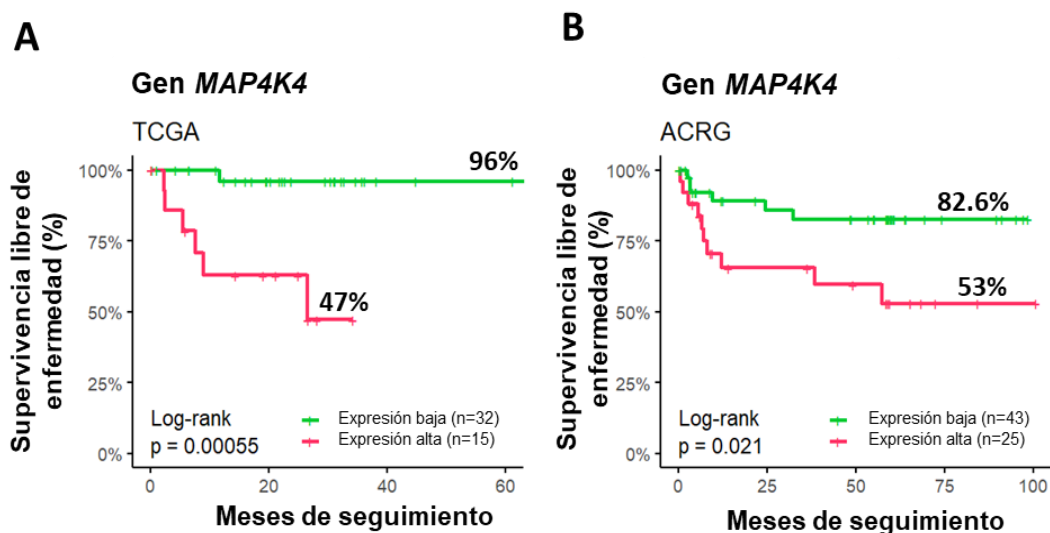


Figura 5. Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites según la expresión del gen *MAP4K4*. Análisis realizado en las cohortes del TCGA (A) y ACRG (B).

Después, se validó la capacidad predictiva de supervivencia global del gen *MAP4K4* a través del AUC hasta 3 años de seguimiento. Como se muestra en la Figura 6A, en el caso de la cohorte del TCGA, el gen *MAP4K4* muestra valores de AUC de 0.67. De manera similar, en el caso de la cohorte del ACRG, la Figura 6B ilustra el valor de área bajo la curva de 0.65 para el gen *MAP4K4*. Además, las curvas ROC muestran una sensibilidad y especificidad $> 50\%$ en ambas cohortes. En conjunto, se analizaron las curvas ROC dependientes y área bajo la curva en el contexto de la supervivencia global para evaluar la precisión pronóstica del gen *MAP4K4* como biomarcador pronóstico a lo largo del tiempo. Se encontró valores de AUC superiores a 0.6 hasta los 3 años de seguimiento.

En resumen, esto sugiere que la expresión alta de *MAP4K4* desempeña un papel como marcador predictivo para un pronóstico desfavorable y una mayor probabilidad de recaída en pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites.

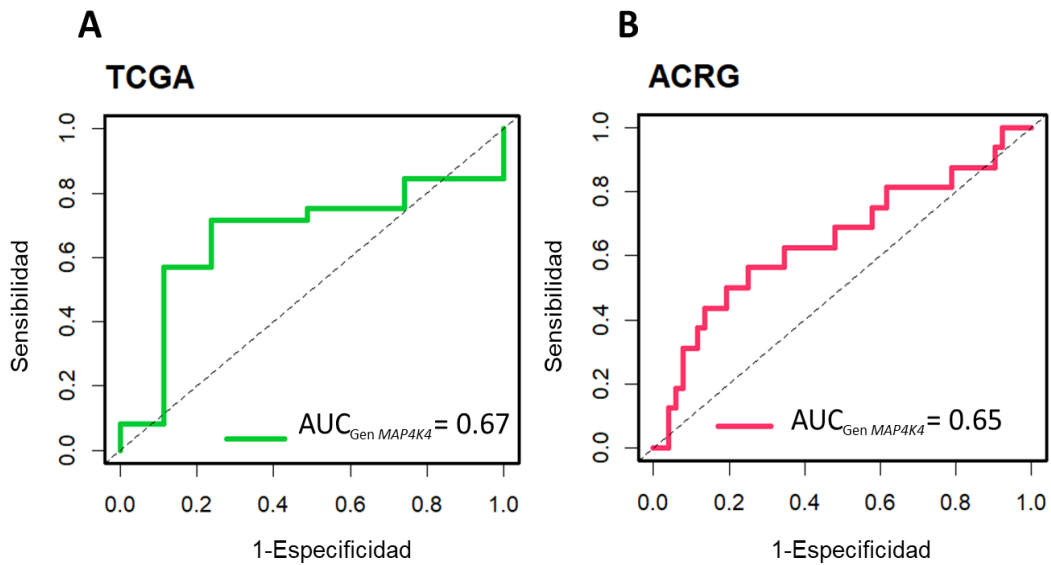


Figura 6. Capacidad pronóstica del gen *MAP4K4* en pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites mediante la curva ROC según la supervivencia global de 3 años de seguimiento. Análisis realizado en las cohortes del TCGA (A) y ACRG (B).

A continuación, se evaluó la asociación entre la expresión del gen *MAP4K4* y la OS mediante un análisis de regresión de Cox. En la cohorte del TCGA, la regresión univariada de Cox para los *MAP4K4*^{alta} indicó un HR de 3.86 ($p=0.0036$) en comparación con los *MAP4K4*^{baja} (Figura 7A). Además, se evaluó variables como la edad, sexo, categoría de Lauren, estado T, N y sitio del tumor primario. Se encontró que la edad (HR=1.07, $p=0.0125$) y el sitio primario del tumor en antro vs. fondo/cuerpo (HR=3.42, $p=0.0313$) se asociaron con la OS. Para evaluar la relación de la expresión alta del gen *MAP4K4* con posibles factores clínicos confusores, se llevó a cabo un análisis de regresión multivariada de Cox. Las variables significativas en el análisis univariado, como antro vs. fondo/cuerpo ($p>0.05$), perdieron su capacidad predictiva mientras que los *MAP4K4*^{alta} (HR=4.56, $p=0.006$) y la edad (HR=1.11, $p=0.0013$) mantuvieron su asociación con la OS (Figura 7A), lo que indica que la expresión del gen *MAP4K4* es un predictor independiente en cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites. De manera similar, en la cohorte del ACRG, el análisis de regresión univariada de Cox para supervivencia global (Figura 7B) indicó que los *MAP4K4*^{alta} tiene un HR=3.09 ($p=0.0073$). También, la etapa del tumor T3/T4 vs. T1/T2 resultó en resultados significativos (HR=3.57, $p=0.0024$). Posteriormente, el

análisis de Cox reveló que los *MAP4K4*^{alta} (HR=3.90, p=0.0057) y la etapa del tumor (HR=4.70, p=0.0011) siguen asociados con la OS.

En síntesis, después del ajuste por factores de confusión, el poder predictivo se mantuvo para los *MAP4K4*^{alta}, confirmando la asociación independiente con el pronóstico.

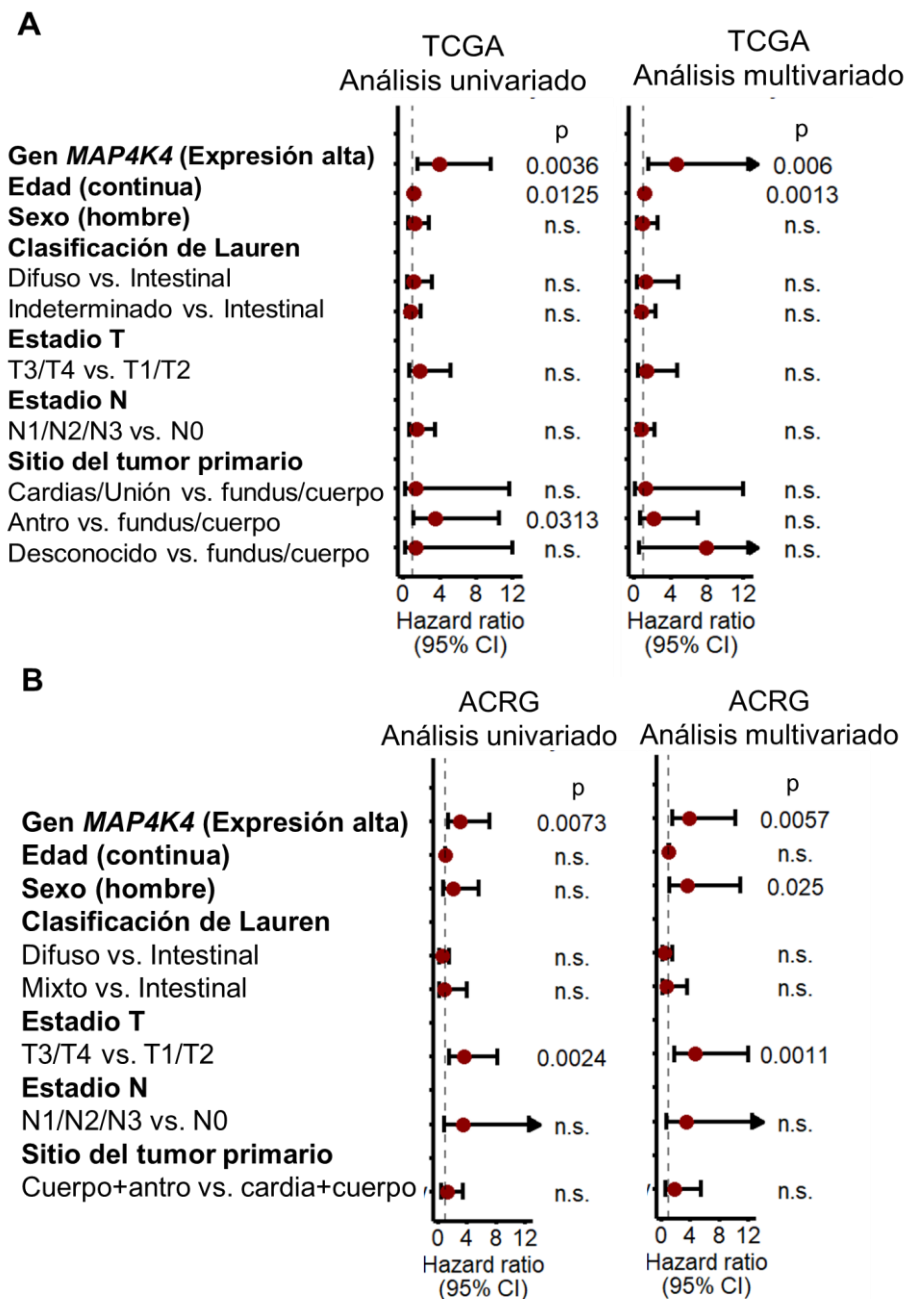


Figura 7. Supervivencia global de los pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites según la regresión de Cox. Análisis realizado para pacientes de las cohortes del TCGA (A) y ACRG (B). n.s.: $p > 0.05$. CI: Intervalo de confianza.

Para evaluar la asociación de la expresión del gen *MAP4K4* con eventos de recaídas en pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites, se analizó la supervivencia libre de enfermedad mediante la regresión de Cox. El análisis en la cohorte de TCGA (Figura 8A) reveló que los *MAP4K4*^{alta} tenían un mayor riesgo de recidiva (HR=16.00, $p=0.0103$). De manera similar, en pacientes de la cohorte del ACRG, nuestro análisis (Figura 8B) demostró que los *MAP4K4*^{alta} presentaban un mayor riesgo de recaídas (HR=3.97, $p=0.0077$). Además, los estadios tumorales T3/T4 también se asociaron con las recaídas, notablemente con un alto riesgo (HR=6.984, $p=0.0003$). No se realizó una regresión multivariada de Cox posterior, debido al bajo número de pacientes en algunas categorías clínicas. Sin embargo, en conjunto, los hallazgos de las cohortes del TCGA y ACRG resaltan el valor clínico de la evaluación de los *MAP4K4*^{alta} para predecir recaídas en pacientes con cáncer gástrico con MSI tratados con esquemas de tratamiento estándar como la cirugía o quimioterapia.

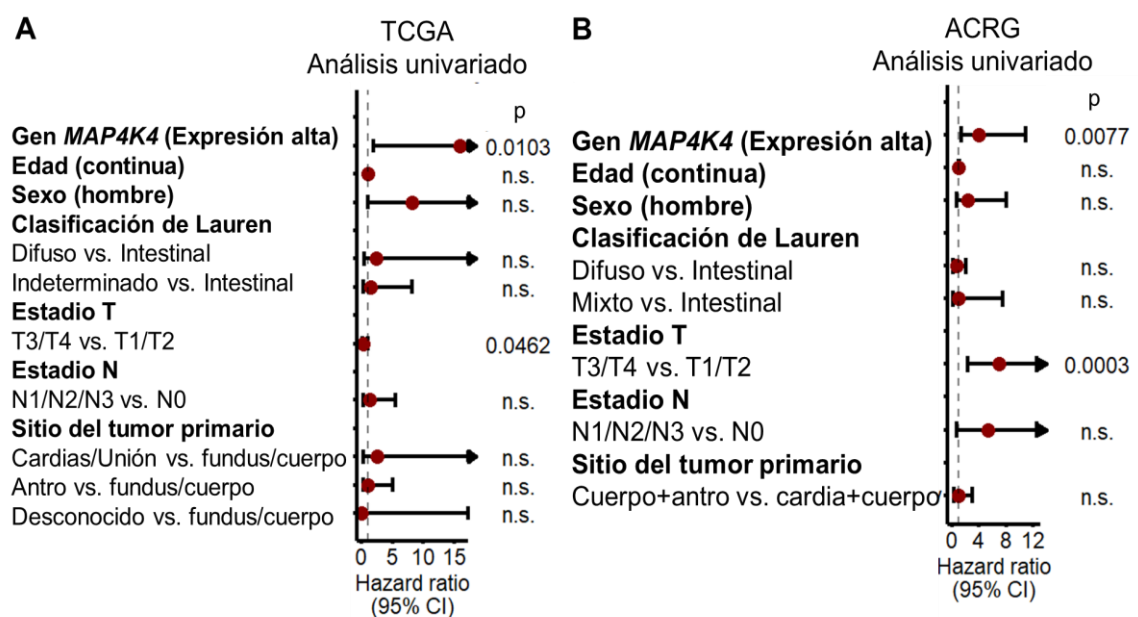


Figura 8. Supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites según la regresión univariada de Cox. Análisis realizado en pacientes de las cohortes del TCGA (A) y ACRG (B). n.s.: $p > 0.05$. CI: Intervalo de confianza.

Valor pronóstico de la expresión alta del gen *MAP4K4* en el subtipo inestabilidad microsatelital frente a todo el espectro del cáncer gástrico.

Recientemente, se ha propuesto la expresión de *MAP4K4* como un biomarcador de pronóstico para el cáncer gástrico (33). Entonces, se comprobó si la capacidad pronóstica de la expresión del gen *MAP4K4* como biomarcador pronóstico resalta más en algunos subtipos moleculares de cáncer gástrico. De este modo, se realizó un análisis de regresión de Cox para evaluar el valor pronóstico de la expresión alta del gen *MAP4K4* en diferentes subgrupos moleculares. En primer lugar, se ejecutó este análisis en las categorías moleculares establecidas por el proyecto del TCGA. Dentro de la cohorte completa, los *MAP4K4*^{alta} tienen un HR=2.4 ($p=0.0076$); sin embargo, se observa un HR=18.3 ($p=0.0184$) para el subtipo de EBV, HR=2.6 ($p=0.0076$) para CIN, HR=3.86 para MSI ($p=0.0036$), y un resultado no significativo para el subtipo GS (Figura 9A). Estos resultados demostraron que los pacientes con cáncer gástrico pertenecientes a la categoría GS no se benefician con el uso de *MAP4K4* como biomarcador pronóstico. Luego, se realizó el mismo análisis para las categorías moleculares establecidas por el proyecto del ACRG. Encontramos que los *MAP4K4*^{alta} predijo resultados específicos para el subtipo con MSI (HR=3.09, $p = 0.0073$). Para otros subtipos del proyecto del ACRG, el grupo de *MAP4K4*^{alta} no alcanzó significación ($p= n.s.$), excepto cuando se analizó todo el conjunto de ACRG (HR = 1.834, $p = 0.0004$) (Figura 9B).

Estos hallazgos resaltan la importancia pronóstica de la expresión alta del gen *MAP4K4* en diferentes subgrupos moleculares de cáncer gástrico, reflejando su heterogeneidad biológica. Además, los resultados destacan el papel potencial del gen *MAP4K4* como biomarcador pronóstico en el subtipo de MSI.

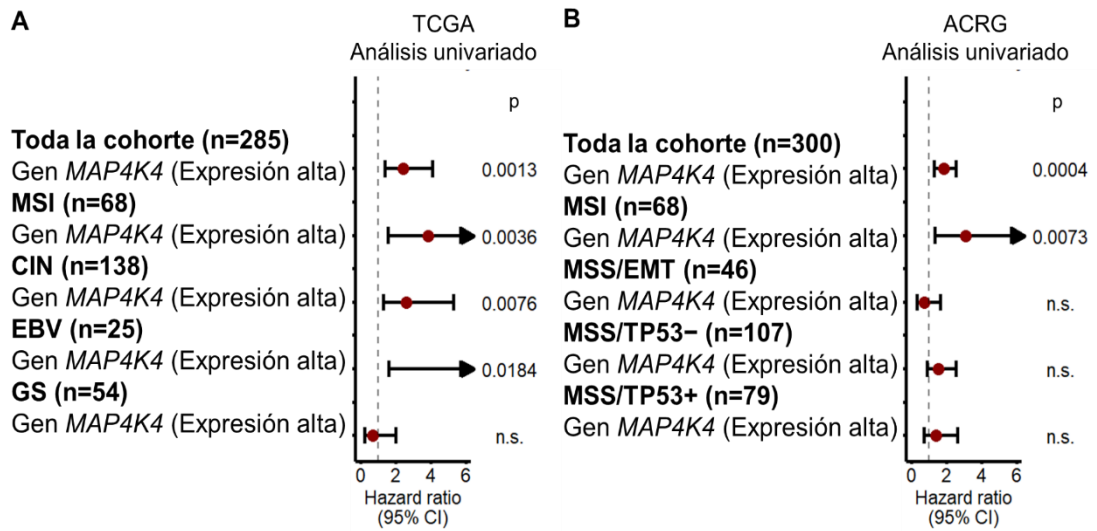


Figura 9. Supervivencia global entre diferentes subtipos en ambas cohortes según la expresión alta del gen *MAP4K4* según la regresión univariada de Cox. Análisis realizado para los subtipos de las cohortes del TCGA (A) y ACRG (B). n.s.: $p > 0.05$. CI: Intervalo de confianza.

Asociación de la expresión del gen *MAP4K4* con variables clínicas y genéticas en el cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites.

Para caracterizar la importancia clínica de la expresión del gen *MAP4K4*, se evaluó las variables clínicas del cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites en relación con su expresión. Curiosamente, en el análisis se reveló que no existe una asociación significativa entre la expresión alta del gen *MAP4K4* y las características clínicas, tanto en las cohortes del TCGA y ACRG (Tablas 1-2).

Estos resultados están en relación con los análisis de regresión y confirman que la variabilidad en la expresión del gen *MAP4K4* no está relacionada con variables clínicas relevantes para el cáncer gástrico con MSI.

Tabla 1. Características clínicas en la cohorte del TCGA según la expresión del gen *MAP4K4*. IQR: Rango intercuartílico.

Variables		Total	Baja	Alta	p
Número de pacientes		68	43	25	
Edad (mediana [IQR])		70.00 [64.00, 75.25]	70.00 [64.00, 75.00]	70.00 [65.00, 76.00]	0.949
Sexo, n (%)	Mujer	35 (51.5)	25 (58.1)	10 (40.0)	0.209
	Hombre	33 (48.5)	18 (41.9)	15 (60.0)	
Conteo de mutaciones (mediana [IQR])		1090.00 [739.25, 1329.25]	1158.00 [749.50, 1355.00]	1043.00 [695.00, 1278.00]	0.321
Raza, n (%)	Asiática	15 (26.8)	10 (27.8)	5 (25.0)	0.781
	Negra o Afroamericana	2 (3.6)	2 (5.6)	0 (0.0)	
	Blanca	39 (69.6)	24 (66.7)	15 (75.0)	
Grado histológico, n (%)	G1	1 (1.5)	0 (0.0)	1 (4.0)	0.323
	G2	19 (27.9)	12 (27.9)	7 (28.0)	
	G3	47 (69.1)	31 (72.1)	16 (64.0)	
	GX	1 (1.5)	0 (0.0)	1 (4.0)	
Estadio T, n (%)	T1/T2	19 (27.9)	13 (30.2)	6 (24.0)	0.78
	T3/T4	49 (72.1)	30 (69.8)	19 (76.0)	
Estadio N, n (%)	N0	30 (44.1)	22 (51.2)	8 (32.0)	0.139
	N1/N2/N3	38 (55.9)	21 (48.8)	17 (68.0)	
Estadio M, n (%)	M0	63 (92.6)	41 (95.3)	22 (88.0)	0.609
	M1	3 (4.4)	1 (2.3)	2 (8.0)	
	Indeterminado	2 (2.9)	1 (2.3)	1 (4.0)	

Clasificación del AJCC TNM, n (%)	IA	1 (1.5)	1 (2.3)	0 (0.0)	0.411
	IB	1 (1.5)	1 (2.3)	0 (0.0)	
	II	15 (22.1)	12 (27.9)	3 (12.0)	
	IIIA	36 (52.9)	22 (51.2)	14 (56.0)	
	IIIB	2 (2.9)	1 (2.3)	1 (4.0)	
	IV	13 (19.1)	6 (14.0)	7 (28.0)	
Sitio primario del tumor, n (%)	Fundus/Cuerpo	22 (32.4)	15 (34.9)	7 (28.0)	0.898
	Cardia	3 (4.4)	2 (4.7)	1 (4.0)	
	Antro	38 (55.9)	22 (51.2)	16 (64.0)	
	Unión gastroesofagica	1 (1.5)	1 (2.3)	0 (0.0)	
	Indeterminado	4 (5.9)	3 (7.0)	1 (4.0)	
Clasificación de Luren, n (%)	Intestinal	27 (39.7)	16 (37.2)	11 (44.0)	0.681
	Difuso	14 (20.6)	8 (18.6)	6 (24.0)	
	Indeterminado	27 (39.7)	19 (44.2)	8 (32.0)	

Tabla 2. Características clínicas en la cohorte del ACRG según la expresión del gen *MAP4K4*. IQR: Rango intercuartílico.

Variables		Total	Baja	Alta	p
Número de pacientes		68	43	25	
Edad (median [IQR])		66.00 [60.00, 72.00]	66.00 [60.50, 73.50]	65.00 [60.00, 70.00]	0.541
Sexo, n (%)	Mujer	23 (33.8)	16 (37.2)	7 (28.0)	0.596
	Hombre	45 (66.2)	27 (62.8)	18 (72.0)	
Estadio T, n (%)	T2	47 (69.1)	31 (72.1)	16 (64.0)	0.588
	T3/T4	21 (30.9)	12 (27.9)	9 (36.0)	
Estadio N, n (%)	N0	16 (23.5)	12 (27.9)	4 (16.0)	0.377
	N1/N2/N3	52 (76.5)	31 (72.1)	21 (84.0)	
Estadio M, n (%)	M0	67 (98.5)	43 (100.0)	24 (96.0)	0.368

	M1	1 (1.5)	0 (0.0)	1 (4.0)	
Clasificación del AJCC TNM, n (%)	IB	14 (20.6)	11 (25.6)	3 (12.0)	0.051
	II	26 (38.2)	18 (41.9)	8 (32.0)	
	IIIA	10 (14.7)	5 (11.6)	5 (20.0)	
	IIIB	9 (13.2)	7 (16.3)	2 (8.0)	
	IV	9 (13.2)	2 (4.7)	7 (28.0)	
Sitio primario del tumor, n (%)	Cuerpo	13 (19.1)	9 (20.9)	4 (16.0)	0.735
	Cardias	4 (5.9)	2 (4.7)	2 (8.0)	
	Antro	49 (72.1)	30 (69.8)	19 (76.0)	
	Cuerpo y cardias	2 (2.9)	2 (4.7)	0 (0.0)	
Clasificación de Lauren, n (%)	Intestinal	42 (61.8)	26 (60.5)	16 (64.0)	0.144
	Difuso	20 (29.4)	11 (25.6)	9 (36.0)	
	Mixto	6 (8.8)	6 (14.0)	0 (0.0)	

Los cambios en la expresión génica a lo largo de diferentes etapas tumorales son una característica biológica bien caracterizada en el cáncer. En este sentido, para identificar si los niveles de transcritos del gen *MAP4K4* están asociados con los estadios en el cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites, se llevó a cabo un análisis comparativo de expresión entre estas. El análisis de la expresión durante la progresión del cáncer gástrico con MSI reveló que no hay una diferencia significativa entre la expresión del gen *MAP4K4* y las diferentes etapas patológicas en las cohortes del TCGA (Figura 10A, $p=0.065$) y ACRG (Figura 10B, $p=0.085$). Este resultado sugiere que el gen *MAP4K4* puede no estar directamente involucrado en la progresión de los tumores de cáncer gástrico con inestabilidad. Sin embargo, podría desempeñar un papel crítico en el mantenimiento de funciones celulares básicas o en aspectos del tumor no directamente relacionados con la progresión.

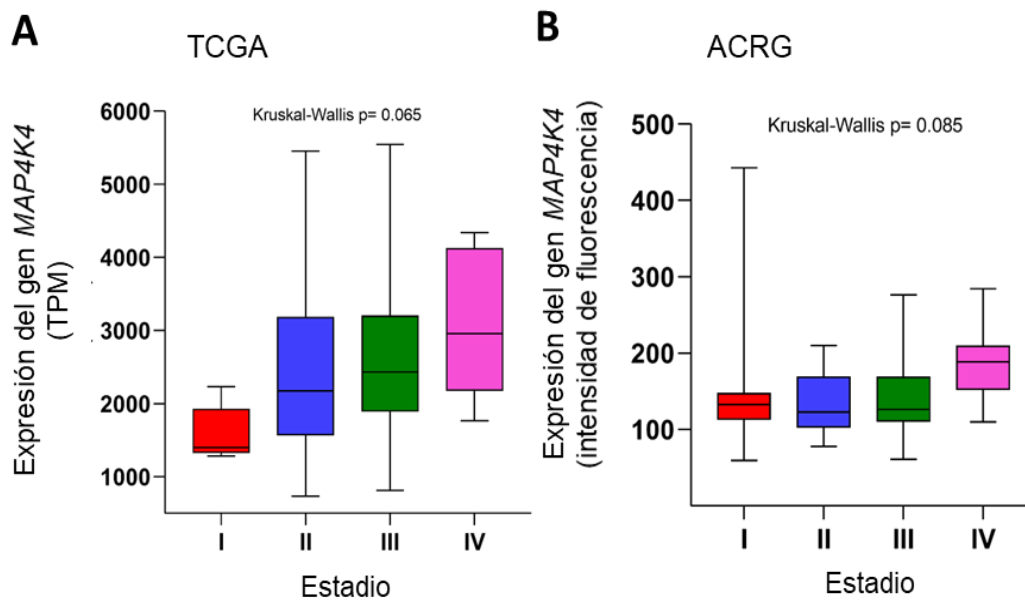


Figura 10. Comparación entre las etapas clínicas del cáncer gástrico según la expresión del gen *MAP4K4*. Análisis realizado en las cohortes del TCGA (A) y ACRG (B). TPM: transcritos por millón.

Seguidamente, se evaluó si la expresión del gen *MAP4K4* podría estar asociada con alteraciones genéticas comunes en el cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites. Para el análisis, se seleccionaron genes cuyas frecuencias mutacionales eran superiores al 45% en la cohorte del TCGA. De este porcentaje, 19 fueron los genes mutados. Se encontró que los niveles de transcripción del gen *MAP4K4* no están explicados por las alteraciones genéticas comunes encontradas en este tipo de cáncer (Figura 11, $p>0.05$). Esto indica que, aunque el gen *MAP4K4* juega un papel en el cáncer gástrico con MSI, su expresión está influenciada por factores más allá de las

alteraciones genéticas comúnmente observadas.

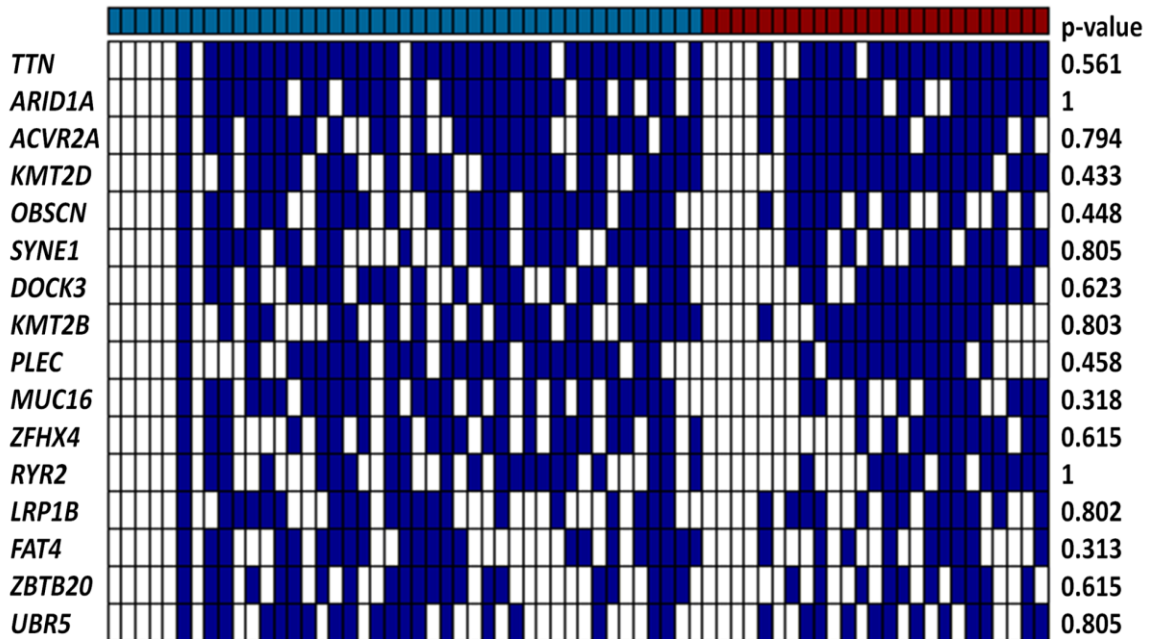


Figura 11. Análisis de mutaciones según la expresión del gen *MAP4K4* en la cohorte del TCGA. En el rectángulo superior, las barras rojas representan a los *MAP4K4*^{alta}, mientras que las barras celestes representan a los *MAP4K4*^{baja}. Además, para cada gen, las barras azules indican la presencia de una alteración mutacional, mientras que las barras blancas indican estado de tipo salvaje.

Finalmente, para identificar si el gen *MAP4K4* está desregulado en el cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites, se comparó los perfiles de expresión en tejidos sanos y tumorales (Figura 12). Se encontró que la expresión del gen *MAP4K4* es más alta en los tumores con MSI en comparación con el tejido sano en la cohorte del ACRG (Figura 12B, $p=0.000789$). Aunque no se encontró estas diferencias en la cohorte del TCGA ($p>0.05$), se observó niveles de transcripción más altos del gen *MAP4K4* en cada uno de los cinco tumores incluidos en este análisis de comparación (Figura 12A). Este resultado ofrece información valiosa sobre los mecanismos de la enfermedad y posibles estrategias de tratamiento.

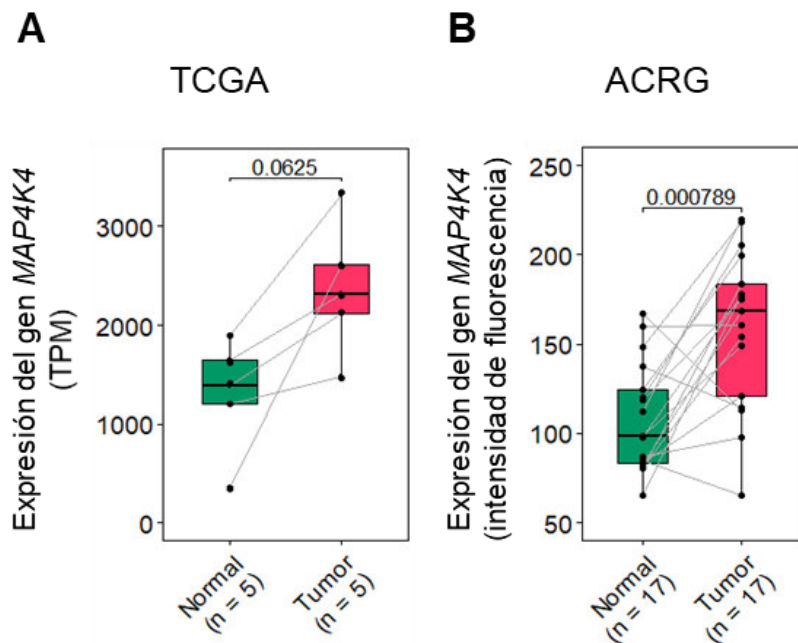


Figura 12. Comparación de muestras pareadas entre tejido normal y tejido tumoral según la expresión del gen *MAP4K4*. Análisis realizado en pacientes de las cohortes del TCGA (A) y ACRG (B). TPM: transcritos por millón.

Asociación entre expresión alta del gen *MAP4K4* y características del metabolismo tumoral, e inmunidad tumoral

Para explorar a fondo el mecanismo molecular que podría explicar los resultados de los *MAP4K4^{alta}*, se realizó un análisis de enriquecimiento de vías biológicas utilizando conjuntos de genes de la Ontología Génica y el transcriptoma de los pacientes con inestabilidad de microsatélites. Un total de 19 vías biológicas se enriquecieron en la cohorte del TCGA (Tabla 3), mientras que 45 vías estaban asociadas cuando se consideraba la cohorte del ACRG (Tabla 4). Tras el análisis de redundancia de estas vías, encontramos que los procesos metabólicos, como la actividad oxidoreductasa dependiente de NAD, el metabolismo de bifosfato de nucleósido de purina, el metabolismo de ácidos grasos y la respiración mitocondrial, son los procesos biológicos canónicos asociados con los *MAP4K4^{alta}* (Figura 13). Interesantemente,

solo las vías asociadas a la respiración mitocondrial se enriquecieron comúnmente tanto en las cohortes del TCGA y ACRG. Estos resultados sugieren una actividad mitocondrial elevada en las células tumorales de los *MAP4K4^{alta}*.

Tabla 3. Vías biológicas asociadas con la expresión alta del gen *MAP4K4* en la cohorte del TCGA. Se muestran diecinueve vías asociadas con la expresión alta del gen *MAP4K4*. DE: Expresión Diferencial; GO: Ontología de Genes; MF: Función Molecular; CC: Componente Celular y BP: Proceso Biológico.

	Vías biológicas	P	P ajustado	Genes DE	Genes en la vía	Ratio de genes	Ontología
GO:0098798	Complejo que contiene proteínas mitocondriales	4,36E-10	5,82E-06	21	223	9,4	CC
GO:0051287	Unión NAD	1,76E-08	7,84E-05	11	51	21,6	MF
GO:0005743	Membrana interna mitocondrial	7,38E-08	2,74E-04	26	390	6,7	CC
GO:0005759	Matriz mitocondrial	1,05E-07	3,34E-04	28	418	6,7	CC
GO:0019866	Membrana interna del organelo	3,67E-07	1,02E-03	27	443	6,1	CC
GO:0016616	Actividad oxidorreductasa, actuando sobre el grupo CH-OH de los donantes, NAD o NADP como aceptor	5,26E-07	1,20E-03	14	123	11,4	MF
GO:0016614	Actividad oxidorreductasa, que actúa sobre el grupo de donantes CH-OH	1,66E-06	2,47E-03	14	135	10,4	MF
GO:0009060	Respiración aeróbica	2,77E-06	3,63E-03	13	142	9,2	BP
GO:0006099	Ciclo del ácido tricarbóxico	4,61E-06	4,67E-03	7	31	22,6	BP
GO:0045333	Respiración celular	1,36E-05	1,22E-02	14	181	7,7	BP
GO:0033865	Proceso metabólico del nucleósido bifosfato	1,59E-05	1,22E-02	12	118	10,2	BP
GO:0033875	Proceso metabólico del ribonucleósido bifosfato	1,59E-05	1,22E-02	12	118	10,2	BP
GO:0034032	Proceso metabólico de nucleósido bifosfato de purina	1,59E-05	1,22E-02	12	118	10,2	BP
GO:0006066	Proceso metabólico del alcohol	3,30E-05	2,23E-02	21	336	6,3	BP
GO:0098800	Complejo proteico de la membrana mitocondrial interna	4,32E-05	2,83E-02	9	103	8,7	CC
GO:0044282	Proceso catabólico de molécula pequeña	6,75E-05	4,18E-02	21	355	5,9	BP
GO:0009062	Proceso catabólico de ácidos grasos	7,29E-05	4,39E-02	10	97	10,3	BP
GO:0044242	Proceso catabólico de lípidos celulares	8,26E-05	4,74E-02	15	209	7,2	BP
GO:0006631	Proceso metabólico de los ácidos grasos	8,67E-05	4,83E-02	21	365	5,8	BP

Tabla 4. Vías biológicas asociadas con la expresión alta del gen *MAP4K4* en la cohorte del ACRG. Se muestran cuarenta y cinco vías biológicas asociadas con la expresión alta del gen *MAP4K4*. Se muestran las 20 principales. DE: Expresión Diferencial; GO: Ontología de Genes; MF: Función Molecular; CC: Componente Celular y BP: Proceso Biológico.

Código GO	Vías biológicas	P	P ajustado	Genes DE	Genes en la vía	Ratio de genes	Ontología
GO:0098800	Complejo proteico de la membrana mitocondrial interna	3,52E-11	4,61E-07	14	115	12,2	CC
GO:0022904	Cadena transportadora de electrones	4,12E-11	4,61E-07	13	92	14,1	BP
GO:0070469	Respirasoma	1,35E-10	8,52E-07	12	84	14,3	CC
GO:0098798	Complejo que contiene proteínas mitocondriales	1,52E-10	8,52E-07	18	234	7,7	CC
GO:0009055	Actividad de transferencia de electrones	3,18E-10	1,42E-06	13	109	11,9	MF
GO:0042773	Transporte de electrones acoplado a la síntesis de ATP	4,84E-10	1,51E-06	11	73	15,1	BP
GO:0042775	Transporte de electrones acoplado a la síntesis de ATP mitocondrial.	4,84E-10	1,51E-06	11	73	15,1	BP
GO:0098803	Complejo de cadena respiratoria	5,55E-10	1,51E-06	11	76	14,5	CC
GO:0005743	Membrana interna mitocondrial	6,08E-10	1,51E-06	23	420	5,5	CC
GO:0005746	Respirasoma mitocondrial	7,19E-10	1,61E-06	11	77	14,3	CC
GO:0022900	Cadena de transporte de electrones	1,18E-09	2,40E-06	14	142	9,9	BP
GO:0006119	Fosforilación oxidativa	2,03E-09	3,79E-06	12	102	11,8	BP
GO:0005201	Constituyente estructural de la matriz extracelular	2,85E-09	4,90E-06	16	164	9,8	MF
GO:1990204	Complejo oxidoreductasa	3,18E-09	5,08E-06	12	104	11,5	CC
GO:0062023	Matriz extracelular que contiene colágeno	7,15E-09	1,07E-05	23	404	5,7	CC
GO:0030199	Organización de las fibrillas de colágeno	8,82E-09	1,23E-05	10	58	17,2	BP
GO:0019866	Membrana interna del organelo	9,60E-09	1,26E-05	23	474	4,9	CC
GO:0019646	Cadena aeróbica de transporte de electrones	4,75E-08	5,91E-05	9	66	13,6	BP
GO:0045333	Respiración celular	6,13E-08	6,53E-05	14	188	7,4	BP

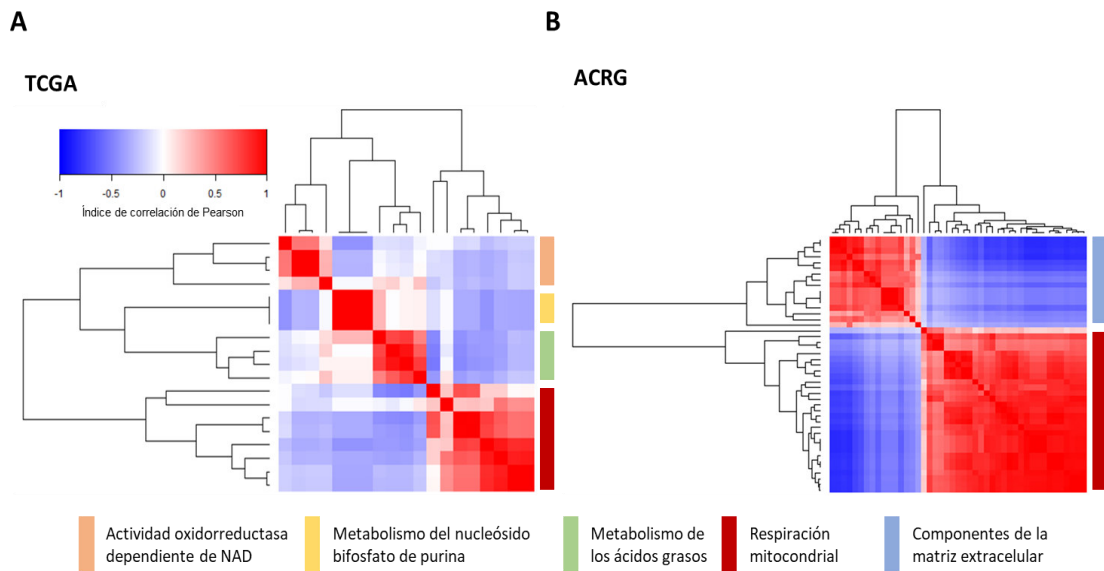


Figura 13. Análisis de redundancia entre las vías asociadas con la expresión alta del gen *MAP4K4*. Análisis realizado en las cohortes del TCGA (A) y ACRG (B). La leyenda representa los valores del índice de correlación de Pearson.

Finalmente, se evaluó la infiltración de células estromales e inmunitarias en el TME en relación con la expresión del gen *MAP4K4*. Se utilizaron 5 algoritmos que corresponden a 119 estimaciones de infiltración inmunitaria. Se encontró un enriquecimiento de monocitos, CAFs y el puntaje estromal en los conjuntos de datos del TCGA y ACRG (Figura 14). El puntaje estromal se refiere a una puntuación que evalúa la presencia y abundancia de células estromales en el TME, estrechamente relacionadas, de hecho, con los CAFs. Estas células podrían desempeñar un papel significativo en el desarrollo y progresión del cáncer. Además, los monocitos podrían jugar un rol crucial en la progresión del tumor al favorecer la diferenciación en subtipos específicos de macrófagos que pueden modular la respuesta inmunitaria a favor o en contra del tumor. Por otro lado, las células dendríticas en reposo, asociadas en los tumores inestabilidad de microsatélites con expresión baja de *MAP4K4*, podrían ser responsables de la presentación de antígenos y la activación de respuestas inmunitarias, lo que puede contribuir a una respuesta inmunitaria sólida contra los tumores.

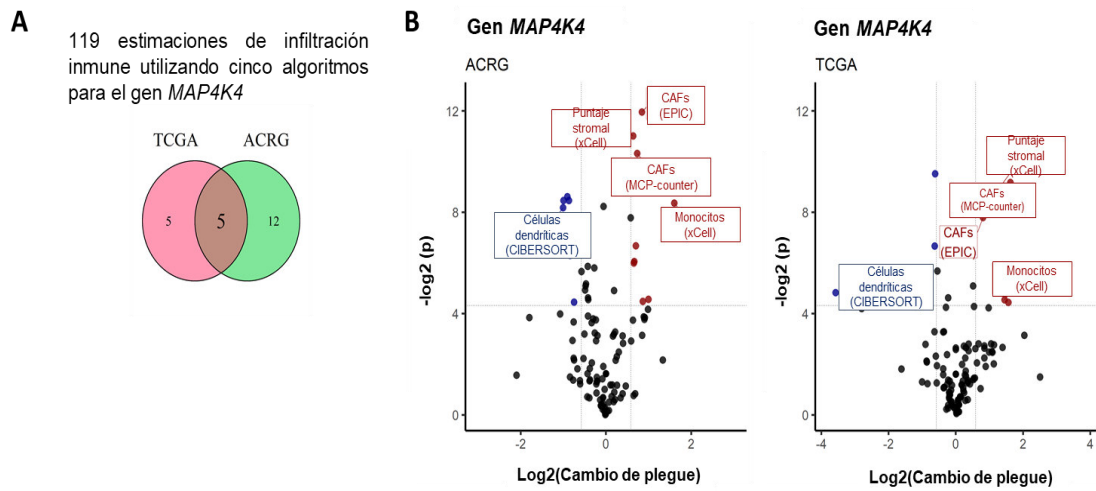


Figura 14. Infiltración inmunitaria asociada con la expresión del gen *MAP4K4*. El diagrama de Venn indica la coincidencia del número de células inmunitarias entre las cohortes del TCGA y ACRG (A), mientras que los gráficos de volcán especifican los tipos de células predichas para infiltrar el tumor en ambas cohortes (B). CAFs: Fibroblastos asociados al cáncer.

CAPÍTULO: IV. DISCUSIÓN

El cáncer gástrico es uno de los cánceres más comunes y agresivos (17). En general, tiene un mal pronóstico (22). Durante décadas, solo se han utilizado el estadio patológico y los datos clínicos para proporcionar un pronóstico y guiar el tratamiento; sin embargo, estos métodos tienen limitaciones graves ya que no consideran la heterogeneidad del cáncer gástrico, lo que limita la implementación de un tratamiento personalizado efectivo y un pronóstico más preciso (26).

A pesar de que el cáncer con MSI se considera de buen pronóstico y opciones terapéuticas efectivas, existen pacientes que fallecen prematuramente, principalmente debido a la recurrencia del tumor después del tratamiento (26). Estudios recientes han informado que incluso dentro del tipo inestabilidad microsatelital, se pueden encontrar subtipos con características moleculares heterogéneas que pueden ser utilizados para un pronóstico mucho más preciso (28).

En este estudio, se utilizó análisis estadísticos para identificar genes asociados con el pronóstico en dos cohortes de pacientes con cáncer gástrico con MSI. Las curvas ROC de supervivencia global determinaron puntos de corte óptimos de expresión para categorizar a los pacientes como de expresión alta o baja. Esto ayudó a evaluar las relaciones entre genes y supervivencia. Luego, se ejecutaron los análisis de regresión de Cox. El análisis univariado se centró en determinar los genes vinculados al pronóstico y a las recaídas, mientras que el análisis multivariado nos permitió considerar la influencia de varias variables clínicas relevantes como la edad, sexo, clasificación de Lauren, estadio T, N y M y sitio del tumor primario. Como resultado de este proceso, se obtuvieron 3 genes: *MAP4K4*, *ASXL1* y *MACF1*. Entre estos genes, el gen *MAP4K4* ha recibido más atención y ha sido estudiado en diversos proyectos de investigación sobre cáncer en comparación con los otros (94–100). El análisis de infiltración inmune y el análisis de enriquecimiento de vías biológicas fueron ejecutados como análisis complementarios para complementar la investigación sobre la expresión del gen *MAP4K4*.

En proteína, el MAP4K4 (también conocido como HGK o NIK) es una quinasa serina/treonina perteneciente a la familia Ste20 de quinasas proteicas en mamíferos (101). En función como gen, sabe que el gen *MAP4K4* desempeña un papel importante en inmunidad, inflamación, trastornos metabólicos, enfermedades cardiovasculares y

cáncer. En el cáncer, se ha identificado a este como promotor del cáncer de páncreas (102) y glioblastoma (103). Complementariamente, se reconoce que, en forma de proteína, participa en procesos fisiológicos como migración, proliferación y adhesión celular, procesos muy ligados a metástasis (104,105).

Al analizar los perfiles de expresión del gen *MAP4K4* en diferentes estudios de otros tipos de cáncer. Se observa que los *MAP4K4*^{alta} están relacionados con un peor pronóstico, progresión acelerada, mayor frecuencia de recurrencia y un mayor número de ganglios linfáticos metastásicos en pacientes con adenocarcinoma ductal pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, adenocarcinoma pulmonar, leucemia mieloide aguda y carcinoma hepatocelular (94–100). Además, se sabe que este perfil de expresión promueve la inmunosupresión y la transición epitelial-mesenquimal, siendo esta necesaria para la metástasis (105). Por el contrario, la expresión nula del gen *MAP4K4* está asociada con mayor supervivencia en células cardíacas (106). La expresión baja del gen *MAP4K4* se ha asociado con una tasa de OS favorable en cáncer colorrectal (107) y carcinoma hepatocelular (108). Esto sugiere que el papel del gen *MAP4K4* como marcador pronóstico no se limita al cáncer gástrico, sino que se extiende a otros tipos de cáncer. Del mismo modo, los resultados de este estudio resaltan que los *MAP4K4*^{alta} se asocian con un pronóstico desfavorable y podrían predecir recaídas, a diferencia de los *MAP4K4*^{baja} que indican un pronóstico mucho más favorable.

Recientemente, se ha estudiado a los *MAP4K4*^{alta} en el cáncer gástrico, este perfil puede predecir OS (HR=1, p=0.0418), aunque con un índice de riesgo menos pronunciado. Adicionalmente en el estudio, el perfil de los *MAP4K4*^{alta} demostró un poder de invasión y metástasis en varios análisis in vitro (33). En esta línea, se procedió a comparar el riesgo asociado a los *MAP4K4*^{alta} entre los subtipos de cáncer gástrico y el cáncer gástrico general, encontramos que este perfil de expresión podría servir potencialmente como un predictor de OS más sólido dentro del subtipo de MSI que en el conjunto completo de las cohortes del TCGA y ACRG.

Con respecto a la expresión y su asociación con variables clínicas y genéticas, se ha informado que la expresión del gen *MAP4K4* está asociada con los estadios patológicos en el adenocarcinoma ductal de páncreas (99), pulmón (100) y

hepatocelular (109). De hecho, Tong et al. demostraron que los niveles de expresión del gen *MAP4K4* estaban asociados con etapas tumorales más avanzadas (110). Asimismo, este gen está más expresado en tumores que en tejido normal (110,111). De igual manera, un estudio reciente mostró que la expresión del gen *MAP4K4* es independiente del estadio patológico (33). Consistentemente con los hallazgos del presente estudio, se revelaron niveles de expresión más altos en el tejido tumoral y no se observaron diferencias significativas entre la expresión del gen *MAP4K4* y los estadios patológicos del cáncer gástrico con MSI y tampoco con ninguna otra variable clínica.

Adicionalmente, se conoce que un tumor con MSI es inmunogénico debido a la formación de neoantígenos ocasionados por la gran tasa mutacional, incluso en el cáncer gástrico con MSI influyendo en el pronóstico (22). En la presente investigación no se encontró ninguna asociación entre las mutaciones genéticas más comunes y los perfiles de expresión del gen *MAP4K4*, sugiriendo así que las mutaciones no estarían implicadas en el pronóstico.

El perfil metabólico de una célula cancerosa es notablemente diverso. En la mayoría de los tumores, hay una transición desde la respiración mitocondrial hasta la fosforilación oxidativa hacia la glucólisis aeróbica, un fenómeno conocido como el efecto Warburg. El efecto Warburg permite a las células cancerosas evitar la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno a partir de la respiración mitocondrial, obteniendo así una mayor resistencia y una ventaja en la supervivencia (112). En cuanto a la fosforilación oxidativa, un tumor con actividad baja en fosforilación oxidativa se asocia con un mal pronóstico (113), a diferencia de un tumor con actividad alta de fosforilación, que podría tener un mejor pronóstico, ya que es más factible tratarlo con un inhibidor de la fosforilación dirigido a la cadena de transporte de electrones, privando así a las células tumorales de energía (114). De hecho, fármacos con efectos inhibitorios ya se han probado en etapas avanzadas del cáncer gástrico (115).

Sin embargo, se ha demostrado que la fosforilación oxidativa desempeña un papel significativo en la progresión del cáncer gástrico y la respuesta al tratamiento. En el estudio de Sotgia et al., se analizó la expresión de genes mitocondriales implicados en

la fosforilación oxidativa, mostrando que una expresión alta de estos genes se asociaba con un peor pronóstico (116). Feichtinger et al. y Pramod et al. también encontraron que una actividad alta de la fosforilación oxidativa estaba relacionada con tumores más grandes y etapas avanzadas, lo que sugiere que una mayor actividad en la fosforilación oxidativa podría promover la malignidad (117,118). Adicionalmente, en el caso del cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites, Cai et al. describieron una conexión entre los tumores con MSI y las vías de la respiración mitocondrial, incluida la fosforilación oxidativa, aunque no se realizó un análisis adicional (119). En comparación con los resultados de esta investigación, el metabolismo está alterado; el perfil de expresión de los pacientes de cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites, los *MAP4K4^{alta}*, mostraron una actividad alta en la vía de la respiración mitocondrial. Esto podría convertirlo en un objetivo para la aplicación de dianas terapéuticas como el uso de fármacos inhibidores de la fosforilación oxidativa, ya que estos pacientes podrían ser más sensibles a los tratamientos que afecten la función mitocondrial debido a su actividad alta; no obstante, se necesitan más estudios para comprender la relación entre la fosforilación oxidativa y el cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites.

La infiltración de monocitos es particular porque esta célula puede actuar de dos maneras diferentes en el TME: ya sea como una célula antitumoral o protumoral (120). Su presencia en tumores con MSI ya había sido descrita, aunque pocos estudios han investigado esta asociación (84,121). Kim et al. encontraron que en el cáncer gástrico con MSI, los macrófagos M2 eran marcadores que indican buenas tasas de DFS (122). En este estudio, se observa una infiltración de monocitos en *MAP4K4^{alta}*, se necesitan más estudios para determinar su polaridad y efecto en la progresión tumoral.

Los CAFs han sido reconocidos como un elemento significativo dentro del TME debido a sus diversas funciones en la progresión tumoral y en la reducción de las tasas de supervivencia de los pacientes con cáncer gástrico (123,124). Estas células modifican su entorno al secretar proteínas como citocinas y al sobreexpresar genes que promueven un fenotipo infiltrativo, lo que resulta en una peor progresión del cáncer gástrico (125,126). Además, se ha informado que esta capacidad secretora también les permite promover la metástasis (127,128). De hecho, se ha reportado la presencia

CAFs en tumores con MSI (29). Recientemente, Mak et al. reveló una conexión entre una presencia baja de CAFs, el estado de MSI y un mejor pronóstico, mientras que una presencia alta de estos fibroblastos se relaciona con el estado de MSS y un mal pronóstico (83). En la presente investigación, la observación de la infiltración de CAFs en los *MAP4K4*^{alta} parece contradecir la asociación previamente reportada entre la baja presencia de estos fibroblastos en tumores con MSI. Esta discrepancia podría deberse a la expresión alta del gen *MAP4K4* en tumores con MSI y a sus distintos mecanismos moleculares involucrados en la progresión del cáncer gástrico.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- Se evaluaron más de 20 mil perfiles de expresión de genes en el estudio, de los cuales solo 3 perfiles podrían servir como biomarcadores pronóstico clave en cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites.
- Se identificaron 3 genes, *MAP4K4*, *ASXL1*, *MACF1*, cuyos perfiles de expresión estaban significativamente relacionados con la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad; sin embargo, solo se evaluó el gen *MAP4K4*.
- Se demostró que la expresión del gen *MAP4K4* es mayor en el tejido tumoral en comparación con el tejido sano. Asimismo, se destaca que la expresión del gen *MAP4K4* es independiente a los estadios patológicos.
- No se encontró ninguna asociación entre el gen *MAP4K4* y las variables genéticas y clínicas.
- Se encontró a los fibroblastos asociados al cáncer o más conocidos como CAFs como una de las células infiltrantes principales en el tumor de acuerdo al perfil de expresión del gen *MAP4K4*.
- Se demostró una asociación entre el perfil de expresión del gen *MAP4K4* y una mayor actividad en la respiración mitocondrial, sugiriendo una mayor actividad metabólica en el cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites.

5.2 RECOMENDACIONES

- Se recomienda validar los hallazgos en una cohorte prospectiva para confirmar su fiabilidad. Además, considerar la inclusión de datos clínicos relevantes como supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad, tipo de tratamiento y tolerancia al tratamiento para una evaluación más completa.
- Se sugiere realizar análisis experimentales para comprender mejor el papel del gen *MAP4K4* en la progresión del cáncer gástrico con inestabilidad de microsatélites.
- Se recomienda investigar la función del gen *MAP4K4* entre los diversos subtipos moleculares del cáncer gástrico para adaptar estrategias terapéuticas personalizadas y mejorar la eficacia del tratamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
2. Morgan E, Arnold M, Camargo MC, Gini A, Kunzmann AT, Matsuda T, et al. The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020–40: A population-based modelling study. *E Clinical Medicine.* 2022;47.
3. Yang WJ, Zhao HP, Yu Y, Wang JH, Guo L, Liu JY, et al. Updates on global epidemiology, risk and prognostic factors of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2023;29(16):2452–68.
4. Tan Z. Recent Advances in the Surgical Treatment of Advanced Gastric Cancer: A Review. *Int Med J Exp Clin Res.* 2019;25:3537–41.
5. Chandra R, Balachandar N, Wang S, Reznik S, Zeh H, Porembka M. The changing face of gastric cancer: epidemiologic trends and advances in novel therapies. *Cancer Gene Ther.* 2021;28(5):390–9.
6. 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.
7. Zheng H, Takahashi H, Murai Y, Cui Z, Nomoto K, Miwa S, et al. Pathobiological characteristics of intestinal and diffuse-type gastric carcinoma in Japan: an immunostaining study on the tissue microarray. *J Clin Pathol.* 2007;60(3):273–7.
8. Machlowska J, Baj J, Sitarz M, Maciejewski R, Sitarz R. Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11).
9. Liu JY, Peng CW, Yang XJ, Huang CQ, Li Y. The prognosis role of AJCC/UICC 8th edition staging system in gastric cancer, a retrospective analysis. *Am J Transl Res.* 2018;10(1):292–303.
10. Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, Reynolds SM, Miller M, Bernard B, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.*

- 2014;513(7517):202–9.
11. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, Kim KM, Ting JC, Wong SS, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med.* 2015;21(5):449–56.
 12. Sohn BH, Hwang JE, Jang HJ, Lee HS, Oh SC, Shim JJ, et al. Clinical Significance of Four Molecular Subtypes of Gastric Cancer Identified by The Cancer Genome Atlas Project. *Clin Cancer Res.* 2017;23(15):4441–9.
 13. Sameer AS, Nissar S, Fatima K. Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev.* 2014;23(4):246–57.
 14. An JY, Kim H, Cheong JH, Hyung WJ, Kim H, Noh SH. Microsatellite instability in sporadic gastric cancer: its prognostic role and guidance for 5-FU based chemotherapy after R0 resection. *Int J Cancer.* 2012;131(2):505–11.
 15. Shen S, Chen X, Li H, Sun L, Yuan Y. MLH1 Promoter Methylation and Prediction/Prognosis of Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta and Bioinformatic Analysis. *J Cancer.* 2018;9(11):1932–42.
 16. Velho S, Fernandes MS, Leite M, Figueiredo C, Seruca R. Causes and consequences of microsatellite instability in gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 28;20(44).
 17. Ajani JA, Lee J, Sano T, Janjigian YY, Fan D, Song S. Gastric adenocarcinoma. *Nat Rev Dis Primer.* 2017;3(1):1–19.
 18. Pietrantonio F, Miceli R, Raimondi A, Kim YW, Kang WK, Langley RE, et al. Individual Patient Data Meta-Analysis of the Value of Microsatellite Instability As a Biomarker in Gastric Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2019 ;37(35):3392–400.
 19. Guan WL, Ma Y, Cui YH, Liu TS, Zhang YQ, Zhou ZW, et al. The Impact of Mismatch Repair Status on Prognosis of Patients With Gastric Cancer: A Multicenter Analysis. *Front Oncol.* 2021;11:712760.
 20. Li X, Zhang L, Wang C, Huang J, Zhu J, Huang Y, et al. Microsatellite instability in Chinese gastric cancer and its correlation with clinical characteristics. *J Gastrointest Oncol.* 2021;12(6):2719–27.
 21. Ramos MFKP, Pereira MA, de Mello ES, Cirqueira CDS, Zilberstein B, Alves VAF, et al. Gastric cancer molecular classification based on

- immunohistochemistry and in situ hybridization: Analysis in western patients after curative-intent surgery. *World J Clin Oncol*. 2021;12(8):688–701.
22. Zhang T, Yu S, Zhao S. Development and verification of a microsatellite instability-related risk signature for predicting survival and therapy effectiveness in gastric cancer. *J Gastrointest Oncol*. 2022;13(1):84–101.
 23. Prasad V, Kaestner V, Mailankody S. Cancer Drugs Approved Based on Biomarkers and Not Tumor Type—FDA Approval of Pembrolizumab for Mismatch Repair-Deficient Solid Cancers. *JAMA Oncol*. 2018;4(2):157.
 24. Joshi SS, Badgwell BD. Current treatment and recent progress in gastric cancer. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):264–79.
 25. Chao J, Fuchs CS, Shitara K, Tabernero J, Muro K, Van Cutsem E, et al. Assessment of Pembrolizumab Therapy for the Treatment of Microsatellite Instability–High Gastric or Gastroesophageal Junction Cancer Among Patients in the KEYNOTE-059, KEYNOTE-061, and KEYNOTE-062 Clinical Trials. *JAMA Oncol*. 2021;7(6):895–902.
 26. Polom K, Marano L, Marrelli D, De Luca R, Roviello G, Savelli V, et al. Meta-analysis of microsatellite instability in relation to clinicopathological characteristics and overall survival in gastric cancer. *Br J Surg*. 2018;105(3):159–67.
 27. Tian R, Hu J, Ma X, Liang L, Guo S. Immune-related gene signature predicts overall survival of gastric cancer patients with varying microsatellite instability status. *Aging*. 2020;13(2):2418–35.
 28. Yang Y, Shi Z, Bai R, Hu W. Heterogeneity of MSI-H gastric cancer identifies a subtype with worse survival. *J Med Genet*. 2021;58(1):12–9.
 29. Zhang M, Cao C, Li X, Gu Q, Xu Y, Zhu Z, et al. Five EMT-related genes signature predicts overall survival and immune environment in microsatellite instability-high gastric cancer. *Cancer Med*. 2023;12(2):2075–88.
 30. Tao Z, Shi A, Li R, Wang Y, Wang X, Zhao J. Microarray bioinformatics in cancer- a review. *J Buon*. 2017;22(4):838–43.
 31. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009;10(1):57–63.
 32. Qian Y, Daza J, Itzel T, Betge J, Zhan T, Marmé F, et al. Prognostic Cancer Gene

- Expression Signatures: Current Status and Challenges. *Cells*. 2021;10(3):648.
33. Zhang J, Cai X, Cui W, Wei Z. Bioinformatics and Experimental Analyses Reveal MAP4K4 as a Potential Marker for Gastric Cancer. *Genes*. 2022;13(10):1786.
34. Brown JS, Amend SR, Austin RH, Gatenby RA, Hammarlund EU, Pienta KJ. Updating the Definition of Cancer. *Mol Cancer Res*. 2023;21(11):1142–7.
35. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31–46.
36. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
37. Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, van Grieken NC, Lordick F. Gastric cancer. *Lancet Lond Engl*. 2020;396(10251):635–48.
38. Guan WL, He Y, Xu RH. Gastric cancer treatment: recent progress and future perspectives. *J Hematol Oncol*. 2023;16(1):57.
39. Pariente A. Tumores del estómago. *Tratado Med*. 1999 ;1–3:1–3.
40. Correa P. Gastric Cancer: Overview. *Gastroenterol Clin*. 2013;42(2):211–7.
41. Juárez-Salcedo LM, Sokol L, Chavez JC, Dalia S. Primary Gastric Lymphoma, Epidemiology, Clinical Diagnosis, and Treatment. *Cancer Control J*. 2018;25(1):1073274818778256.
42. Sbaraglia M, Businello G, Bellan E, Fassan M, Dei Tos AP. Mesenchymal tumours of the gastrointestinal tract. *Pathologica*. 2021;113(3):230–51.
43. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020;76(2):182–8.
44. Baccili T, Farooq AR, Wang X, Elimova E. Gastric Cancer: Molecular Mechanisms, Novel Targets, and Immunotherapies: From Bench to Clinical Therapeutics. *Cancers*. 2023;15(20):5075.
45. Oya Y, Hayakawa Y, Koike K. Tumor microenvironment in gastric cancers. *Cancer Sci*. 2020 Aug;111(8):2696–707.
46. Yang Y, Meng WJ, Wang ZQ. Cancer Stem Cells and the Tumor Microenvironment in Gastric Cancer. *Front Oncol*. 2021;11.
47. Nurmik M, Ullmann P, Rodriguez F, Haan S, Letellier E. In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. *Int J Cancer*. 2020;146(4):895–

- 905.
48. De P, Aske J, Dey N. Cancer-Associated Fibroblast Functions as a Road-Block in Cancer Therapy. *Cancers*. 2021;13(20).
 49. Kobayashi H, Enomoto A, Woods SL, Burt AD, Takahashi M, Worthley DL. Cancer-associated fibroblasts in gastrointestinal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(5):282–95.
 50. Huang X, Li Y, Fu M, Xin HB. Polarizing Macrophages In Vitro. *Methods Mol Biol*. 2018;1784:119–26.
 51. Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci*. 2014;105(1):1–8.
 52. Wang XL, Jiang JT, Wu CP. Prognostic significance of tumor-associated macrophage infiltration in gastric cancer: a meta-analysis. *Genet Mol Res GMR*. 2016;15(4).
 53. Feng Y, Ye Z, Song F, He Y, Liu J. The Role of TAMs in Tumor Microenvironment and New Research Progress. *Stem Cells Int*. 2022.
 54. Gunaydin G. CAFs Interacting With TAMs in Tumor Microenvironment to Enhance Tumorigenesis and Immune Evasion. *Front Oncol*. 2021;11.
 55. Reyes VE. Helicobacter pylori and Its Role in Gastric Cancer. *Microorganisms*. 2023;11(5):1312.
 56. Guo Y, Cao XS, Zhou MG, Yu B. Gastric microbiota in gastric cancer: Different roles of Helicobacter pylori and other microbes. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12.
 57. Salvatori S, Marafini I, Laudisi F, Monteleone G, Stolfi C. Helicobacter pylori and Gastric Cancer: Pathogenetic Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3).
 58. Dincă AL, Meliț LE, Mărginean CO. Old and New Aspects of H. pylori-Associated Inflammation and Gastric Cancer. *Child Basel Switz*. 2022 Jul 20;9(7).
 59. Mukkamalla SKR, Recio-Boiles A, Babiker HM. Gastric Cancer. *Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*; 2023.
 60. Richa, Sharma N, Sageena G. Dietary factors associated with gastric cancer - a review. *Transl Med Commun*. 2022;7(1):7.
 61. Zali H, Rezaei-Tavirani M, Azodi M. Gastric cancer: prevention, risk factors and treatment. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2011;4(4):175–85.

62. Li K, Luo H, Huang L, Luo H, Zhu X. Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer Cell Int.* 2020; 20:16.
63. Vieira MLC, Santini L, Diniz AL, Munhoz C de F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet Mol Biol.* 2016;39(3):312–28.
64. Yamamoto H, Imai K. Microsatellite instability: an update. *Arch Toxicol.* 2015;89(6):899–921.
65. Negrete-Tobar G, González-Motta A, Messa-Botero OA, Galvis JC, Garcíandía Rozo I, Álvarez Martínez JS, et al. Inestabilidad microsatelital y cáncer gástrico. *Rev Colomb Cir.* 2021;36(1):120–31.
66. Yuza K, Nagahashi M, Watanabe S, Takabe K, Wakai T. Hypermutation and microsatellite instability in gastrointestinal cancers. *Oncotarget.* 2017;8(67):112103–15.
67. Ratti M, Lampis A, Hahne JC, Passalacqua R, Valeri N. Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(22):4151–62.
68. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, Singh N, Nottegar A, Bosse T, et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *J Eur Soc Med Oncol.* 2019;30(8):1232–43.
69. Malapelle U, Parente P, Pepe F, De Luca C, Pisapia P, Sgariglia R, et al. Evaluation of Microsatellite Instability and Mismatch Repair Status in Different Solid Tumors: A Multicenter Analysis in a Real World Setting. *Cells.* 2021;10(8):1878.
70. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998;58(22):5248–57.
71. Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology.* 2002;123(6):1804–11.
72. Bacher JW, Flanagan LA, Smalley RL, Nassif NA, Burgart LJ, Halberg RB, et al.

- Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors. *Dis Markers*. 2004;20(4-5):237-50.
73. Smyth EC, Wotherspoon A, Peckitt C, Gonzalez D, Hulkki-Wilson S, Eltahir Z, et al. Mismatch Repair Deficiency, Microsatellite Instability, and Survival: An Exploratory Analysis of the Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy (MAGIC) Trial. *JAMA Oncol*. 2017;3(9):1197-203.
74. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993;260(5109):812-6.
75. Strickler JG, Zheng J, Shu Q, Burgart LJ, Alberts SR, Shibata D. p53 mutations and microsatellite instability in sporadic gastric cancer: when guardians fail. *Cancer Res*. 1994 Sep 1;54(17):4750-5.
76. Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Watson P, Lynch HT, Boyd J. Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. *Cancer Res*. 1993;53(21):5100-3.
77. do Nascimento CN, Mascarenhas-Lemos L, Silva JR, Marques DS, Gouveia CF, Faria A, et al. EBV and MSI Status in Gastric Cancer: Does It Matter? *Cancers*. 2022;15(1):74.
78. Quaas A, Biesma HD, Wagner AD, Verheij M, van Berge Henegouwen MI, Schoemig-Markiefka B, et al. Microsatellite instability and sex differences in resectable gastric cancer - A pooled analysis of three European cohorts. *Eur J Cancer*. 2022; 173:95-104.
79. Jahng J, Youn YH, Kim KH, Yu J, Lee YC, Hyung WJ, et al. Endoscopic and clinicopathologic characteristics of early gastric cancer with high microsatellite instability. *World J Gastroenterol*. 2012;18(27):3571-7.
80. Lorenzi M, Amonkar M, Zhang J, Mehta S, Liaw KL. Epidemiology of Microsatellite Instability High (MSI-H) and Deficient Mismatch Repair (dMMR) in Solid Tumors: A Structured Literature Review. *J Oncol*. 2020.
81. Puliga E, Corso S, Pietrantonio F, Giordano S. Microsatellite instability in Gastric Cancer: Between lights and shadows. *Cancer Treat Rev*. 2021;95.
82. Choi YY, Kim H, Shin SJ, Kim HY, Lee J, Yang HK, et al. Microsatellite Instability and Programmed Cell Death-Ligand 1 Expression in Stage II/III Gastric

- Cancer: Post Hoc Analysis of the CLASSIC Randomized Controlled study. *Ann Surg.* 2019;270(2):309–16.
83. Mak TK, Li X, Huang H, Wu K, Huang Z, He Y, et al. The cancer-associated fibroblast-related signature predicts prognosis and indicates immune microenvironment infiltration in gastric cancer. *Front Immunol.* 2022;13.
84. Huang YK, Wang M, Sun Y, Di Costanzo N, Mitchell C, Achuthan A, et al. Macrophage spatial heterogeneity in gastric cancer defined by multiplex immunohistochemistry. *Nat Commun.* 2019;10(1):3928.
85. Velásquez Sotomayor MB, Campos Segura AV, Asurza Montalva RJ, Marín-Sánchez O, Murillo Carrasco AG, Ortiz Rojas CA. Establishment of a 7-gene expression panel to improve the prognosis classification of gastric cancer patients. *Front Genet.* 2023;14.
86. Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol.* 2010;11(2): R14.
87. Nota B. Gogadget: An R Package for Interpretation and Visualization of GO Enrichment Results. *Mol Inform.* 2017;36(5–6).
88. Newman AM, Liu CL, Green MR, Gentles AJ, Feng W, Xu Y, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods.* 2015;12(5):453–7.
89. Racle J, Gfeller D. EPIC: A Tool to Estimate the Proportions of Different Cell Types from Bulk Gene Expression Data. *Methods Mol Biol.* 2020; 2120:233–48.
90. Aran D, Hu Z, Butte AJ. xCell: digitally portraying the tissue cellular heterogeneity landscape. *Genome Biol.* 2017;18(1):220.
91. Becht E, Giraldo NA, Lacroix L, Buttard B, Elarouci N, Petitprez F, et al. Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression. *Genome Biol.* 2016;17(1):218.
92. Finotello F, Mayer C, Plattner C, Laschober G, Rieder D, Hackl H, et al. Molecular and pharmacological modulators of the tumor immune contexture revealed by deconvolution of RNA-seq data. *Genome Med.* 2019;11(1):34.
93. Li T, Fan J, Wang B, Traugh N, Chen Q, Liu JS, et al. TIMER: A Web Server for Comprehensive Analysis of Tumor-Infiltrating Immune Cells. *Cancer Res.* 2017;77(21):e108–10.

94. Garcia-Garcia S, Rodrigo-Faus M, Fonseca N, Manzano S, Györfly B, Ocaña A, et al. HGK promotes metastatic dissemination in prostate cancer. *Sci Rep.* 2021;11(1):12287.
95. Chen H, Kong Y, Yao Q, Zhang X, Fu Y, Li J, et al. Three hypomethylated genes were associated with poor overall survival in pancreatic cancer patients. *Aging.* 2019;11(3):885–97.
96. Min L, He B, Hui L. Mitogen-activated protein kinases in hepatocellular carcinoma development. *Semin Cancer Biol.* 2011;21(1):10–20.
97. Bai Z, Yao Q, Sun Z, Xu F, Zhou J. Prognostic Value of mRNA Expression of MAP4K Family in Acute Myeloid Leukemia. *Technol Cancer Res Treat.* 2019;18.
98. Hao JM, Chen JZ, Sui HM, Si-Ma XQ, Li GQ, Liu C, et al. A five-gene signature as a potential predictor of metastasis and survival in colorectal cancer. *J Pathol.* 2010;220(4):475–89.
99. Liang JJ, Wang H, Rashid A, Tan TH, Hwang RF, Hamilton SR, et al. Expression of MAP4K4 is associated with worse prognosis in patients with stage II pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008;14(21):7043–9.
100. Qiu MH, Qian YM, Zhao XL, Wang SM, Feng XJ, Chen XF, et al. Expression and prognostic significance of MAP4K4 in lung adenocarcinoma. *Pathol Res Pract.* 2012;208(9):541–8.
101. Delpire E. The mammalian family of sterile 20p-like protein kinases. *Pflugers Arch.* 2009;458(5):953–67.
102. Singh SK, Kumar S, Viswakarma N, Principe DR, Das S, Sondarva G, et al. MAP4K4 promotes pancreatic tumorigenesis via phosphorylation and activation of mixed lineage kinase 3. *Oncogene.* 2021;40(43):6153–65.
103. Prolo LM, Li A, Owen SF, Parker JJ, Foshay K, Nitta RT, et al. Targeted genomic CRISPR-Cas9 screen identifies MAP4K4 as essential for glioblastoma invasion. *Sci Rep.* 2019;9(1):14020.
104. Gao X, Gao C, Liu G, Hu J. MAP4K4: an emerging therapeutic target in cancer. *Cell Biosci.* 2016;6:56.
105. Gao X, Chen G, Gao C, Zhang DH, Kuan S, Stabile LP, et al. MAP4K4 is a novel MAPK/ERK pathway regulator required for lung adenocarcinoma maintenance. *Mol Oncol.* 2017;11(6):628–39.

106. Fiedler LR, Chapman K, Xie M, Maifoshie E, Jenkins M, Golfroush PA, et al. MAP4K4 Inhibition Promotes Survival of Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes and Reduces Infarct Size In Vivo. *Cell Stem Cell*. 2019;24(4):579-591.e12.
107. Wang B, Shen Z long, Gao Z dong, Zhao G, Wang C you, Yang Y, et al. MiR-194, commonly repressed in colorectal cancer, suppresses tumor growth by regulating the MAP4K4/c-Jun/MDM2 signaling pathway. *Cell Cycle*. 2015;14(7):1046–58.
108. Song WH, Feng XJ, Gong SJ, Chen JM, Wang SM, Xing DJ, et al. microRNA-622 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther*. 2015;16(12):1754–63.
109. Liu AW, Cai J, Zhao XL, Jiang TH, He TF, Fu HQ, et al. ShRNA-targeted MAP4K4 inhibits hepatocellular carcinoma growth. *Clin Cancer Res*. 2011;17(4):710–20.
110. Tong Z, Guo-Xin L, Jian Z, De-Fang Z. The expression level of gene MAP4K4 and its clinical effect in cancerous tissue of gastric carcinoma. *Biomed Res*. 2017;28(7):2920–5.
111. Liu YF, Qu GQ, Lu YM, Kong WM, Liu Y, Chen WX, et al. Silencing of MAP4K4 by short hairpin RNA suppresses proliferation, induces G1 cell cycle arrest and induces apoptosis in gastric cancer cells. *Mol Med Rep*. 2016;13(1):41–8.
112. Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett*. 2015;356(2 Pt A):156–64.
113. Ashton TM, McKenna WG, Kunz-Schughart LA, Higgins GS. Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*. 2018;24(11):2482–90.
114. Sancho P, Barneda D, Heeschen C. Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br J Cancer*. 2016;114(12):1305–12.
115. Janku F, Beom SH, Moon YW, Kim TW, Shin YG, Yim DS, et al. First-in-human study of IM156, a novel potent biguanide oxidative phosphorylation (OXPHOS) inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*.

- 2022;40(5):1001–10.
116. Sotgia F, Lisanti MP. Mitochondrial biomarkers predict tumor progression and poor overall survival in gastric cancers: Companion diagnostics for personalized medicine. *Oncotarget*. 2017;8(40):67117–28.
 117. Feichtinger RG, Neureiter D, Skaria T, Wessler S, Cover TL, Mayr JA, et al. Oxidative Phosphorylation System in Gastric Carcinomas and Gastritis. *Oxid Med Cell Longev*. 2017.
 118. Pramod S, Magesh S, Parvathi VD. Mitochondrial Genetics in Gastric Cancer. *Middle East J Cancer*. 2022;13(1):25–33.
 119. Cai L, Sun Y, Wang K, Guan W, Yue J, Li J, et al. The Better Survival of MSI Subtype Is Associated With the Oxidative Stress Related Pathways in Gastric Cancer. *Front Oncol*. 2020; 10:1269.
 120. Olingy CE, Dinh HQ, Hedrick CC. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J Leukoc Biol*. 2019;106(2):309–22.
 121. Bauer K, Michel S, Reuschenbach M, Nelius N, von Knebel Doeberitz M, Kloor M. Dendritic cell and macrophage infiltration in microsatellite-unstable and microsatellite-stable colorectal cancer. *Fam Cancer*. 2011;10(3):557–65.
 122. Kim KJ, Wen XY, Yang HK, Kim WH, Kang GH. Prognostic Implication of M2 Macrophages Are Determined by the Proportional Balance of Tumor Associated Macrophages and Tumor Infiltrating Lymphocytes in Microsatellite-Unstable Gastric Carcinoma. *Plos One*. 2015;10(12).
 123. Li X, Sun Z, Peng G, Xiao Y, Guo J, Wu B, et al. Single-cell RNA sequencing reveals a pro-invasive cancer-associated fibroblast subgroup associated with poor clinical outcomes in patients with gastric cancer. *Theranostics*. 2022;12(2):620–38.
 124. Zhang C, Sun D, Li C, Liu Y, Zhou Y, Zhang J. Development of cancer-associated fibroblasts subtype and prognostic model in gastric cancer and the landscape of tumor microenvironment. *Int J Biochem Cell Biol*. 2022;152.
 125. Hong Z, Xie W, Zhuo H, Wei X, Wang K, Cheng J, et al. Crosstalk between Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts Mediated by TGF- β 1–IGFBP7 Signaling Promotes the Progression of Infiltrative Gastric Cancer. *Cancers*. 2023;15(15).

126. Zhou Z, Guo S, Lai S, Wang T, Du Y, Deng J, et al. Integrated single-cell and bulk RNA sequencing analysis identifies a cancer-associated fibroblast-related gene signature for predicting survival and therapy in gastric cancer. *BMC Cancer*. 2023;23(1):108.
127. Lu G, Du R, Dong J, Sun Y, Zhou F, Feng F, et al. Cancer associated fibroblast derived SLIT2 drives gastric cancer cell metastasis by activating NEK9. *Cell Death Dis*. 2023;14(7).
128. Yin Y, Liu Y, Wang Y, Li J, Liang S, Zhang W, et al. DZIP1 expressed in fibroblasts and tumor cells may affect immunosuppression and metastatic potential in gastric cancer. *Int Immunopharmacol*. 2023;117.

ANEXOS

ANEXO N° 1: Diagrama de flujo de la estrategia utilizada para identificar genes asociados con el pronóstico.

