

UCH-FC
MAG-B
K.896
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
ESCUELA DE POSTGRADO

“Estudio del efecto de MICA expresado por células de cáncer gástrico en la activación de funciones efectoras de células NK”

Tesis entregada a la Universidad De Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Grado de:

Magíster en Ciencias Biológicas

Karina Loreto Kramm Vergara

Directora de Tesis
Dra. María Carmen Molina

Co-Directora de Seminario de Título
Dra. Carolina H. Ribeiro

Diciembre, 2014
Santiago-Chile

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata

KARINA LORETO KRAMM VERGARA

“Estudio del efecto de MICA expresado por células de cáncer gástrico en la activación de funciones efectoras de células NK”

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas , en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día jueves 27 de noviembre de 2014.

Dra. María Carmen Molina
Directora de Tesis

Carolina Hager Ribeiro
Co-Directora de Tesis



Two handwritten signatures in blue ink, one above the other, each followed by a horizontal line.

Comisión de Evaluación

Dra. María Rosa Bono
Presidenta

Dr. Tulio Núñez



A circular stamp with the text "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL", and "U. DE CHILE" around the perimeter. Below the stamp are two handwritten signatures in blue ink, each followed by a horizontal line.

A mi Familia , Edelcita y Suri

AGRADECIMIENTOS

- Primero quisiera agradecer a mi papá y mamá por su apoyo, preocupación, paciencia y por regalarme al máximo cada vez que voy a Chillán a visitarlos.

A mi hermana por la compañía, paciencia y buenos momentos durante toda mi vida y estos años universitarios.

Agradezco también a la Dra. María Carmen Molina, directora de este seminario de título, por recibirme en su laboratorio y brindarme su apoyo y guía en el transcurso de este trabajo.

A la Dra. Carolina H. Ribeiro, co-directora del seminario, por su ayuda, consejos y sus grandes aportes a la tesis.

A mis compañeros del laboratorio: Maca, Caro, Bastián, Vale, Lorenzo, Agnes, Marce, Daniel, Felipe, Gabriel por su compañía, buena onda y ayuda dentro y fuera del laboratorio.

Al IBT, LIAM por su buena disposición y prestarme muchas veces los equipos.

Al programa de Inmunología en general por hacer que el transcurso de el tiempo desarrollando mi tesis sea mucho mas ameno.

A mis compañeros de la Universidad por su amistad y hacer estos años en Santiago entretenidos y llevaderos, principalmente a la Pame, Manu, Amparo, Nicole, Caro P., Diego, Caro O., Nacho, Pablo y Leo.

A mis amigas del colegio por apoyarme cuando lo necesite: Maca, Carola, Joce, Camila S., Espe, Marietta, Paula, Negra, Camila J., Ana Luisa, Cote y Marcela.

A mi tía Adriana, Betty y tío David por acogernos en Santiago y ser siempre tan cariñosos.

A la Edel y a la Surita por hacerme siempre compañía.

A todos ustedes, muchas gracias!

FINANCIAMIENTO

Fondecyt Regular 1130330

Fondecyt de Iniciación 11110456

Beca CONICYT para Estudios de Magíster en Chile, 2011.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cáncer gástrico.....	1
1.2. Sistema Inmune y células NK.....	3
1.3. Activación de las células NK.....	5
1.4. Receptor NKG2D.....	5
1.5. Ligandos del receptor NKG2D.....	7
1.6. Expresión de NKG2DLs.....	8
1.7. Evasión del sistema inmune.....	10
1.8. Hipótesis.....	15
1.9. Objetivos.....	15
1.10. Objetivo general.....	15
1.11. Objetivos específicos.....	15
2. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1. Pacientes.....	16
2.2. Sangre periférica.....	18
2.3. Líneas celulares.....	18
2.4. Detección de MICA y MICB soluble en suero de pacientes.....	18
2.5. Preparación de suspensiones celulares desde el tejido tumoral y de mucosa gástrica.....	19
2.6. Detección de MICA en células derivadas de tejidos tumorales.....	20
2.7. Análisis de la expresión del receptor NKG2D en células NK infiltrantes por citometría de flujo.....	21
2.8. Aislamiento de PBMC.....	22
2.9. Análisis de la expresión del receptor NKG2D en células NK y linfocitos T CD8 ⁺ de sangre periférica por citometría de flujo.....	23

2.10. Análisis de las funciones efectoras de células NK de sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico	23
2.11. Efecto de sueros de pacientes con CG sobre la expresión del receptor NKG2D.....	25
2.12. Modulación de la expresión del receptor NKG2D por el sobrenadante de cultivo de tumores de pacientes con CG	26
2.13. Correlación entre los niveles de expresión de MICA con parámetros clínico-patológicos de la enfermedad	26
2.14. Análisis estadístico	27
3. RESULTADOS	29
3.1. Niveles de MICA en superficie de células derivadas del tumor primario de pacientes con cáncer gástrico	29
3.2. Niveles del receptor NKG2D en superficie de células NK infiltrantes del tumor y mucosa	34
3.3. Niveles del receptor NKG2D en superficie de células NK de sangre periférica en pacientes con CG.....	36
3.4. Niveles de sMICA sérico en pacientes con CG	41
3.5. Expresión de CD107a y producción de IFN- γ por células NK en pacientes con CG	42
3.6. Efecto del suero de pacientes con CG sobre la expresión de NKG2D en células NK normales	45
3.7. Efecto del sobrenadante de cultivo de tejido tumoral de CG sobre la expresión de NKG2D en células NK normales	48
3.8. Correlación de los niveles en superficie del receptor NKG2D, MICA y sMICA con los parámetros clínico-patológicos de la enfermedad	52
4. DISCUSIÓN	58
4.1. Expresión de MICA en células derivadas del tumor de pacientes con CG... 58	
4.2. Expresión de NKG2D en células NK y linfocitos T CD8 ⁺ en CG.....	62
4.3. Expresión de sMICA y del receptor NKG2D y su correlación con parámetros clínico-patológicos en cáncer gástrico.....	70
5. RESUMEN Y CONCLUSIONES	75
6. ANEXOS	77
7. BIBLIOGRAFÍA	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características clínico-patológicas de los pacientes con cáncer gástrico....	17
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo de señalización del receptor NKG2D.....	7
Figura 2. Ilustración representativa de los NKG2DL humanos en comparación con la molécula MCH de clase I.....	9
Figura 3. Estrategia de análisis para las células tumorales.....	31
Figura 4. El tejido tumoral presenta un mayor porcentaje de células CD45 ⁺ EpCAM ⁺ ..	32
Figura 5. Niveles de MICA en superficie de células tumorales y de mucosa gástrica de pacientes con CG.....	34
Figura 6. Los niveles del receptor NKG2D están reducidos en células NK infiltrantes de tumores de pacientes con CG.....	36
Figura 7. Niveles del receptor NKG2D en superficie de células NK y T CD8 ⁺ circulantes en pacientes con CG.	39
Figura 8. Niveles del receptor NKG2D en superficie de células NK y linfocitos T CD8 ⁺ infiltrantes del tumor.....	39
Figura 9. Correlación entre los niveles de MICA en superficie de células tumorales de pacientes con cáncer gástrico y expresión de NKG2D en células NK.	40
Figura 10. Niveles séricos elevados de sMICA en pacientes con cáncer gástrico.	41
Figura 11. Asociación entre los niveles séricos de sMICA séricos en pacientes con cáncer gástrico y los niveles del receptor NKG2D en superficie de células citotóxicas.....	42
Figura 12. La línea celular de adenocarcinoma MKN45 posee mayores niveles de MICA y MHC-I que células K562.....	43
Figura 13. Niveles de CD107a y producción de IFN- γ por células NK circulantes en pacientes con CG.	44
Figura 14. El suero de algunos de pacientes con CG disminuye los niveles de NKG2D en superficie de células NK.....	47
Figura 15. El sobrenadante de cultivo de tumor gástrico presenta tanto sMICA como sMICB.....	49
Figura 16. Efecto del sobrenadante de cultivo de un tumor MICA ⁺ sobre los niveles de NKG2D en células NK.	51

Figura 17. Presencia de sMICB en el suero de pacientes con cáncer gástrico.....	51
Figura 18. Correlación entre los parámetros clínico-patológicos de pacientes con CG y los niveles de NKG2D en superficie en células NK.....	53
Figura 19. Correlación entre los parámetros clínico-patológicos de pacientes con cáncer gástrico y los niveles séricos de sMICA.....	54
Figura 20. Correlación entre los parámetros clínico-patológicos de pacientes con cáncer gástrico y los niveles de MICA en CG	55
Figura 21. Pronóstico post operatorio de pacientes con CG de acuerdo a los niveles de NKG2D, MICA y sMICA.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMo	Anticuerpo monoclonal
Akt	Proteína quinasa B
APC	Aloficocianina
CG	Cáncer gástrico
DAP10	Proteína de activación de DNAX de 10 kDa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERK	Quinasa reguladas por señales extracelulares
Fas	Receptor 6 de la superfamilia TNF
FITC	Isocianato de Fluoresceína
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocito-macrófago
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
Grb2	Proteína 2 de unión al receptor del factor de crecimiento
h	Hora
HBSS	Solución salina equilibrada de Hanks
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
ITAMs	Motivos de activación en inmuno receptores basados en tirosina
kDa	Kilodalton
MEK	MAPK/ERK quinasa
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
MICA/B	Proteína relacionada con la cadena A/B de la molécula de clase I del MHC
min	Minutos
mRNA	RNA mensajero
NK	Natural Killer

NKG2D	Receptor de activación de células NK, grupo 2, miembro D
NKG2DL	Ligando de NKG2D
NKT	Natural Killer T
p85	Subunidad reguladora p85 de la PI3K
PBS	Tampón fosfato salino
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PE	Ficoeritrina
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
Rac	Proteína G monomérica de la familia Rho
rMICA	MICA recombinante
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	PCR de transcripción reversa
s	Segundos
SFB	Suero Fetal Bovino
sMICA	MICA soluble
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF
ULBP	Proteínas de unión a UL16

RESUMEN

El cáncer gástrico (CG) es la segunda causa de muerte más común por cáncer en todo el mundo. Las células natural killer (NK) desempeñan un papel importante en la defensa inmune del huésped contra las células transformadas. Las células NK expresan el receptor activador NKG2D, cuyos ligandos (NKG2DL), expresados en la superficie de las células blanco, pertenecen a las familias MIC (MICA y MICB) y ULBP/RAET (ULBP-1-6). Aunque está bien establecido que estos ligandos son generalmente sobreexpresados en las células tumorales, los tumores son capaces de crecer en huéspedes inmunocompetentes debido a mecanismos de escape del tumor a la inmunovigilancia mediada por el receptor NKG2D. Por ejemplo, el corte proteolítico de MICA a partir de células tumorales constituye una estrategia de escape inmune que disminuye la reactividad antitumoral de los linfocitos citotóxicos que expresan el receptor NKG2D. En consecuencia, los niveles séricos de MICA soluble con frecuencia se encuentran elevados en pacientes con cáncer. El objetivo de este trabajo fue analizar los niveles de MICA (de superficie celular y soluble) y del receptor NKG2D en superficie de células NK de pacientes con CG, y determinar una asociación entre los niveles de NKG2D y los niveles en superficie celular y séricos de MICA soluble. Para esto, se reclutaron trece pacientes diagnosticados con cáncer gástrico del Departamento de Cirugía Digestiva del Hospital del Salvador. En este estudio, tanto los niveles de MICA en superficie de células derivadas del tumor primario y de la mucosa circundante del estómago como los niveles del receptor NKG2D en superficie de células NK de sangre periférica e infiltrantes de tumor se evaluaron por citometría de flujo. Los niveles séricos de MICA soluble (sMICA) se determinaron por ELISA.

Además, se analizó la correlación de estos resultados con los parámetros clínico-patológicos de los pacientes. Se observó que, en pacientes con CG, las células tumorales y de la mucosa gástrica presentan MICA en la superficie celular. Por otro lado, los pacientes con CG poseen niveles séricos significativamente mayores de sMICA que controles sanos. Interesantemente, los niveles de NKG2D en superficie fueron significativamente menores en células NK infiltrantes del tumor y periféricas de pacientes con CG en comparación con las células NK infiltrantes de mucosa gástrica y periféricas de controles sanos, respectivamente. Por otro lado, los niveles de NKG2D en superficie de células NK se correlacionaron negativamente con los niveles de MICA en la superficie de las células tumorales, pero no con los niveles séricos de sMICA en pacientes con CG. Además,, sueros positivos para sMICA, de pacientes con CG, regularon negativamente los niveles del receptor NKG2D en la superficie de células NK de controles sanos, pero este efecto no fue inhibido al pre-tratar el suero de paciente con un anticuerpo monoclonal anti-MICA. Cuando se correlacionaron los niveles de NKG2D con los parámetros clínico-patológicos relevantes de los pacientes con GC, se observó que los niveles de este receptor en superficie de células NK periféricas de pacientes fueron significativamente menores en tumores con mayor extensión tumoral (T3/T4) y estadios más tardíos (III,IV) en comparación a tumores con una menor extensión tumoral (T1/T2) y estadios más tempranos (I,II). Por otra parte, se observó que los niveles de NKG2D fueron significativamente menores en pacientes con tumores no diferenciados en comparación con tumores bien diferenciados. Sin embargo, no se encontró una asociación entre los niveles séricos de sMICA y datos clínico-patológicos de la enfermedad. Nuestros resultados indican que la disminución en los niveles del receptor NKG2D en superficie de las células NK y la expresión de MICA en la superficie de las células tumorales se correlacionan con la severidad de la

enfermedad. Por otro lado, nuestros datos sugieren que sMICA no es responsable de la disminución de los niveles del receptor NKG2D en la superficie de células citotóxicas, por lo que otros factores solubles u otros ligandos de NKG2D podrían contribuir a la evasión de la respuesta inmune por el cáncer gástrico. Por lo tanto, este estudio propone que una deficiencia en la inmunovigilancia mediada por el receptor NKG2D presente en células inmunes citotóxicas, contribuye a la progresión del cáncer gástrico.

ABSTRACT

Gastric cancer (GC) is the second most common cause of cancer death worldwide. Natural killer (NK) cells play an important role in the immune defense of the host against transformed cells. NK cells express the activating receptor NKG2D, whose ligands (NKG2DL), expressed on the surface of target cells, belong to the MIC (MICA and MICB) and ULBP/RAET (ULBP-1-6) families. Although it is well established that these ligands are generally overexpressed in tumor cells, tumors can grow in immunocompetent hosts due to mechanisms of tumor escape from NKG2D-mediated immunosurveillance. For instance, proteolytic shedding of MICA from cancer cells represents an immune escape strategy that diminishes the antitumor reactivity mediated by NKG2D-bearing cytotoxic lymphocytes. As a consequence, serum levels of soluble MICA are frequently elevated in cancer patients. The aim of this study was to analyze the expression of both, soluble and cell-associated MICA and NKG2D receptor expression in GC patients, and determine an association between the expression levels of NKG2D on NK cells and cell surface and soluble serum levels of MICA. For this purpose, we enrolled thirteen gastric cancer patients from the Departamento de Cirugía Digestiva, Hospital del Salvador. In this study, cell surface levels of MICA in cells derived from the primary tumor and the surrounding mucosa of the stomach, as well as cell surface levels of NKG2D receptor on tumor infiltrating and peripheral NK cells were evaluated by flow cytometry. Serum levels of soluble MICA (sMICA) were determined by ELISA. In addition, we analyzed the correlation of these results with clinicopathological parameters of the disease. We observed that, in GC patients, cells derived from the primary tumor and gastric mucosa present MICA on the cell surface .

Furthermore, GC patients have significantly higher serum levels of sMICA than healthy controls. Interestingly, NKG2D receptor surface levels were significantly lower in peripheral and tumor-infiltrating NK cells from GC patients as compared to NK cells infiltrating patient gastric mucosa and peripheral NK cells from healthy controls, respectively. Furthermore NKG2D levels on the surface of NK cells were negatively correlated with MICA surface expression levels on tumor cells but not with sMICA serum levels in patients with CG. However, cell surface levels of NKG2D receptor did not correlate with sMICA levels in patients with CG, although sera from GC patients that were positive for sMICA downregulated NKG2D receptor on the surface of NK cells from healthy controls, but this effect was not inhibited with pretreatment of patient serum with a monoclonal antibody against MICA. When these results were correlated with relevant clinicopathological parameters of the disease, we observed that the NKG2D receptor surface levels on peripheral NK cells were significantly lower in tumors with higher extension (T3/T4) and advanced stages (III, IV) than in tumors with lower extension (T1/T2) and earlier stages (I, II). Moreover, cell surface levels of NKG2D receptor were significantly lower in patients with non-differentiated tumors compared to well-differentiated tumors. However, a significant association between serum levels of sMICA and clinicopathological data of the disease has not been found. Our results indicate that the decrease in the levels of NKG2D receptor on NK cells and cell surface expression of MICA on tumor cells correlate with disease severity. However, the results presented here indicate that soluble MICA might not be uniquely responsible for the decrease in NKG2D receptor levels, suggesting that other soluble factors or other NKG2D ligands may contribute to tumor immune evasion. Therefore, this study suggests that a deficiency in the NKG2D-mediated immune surveillance may contribute to the progression of gastric cancer.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer gástrico

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en el mundo (Globocam, 2008). En Chile, esta enfermedad corresponde a la segunda causa principal de muerte según el MINSAL (Minsal, 2010). El cáncer gástrico (CG) es el cuarto cáncer más común en el mundo y la segunda causa de muerte relacionada con el cáncer, con 989,600 casos nuevos y 738,000 muertes por año, abarcando cerca de un 8% de todos los nuevos casos de cáncer y un 10% del total de las muertes debido a esta enfermedad (Jemal y col, 2011). Su incidencia varía de un país a otro, y Chile está dentro de los países con las tasas más altas, junto a Japón, Costa Rica y Singapur (Lee y col, 2006). En Chile, el CG representa la primera causa de muerte por tumores malignos para ambos sexos, y fallecen al año, por esta causa, alrededor de 3.000 personas (Minsal, 2010). La probabilidad media de que un chileno muera por CG es cerca de un 3% (Medina & Kaempffer, 2001).

El pronóstico del CG se relaciona directamente con el estadio de la neoplasia al momento de la confirmación diagnóstica. Los estadios tempranos de la enfermedad con frecuencia son asintomáticos o se presentan síntomas no específicos, los cuales la mayoría están asociados también con otras condiciones gástricas. Como consecuencia, el diagnóstico inicial frecuentemente es tardío, y los pacientes se presentan en un estadio avanzado de la enfermedad, por lo que el tratamiento es sólo paliativo (Minsal, 2010).

Las opciones de tratamiento para el CG incluyen cirugía, quimioterapia,

radioterapia o una combinación de ellas. La cirugía es el único tratamiento potencialmente curativo, lo cual involucra la resección quirúrgica, más comúnmente una gastrectomía total o subtotal, acompañada de linfadenectomía. En Chile, se estima que cerca del 50% de los pacientes con CG ya tienen metástasis ganglionares o compromiso de órganos vecinos al momento del diagnóstico; además, la mayoría de los enfermos que pueden ser resecados se presentan en etapas avanzadas de la enfermedad. Este problema se complica aún más debido a que entre el 40% a 65% de los pacientes resecados, con intento curativo, presentará recurrencia. Por esto, la tasa de supervivencia a 5 años en pacientes con CG resecable varía entre el 10% al 30%, con un tiempo de supervivencia promedio cercano a los 24 meses (Dicken y col, 2005). Debido a estos antecedentes, la morbilidad del CG es debida, en gran parte, a las metástasis, y la mayoría de los pacientes con CG avanzando mueren a causa de las complicaciones por las metástasis, no por el tumor primario. Por lo tanto, una forma de disminuir la carga de enfermedad por el CG sería por medio de intervenciones de prevención primaria o detección tempranas efectivas.

El CG es una enfermedad multifactorial resultado de la interacción entre la susceptibilidad genética del individuo y factores ambientales. Los factores de riesgo ambientales más importantes implicados en la carcinogénesis gástrica son la dieta y la infección con *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Un alto consumo de alimentos salados, ahumados y que contienen nitritos aumentan significativamente el riesgo de desarrollar CG, mientras que el consumo de fibras, vegetales y frutas frescas están inversamente asociados con el riesgo de desarrollar cáncer gástrico (Compare y col, 2010). Otro factor de riesgo ya establecido, no dietético, corresponde al tabaquismo. Además, como se mencionó anteriormente, es ampliamente aceptada la gran asociación entre la infección con *H. pylori* y el CG (IARC, 1994). La infección con esta bacteria, la cual

gatilla un inflamación crónica, eleva hasta 6 veces el riesgo de desarrollar CG comparado con individuos no infectados (Kandulski y col, 2010).

La incidencia del CG ha ido disminuyendo en la mayoría de los países, probablemente como resultado de una reducción significativa de los factores de riesgo, incluyendo cambios en la preservación de los alimentos y una disminución en la prevalencia de infección por *H. pylori* (Arkenau, 2009; Kandulski y col, 2010).

Sin embargo, a pesar de las considerables mejoras terapéuticas en la técnicas quirúrgicas, innovaciones en el diagnóstico clínico y el desarrollo de nuevos regímenes de quimioterapia, esta enfermedad aún sigue siendo un desafío, debido a que el pronóstico para pacientes con CG avanzado es generalmente pobre (Arkenau, 2009). Además, la tasa de supervivencia de 5 años asociada con esta enfermedad no ha mejorado significativamente (Kandulski y col, 2010), razón por la que el CG es aún un gran problema de salud pública.

1.2. Sistema Inmune y células NK

El sistema inmune provee de mecanismos esenciales para la vigilancia del tejido estresado, de la transformación celular y oncogénesis, como también participa en la eliminación y control de un cáncer ya establecido (Chan y col, 2008). Tanto el sistema inmune innato como adaptativo, mediante mecanismos de inmunovigilancia, pueden proteger al huésped contra el desarrollo de tumores (Dunn y col, 2004).

Dentro del sistema inmune innato, uno de los componentes más importantes son las células "natural killer" (NK) (células citolíticas naturales), las cuales corresponden a la primera línea de defensa contra ciertas infecciones virales y tumores (Trinchieri, 1989). Estas células son capaces de reconocer y lisar células tumorales e

infectadas con virus sin sensibilización previa (Cerwenka & Lanier, 2001). Las células NK son linfocitos derivados de la médula ósea, y la mayoría se encuentra localizada en la sangre periférica, linfonodos, bazo y médula ósea (Ferlazzo y col, 2004), aunque pueden ser inducidas a migrar hacia el sitio de inflamación por diferentes quimioattractantes (Robertson, 2002). En humanos, las células NK comprenden entre un 5 y 20% de los linfocitos de sangre periférica. De acuerdo a sus marcadores de superficie celular, normalmente están definidas como CD3⁺CD56⁺ y se pueden dividir en dos sub-poblaciones principales: CD56^{dim}CD16⁺ y CD56^{bright}CD16⁻. La población CD56^{dim} predomina en la sangre periférica (aproximadamente 95% de las células NK) y en los sitios de inflamación, y presenta un alto potencial citotóxico. Al contrario, las células de la población CD56^{bright} predominan en los linfonodos (aproximadamente 75% de las células NK). Una vez activadas, producen principalmente citoquinas y poseen baja actividad citotóxica (Frag & Caligiuri, 2006).

Las células NK eliminan las células blanco (células tumorales o células infectadas por virus) mediante diversos mecanismos. Uno de ellos corresponde a la liberación, por las células NK, de gránulos citoplasmáticos que contienen proteínas como perforina y granzimas, las cuales promueven lisis celular por osmosis e inducen apoptosis de las células blanco, respectivamente (Dennert y col, 1987; Podack & Dennert, 1983).

Una alternativa a la liberación de gránulos es la muerte de la célula blanco inducida por apoptosis mediante receptores de muerte presentes en estas. Las células NK pueden expresar ligandos de muerte de familia del factor de necrosis tumoral (TNF), como ligando Fas, TNF- α y TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado al TNF), los cuales se unen a receptores específicos en la superficie de la célula blanco, gatillando su lisis (Zamai y col, 1998).

Además, como se mencionó anteriormente, las células NK pueden secretar citoquinas, como interferón gamma (IFN- γ), TNF- α y el factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF). Dentro de estas citoquinas, el IFN- γ es la más importante en suprimir la metástasis tumoral, las infecciones por virus y otros patógenos por medio de distintos mecanismos, incluyendo la estimulación de la presentación de antígenos, regulación de la proliferación celular, la sensibilidad a la apoptosis, activación de la fagocitosis e inhibición de la angiogénesis tumoral, y estimulación de la respuesta inmune adaptativa (Smyth y col, 2002).

1.3. Activación de las células NK

El reconocimiento de las células blanco por las células NK involucra una alteración en el balance entre señales activadoras e inhibitorias. Estas señales son entregadas simultáneamente a las células NK por distintas familias de receptores presentes en estas células y que se unen a ligandos expresados por las células blanco (Smyth y col, 2002). El resultado de esta interacción va a determinar si la célula NK es finalmente activada, si se producen citoquinas y/o si la célula blanco es eliminada (Caligiuri, 2008).

1.4. Receptor NKG2D

Dentro de los receptores activadores de las células NK, el receptor NKG2D (receptor de activación de células NK, grupo 2, miembro D) es uno de los que ha sido mejor caracterizado. Este receptor es una proteína de transmembrana de tipo II que pertenece a la familia de lectinas de tipo C (Houchins y col, 1991), y se expresa en

células NK, células NKT, linfocitos T $\gamma\delta$ y algunos linfocitos T CD8⁺ citotóxicos. En el caso de los linfocitos T CD8⁺ y linfocitos T $\gamma\delta$, la unión del receptor NKG2D a los ligandos contribuye a la co-estimulación del TCR para la activación de los linfocitos T (Groh y col, 2001a; Jamieson y col, 2002; Whang y col, 2009).

El receptor NKG2D consiste en dos proteínas de transmembrana de tipo II unidas por un puente de disulfuro. El dominio de transmembrana posee aminoácidos cargados positivamente; el dominio intracelular es muy corto y no tiene propiedad de señalización, por lo que, para la transducción de señales, NKG2D se asocia, como muchos otros receptores activadores, con proteínas adaptadoras por medio de los residuos ITAMs cargados en su dominio de transmembrana. En humanos, el receptor NKG2D forma un complejo con la molécula adaptadora DAP10 (proteína activadora DNAX de 10 kDa). El complejo de señalización NKG2D forma una estructura hexamérica, debido a que cada homodímero de NKG2D se une a dos homodímeros de moléculas adaptadoras (Garrity y col, 2005). DAP10 tiene en su cola citoplasmática un motivo Tyr-Ile-Asn-Met (YINM), que, al ser fosforilado, recluta la subunidad p85 de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y a la proteína adaptadora Grb2 (proteína 2 de unión al receptor de factor de crecimiento), la cual interacciona con Vav1 (ver Figura 1) (Upshaw y col, 2006). Esta señal estimula la proliferación y citotoxicidad de las células NK, y provee de co-estimulación a los linfocitos T activados (Chang y col, 1999; Wu y col, 2000; Wu y col, 1999).

El grado de respuesta del receptor NKG2D no sólo depende de la unión con sus respectivos ligandos, sino que también de otros estímulos que pueden influenciar el estado de activación de la vía NKG2D-DAP10, tales como la presencia de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21, entre otras citoquinas (Burgess y col, 2006; Horng y col, 2007; Song y col, 2006; Zhang y col, 2008).

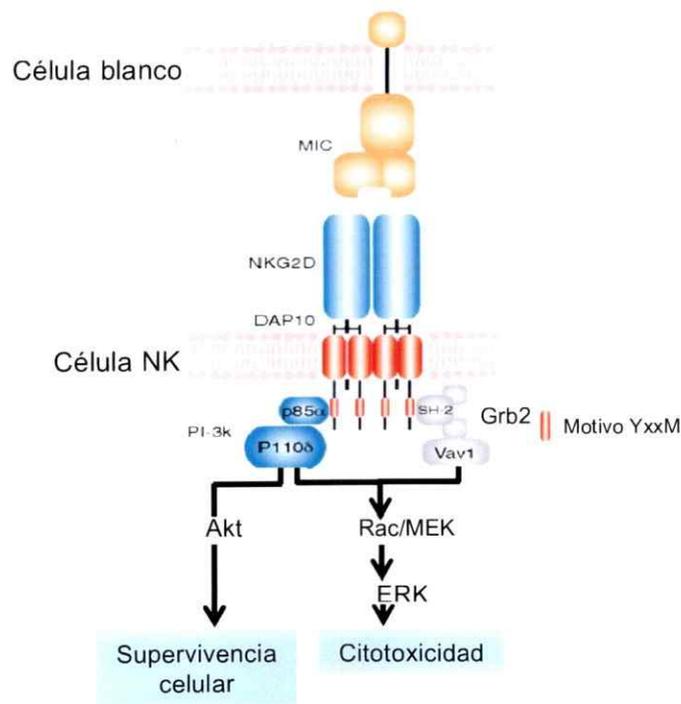


Figura 1. Esquema representativo de señalización del receptor NKG2D. Estimulación de las células NK vía receptor NKG2D: La unión del receptor NKG2D a su ligando en la célula blanco resulta en la fosforilación de DAP10 y reclutamiento de PI3K y Grb2-Vav1. Posteriormente, la señal río abajo es desencadenada, y las células NK son activadas para eliminar las células blanco que portan los ligandos de NKG2D. Adaptado de (Lopez-Larrea y col, 2008).

1.5. Ligandos del receptor NKG2D

Una de las características más notables del sistema NKG2D es la diversidad de ligandos que se pueden unir a este receptor invariante. Los ligandos de NKG2D (NKG2DL) son homólogos estructurales de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I (MHC-I), pero están lejanamente relacionados. En humanos, se han descrito dos familias de NKG2DL: la familia de proteínas relacionadas con la cadena de MHC-I (MIC), MICA y MICB, cuyos genes se codifican dentro del complejo principal de histocompatibilidad clase I (Bauer y col, 1999), y la

familia de proteínas de unión a la molécula UL16 del citomegalovirus, la cual contiene 6 miembros descritos (ULBP1-6) (Champsaur & Lanier, 2010). Ambos MICA y MICB son altamente polimórficos: 100 alelos han sido descritos para MICA y 40 para MICB (base de datos IMGT).

Del mismo modo que las moléculas de MHC-I, las proteínas MIC poseen 3 dominios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$), una región transmembrana y un dominio citoplasmático corto. Los miembros de la familia ULBP son estructuralmente similares a MIC, pero carecen del dominio $\alpha 3$. Sin embargo, a diferencia de las moléculas de MHC-I, los NKG2DL no se asocian a la molécula $\beta 2$ -microglobulina, tampoco unen péptidos (Figura 2) (Li y col, 2001).

1.6. Expresión de NKG2DLs

Aunque el mRNA de MICA/B y ULBPs puede ser encontrado en algunas células normales (Cosman y col, 2001; Schrambach y col, 2007), los niveles de expresión de NKG2DLs en la superficie celular de la gran mayoría de células sanas son nulos o bajos, y claramente por debajo de lo necesario para activar las células inmunes que expresan el receptor NKG2D. En cambio, la expresión en superficie celular de NKG2DLs aumenta en diversos tipos celulares bajo condiciones de estrés (como el *shock* térmico), infección y frecuentemente durante la tumorigénesis (Cerwenka y col, 2001; Gasser y col, 2005; Groh y col, 2001b).

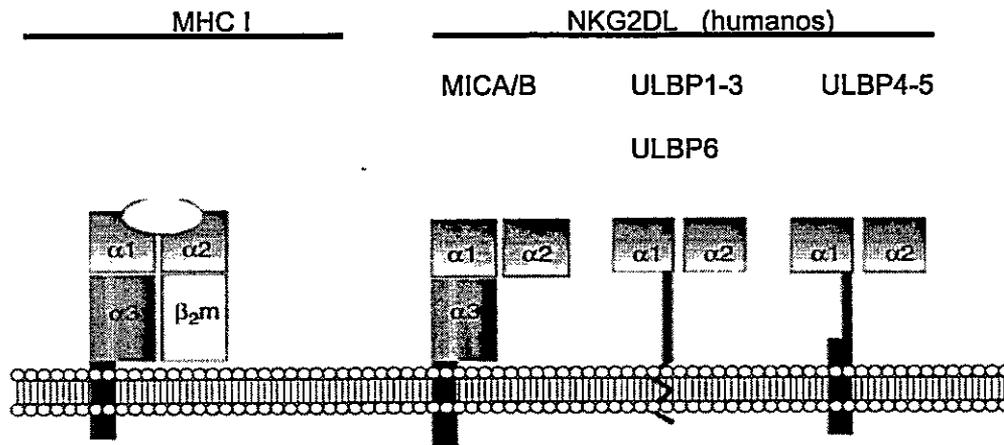


Figura 2. Ilustración representativa de los NKG2DL humanos en comparación con la molécula MCH de clase I. Como las moléculas MHC-I, MICA y MICB tienen los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ y un dominio de transmembrana. Las moléculas ULBPs carecen del dominio $\alpha 3$. Dentro de la familia de proteínas ULBP, ULBP4-5 también tienen dominios transmembrana, mientras que las proteínas ULBP1-3 y ULBP6 se encuentran unidas a la membrana celular a través de GPI. $\alpha 1$ - $\alpha 3$, dominios tipo Ig, $\beta 2m$, cadena liviana $\beta 2$ microglobulina. Adaptada de (Nausch & Cerwenka, 2008).

Se ha visto que los NKG2DL se expresan constitutivamente en una gran variedad de tumores primarios y líneas celulares derivadas de tumores (Mistry & O'Callaghan, 2007). Por ejemplo, los ULBPs se expresan en una variedad de tumores, incluyendo neuroblastoma, gliomas malignos, leucemias y carcinomas ováricos (Sutherland y col, 2006). MICA/B se expresan en melanomas, neuroblastomas, leucemias, carcinomas (mama, pulmón, próstata, colon, renal, ovárico, páncreas) y distintos tipos de neoplasias hematopoyéticas (Fernandez-Messina y col, 2010).

Debido a que los tumores se desarrollan a partir de células propias, son generalmente poco inmunogénicos y muchas veces no son reconocidos eficientemente por el sistema inmune. Por lo tanto, estos ligandos, presentes en la superficie de células tumorales, actuarían como una señal de peligro para su detección por células citolíticas.

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que las células NK puede eliminar células tumorales (Stagg & Smyth, 2007). Además, la expresión de NKG2DL en tumores los hace susceptibles a su eliminación por las células NK *in vitro* (Bauer y col, 1999), y la formación de tumores puede ser prevenida a través de la señalización vía receptor NKG2D (Smyth y col, 2005). Estudios *in vivo* han demostrado que la expresión de NKG2DLs en las células tumorales luego de ser trasplantadas en ratón, resulta en la eliminación del tumor mediada por NKG2D (Cerwenka y col, 2001; Diefenbach y col, 2001). Además, se ha demostrado que la regulación negativa o el *knockout* del receptor NKG2D en ratones resulta en una respuesta inmune comprometida contra células tumorales, un mayor nivel de expresión de los ligandos de NKG2D y una elevada incidencia de ciertos tumores (Guerra y col, 2008; Wiemann y col, 2005a).

Por lo tanto, el sistema receptor NKG2D/NKG2DL es importante en la inmunidad anti tumoral, tanto para prevenir el desarrollo del tumor como también su progresión (Dunn y col, 2002). Este debe ser un mecanismo para impedir el crecimiento tumoral por una eficiente respuesta inmune contra el tumor.

1.7. Evasión del sistema inmune

Aunque los tumores expresen NKG2DL, estos son capaces de crecer progresivamente debido a múltiples mecanismos de evasión de la respuesta inmune (Oppenheim y col, 2005). Las células tumorales utilizan diversas estrategias para prevenir su eliminación mediada por el receptor NKG2D. Una de estas corresponde a la regulación negativa de los NKG2DL. Se ha demostrado que muchos tumores inhiben activamente la expresión de NKG2DL (Sers y col, 2009). Un mecanismo importante

para la regulación negativa de los NKG2DL sería la producción de citoquinas inmunomoduladoras, como el TGF- β , IL-10 o IFN- γ , el cual puede ser secretado directamente por las células tumorales o por células inmunoregulatorias que se expanden durante la progresión del tumor (Eisele y col, 2006; Ghiringhelli y col, 2005; Serrano y col, 2010). Se ha demostrado que TGF- β disminuye la transcripción de MICA, ULBP-2 y ULBP-4 en células de glioma humano (Eisele y col, 2006). En nuestro laboratorio, se demostró que IL-10, reduce la expresión de MICA en la superficie de células de melanoma, afectando la citotoxicidad mediada por las células NK. También IFN- γ regula negativamente la expresión de MICA y ULPB-2 en células de melanoma (Schwinn y col, 2009).

En células tumorales, la expresión en superficie de NKG2DL también puede disminuir por la acción de metaloproteasas que son secretadas por las células tumorales. Estas enzimas son capaces de proteolizar los ligandos de NKG2D expresados en la superficie celular, resultando en la liberación de formas solubles de los ectodominios de estos ligandos (Tamaki y col, 2009). De hecho, se han encontrado ligandos de NKG2D solubles (sNKG2DL), como el MICA soluble (sMICA), en el sobrenadante de líneas celulares tumorales que expresan NKG2DL en su superficie y en el suero de pacientes con diferentes tipos de tumores malignos (Holdenrieder y col, 2006b). Por ejemplo, se ha detectado sMICA en el suero de pacientes con cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de páncreas, neuroblastoma, osteosarcoma y tumores hematopoyéticos severos (Groh y col, 2002; Holdenrieder y col, 2006a).

Debido al hecho de que altos niveles de sMICA en el suero de pacientes con algunos tipos de cáncer se correlacionan significativamente con el estadio del cáncer,

diferenciación tumoral y metástasis, este ligando soluble podría ser usado como un marcador para la progresión del tumor (Salih y col, 2008).

Por otro lado, se ha descrito que sMICA facilita la internalización y consecuente degradación lisosomal del receptor NKG2D, disminuyendo así sus niveles de expresión en la superficie de células NK y linfocitos T CD8⁺ (Raffaghello y col, 2004). Como resultado, la capacidad de estas células efectoras en reconocer y, consecuentemente, lisar la célula tumoral se ve afectada, lo que favorecería la evasión inmune por el tumor.

Además, se ha detectado sMICB en el suero de pacientes con cáncer de páncreas, leucemia, pulmón, colon y recto (Duan y col, 2011; Hilpert y col, 2012; Holdenrieder y col, 2006b; Salih y col, 2006), como también ULBP-1-3 soluble en leucemia (Hilpert y col, 2012).

Otros tumores utilizan una estrategia opuesta para manipular la señalización mediada por el receptor NKG2D al presentar mayor expresión de NKG2DL en su superficie (McGilvray y col, 2010). La expresión sostenida de los NKG2DL en los tumores puede también promover la disminución de la expresión del receptor NKG2D de las células efectoras, comprometiendo así su citotoxicidad. Por lo tanto, una exposición crónica de las células NK a los NKG2DL de superficie o solubles llevan a la modulación del receptor NKG2D, lo que afectaría la activación celular dependiente de este receptor (Oppenheim y col, 2005).

Los tumores pueden usar combinaciones de estos mecanismos para regular negativamente la expresión de los ligandos de NKG2D. Se ha demostrado que gliomas malignos utilizan TGF- β y metaloproteasas para reducir la expresión de los NKG2DL (Eisele y col, 2006).



En pacientes con cáncer gástrico, se ha observado que existen defectos inmunes sistémicos y locales, los cuales se correlacionan con la progresión de la enfermedad y el mal pronóstico. Por ejemplo, se ha demostrado que, en estos pacientes, las células NK, linfocitos T CD8⁺ y linfocitos T $\gamma\delta$, tanto de sangre periférica como aquellos infiltrados en tumores, expresan bajos niveles del receptor NKG2D, lo que compromete la función efectora de estas células citotóxicas, contribuyendo a la severidad de la enfermedad (Kuroda y col, 2012; Osaki y col, 2007; Saito y col, 2012).

Recientemente, en nuestro laboratorio, se observó, por citometría de flujo, que los tumores de CG expresan múltiples ligandos de NKG2D, incluyendo MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3. La expresión de MICA y ULBP1 en los tumores se correlaciona con el tamaño del tumor. Además, la expresión de MICA, ULBP-1-3 se correlaciona con mayor número de linfonodos metastásicos, el cual corresponde a un factor de pronóstico para cáncer gástrico en estados avanzados. Además, mediante estudios de inmunohistoquímica, pudimos comprobar que la expresión de MICA/B era significativamente mayor en el tejido tumoral en comparación a la mucosa gástrica en los pacientes con CG.

Al evaluar los niveles séricos de MICA soluble en los pacientes con CG, pudimos comprobar que el 71% de los pacientes evaluados presentaban sMICA, cuyos niveles se correlacionaron negativamente con la expresión en superficie celular de MICA y con el porcentaje de células positivas para este ligando presentes en el tumor. Estos resultados podrían también sugerir que una alta expresión de NKG2DLs en el microambiente tumoral correspondería a una estrategia de evasión inmune desarrollada por las células de adenocarcinoma gástrico, lo cual podría favorecer el crecimiento del tumor (Ribeiro y col., manuscrito en preparación). Esto se ve reflejado en otros carcinomas que sobreexpresan NKG2DLs (Oppenheim y col, 2005). Además,

debido a que se ha asociado una disminución del receptor NKG2D con la presencia de sMICA en suero de pacientes con diferentes tumores malignos (Groh y col, 2002; Raffaghello y col, 2004; Salih y col, 2003; Wu y col, 2004b), es posible que este fenómeno también esté ocurriendo en los pacientes con cáncer gástrico.

Por lo tanto, esta disminución en la expresión del receptor NKG2D en pacientes con cáncer gástrico podría deberse a la acumulación de MICA soluble en el ambiente tumoral y/o por una expresión crónica de este ligando en la superficie de las células tumorales. Estos datos sugieren que una expresión sostenida de los NKG2DLs en CG podría causar una inmunosupresión de las actividades antitumorales de las células NK y disminuir la susceptibilidad tumoral frente a estas células efectoras.

Los mecanismos mediante los cuales el cáncer gástrico evade la respuesta inmune antitumoral siguen sin comprenderse totalmente. Por esa razón, es necesario un mejor entendimiento de estos, ya que son muy importantes en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y tratamientos de esta enfermedad. Por esta razón, en este trabajo, se estudió tanto la expresión de MICA en las células tumorales derivadas de tumores gástricos como los niveles de sMICA séricos, así como la expresión del receptor NKG2D en células NK de pacientes con CG. De esta manera, se pudo analizar la correlación entre la expresión del receptor NKG2D en las células NK y la expresión de MICA presente en las células tumorales o niveles de sMICA para así poder investigar un posible mecanismo responsable de la evasión de la respuesta inmune en pacientes con cáncer gástrico.

1.8. Hipótesis

La expresión de MICA en el tejido tumoral de pacientes con cáncer gástrico disminuye la expresión del receptor NKG2D en las células NK, comprometiendo su función efectora.

1.9. Objetivos

1.10. Objetivo general

Determinar el rol de MICA expresado en células de adenocarcinoma gástrico en la evasión de la respuesta inmune mediada por el receptor NKG2D en las células NK.

1.11. Objetivos específicos

- I. Analizar la expresión del receptor NKG2D en células NK infiltrantes del tumor y sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico.
- II. Estudiar la actividad citotóxica de células NK de sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico.
- III. Evaluar el efecto de MICA en pacientes con cáncer gástrico en la regulación de las funciones efectoras de células NK.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Pacientes

Para realizar este estudio, se reclutaron 13 pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a gastrectomía en el Hospital Salvador (Santiago, Chile) en colaboración con el Dr. Marco Bustamante, Director del Departamento de Cirugía de este Hospital. Previamente a la recolección de muestras, se obtuvo una autorización firmada por el paciente a través de un Consentimiento Informado (Anexo 1). Para el estudio, se incluyeron pacientes con tumores localizados; tanto las muestras tumorales como tejido de la mucosa gástrica adyacente al tumor, se recolectaron durante la cirugía, luego de la remoción del estómago. Además, se obtuvieron muestras de sangre periférica de cada paciente con CG y de 13 voluntarios sanos (grupo control), los que también firmaron un Consentimiento Informado (Anexo 2). El criterio de exclusión de los pacientes fue haber tenido un tratamiento de quimioterapia y/o radioterapia previo a la cirugía. El protocolo de estudio se aprobó por el Comité de Ética Científico del Servicio de Salud Metropolitano Oriente del Gobierno de Chile (Anexo 3) y por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Anexo 4). La Tabla 1 indica los datos demográficos y clínico-patológicos de los pacientes reclutados en el presente estudio.

Tabla 1. Características clínico-patológicas de los pacientes con cáncer gástrico.

	n (pacientes)	%
Genero		
Masculino	10	76,9
Femenino	3	23,1
Tamaño tumor		
≤ 4 cm	2	15,4
> 4 cm	11	84,6
Diferenciación tumoral		
alta/mediana	7	53,8
baja/sin	6	46,2
Profundidad de invasión^a		
T1, T2	6	46,2
T3, T4	7	53,8
Metástasis nodos linfáticos		
Ausente	3	23,1
Presente	10	76,9
Estadio TNM^b		
I, II	7	53,8
III, IV	6	46,2
Borrmann		
I,II	3	23,1
III,IV	10	76,9

^a Profundidad de invasión corresponde a la invasión del tumor hacia el epitelio o mucosa de lamina propia, muscularis mucosae o submucosa (T1), muscularis propia o subserosa (T2), serosa (T3) y órganos adyacentes (T4). ^bEstadio de acuerdo a la clasificación TNM para el cáncer gástrico (AJCC).

2.2. Sangre periférica

Las muestras de sangre periférica tanto de pacientes como de controles sanos se obtuvieron en tubos con heparina (para posterior obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)) y en tubos sin anticoagulantes (para adquisición de suero). Las muestras de sangre de pacientes con CG fueron obtenidas durante el proceso quirúrgico bajo condiciones de esterilidad.

2.3. Líneas celulares

La línea celular de adenocarcinoma gástrico MKN-45 y de eritroleucemia K562 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Hyclone, EE.UU.) suplementado con penicilina/estreptomicina y 10% de suero fetal bovino (SFB) (Hyclone, EE.UU.), el cual corresponde al medio RPMI completo.

2.4. Detección de MICA y MICB soluble en suero de pacientes

Se evaluó la presencia de MICA y MICB soluble en el suero de pacientes con CG y controles sanos utilizando el kit de ELISA para sMICA humano (BAMOMAB, Alemania) y MICB DuoSet (R&D Systems, EE.UU.), respetivamente y se siguieron las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones indicadas a continuación. En resumen para detectar sMICA, placas de poliestireno de 96 pocillos (Maxisorp, Thermo Scientific Nunc, EE.UU) se sensibilizaron con el AcMo de captura anti-MICA AMO1 a 5 µg/ml en PBS durante toda la noche. Luego, se bloquearon los pocillos con PBS-BSA 15% y se incubó durante 1 h a 37°C. Enseguida, se lavaron con PBS-Tween20 0,05%

(PBST) e incubaron con la proteína estándar (sMICA*004 recombinante producida en *E. coli* (BAMOMAB, Alemania)) o suero de paciente (o controles sanos), los cuales se dejaron incubando durante la noche. Los sueros se diluyeron 1:3 en PBS-BSA 7,5%. Después, las placas se lavaron, se incubaron con el AcMo de detección BAMO3 a 1 µg/ml durante 2 h a 37°C, se lavaron nuevamente, y se añadió el anticuerpo secundario, de cabra anti-IgG2a de ratón conjugado a HRP (dilución 1:3000) (Southern Biotechnologies, EE.UU.) y se incubó durante 1 h a 37°C. Finalmente, las placas se lavaron y revelaron usando el sustrato tetrametil-bencidina (TMB) (Thermo Scientific, EE.UU.) y la absorbancia se midió a 450 nm en un lector de ELISA. Los niveles de MICB solubles presentes en el suero se evaluaron según las instrucciones del fabricante del kit. Los sueros se diluyeron 1:2 en PBS-BSA 1%. Los niveles de MICA y MICB solubles presentes en el sobrenadante de cultivo de trozos de tumor se midieron de forma directa utilizando los kit de ELISA mencionados anteriormente.

2.5. Preparación de suspensiones celulares desde el tejido tumoral y de mucosa gástrica

Las muestras de tejido tumoral y mucosa gástrica adyacente al tumor se transportaron en forma separada en medio HBSS (Gibco, EE.UU.) suplementando con penicilina/estreptomicina al 1% (Hyclone, EE.UU.). Los tejidos se cortaron en pequeñas piezas usando hojas de bisturí estériles y se disgregaron mecánicamente mediante el uso de agujas y émbolos de una jeringa en medio RPMI suplementando con 1% penicilina/estreptomicina y 3% de suero fetal bovino (SFB) (Hyclone, EE.UU.). El tejido disociado se filtró por un "cell strainer" de 70 µm (BD Falcon, EE.UU.). Las células se centrifugaron a $805 \times g$ por 10 min a 4°C y el pellet se incubó con

solución ACK de lisis de eritrocitos (NH_4Cl 154 mM, KHCO_3 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.2) por 10 min a temperatura ambiente. Luego, las células se lavaron con medio RPMI suplementado con SFB al 3% y se evaluó la viabilidad celular mediante la tinción con azul de Tripán. Las células se congelaron en SFB con un 10% de DMSO usando un contenedor de congelamiento con isopropanol a -80°C y luego de 24 h se guardaron en nitrógeno líquido.

2.6. Detección de MICA en células derivadas de tejidos tumorales

Las suspensiones celulares obtenidas de los tejidos de tumor primario y de la mucosa adyacente se resuspendieron en PBS con SFB al 1% (PBS-SFB 1%) e incubaron en hielo por 30 min. Las células se transfirieron a una placa de 96 pocillos con fondo en "V" (Nunc Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) y se centrifugaron a $805 \times g$ por 3 min a 4°C . Al menos 2×10^5 células se incubaron con el anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD45-PerCPCy5.5 humano (clon HI30, 1:200, BioLegend, EE.UU.) y el mAb anti-EpCAM-FITC (clon 9C4, 1:100, Biolegend, EE.UU.), así como con el mAb anti-MICA-APC (clon 159227, 1:10, R&D Systems, EE.UU.). Como control de isotipo para MICA, se utilizó el anticuerpo IgG2b-APC (clon 133303, 1:5, R&D Systems, EE.UU.). La expresión de MICA se evaluó en las células tumorales en la población $\text{EpCAM}^+\text{CD45}^-$. EpCAM corresponde a un molécula de adhesión epitelial que generalmente se sobreexpresa en tumores epiteliales, incluyendo cáncer gástrico (Wenqi y col, 2009), mientras que CD45 es una proteína tirosina fosfatasa que se encuentra presente en la superficie de todos los leucocitos (Lorenz y col, 1994). Por lo tanto, al detectar ambos marcadores celulares, se puede asegurar la selección de la población de células tumorales, excluyendo específicamente a los leucocitos.

Las células se incubaron con los mAbs por 30 min a 4°C, y luego se realizaron 2 lavados con PBS-SFB 1%. Para evaluar la expresión intracelular de MICA, las células se permeabilizaron y fijaron utilizando el kit BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution (BD Biosciences, EE.UU.), según el protocolo indicado por el fabricante, seguido de incubación con el mAb anti-MICA-APC por 30 min a 4°C. Finalmente, se analizaron las suspensiones celulares usando el citómetro FACSCalibur o FACSaria III, y los datos se adquirieron con el programa CellQuest (ambos de Becton-Dickinson, EE.UU.), los cuales se analizaron usando el software FlowJo v8.7 (Tree Star). Las células muertas se excluyeron de acuerdo a sus características de tamaño (side scatter (SSC)) y granularidad (forward scatter (FSC)). Se recolectaron y analizaron un promedio de 20.000 eventos por muestra.

2.7. Análisis de la expresión del receptor NKG2D en células NK infiltrantes por citometría de flujo

En este estudio, se evaluaron los niveles del receptor NKG2D en superficie de las células NK (definidas como CD3⁻ y CD56⁺) y linfocitos T CD8⁺ (definidos como CD3⁺ y CD8⁺) infiltrantes de tumor mediante citometría de flujo. Para esto, se utilizaron los siguientes mAbs: anti-CD45-PerCP-Cy5.5, CD3-PE-Cy7 (clon OKT3, 1:100, BioLegend, EE.UU.), CD56-PE (clon CMSSB, 1:25, eBioscience, EE.UU.), CD8-FITC (clon HIT8a, 1:100, BioLegend, EE.UU.), y NKG2D-APC (clon 1D11, 1:10, BD Pharmigen, EE. UU.), o con el anticuerpo control de isotipo para el receptor NKG2D IgG2b-APC (clon 27-35, 1:10, BD Pharmigen, EE. UU.).

Las suspensiones celulares obtenidas del tumor primario y de la mucosa (Sección 2.5) se incubaron con los anticuerpos anteriormente mencionados por 30 min a 4°C; luego, se realizaron 2 lavados con PBS-SFB 1%, se fijaron las células con el buffer BD Cytotfix™ (BD Biosciences, EE.UU.) durante 15 min a 4°C, se lavaron y se resuspendieron en buffer de tinción PBS-SFB 1% hasta el análisis por citometría de flujo. Los niveles del receptor NKG2D en superficie se evaluaron como la intensidad de fluorescencia mediana (MFI) de las células teñidas y también se evaluó el porcentaje de células NK o linfocitos CD8⁺ positivas para NKG2D..

2.8. Aislamiento de PBMC

El aislamiento de PBMCs se realizó a partir de sangre periférica heparinizada, extraída en condiciones estériles, de pacientes con CG o donantes sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll Paque (GE Healthcare, Suecia). La sangre se diluyó en igual volumen de PBS estéril, y se depositó cuidadosamente sobre 12 ml de Ficoll en tubos estériles de 50 ml. Los tubos se centrifugaron durante 20 minutos a 300 × g y 18°C. Las células mononucleares se recogieron de la interfase, se lavaron dos veces en RPMI-SFB 3% y se incubaron con solución ACK. Las células se volvieron a lavar con medio RPMI y el precipitado celular se resuspendió en medio de cultivo de linfocitos humanos, el que consta de RPMI suplementado con 2mM de L-Glutamina con 10% v/v de suero humano o SFB, dependiendo del procedimiento.

2.9. Análisis de la expresión del receptor NKG2D en células NK y linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica por citometría de flujo

La tinción celular se realizó utilizando anticuerpos conjugados a fluorocromos específicos para seleccionar células NK: anti-CD3-PE-y7, anti-CD56-PE y anti CD8-FITC, además del anticuerpo anti-NKG2D-APC o con el anticuerpo control de isotipo para NKG2D, IgG2b-APC. Los niveles del receptor NKG2D en la superficie de las células NK se evaluaron por la intensidad de fluorescencia mediana (MFI) de las células teñidas. Luego del lavado con PBS-1% FBS, las células se incubaron por 30 minutos con la mezcla de estos anticuerpos. Luego, se lavaron, fijaron, y se resuspendieron en FACS buffer (BD Biosciences, EE.UU.) y luego se analizaron por citometría de flujo.

2.10. Análisis de las funciones efectoras de células NK de sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico

Se co-cultivó PBMC de pacientes o de donantes sanos con la línea celular de cáncer gástrico MKN45 y se evaluó la capacidad de estas células en activar las funciones efectoras de las células NK, como citotoxicidad y producción de citoquinas. Para el análisis de la activación citolítica de las células NK, se utilizó un ensayo de degranulación. En este ensayo, se evaluó la expresión de CD107a (o LAMP-1), un marcador de gránulos citolíticos intracitoplasmáticos, el cual se moviliza hacia la superficie de células citolíticas luego de su activación en presencia de células blanco (Alter y col, 2004).

El PMBC se sembró en placas de 96 pocillos con fondo "U" a una concentración de 2×10^5 células/pocillo en presencia del anticuerpo anti CD107a-FITC (clon H4A3, 3 μ l/ pocillo; BD Pharmingen, EE.UU.) o el control de isotipo (clon MOPC-21, 3 μ l/ pocillo; BD Pharmingen, EE.UU.). La degranulación se indujo al agregar células de la línea celular de adenocarcinoma gástrico (MKN-45) (2×10^4 células/pocillo, razón efector/blanco [E:B]= 10:1). Como control negativo, se incubó el PBMC sólo en presencia de medio RPMI completo. Además, como control positivo para la activación de las células NK, el PBMC se enfrentó con la línea celular de eritroleucemia K562 (Nishimura y col, 1994). Luego, se centrifugaron las células a $30 \times g$ por 1 min, seguido de incubación por 1 h a 37°C con 5% de CO_2 .

Luego de 1 h de co-cultivo (PBMC más células blanco tumorales), se agregó monensina y brefeldina A (concentración final 3 μM y 1 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) (ambos de BD Biosciences) en cada pocillo. La brefeldina A previene la exocitosis de las vesículas que contienen la citoquinas, permitiendo la detección intracelular de la producción de citoquinas después de la estimulación, mientras que la monensina previene la acidificación de las vesículas endocíticas, impidiendo la degradación de CD107a reinternalizado desde la superficie celular y así permitiendo la detección de este marcador después de la estimulación (Alter y col, 2004). Posteriormente, las células efectoras y células blanco se cultivaron a 37°C durante 5 h. Después de un total de 6 h de co-cultivo, las células se centrifugaron a $450 \times g$ por 1 min, se lavaron con PBS-SFB 1% y se incubaron por 30 min 4°C con una mezcla de los anticuerpos anti-CD45-PerCP-Cy5.5, anti-CD3-Alexa 700 (clon HI30 ,1:170, BioLegend, EE.UU.), anti-CD56-PE y anti-NKG2D-APC. Después, las células se fijaron y permeabilizaron con el Kit Cytotfix/Cytoperm Fixation/ Permeabilization (BD Biosciences, EE.UU.) por 20 min a 4°C . Luego del lavado, se midió la producción de INF- γ intracelular por las

células NK al incubarlas con el anticuerpo anti-IFN- γ -PE-Cy7 (clon, 1:200, BioLegend, EE.UU.) durante otros 30 min a 4°C. Finalmente, se analizó, mediante citometría de flujo, la expresión de CD107a y de INF- γ intracelular por las células NK CD3⁺CD56⁺.

2.11.Efecto de sueros de pacientes con CG sobre la expresión del receptor

NKG2D

En este estudio, se evaluó, *in vitro*, el efecto de sueros de pacientes con CG positivos para sMICA (n=13) (Sección 2.4) sobre los niveles del receptor NKG2D en superficie de células NK y linfocitos T CD8⁺ de donantes sanos. Para esto, se incubó PBMC de donantes sanos (n=3, 2×10^5 células/pocillo) en medio conteniendo, individualmente, 30% de suero de paciente o de donante sano durante 48 h. Por otro lado, para confirmar que una disminución en los niveles de NKG2D era mediada por MICA soluble, se utilizó un anticuerpo para prevenir la unión de sMICA al receptor NKG2D mediante la adición de un anticuerpo anti-MICA (clon: AMO1, concentración final 10 μ g/ml; BAMOMAB, Alemania) al suero de los pacientes y controles sanos previo al cultivo de estos sueros con el PBMC. Como control del ensayo, se incubó el PBMC en presencia de rMICA (ab182709, Abcam, EE.UU.). Posteriormente, se determinaron los niveles del receptor NKG2D en superficie de células NK y células T CD8⁺ por citometría de flujo. Para esto, se incubaron las células con los anticuerpos anti-CD3-PE-Cy7, anti-CD56-PE, anti-CD8-FITC y anti-NKG2D-APC durante 30 min a 4°C. Enseguida, se lavaron las células y se resuspendieron en FACS buffer y luego se analizaron por citometría de flujo.

2.12. Modulación de la expresión del receptor NKG2D por el sobrenadante de cultivo de tumores de pacientes con CG

En este trabajo, también se estudió el efecto del sobrenadante de cultivo de un trozo de tumor de pacientes (n=4) con CG sobre los niveles del receptor NKG2D en superficie de células NK y linfocitos T CD8⁺ de donantes sanos. Para esto, una vez obtenida la muestra de tumor, se dejó incubando un trozo de tumor de aproximadamente 300 mg con 250 µl de medio de cultivo en una placa de 48 pocillos durante 24 h. Luego, se removió el sobrenadante de cultivo y se centrifugó a 300 × g. Ya obtenido el sobrenadante libre de *debris* celulares, se incubó el PBMC (n=3, 2 × 10⁵ células/pocillo) con este medio durante 48 h, periodo el cual se ha descrito en otros trabajos (Wu y col, 2004a). También se utilizó un anticuerpo anti-MICA como control para poder confirmar que la disminución del receptor de NKG2D es mediada por MICA soluble liberado por las células tumorales al medio extracelular. Para esto, se agregó el anticuerpo bloqueante al sobrenadante de cultivo previo a la incubación con el PBMC. También se evaluó, por ELISA, la concentración de MICA y MICB solubles presentes en el sobrenadante de cultivo de los pedazos de tumor, de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.5.

2.13. Correlación entre los niveles de expresión de MICA con parámetros clínico-patológicos de la enfermedad

Se analizaron las fichas clínicas de cada paciente con adenocarcinoma gástrico incluidos en este estudio, y se clasificaron de acuerdo al resultado obtenido en las respectivas biopsias para el tamaño del tumor, estadio de invasión tumoral, metástasis

hacia linfonodos y estado TNM (el cual se refiere a la extensión del tumor primario, la propagación del tumor hacia los linfonodos y a la presencia de metástasis a otros órganos) (Tabla 1). El sistema de clasificación utilizado fue el propuesto por la American Joint Commission on Cancer (AJCC) 7ª edición (Washington, 2010). Se determinó la asociación entre los niveles de MICA en superficie celular, la expresión del receptor NKG2D en superficie de las células NK y la presencia de MICA y MICB soluble en el suero de pacientes y los distintos parámetros clínico- patológicos de la enfermedad.

2.14. Análisis estadístico

Primero, se llevó a cabo el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov en cada grupo en estudio para determinar si los datos presentaban una distribución normal. La evaluación estadística de la diferencia de los niveles y frecuencia de MICA entre el tumor y la mucosa gástrica se realizó usando el test de Wilcoxon o test *t* pareado. La correlación entre los niveles séricos de sMICA y los niveles del receptor NKG2D en superficie de células NK y linfocitos T CD8⁺, y entre los niveles de sMICA o del receptor NKG2D en células NK y linfocitos T CD8⁺ y el tamaño del tumor se realizó utilizando el test de correlación de Spearman.

Las diferencias entre la expresión y frecuencia de MICA del tumor entre los grupos de pacientes correspondientes al tamaño del tumor y otros parámetros clínico patológicos se evaluaron utilizando el test de Mann-Whitney o test *t* no pareado.

Las curvas de supervivencia se generaron según el método de Kaplan-Meier, y la diferencia entre las curvas de supervivencia se analizó por la prueba Log-rank. Todos los pacientes cuyas muertes se asociaron al adenocarcinoma gástrico, incluyendo aquellos

que murieron de complicaciones post operativas, se incluyeron en el análisis de sobrevida, la cual se evaluó durante un periodo de 16 meses luego de la intervención quirúrgica para remoción del estómago. Todos los datos se analizaron con el software GraphPad Prism, versión 5 (EE.UU.), y los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

3. RESULTADOS

3.1. Niveles de MICA en superficie de células derivadas del tumor primario de pacientes con cáncer gástrico

Durante este estudio, se analizaron 13 pacientes con adenocarcinoma gástrico sometidos a gastrectomía total, mujeres y hombres, con un promedio de edad de 66,1 años. La Tabla 1 resume los diversos datos demográficos, clínicos, patológicos y operatorios correspondientes a los 13 pacientes.

Para identificar las células tumorales en las suspensiones celulares derivadas del tejido tumoral, se desarrolló una estrategia de análisis de marcadores celulares por citometría de flujo. En trabajos previos en nuestro laboratorio, como control positivo para las células tumorales, se analizó la expresión en superficie de CD44, una molécula de adhesión que se sobreexpresa en varios tipos de tumores, incluyendo el CG (Ghaffarzadehgan y col, 2008; Ko y col, 2011). En la Figura 3 se muestran *density plots* de FSC *versus* SSC representativos de las células derivadas del tumor y mucosa gástrica. Como primera estrategia de análisis, se evaluó la población seleccionada en rojo (G1), en la cual se descartaba el *debris* celular en el grafico *forward* y *side scatter* (FSC/SSC). Se muestra en la Figura 3A y B un *dot blot* de CD44/SSC de la población G1, y se observaron que tanto las células derivadas del tumor como de la mucosa gástrica presentan CD44 en la superficie celular, y se pueden discriminar dos poblaciones derivadas de ambos tejidos que son positivas para este marcador (CD44⁺ P1 y P2).

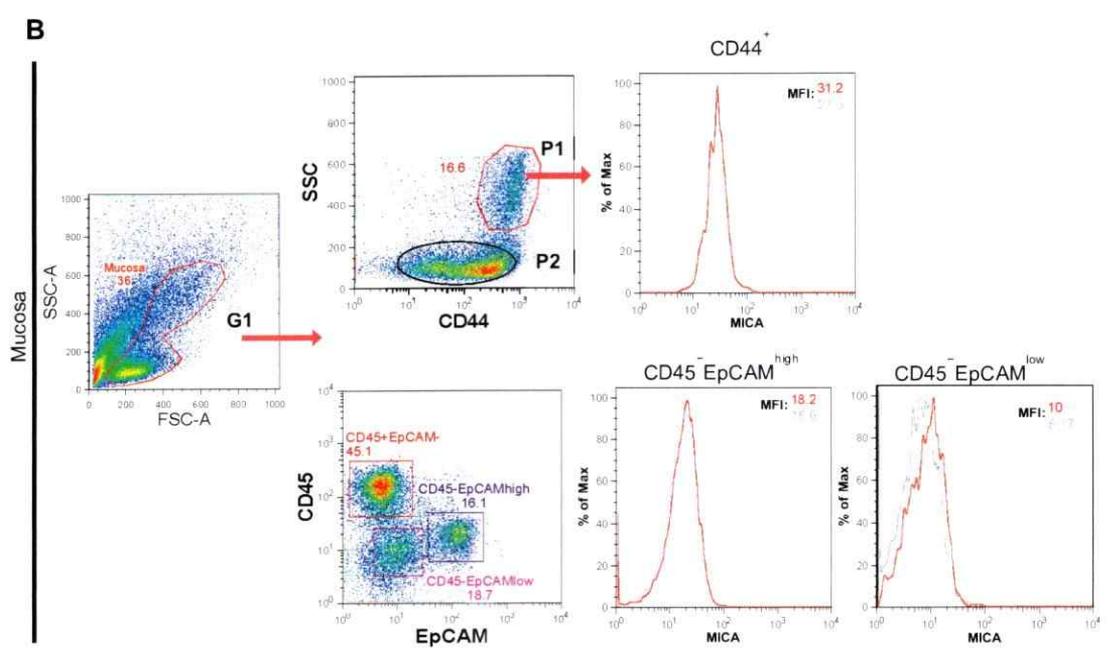
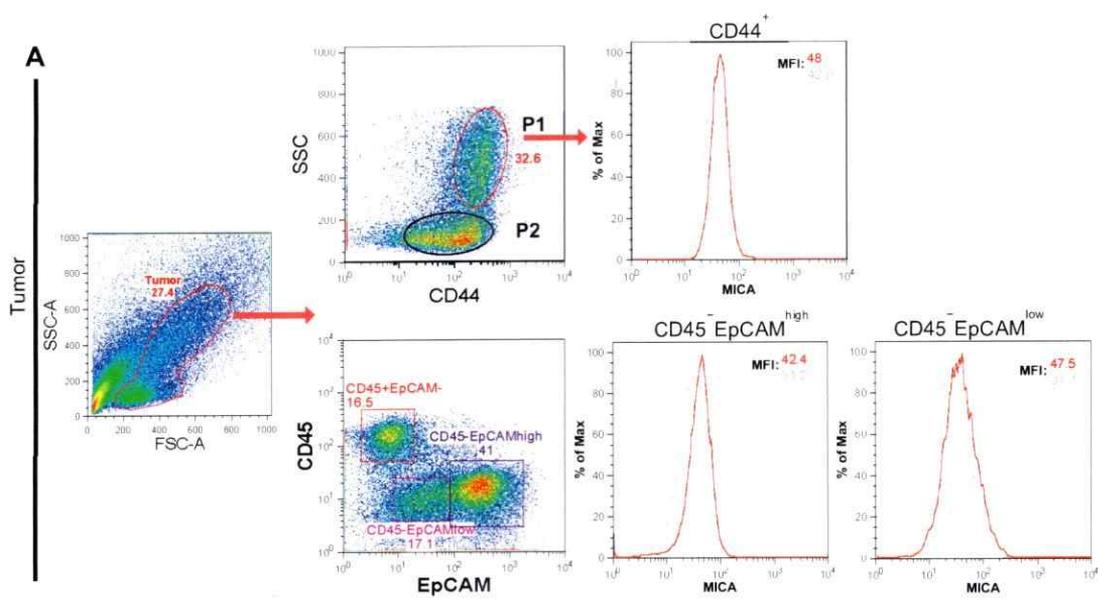


Figura 3. Estrategia de análisis para las células tumorales. (A) Gráficos de densidad (*dot plot*), obtenidos por citometría de flujo, que muestran las propiedades de tamaño (FSC) *versus* granularidad (SSC) del tumor primario y de la (B) mucosa gástrica de un paciente con CG representativo. La población de células en estudio se seleccionó según las propiedades de SSC y FSC (círculo rojo) y, a partir de esta selección, se analizó los niveles de CD44 o CD45/EpCAM. Los números en los *dot plots* indican el porcentaje de células en cada población seleccionada. Los niveles de MICA en superficie celular se analizaron en la población CD45⁻EpCAM^{high} (cuadrado morado) y CD45⁻EpCAM^{low} (cuadrado rosado) y se midió la intensidad de fluorescencia mediana (MFI), la que se representa en el histograma rojo; el isotipo correspondiente está representado en el histograma gris. Los valores de MFI están indicados en la leyenda coloreada sobre el histograma.

Sin embargo, debido a que CD44 también se expresa en los linfocitos, se decidió posteriormente utilizar el marcador EpCAM, una molécula que se expresa esencialmente en todos los adenocarcinomas humanos, incluyendo el cáncer gástrico y, además, prácticamente no se expresa en el epitelio gástrico normal (Baeuerle & Gires, 2007; Balzar y col, 1999a). Además, para poder excluir los leucocitos del análisis, se decidió utilizar el marcador CD45, antígeno común leucocitario. En el tumor, al evaluar los niveles en superficie celular de ambos marcadores (EpCAM y CD45) en G1, se pudo discriminar tres poblaciones: CD45⁻EpCAM^{high}, CD45⁻EpCAM^{low} y CD45⁺EpCAM⁻ (Figura 3A y B). En el caso de la mucosa gástrica, se discriminaron las mismas tres poblaciones; sin embargo, en algunos pacientes, no se observó la población EpCAM^{high}CD45⁻. La población de células con altos niveles de EpCAM (EpCAM^{high}) correspondería a las células tumorales y la población de células con bajos niveles de EpCAM (EpCAM^{low}) correspondería a las células epiteliales de la mucosa gástrica.

Pudimos observar, para los pacientes analizados, que el 36% de las células derivadas del tejido tumoral y de mucosa corresponden a leucocitos humanos (CD45⁺EpCAM⁻), además se observó un mayor porcentaje de células CD45⁻EpCAM^{high}

en el tejido tumoral que en la mucosa, donde incluso en la mucosa gástrica de algunos pacientes no se observó esta población (Figura 4A) y un porcentaje de células $CD45^-EpCAM^{low}$ y $CD44^+$ similar entre los tejidos (Figura 4B y C). Debido a que no todas las muestras de mucosa gástrica de los pacientes con CG presentaban la población $CD45^-EpCAM^{high}$, se compararon los niveles de MICA en superficie celular entre la población de células con bajos niveles de EpCAM ($EpCAM^{low}$), que corresponderían a las células de mucosa normal, y las células tumorales, las que presentarían altos niveles de EpCAM (Moldenhauer y col, 1987; Wenqi y col, 2009).

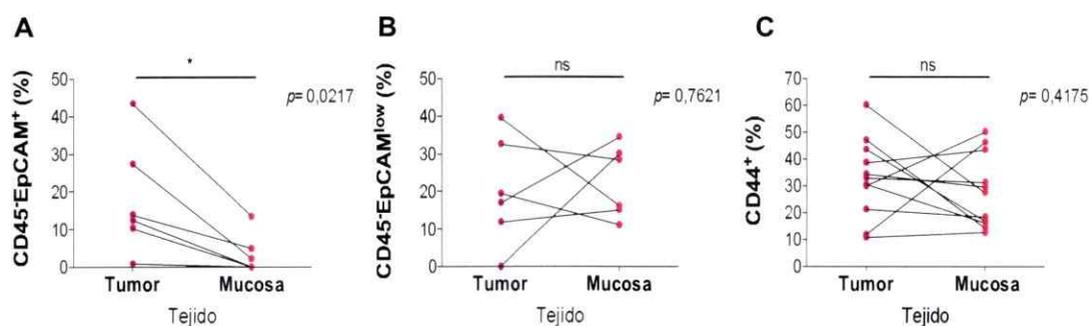


Figura 4. El tejido tumoral presenta un mayor porcentaje de células $CD45^-EpCAM^+$. (A) Porcentaje de células del tumor y mucosa gástrica $CD45^-EpCAM^{high}$, (B) $CD45^-EpCAM^{low}$ (n=6) y (C) $CD44^+$. *, $p < 0,05$.

Para el análisis de las primeras muestras de pacientes, se utilizó sólo el marcador $CD44$ para definir la población de células tumorales, y se procedió a analizar los niveles de MICA en superficie de las poblaciones celulares $P1 CD44^+$, correspondientes al tumor y la mucosa gástrica, como se muestra en la Figura 3. Para las demás muestras, se analizó tanto los niveles de MICA en las poblaciones $CD44^+$ en el tumor y la mucosa, como también las poblaciones $CD45^-EpCAM^{high}$ o

CD45⁻EpCAM^{low}, para poder comparar los niveles de MICA entre las poblaciones definidas con los distintos marcadores.

En la Figura 5, se muestra la intensidad media de fluorescencia (MFI) de MICA en células derivadas del tumor primario y de la mucosa gástrica adyacente al tumor. La MFI específica para MICA se determinó restando la MFI del control de isotipo correspondiente, la cual se muestra en los histogramas correspondientes.

Pudimos demostrar, para esos pacientes con CG, que la población P1 CD44⁺ del tumor posee mayores niveles de MICA en superficie celular en comparación a la población P1 CD44⁺ en la mucosa, pero esto no se observó para los niveles de MICA intracelular (Figura 5B).

Al comparar los niveles de MICA entre la población de células tumorales y células epiteliales de la mucosa adyacente correspondiente (CD45⁻EpCAM^{low} y CD45⁻EpCAM^{high}), se pudo observar que no hay una diferencia significativa respecto a los niveles de MICA tanto en la superficie celular como intracelular (Figura 5A). Por otro lado, se observó que la población P1 CD44⁺ posee niveles significativamente mayores de MICA intracelular que de superficie celular, pero esto no se observó para la población CD45⁻EpCAM^{high} (Figura 5A y B).

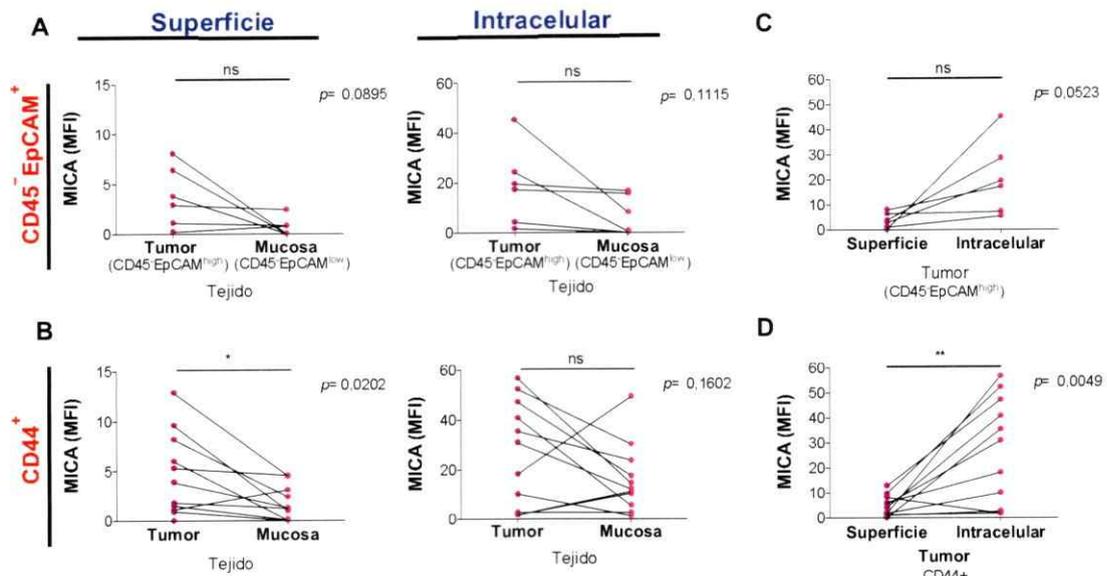


Figura 5. Niveles de MICA en superficie de células tumorales y de mucosa gástrica de pacientes con CG. (A) Niveles de MICA de superficie celular e intracelular, en población $CD45^-EpCAM^{high}$ del tumor y $CD45^-EpCAM^{low}$ de la mucosa (n=6) (B) Niveles de MICA en superficie de células $CD44^+$ en tumor y mucosa (superficie celular e intracelular) (n=11). (C) Niveles de MICA en superficie e intracelular en células $CD45^-EpCAM^{high}$ del tejido tumoral (n=6). (D) Niveles de MICA en superficie e intracelular en células $CD44^+$ del tejido tumoral (n=11). *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$

3.2. Niveles del receptor NKG2D en superficie de células NK infiltrantes del tumor y mucosa

En pacientes con tumores $MICA^+$ o $MICB^+$ (cáncer de mama, pulmón, colon, ovario y melanoma), las células NK y linfocitos T $CD8^+$ infiltrantes de tumor y sistémicos frecuentemente expresan bajos niveles del receptor NKG2D y se encuentran funcionalmente comprometidas (Groh y col, 2002).

En este estudio, se determinaron los niveles de receptor NKG2D en superficie de las células NK obtenidas desde el tejido tumoral y mucosa gástrica de pacientes con

adenocarcinoma gástrico. Pudimos observar que los niveles (MFI) de NKG2D en superficie de las células NK infiltrantes del tejido tumoral fueron significativamente menores que en las células NK de la mucosa (Figura 6A). Sin embargo, esta diferencia no se observó para el porcentaje de células positivas para NKG2D en ambos tejidos (Figura 6B).

Debido a que también se ha descrito que hay una disminución en la expresión de NKG2D en linfocitos T CD8⁺ (Groh y col, 2002), también se analizaron los niveles de este receptor en estas células. Los resultados obtenidos indican que no existe diferencia significativa en el porcentaje células positivas para NKG2D y los niveles de NKG2D (MFI) en superficie entre linfocitos T CD8⁺ infiltrantes del tejido tumoral y mucosa gástrica entre los pacientes analizados (Figura 6C y D)

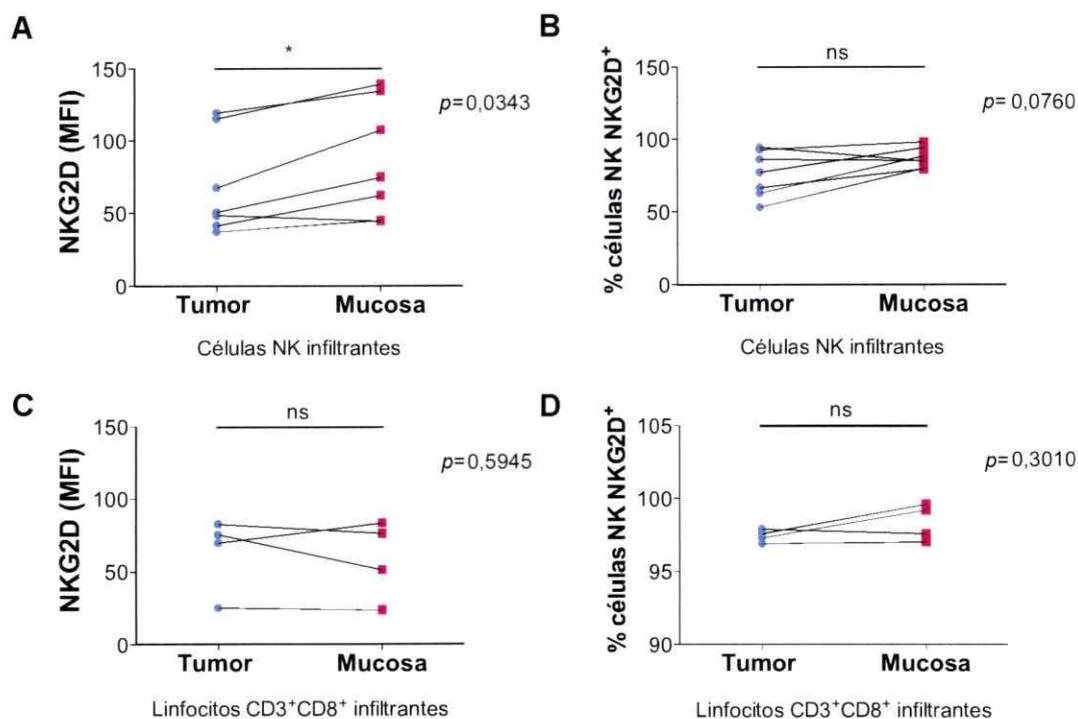


Figura 6. Los niveles del receptor NKG2D están reducidos en células NK infiltrantes de tumores de pacientes con CG. (A y B) Niveles del receptor NKG2D (MFI) en superficie de células NK y porcentaje de células positivas para este receptor en células infiltrantes de tumor (●) y mucosa gástrica (■), respectivamente (n=7). (C y D) Niveles del receptor NKG2D en linfocitos T CD8⁺ (MFI) y porcentaje de células positivas infiltrantes de tumor y mucosa gástrica (n=4). *, p < 0,05

3.3. Niveles del receptor NKG2D en superficie de células NK de sangre periférica en pacientes con CG

Como se mencionó anteriormente, las células NK de sangre periférica de pacientes con cáncer (de mama, pulmón, colon, ovario, próstata, leucemia, glioma y melanoma) también presentan una disminución en la expresión del receptor NKG2D en comparación a individuos sanos (Crane y col, 2010; Salih y col, 2002b; Szczepanski y col, 2011). Por esta razón, se determinaron los niveles de NKG2D (MFI y porcentaje

células positivas) en células NK y linfocitos T CD8⁺ circulantes tanto de pacientes con cáncer gástrico (Figura 7A) como de controles sanos (Figura 7B). Los niveles de NKG2D (tanto MFI como porcentaje de células positivas) en las células NK y linfocitos T CD8⁺ de pacientes con cáncer gástrico (n=10) fueron significativamente menores en pacientes que en los controles sanos (n=11) (Figura 7D).

Luego, se compararon los niveles del receptor NKG2D en las células NK y linfocitos T CD8⁺ presentes en sangre periférica con células infiltrantes de tumor y se observó que los niveles de este receptor en superficie de las células NK y linfocitos T CD8⁺ presentes en el tejido tumoral fueron significativamente menores que en las células NK y linfocitos T CD8⁺ circulantes (Figura 8A y B).

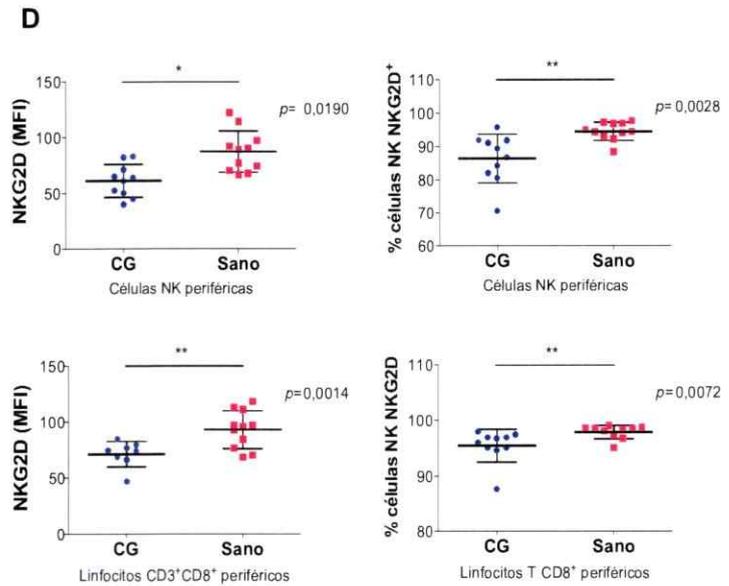
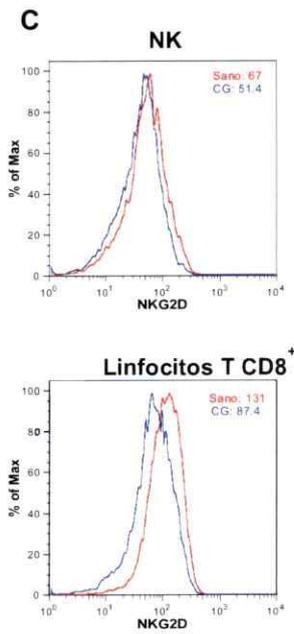
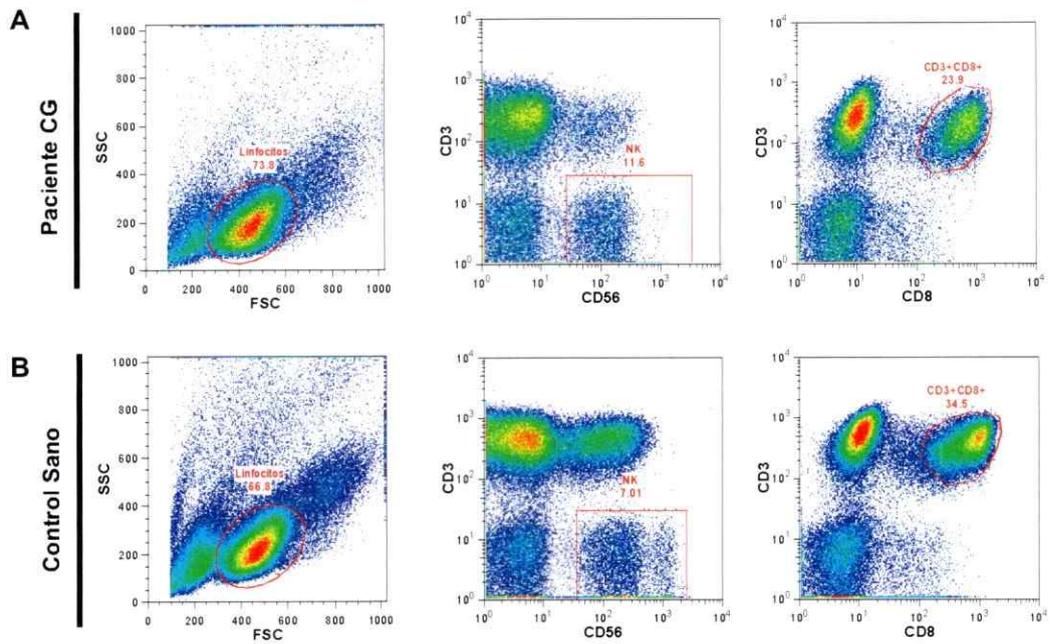


Figura 7. Niveles del receptor NKG2D en superficie de células NK y T CD8⁺ circulantes en pacientes con CG. (A y B) *Dot plots* que muestran las propiedades de FSC *versus* SSC del PBMC de un paciente con CG y de un control sano (ambos representativos para este análisis). La población de linfocitos fue seleccionada según las propiedades de SSC y FSC (círculo rojo). Luego, la población de células NK y linfocitos T CD8⁺ fue definida como CD3⁻CD56⁺ y CD3⁺CD8⁺, respectivamente. (C) Histogramas representativos de los niveles de NKG2D en superficie de células NK y linfocitos T CD8⁺ en un paciente con CG y un control sano. Los números corresponden a los valores de MFI. Histograma rojo: control sano, histograma azul: paciente CG. (D) Expresión de NKG2D en células NK y T CD8⁺, MFI y porcentaje de células positivas circulantes en 10 pacientes con CG (●) y 10 controles sanos (■). **, $p < 0,01$

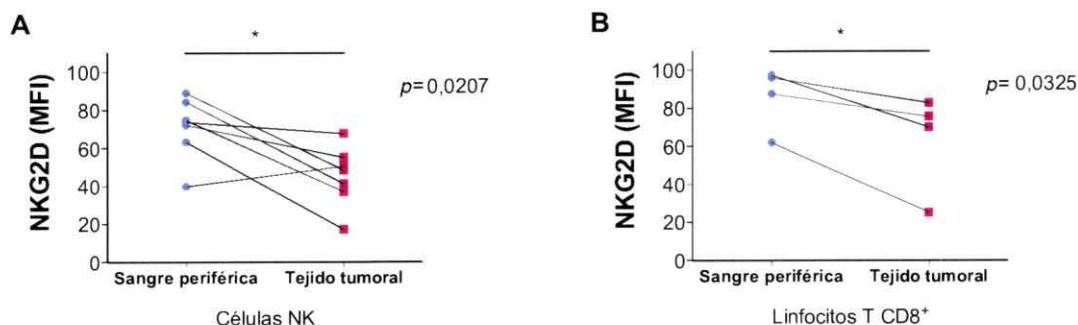


Figura 8. Niveles del receptor NKG2D en superficie de células NK y linfocitos T CD8⁺ infiltrantes del tumor. (A) Niveles del receptor NKG2D (MFI) en superficie de células NK (n=7) y (B) linfocitos T CD8⁺ (n=4) circulantes (●) e infiltrantes de tumor (■) en pacientes con CG. Los puntos unidos por una línea representan al mismo individuo. *, $p < 0,05$.

La presencia de MICA en las células tumorales se ha correlacionado con una disminución en los niveles de NKG2D en células NK y linfocitos T CD8⁺ (Groh y col, 2002). Por esta razón, se asociaron los niveles de MICA en superficie de las células tumorales gástricas y de NKG2D en las células NK y linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica. Tanto para las células NK como los linfocitos T CD8⁺, los niveles de NKG2D se correlacionaron negativamente con los niveles de MICA en superficie de células CD44⁺ presentes en el tumor de pacientes con CG (Figura 9B). Sin embargo, no se

encontró una correlación entre los niveles de NKG2D con los niveles de MICA en superficie de las células $CD45^-EpCAM^+$ presentes en el tumor (Figura 9A).

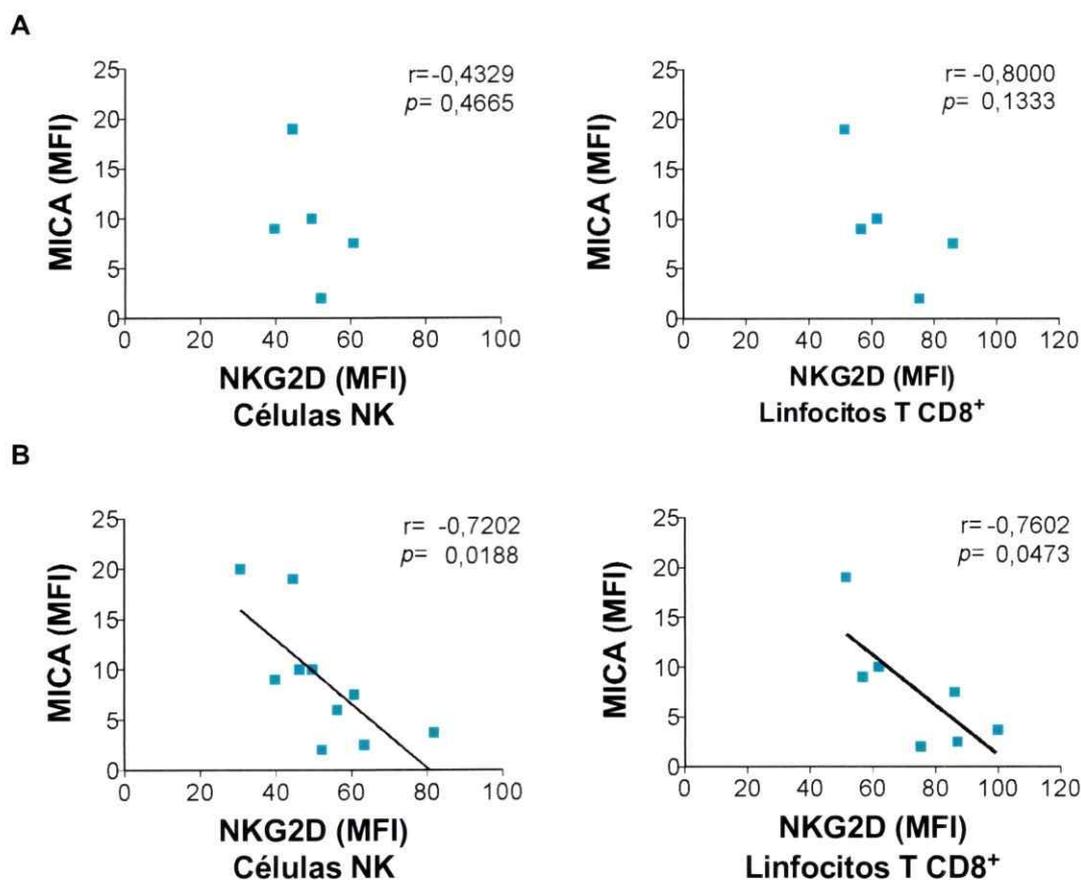


Figura 9. Correlación entre los niveles de MICA en superficie de células tumorales de pacientes con cáncer gástrico y expresión de NKG2D en células NK. (A) Correlación entre los niveles de NKG2D (MFI) en superficie de células NK (n=10) o en linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica (n=7) y los niveles de MICA en superficie (MFI) de la población $CD45^-EpCAM^+$ en el tumor de pacientes con CG. (B) Correlación entre los niveles de NKG2D (MFI) en superficie de células NK (n=5) o en linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica (n=5) y los niveles de MICA en superficie (MFI) de la población $CD44^+$ en el tumor. Los análisis estadísticos se realizaron por el test de correlación de Spearman.

3.4. Niveles de sMICA sérico en pacientes con CG

Debido a que sMICA está asociado con la regulación negativa de la expresión del receptor NKG2D en las células NK de pacientes con cáncer de próstata, pulmón, mama, colón (Dobrovina y col, 2003; Groh y col, 2002; Wu y col, 2004a), en este estudio, se evaluaron los niveles séricos de sMICA en los pacientes con CG y en controles sanos. Las concentraciones promedio de sMICA en el suero obtenido de pacientes con CG y controles sanos fueron de 196,5 y 49,5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Como se muestra en la Figura 10, la concentración de sMICA sérico en los pacientes evaluados fue significativamente mayor en comparación a los controles sanos testeados.

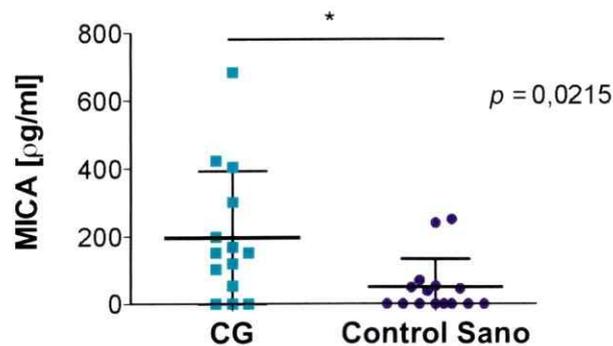


Figura 10. Niveles séricos elevados de sMICA en pacientes con cáncer gástrico. Niveles de sMICA en suero de pacientes con cáncer gástrico (■) (n=13) y controles sanos (●) (n=13). Los datos mostrados corresponden al promedio de triplicados. Cada punto corresponde a un individuo, y los valores promedio de cada grupo se muestran como líneas horizontales \pm la desviación estándar. *, $p < 0,05$

Para evaluar la posible consecuencia funcional que tendría la presencia de mayores niveles de sMICA en el suero de los pacientes con cáncer gástrico, se correlacionaron los niveles del receptor NKG2D en superficie de células NK y linfocitos T CD8⁺ periféricos con los niveles de sMICA séricos en estos pacientes. Como se muestra en la Figura 11, no se observó una correlación entre los niveles de sMICA y de NKG2D en las células NK o linfocitos T CD8⁺.

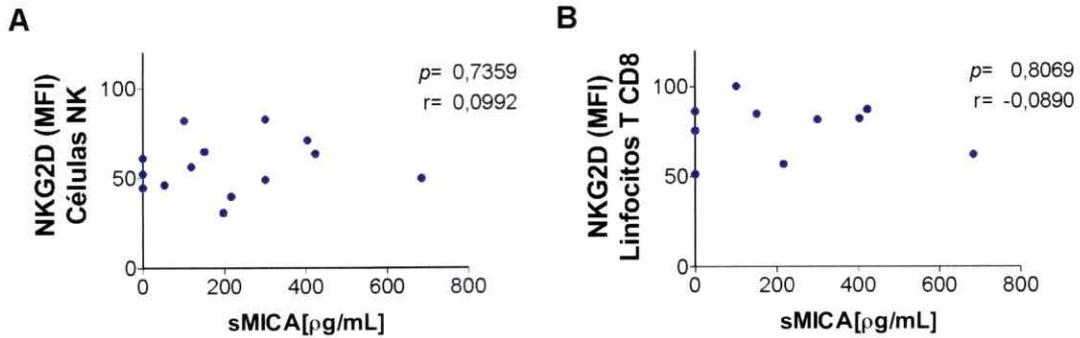


Figura 11. Asociación entre los niveles séricos de sMICA séricos en pacientes con cáncer gástrico y los niveles del receptor NKG2D en superficie de células citotóxicas. (A) Correlación entre los niveles séricos de sMICA en pacientes con CG (n=14) y los niveles de NKG2D (MFI) en superficie de células NK y (B) de linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica (n=10). Los análisis estadísticos se realizaron con por el test de correlación de Spearman.

3.5. Expresión de CD107a y producción de IFN- γ por células NK en pacientes con CG

Una disminución en los niveles del receptor NKG2D en superficie de las células NK está asociada a una función defectuosa en estas células (Vivier y col, 2002). En este estudio, se evaluó la funcionalidad de las células NK de sangre periférica mediante el análisis del potencial citolítico (externalización de CD107a) y la producción de IFN- γ en respuesta al desafío con células blanco: K562 (negativas para MHC-I, control positivo de activación de células NK) y la línea celular de cáncer gástrico MKN45, la que expresa MICA en su superficie (Figura 12A).

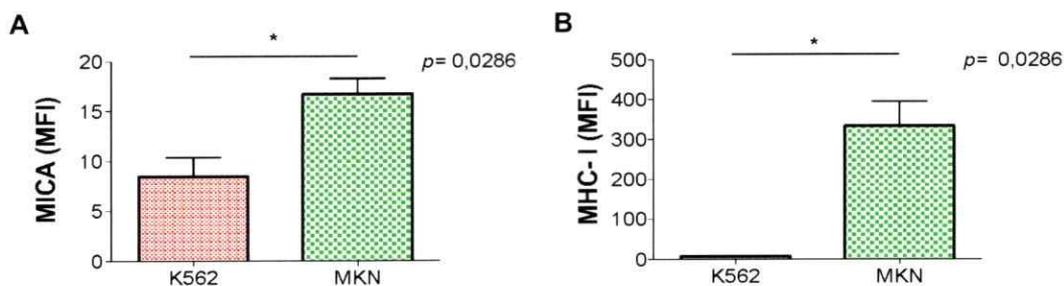


Figura 12. La línea celular de adenocarcinoma MKN45 posee mayores niveles de MICA y MHC-I que células K562. (A) Niveles de MICA y (B) MHC-I en las líneas celulares K562 y MKN45.

Luego de 6 h de co-cultivo entre PBMC de pacientes o controles sanos y las líneas celulares (Figura 13B), se evaluaron los niveles de CD107a e IFN- γ de las células NK presentes en el PBMC. El control sin estímulo, en el cual las células efectoras son cultivadas en ausencia de células blanco, permite determinar la degranulación espontánea de las células NK. Como control positivo, se muestran los niveles de CD107a e IFN- γ en un control sano y paciente con CG representativos al co-cultivarlos con células K562 (Figura 13D y E).

Los niveles de CD107a en las células NK fueron significativamente mayores en los controles sanos en comparación a los pacientes con cáncer gástrico cuando el PBMC se co-cultivó con la línea K562. Sin embargo, no se obtuvo una diferencia significativa para los niveles de IFN- γ en las células NK entre controles sanos y pacientes con CG co-cultivadas con esta misma línea celular (Figura 13F). Al evaluar la funcionalidad de las células NK enfrentadas con una línea celular de CG (MKN45), no se observó una diferencia significativa para el porcentaje de células NK positivas para CD107a entre controles sanos y pacientes con CG, ni para el porcentaje de células NK que expresa IFN- γ (Figura 13G).

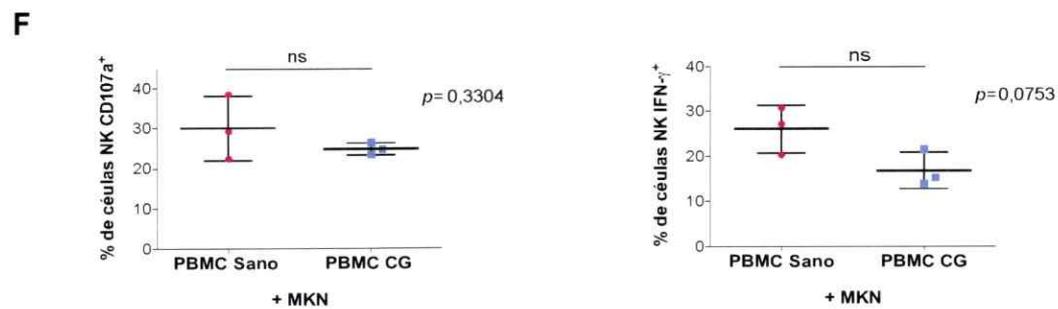
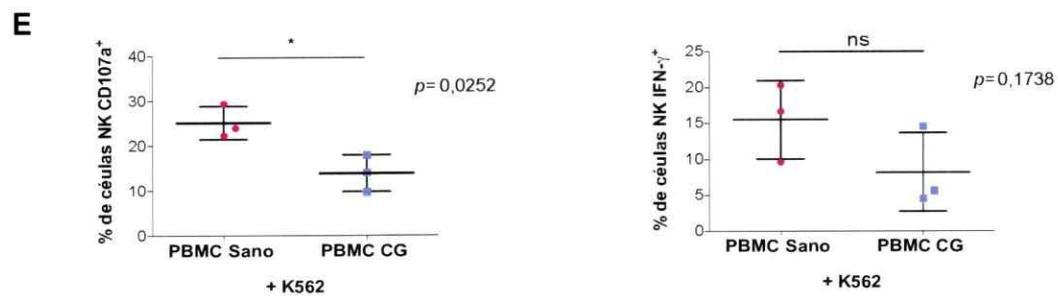
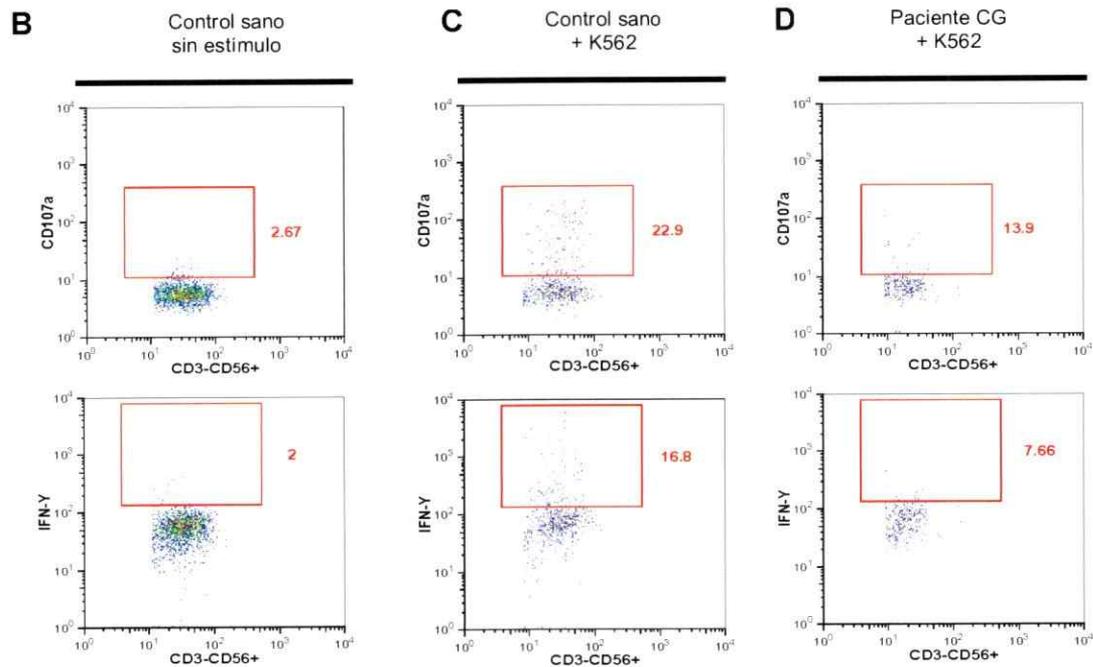
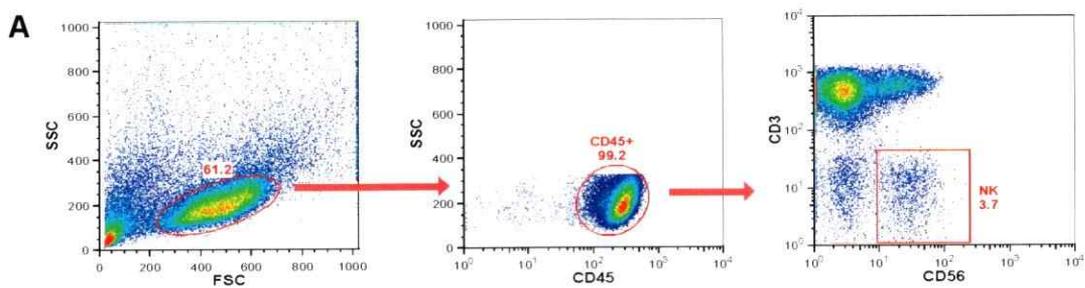


Figura 13. Niveles de CD107a y producción de IFN- γ por células NK circulantes en pacientes con CG. (A) *Dot plot* que muestra las propiedades de FSC versus SSC de un PBMC sano representativo. La población de linfocitos fue seleccionada según las propiedades de SSC y FSC (círculo rojo). Luego, se seleccionaron las células CD45⁺ y, de esta población, se definieron las células NK como CD3⁻CD56⁺. (B) *Dot plots* representativos que muestran la expresión de CD107a e IFN- γ por células NK de un control sano sin estimul, (C) control sano y (D) paciente con cáncer gástrico estimulados con células K562. Los valores en los cuadrantes representan los porcentajes de células NK positivas para CD107a o IFN- γ . Los datos agrupados muestran el porcentaje de células NK positivas para CD107a o IFN- γ para controles sanos (n=3) y pacientes con CG (n=3) cuando desafiados con (E) células K562 o (F) MKN45.

3.6. Efecto del suero de pacientes con CG sobre la expresión de NKG2D en células NK normales

En muchos tipos de cáncer, la expresión del receptor NKG2D puede disminuir en las células NK y linfocitos T CD8⁺ mediante la liberación de uno o más ligandos de NKG2D, en forma soluble, por las células tumorales (Groh y col, 2002). Estos ligandos solubles se pueden unir al receptor NKG2D y promover su internalización. La disminución resultante en los niveles de NKG2D en la superficie celular afecta la lisis de las células tumorales, y, probablemente, sirve como un mecanismo de escape inmune, favoreciendo la supervivencia de las células tumorales (Groh y col, 2002).

En este estudio, se evaluó el posible efecto de sMICA del suero de pacientes con CG sobre los niveles de NKG2D en la superficie de células NK. Como control positivo de la disminución de los niveles de NKG2D en superficie de las células NK mediado por sMICA, se utilizó MICA recombinante (rMICA) comercial. El PBMC sano fue cultivado con rMICA, lo que indujo una disminución en los niveles de NKG2D en las células NK, efecto inhibido al pre-incubar rMICA con el mAb anti MICA AMO1 (Figura 14A). La actividad bloqueante del anticuerpo anti-MICA AMO1 se pudo confirmar con el

uso de un anticuerpo irrelevante de igual isotipo que el AMO1, con el cual no se observó ningún efecto inhibitorio (Figura 14A, histograma rosado).

Para determinar si sMICA presente en el suero es, en parte, responsable de la disminución de los niveles de NKG2D en superficie de células NK que se observa en los pacientes con CG (Figura 10), se analizó el efecto del suero de pacientes con CG sobre los niveles de NKG2D en células NK de controles sanos.

Para esto, el PBMC de controles sanos fue cultivado con medio RPMI que contenía 30% de suero de pacientes con CG o suero de individuos sanos durante 48 h. Como se muestra en la Figura 14, se observó una reducción en los niveles de NKG2D en la superficie de células NK en presencia de sueros de algunos pacientes con CG (Figura 14B, sueros CG41 y 42, histograma azul). Sin embargo, al pre-incubar los sueros con un anticuerpo AMO1 contra MICA, se observó la misma reducción en los niveles de NKG2D en la superficie de las células NK (Figura 14B, histograma verde), lo que sugiere que algún otro factor soluble (como otro ligando del receptor NKG2D), y no sMICA, produciría la disminución de los niveles del receptor NKG2D en las células NK.

A pesar de que se observó esta disminución de los niveles del receptor NKG2D en presencia de sueros de 2 pacientes con CG, la mayoría de los sueros de los pacientes probados no presentó ningún efecto en los niveles de este receptor en las células NK. Además, no se observó ninguna disminución en los niveles de NKG2D en superficie cuando se cultivaron las células con sueros controles normales o con sueros de pacientes con CG que no presentaban niveles detectables de sMICA en el suero (Figura 14C y D, sueros CG55, sano1 y sano2).

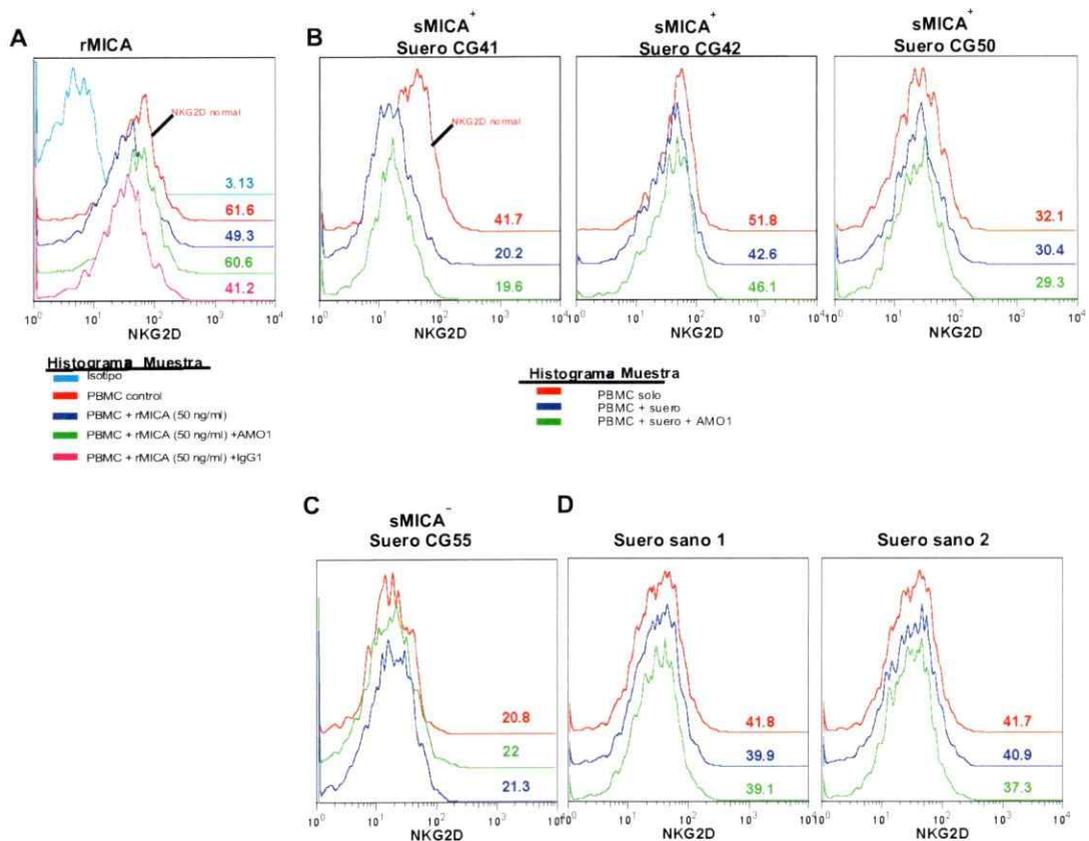


Figura 14. El suero de algunos de pacientes con CG disminuye los niveles de NKG2D en superficie de células NK. (A) Efecto de rMICA (50 ng/ml) sobre los niveles de NKG2D en superficie células NK de un control sano. Efecto de suero de paciente con CG sobre los niveles de NKG2D: (B) suero CG positivos para sMICA, (C) suero CG negativo para sMICA y (D) también de sueros de controles sanos. Los niveles de NKG2D en células NK se evaluó después de cultivar PBMC de un control sano con medio RPMI que contenía suero de paciente con CG o de un control sano durante 24 h (histograma rojo/azul, respectivamente). También se evaluó el efecto del pre-tratamiento del suero con el mAb anti MICA AMO1 (histograma verde). Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

3.7. Efecto del sobrenadante de cultivo de tejido tumoral de CG sobre la expresión de NKG2D en células NK normales

Para estudiar si MICA es liberado por los tumores de CG en forma soluble, un trozo de tumor se dejó cultivando en medio RPMI-10 durante 24 h, y luego, mediante ELISA, se determinó la concentración de sMICA en el sobrenadante de cultivo. Se pudo detectar la presencia de sMICA en todos los sobrenadantes de cultivo de tumores derivados de pacientes con CG (Figura 15A). Además, es posible que otros ligandos del receptor NKG2D, como MICB, sean capaces de inducir la disminución de los niveles de NKG2D en superficie de células NK. Por esta razón, en este estudio se decidió evaluar si el ligando MICB, en forma soluble, participa en la disminución de los niveles de NKG2D en superficie celular. MICB soluble ha sido involucrado en distintas enfermedades malignas (Holdenrieder y col, 2006b); sin embargo, su rol en CG no ha sido descrito. En este estudio, efectivamente, también se detectó sMICB en el sobrenadante de cultivo de los mismos trozos de tumor (Figura 15B) por ELISA. Por lo tanto, dado que las células tumorales secretan sMICA y sMICB, se evaluó el efecto de estos sobrenadantes en los niveles del receptor NKG2D en superficie de células NK periféricas de individuos sanos (Figura 16).

Luego de cultivar PBMC de donantes sanos con el sobrenadante de cultivo de tumor y de mucosa durante 24 h, se pudo observar una disminución en los niveles de NKG2D en superficie en células NK y en el porcentaje de células NK periféricas positivas para NKG2D en comparación al control, que corresponde al PBMC cultivado sólo en medio RPMI (Figura 16B, F y A, respectivamente). Sin embargo, esta reducción de los niveles del receptor NKG2D no es al nivel de las células NK infiltrantes del mismo tumor (Figura 16H). Además, cuando se trató previamente el

sobrenadante de cultivo de tumor con el anticuerpo mAb anti MICA AMO1, la reducción de los niveles de NKG2D se mantuvo al igual que con el control del anticuerpo (del mismo isotipo que AMO1) (Figura 16C y E, respectivamente).

También se evaluó el efecto de los sobrenadantes en los niveles de NKG2D en superficie de células NK al pre-tratarlos previamente con un anticuerpo anti MICA/B, pero se observó la misma reducción de los niveles de NKG2D observada cuando se cultivaron las células solamente con los sobrenadantes o cuando se trataron previamente a estos sobrenadantes con AMO1 (Figura 16D).

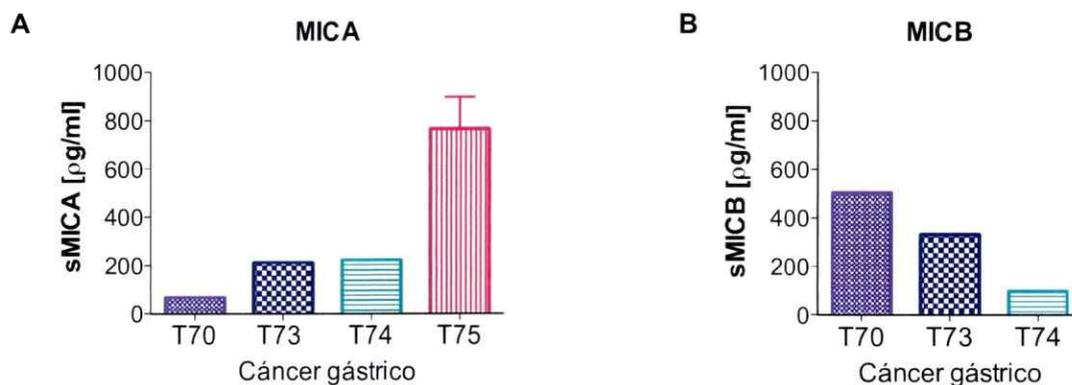


Figura 15. El sobrenadante de cultivo de tumor gástrico presenta tanto sMICA como sMICB. (A) Niveles de sMICA (n=4) y (B) sMICB (n=3) en sobrenadante de cultivo de tumores de pacientes con CG, durante 24 h, evaluado por ELISA. T: Tumor y M: Mucosa

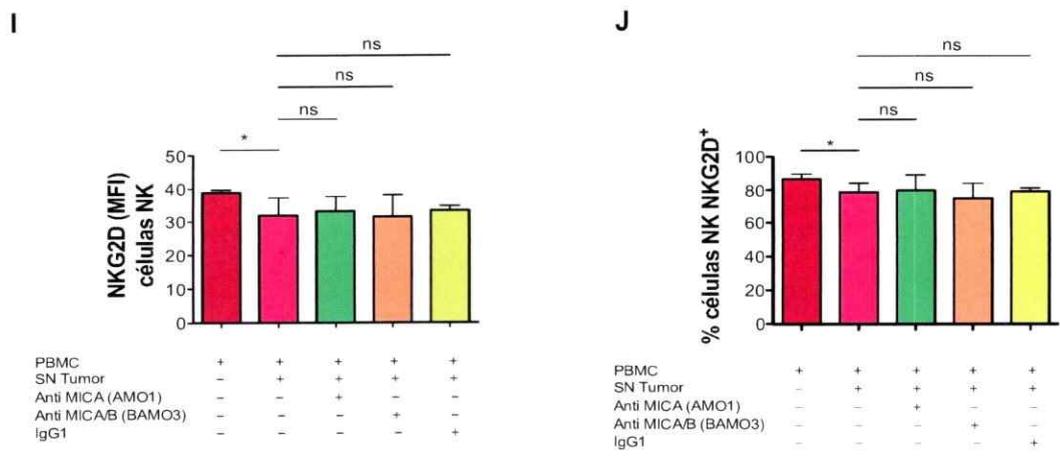
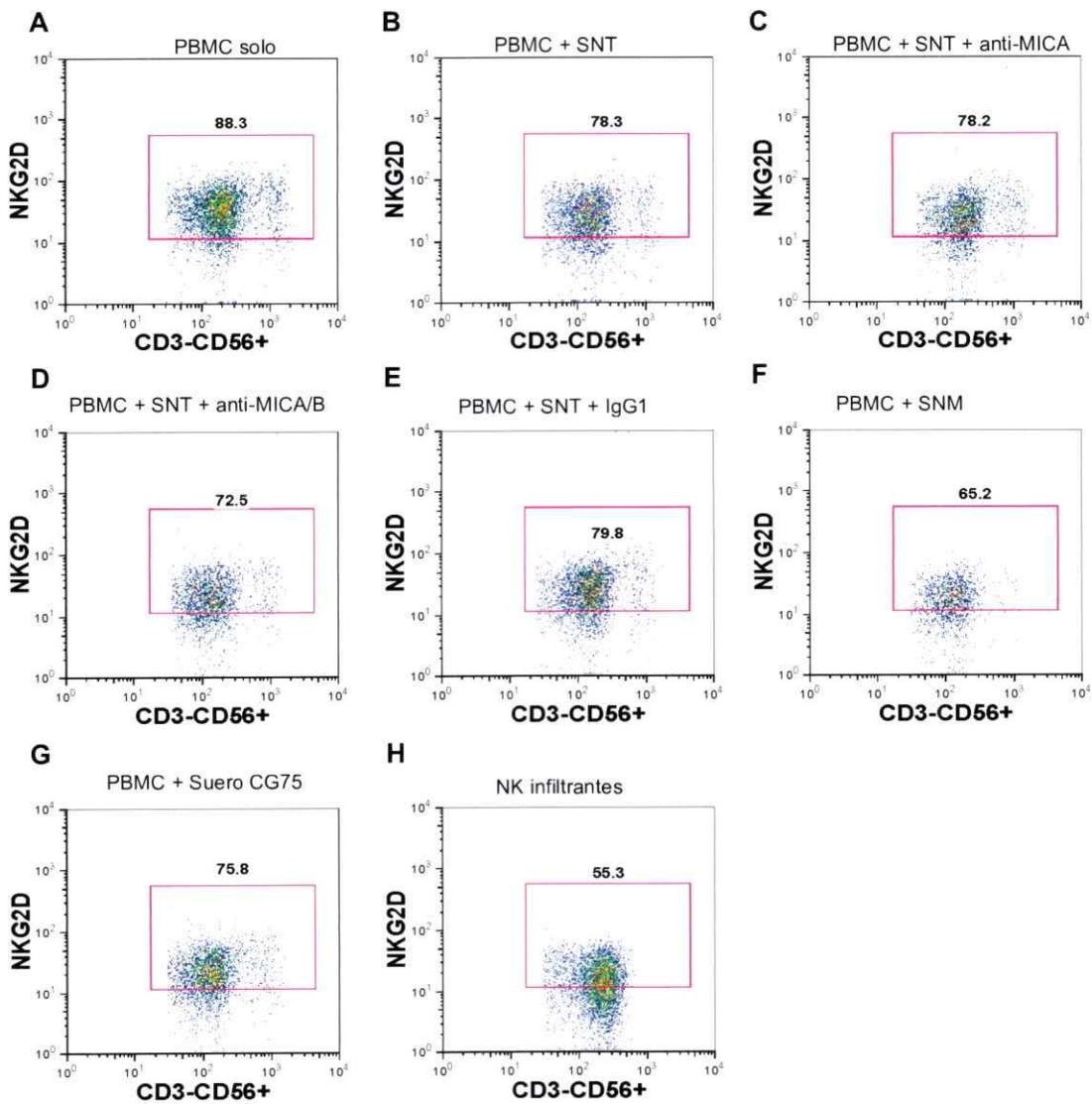


Figura 16. Efecto del sobrenadante de cultivo de un tumor MICA⁺ sobre los niveles de NKG2D en células NK. (B) *Dot plots* representativos de los niveles de NKG2D en superficie de las células NK periféricas de un donante sano, que muestran el porcentaje de células positivas para NKG2D. Las condiciones de cultivo del PBMC se encuentran descritas sobre el dot plot correspondiente. (B) El PBMC se cultivó con sobrenadante de cultivo de tumor (SNT), y se midió el (C) efecto del pre-tratamiento de este sobrenadante con el mAb anti MICA AMO1, (D) anti-MICA/B BAMO1 o (E) con el control de anticuerpo irrelevante (IgG1). (F) Además, se evaluó el efecto del sobrenadante de cultivo de mucosa gástrica adyacente al tumor (SNM) y (G) suero del mismo paciente con CG. (H) Niveles de NKG2D en células NK infiltrantes de este tumor. (I) En total, se evaluaron los sobrenadantes de cultivo de tumores derivados de 4 pacientes con CG, y se muestran los niveles de NKG2D en superficie de células NK y (J) el porcentaje de células NK positivas para NKG2D, al cultivar el PBMC con estos sobrenadantes de cuatro pacientes en las condiciones descritas.

Debido a que detectamos MICB soluble en el sobrenadante de cultivo de tumores gástricos, también evaluamos los niveles de MICB séricos en pacientes con CG. La concentración promedio de sMICB en los pacientes con CG fue de 44,9 pg/ml y no se observó una diferencia significativa con los niveles de sMICB en donantes sanos (Figura 17A). Además, no se observó una correlación entre los niveles de sMICA y sMICB séricos (Figura 17B).

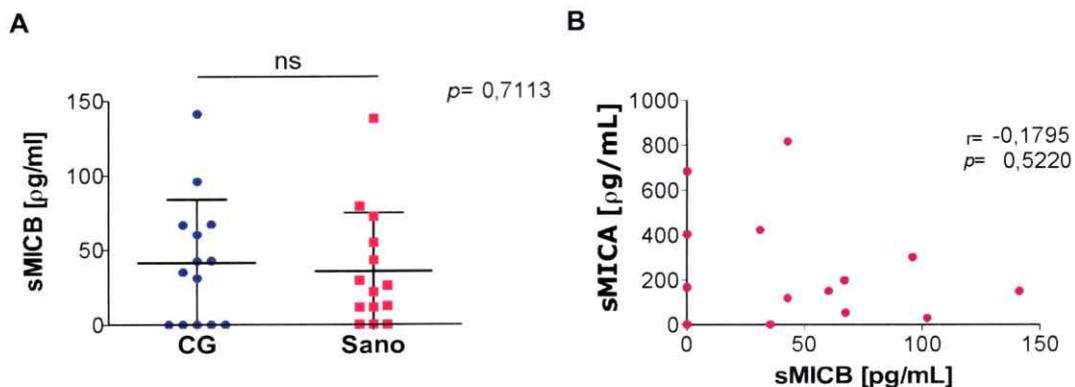


Figura 17. Presencia de sMICB en el suero de pacientes con cáncer gástrico. (A) Niveles de sMICB en suero de pacientes con cáncer gástrico (■) y controles sanos (●) (n=13). Los datos mostrados corresponden al promedio de duplicados. Cada punto corresponde a un individuo, y los valores promedios de cada grupo se muestran como líneas horizontales ± la desviación estándar. (B) Correlación entre niveles de sMICA y sMICB séricos de pacientes con CG (n=13).

3.8. Correlación de los niveles en superficie del receptor NKG2D, MICA y sMICA con los parámetros clínico-patológicos de la enfermedad

Debido a que se observaron niveles reducidos del receptor NKG2D en superficie de células NK circulantes e infiltrantes del tumor primario en pacientes con CG en comparación a controles sanos y mucosa gástrica, respectivamente (Figuras 6 y 7), se evaluó si esta característica se asociaba con los parámetros clínico-patológicos de la enfermedad. Se observó que el tamaño de los tumores gástricos se correlacionaba inversamente con los niveles de NKG2D en células NK periféricas (Figura 18A). Además, los pacientes que se encontraban en estados más avanzados de la enfermedad (etapas III y IV) presentaron niveles de NKG2D en superficie de células NK significativamente menores que pacientes en estados más tempranos de la enfermedad (etapas I y II) (Figura 18C). Las células NK de los pacientes con tumores bien diferenciados y con una mayor extensión de invasión tumoral (T3/T4) poseen niveles significativamente menores de NKG2D en comparación a pacientes con tumores poco diferenciados y con menor extensión de invasión (T1/T2), respectivamente (Figura 18D). En cuanto a los otros parámetros clínico-patológicos, no se encontró una asociación con los niveles de NKG2D (Figura 18B y F).

Dado que se detectó sMICA en el suero de los pacientes con CG, se quiso evaluar si los niveles séricos de sMICA de estos pacientes podrían ser utilizados como un posible marcador en el diagnóstico diferencial y estadio del cáncer. Sin embargo, no se encontró una asociación entre los niveles de sMICA y los parámetros clínico-patológicos de pacientes con CG (Figura 19), tampoco para los niveles séricos de sMICB (datos no mostrados).

Por otro lado, se observó que los niveles de MICA en superficie de las células tumorales son significativamente mayores en pacientes con mayor extensión tumoral (T3/T4) en comparación a los pacientes con menor extensión del tumor (T1/T2). Sin embargo, no se encontró una asociación entre los niveles de MICA en la superficie de células presentes en el tumor y otros parámetros clínico-patológicos del CG (Figura 20E).

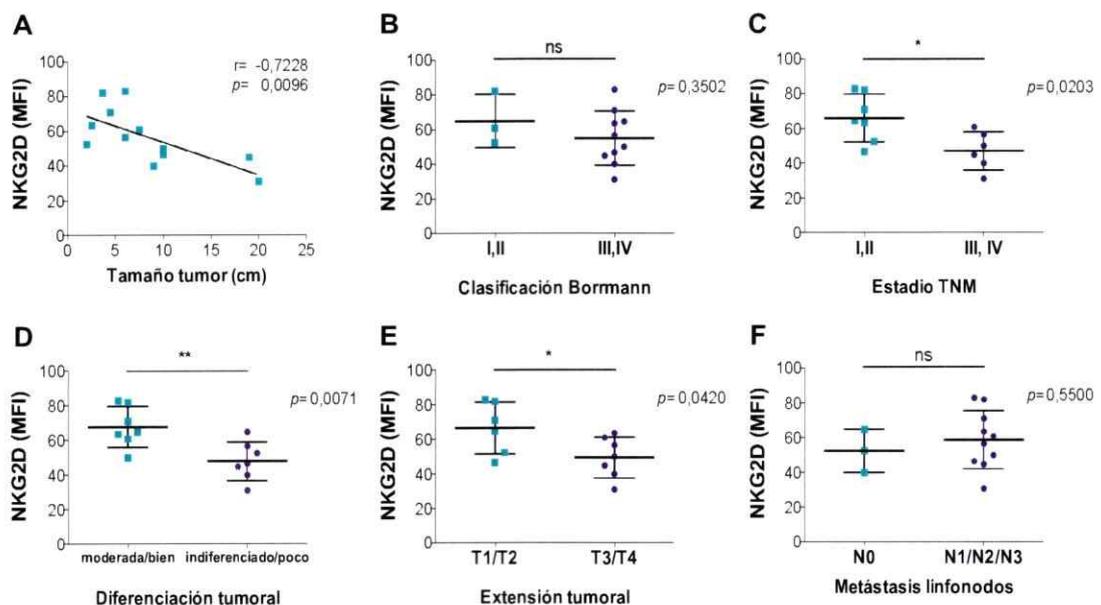


Figura 18. Correlación entre los parámetros clínico-patológicos de pacientes con CG y los niveles de NKG2D en superficie en células NK. (A) Correlación del tamaño del tumor gástrico con los niveles de NKG2D en superficie de células NK periféricas de pacientes con CG. Los niveles NKG2D en pacientes con CG fueron agrupados según: (B) clasificación de Borrmann, (C) estadio TNM (I,II y III,IV), (D) diferenciación tumoral (indiferenciado/ poco diferenciado y moderado/bien diferenciado), (E) extensión tumoral (T1/T2 y T3/T4) y (F) metástasis hacia los linfonodos (N0 = negativa y N1,2,3 = positiva).

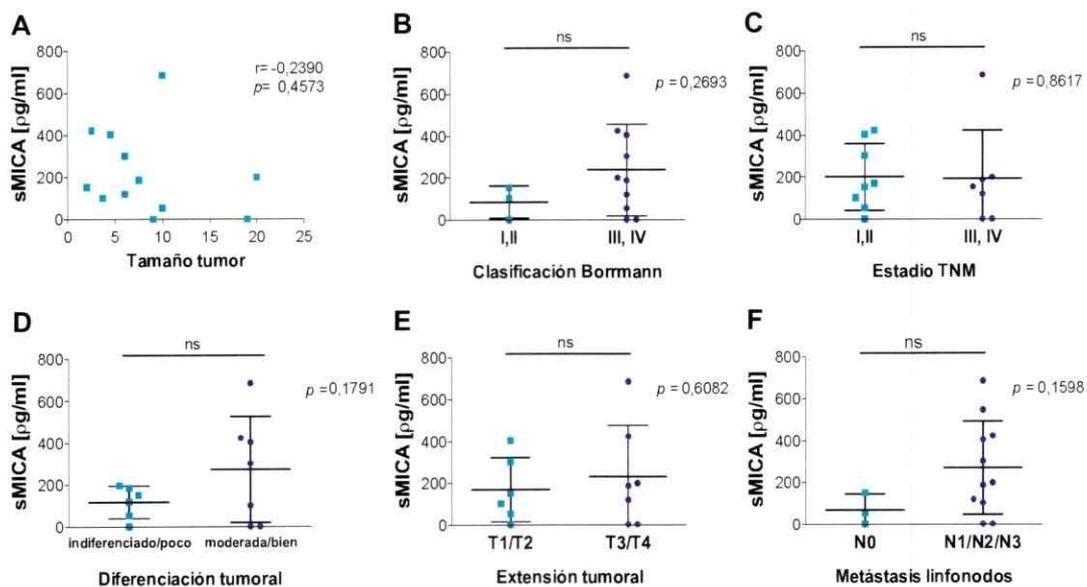


Figura 19. Correlación entre los parámetros clínico-patológicos de pacientes con cáncer gástrico y los niveles séricos de sMICA. (A) Correlación entre el tamaño de los tumores gástricos y los niveles de sMICA séricos en pacientes con CG. Los niveles de sMICA séricos en pacientes CG fueron agrupados según: (B) clasificación de Borrmann, (C) estadio TNM (I,II y III,IV), (D) diferenciación tumoral (indiferenciado/poco diferenciado y moderado/bien diferenciado), (E) extensión tumoral (T1/T2 y T3/T4) y (F) metástasis hacia los linfonodos (N0 = negativa y N1/N2/N3 = positiva).

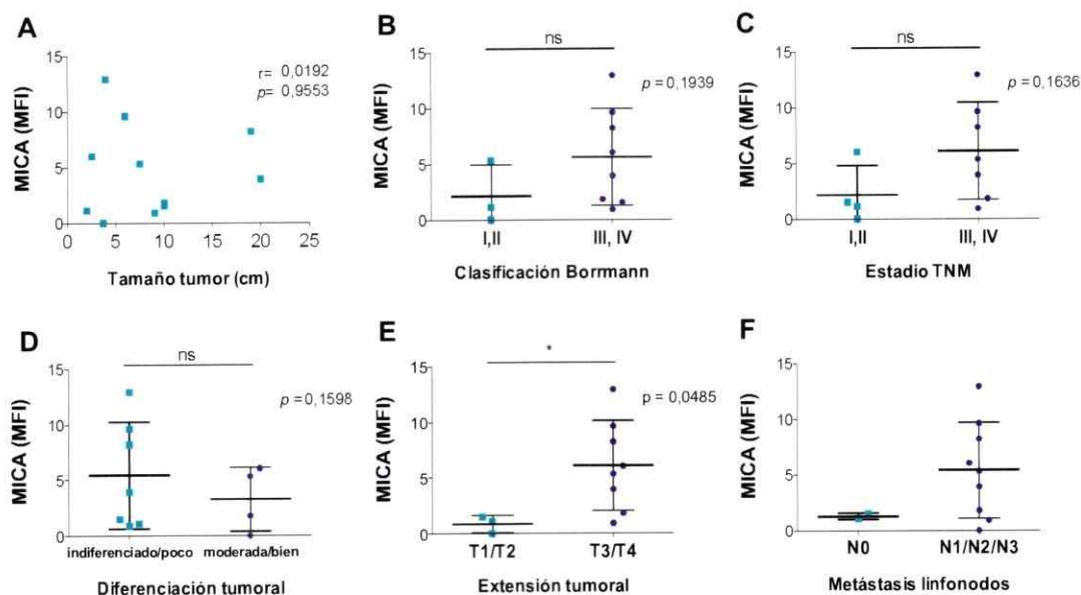


Figura 20. Correlación entre los parámetros clínico-patológicos de pacientes con cáncer gástrico y los niveles de MICA en CG. (A) Correlación entre el tamaño de los tumores gástricos y los niveles de MICA (MFI) en superficie de células tumorales de CG. Los niveles de expresión de MICA (MFI) en tumores gástricos fueron agrupados según: (B) clasificación de Borrmann, (C) estadio TNM (I,II y III,IV), (D) diferenciación tumoral (indiferenciado/ poco diferenciado y moderado/bien diferenciado), (E) extensión tumoral (T1/T2 y T3/T4) y (F) metástasis hacia los linfonodos (N0 = negativa y N1/N2/N3 = positiva).

Finalmente, se estudió la **sobrevida** de los pacientes con CG durante un periodo de 13,2 meses después de haberse realizado la operación para remoción del tumor. De los 13 pacientes que se realizó la gastrectomía total, 4 de ellos (31%) fallecieron durante el período analizado (Figura 21A).

Para evaluar si los niveles del receptor NKG2D en superficie de las células NK tenía correlación con la sobrevida de los pacientes, se realizó un análisis de sobrevida según el método de Kaplan-Meier, y las curvas de sobrevida se compararon utilizando la prueba de Log-rank.

Primero, se determinó el punto de corte para la intensidad de fluorescencia (MFI) de NKG2D utilizando la curva ROC para distinguir entre niveles altos (MFI > 66,8) y bajos (MFI < 66,8). Lo mismo se realizó para los niveles séricos de sMICA, donde se establecieron 2 grupos de pacientes según los niveles de sMICA: altos (sMICA > 85 pg/ml) y bajos (sMICA < 85 pg/ml), también según la curva ROC.

El análisis de sobrevida de Kaplan-Meier para NKG2D reveló que no hay una diferencia significativa en la sobrevida entre los pacientes que poseen altos y bajos niveles del receptor (Figura 21B). También se analizó si la expresión de sMICA en el suero se correlacionaba con la sobrevida de los pacientes con CG. Los pacientes se agruparon de acuerdo a los valores de expresión de sMICA alto y bajo. Sin embargo, tampoco se observó una diferencia en la sobrevida entre los pacientes con niveles séricos elevados y bajos de sMICA (Figura 21C). Finalmente, se determinó si existía una relación entre la sobrevida de los pacientes y los niveles de MICA en superficie de las células tumorales. Se consideraron niveles bajos de MICA al percentil 25 (MFI < 3,4) y niveles altos de MICA sobre este valor de MFI. Sin embargo, tampoco se observó una diferencia en la sobrevida entre ambos grupos de pacientes (Figura 21D).

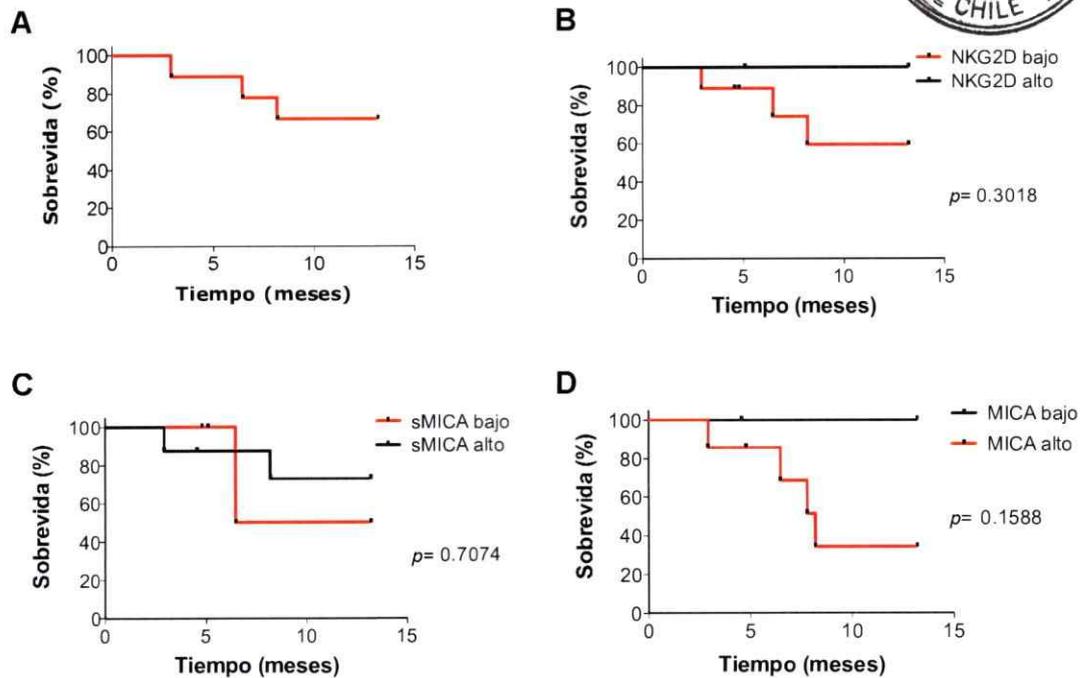


Figura 21. Pronóstico post operatorio de pacientes con CG de acuerdo a los niveles de NKG2D, MICA y sMICA. (A) Curva de sobrevivida (Kaplan-Meier) general de 13 pacientes con cáncer gástrico después de la gastrectomía total. (B) Curvas de sobrevivida (Kaplan-Meier) de acuerdo a los niveles de NKG2D en superficie de células NK periféricas en pacientes con CG. Los pacientes se agruparon de acuerdo a los valores de MFI de NKG2D alto o bajo. (C) Gráfico de Kaplan-Meier para los pacientes con CG representando sobrevivida general de acuerdo a los niveles séricos de sMICA, alto o bajo. (D) Curva de sobrevivida para los pacientes con CG representando sobrevivida general de acuerdo a los niveles de MICA en la superficie de células tumorales gástricas, alto o bajo (MFI <3,4 o MFI >3,4).

4. DISCUSIÓN

4.1. Expresión de MICA en células derivadas del tumor de pacientes con CG

Las células NK son células efectoras importantes para la primera línea de defensa contra los tumores. El receptor activador NKG2D juega un rol crítico en la eliminación de las células tumorales por células citolíticas, como las células NK. Se ha demostrado que la eficiencia de la respuesta inmune antitumoral podría ser críticamente dependiente de los niveles de ligandos de NKG2D expresados en la superficie de las células tumorales. Por lo tanto, una fina regulación de la expresión de los ligandos del receptor NKG2D es muy importante para la inmunovigilancia contra el cáncer (Hayakawa y col, 2002) y la evasión inmune (El-Gazzar y col, 2013). Dentro de los NKG2DL, MICA ha sido uno de los más investigados, y diversos estudios indican que esta molécula juega un rol importante en la inmunidad antitumoral (Jinushi y col, 2003). MICA se ha detectado en varios carcinomas, tales como de pulmón, mama, ovario, próstata y cáncer de colon, y, por consiguiente, ha sido considerado como un antígeno asociado a tumor (Fuertes y col, 2008b; Groh y col, 1999; Watson y col, 2006; Xiao y col, 2008). El cáncer gástrico sigue siendo un problema de salud pública a nivel mundial, y el actual conocimiento del efecto de la expresión de MICA y los otros NKG2DL en este cáncer es limitado.

En este trabajo, estudiamos la expresión de MICA en tumores primarios de CG. Previamente, en nuestro laboratorio, y parte de las muestras analizadas en este estudio, se utilizó como marcador tumoral la molécula CD44, que es altamente expresada en adenocarcinoma gástrico. Su expresión está correlacionada con un mal pronóstico en pacientes con el adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal (da Cunha y

col, 2010; Wenqi y col, 2009). Además, CD44 se ha asociado fuertemente con metástasis en adenocarcinoma gástrico, y también se ha asociado con la recurrencia del tumor y mortalidad en CG (Mayer y col, 1993; Okayama y col, 2009). CD44, además, ha sido reconocido como un marcador de células madre cancerosas en diversos tipos de cáncer, incluyendo CG (Chen y col, 2012; Collado y col, 1991). Debido a que inicialmente utilizamos sólo el marcador CD44 para identificar a las células tumorales, se analizó el *dot blot* de SSC (granularidad) versus los niveles de CD44 en las poblaciones seleccionadas por tamaño y granularidad, excluyendo el *debris* celular. Observamos 2 poblaciones que son positivas para CD44 al analizar las suspensiones celulares obtenidas tanto de tejido tumoral como de mucosa gástrica. Estas poblaciones celulares corresponderían a las células tumorales (o de la mucosa) y una población de leucocitos (Figura 3). Por otro lado, se ha descrito que CD44 es expresado ubicuamente en muchos tipos celulares, incluso linfocitos (Aruffo y col, 1990; Zoller, 2011), por lo que su uso como marcador de células tumorales podría estar limitado. Por esta razón, sería necesario, además, agregar un marcador de leucocitos para poder diferenciar las células tumorales o de mucosa gástrica no sólo por la granularidad o tamaño, sino que a través de otros marcadores de linaje celular.

Para definir la población de las células tumorales obtenidas del tumor primario, se utilizó un nuevo marcador, EpCAM, el cual, a diferencia de CD44, usualmente no se expresa o se expresa en bajos niveles en la mucosa gástrica sana, pero sí es expresado frecuentemente en cáncer gástrico (Balzar y col, 1999b). Este marcador ha sido utilizado previamente para separar poblaciones de células tumorales por citometría de flujo en otros trabajos (Benitez y col, 2011; Yokota y col, 2013). Además, para poder excluir a los linfocitos del análisis, se utilizó el marcador de leucocitos CD45

(Lorenz y col, 1994). Así, en las siguientes muestras analizadas en este trabajo, se utilizaron los marcadores EpCAM y CD45. Tanto en el tumor como en la mucosa gástrica de algunos pacientes, se pudieron definir dos poblaciones no leucocitarias (CD45⁻), según los niveles de EpCAM: una que presentaba bajos niveles y otra con altos niveles de esta molécula de adhesión celular. Altos niveles de EpCAM en las células derivadas de la mucosa podría deberse a que este tejido esté infiltrado con células tumorales. Es posible que la población con baja expresión de EpCAM corresponda a células epiteliales no tumorales, ya que, como se mencionó anteriormente, se ha descrito que esta molécula se expresa en bajos niveles en la mucosa gástrica sana (Balzar y col, 1999b). Interesantemente, los pacientes que presentaban la población EpCAM^{high} en la mucosa gástrica poseían tumores en estado avanzado (III y IV); incluso, 2 de 3 pacientes analizados presentaron muy baja supervivencia luego de la resección del estómago (13 meses) (Lorenz y col, 1994).

Debido a que no todas las muestras de mucosa gástrica de los pacientes con CG presentaban la población CD45⁻EpCAM^{high}, se comparó la expresión de MICA entre la población de células que presentaba bajos niveles de EpCAM (EpCAM^{low}), que deberían corresponder a las células de mucosa normal, y las células tumorales corresponderían a la población con altos niveles de EpCAM (Moldenhauer y col, 1987; Wenqi y col, 2009). Se observó la presencia de MICA en células derivadas del adenocarcinoma gástrico y de la mucosa gástrica adyacente al tumor (Figura 5A). Sin embargo no hay una diferencia entre los niveles de MICA en superficie de células presentes en el tumor y mucosa en los pacientes analizados. Es probable que esta diferencia de expresión de MICA podría resultar significativa si se aumentara el número de pacientes evaluados, ya que se puede observar una tendencia a que los niveles de

MICA sean mayores en el tejido tumoral que en la mucosa gástrica adyacente (Figura 5A). Además, al comparar los niveles de MICA en superficie entre las poblaciones CD44⁺ de tumor y mucosa, podemos observar que, en el tejido tumoral, los niveles de MICA en la superficie celular son significativamente mayores que en la mucosa gástrica (Figura 5B).

Si bien MICA está presente en las células tumorales, es probable que sus niveles en la superficie celular no sean óptimos para estimular adecuadamente la respuesta antitumoral mediada por los linfocitos citotóxicos. Se ha descrito, por ejemplo, que la capacidad de una línea celular que expresa NKG2DL para estimular la respuesta antitumoral depende críticamente de los niveles de NKG2DL en la superficie de las células tumorales (Diefenbach y col, 2001). Debido a que esta actividad está guiada por el balance de señales activadoras e inhibitoras, y así como una expresión de NKG2DL elevada es capaz de gatillar que las células NK superen las señales inhibitorias y se activen, una modesta disminución de NKG2DL puede influenciar críticamente en la reactividad de las células NK (Bauer y col, 1999; Cosman y col, 2001).

Bajos niveles de expresión de NKG2DL podrían indicar que los tumores son capaces de escapar al sistema NKG2DL-receptor al disminuir la expresión de ligandos en la superficie celular, posiblemente mediante la liberación de MICA soluble (Groh y col, 2002), o a través del efecto de alguna citoquina inmunomoduladora que produzca una disminución en la expresión de estos ligandos, como el TGF- β (Friese y col, 2004), o, incluso, mediante la retención de MICA en el retículo endoplásmico (Fuertes y col, 2008a).

En este estudio, también se evaluaron niveles intracelulares de MICA, tanto en células derivadas del tumor como de la mucosa gástrica. Observamos que las células de ambos tejidos presentan MICA intracelular, aunque no se observó una diferencia significativa en los niveles intracelulares de MICA entre el tumor y mucosa (5A y B). Sin embargo, se pudo demostrar que los niveles intracelulares de MICA son significativamente mayores que los de superficie celular (Figura 5D) en la población CD44⁺ en el tejido tumoral. Es posible, por lo tanto, que las células de la mucosa gástrica expresen MICA, pero esta molécula estaría retenida dentro de la célula y no se localizaría en la superficie en niveles suficientes para gatillar finalmente la activación de las células NK. Estos posibles depósitos de MICA se localizarían rápidamente en la superficie celular bajo algún tipo de estrés, como lo es la transformación tumoral (Girardi y col, 2001).

4.2. Expresión de NKG2D en células NK y linfocitos T CD8⁺ en CG

Se han demostrado en diversos estudios que la inmunidad mediada por MICA-NKG2D está afectada en pacientes con cáncer progresivo de mama, pulmón, ovario y de colon (Dobrovina y col, 2003; Groh y col, 2002). Además, se ha descrito que la presencia de sMICA en el suero de pacientes con cáncer interfiere con la inmunidad antitumoral por medio de la regulación negativa del receptor NKG2D en los linfocitos citotóxicos, llevando a una función citotóxica defectuosa (Groh y col, 2002; Jinushi y col, 2005). Tal deficiencia en la función efectora mediada por el receptor NKG2D en estas células se ha propuesto como uno de los mecanismos mediante los cuales los

tumores evaden la inmuno vigilancia y las funciones efectoras de las células NK y linfocitos T CD8⁺ (Groh y col, 2002).

Por lo mismo, en este estudio, también se evaluaron los niveles del receptor NKG2D en la superficie de células NK de sangre periférica de pacientes con CG y se observó que los pacientes poseen niveles significativamente menores de este receptor tanto en las células NK como linfocitos T CD8⁺ en comparación a controles sanos (Figura 7D). Se ha demostrado que la regulación negativa de la expresión del receptor NKG2D tiene implicaciones funcionales para las células NK y linfocitos T CD8⁺, como, por ejemplo produciendo una disminución en la citotoxicidad de las células NK y T CD8⁺ y producción de IFN- γ (Groh y col, 2002; Wiemann y col, 2005b). Por esta razón, se evaluó las funciones efectoras de las células NK en respuesta a las células blanco tumorales K562 y MKN45. Este análisis se realizó mediante la determinación del potencial citolítico (externalización de CD107a) y la producción de IFN- γ , ambos por citometría de flujo. Se observó un menor porcentaje de células NK CD107a⁺ (niveles de degranulación) en los pacientes con CG que en controles sanos al enfrentar estas células citolíticas con la línea K562 (Figura 13F). Sin embargo, al enfrentar las células NK con la línea de adenocarcinoma MKN45, no se observó esta misma diferencia (Figura 13G). Estos resultados pueden deberse a que la línea MKN45 posee altos niveles en superficie de MHC de clase I, y muchos receptores inhibidores de células NK son específicos para esta molécula, por lo que es posible que las células NK tanto de pacientes como de controles sanos presenten mayor inhibición de su activación, lo que contrastaría con la respuesta citolítica ante la línea celular K562, la cual no expresa MHC de clase I (Lozzio & Lozzio, 1975). Adicionalmente, no se observaron diferencias entre los niveles de producción de IFN- γ entre los pacientes con CG y

donantes sanos al enfrentar las células NK con células K562 (Figura 13F y G), lo cual puede deberse a la alta variabilidad en la capacidad de síntesis de IFN- γ entre los pacientes evaluados. Estos resultados se podrían mejorar una vez que se aumente el número de pacientes estudiados, además del aumento en el número de células recolectadas y analizadas en cada experimento, para, así, obtener datos más significativos. Sin embargo, el hecho que las muestras de sangre se tomen durante el procedimiento quirúrgico no nos permite tomar una cantidad de muestra de sangre suficiente para poder realizar este tipo de ensayo para todos los pacientes.

Para determinar más a fondo el mecanismo detrás de los niveles reducidos del receptor NKG2D en superficie de células NK y linfocitos T CD8⁺, se evaluaron los niveles séricos de sMICA en pacientes con CG. Pudimos comprobar que los niveles de sMICA son significativamente mayores en pacientes con CG en comparación a controles sanos (Figura 10). Sin embargo, no se pudo determinar una correlación entre los niveles séricos de sMICA y los bajos niveles del receptor NKG2D en células NK (Figura 11), por lo que es posible que la presencia de sMICA en el suero de los pacientes con CG no esté asociada a la reducción en los niveles de NKG2D en superficie, contrario a lo que describen otros autores para cáncer de páncreas, cervical, hepático, leucemia linfocítica crónica y próstata (Arreygue-García y col, 2008; Duan y col, 2011; Huergo-Zapico y col, 2012; Kohga y col, 2008; Wu y col, 2004b). No obstante ello, se evaluó el efecto de los sueros de pacientes sobre los niveles del receptor NKG2D en superficie de células NK de controles sanos. Sin embargo aunque se observó una disminución en los niveles de NKG2D en superficie de células NK con algunos sueros de pacientes con CG, al pre-tatar estos mismos sueros con un anticuerpo monoclonal anti-MICA, cuya actividad bloqueante ha sido previamente

comprobada en otros trabajos (Eisele y col, 2006; Salih y col, 2003), no se observó que esta reducción en los niveles de NKG2D en las células NK se inhibiera (Figura 14B). Estos resultados sugirieron que sMICA, presente en el suero, no regula negativamente los niveles de NKG2D en estos pacientes. Por otro lado, además de sMICA, la presencia de cáncer en pacientes también se ha correlacionado con un aumento en los niveles solubles de MICB y ULBP1-3 (Hilpert y col, 2012; Holdenrieder y col, 2006b; Marten y col, 2006; Nuckel y col, 2010; Salih y col, 2003; Wu y col, 2004b). De hecho, posteriormente, evaluamos los niveles de sMICB en algunos sueros de pacientes con CG, y observamos que el 70% de los pacientes evaluados presentaron sMICB en el suero (Figura 17). Por lo tanto, es posible que otros ligandos solubles de NKG2D estén afectando los niveles de este receptor en la superficie de las células. Incluso, como pudimos comprobar, es factible que las células tumorales gástricas estén liberando, a la vez, más de un ligando soluble hacia el medio extracelular. Por esta razón, también sería interesante investigar los niveles de otros ligandos de NKG2D en el suero de los pacientes con cáncer gástrico, y evaluar si estos ligandos son responsables de la disminución del receptor NKG2D en células NK al cultivarlas con los sueros de paciente. Por otro lado, el suero de pacientes con tumores contiene otros factores solubles que pueden regular los niveles de NKG2D. Se ha demostrado, por ejemplo, que la presencia de TGF- β puede regular negativamente los niveles de NKG2D en las células efectoras, y que el bloqueo de esta citoquina puede llevar a un aumento en los niveles del receptor NKG2D, independientemente de los niveles séricos de sMICA (Crane y col, 2010; Dasgupta y col, 2005).

Debido a que MICA tiene más de 100 variantes alélicas descritas, también es posible que las variantes presentes en cáncer gástrico tengan una menor afinidad por

el receptor NKG2D (Steinle y col, 2001). Así, es posible que las moléculas de sMICA liberadas en el suero tengan un menor efecto en la disminución del receptor NKG2D, por lo que sería interesante analizar los polimorfismos de estas moléculas en los pacientes con cáncer gástrico.

También es posible que la concentración de sMICA en el suero de los pacientes no sea suficiente para promover un efecto en los niveles de NKG2D en superficie celular. Así, en trabajos en que han demostrado una disminución de los niveles de NKG2D en células NK, al cultivar con sueros de pacientes con cáncer, la concentración de sMICA estaba en el orden de los nanogramos (Groh y col, 2002; Wu y col, 2004b). Además, Groh et al. demostraron que, en experimentos *in vitro* para poder observar una reducción en los niveles del receptor NKG2D pronunciada, se utilizaron 100 ng/ml de rMICA (Groh y col, 2002), lo cual está sobre los niveles fisiológicos de sMICA, ya que la concentración promedio de MICA soluble en el suero de individuos que tienen diversos tipos de tumores es de 228 pg/ml, mientras que los controles sanos presentan 90 pg/ml de sMICA en el suero (Holdenrieder y col, 2006a). Las concentraciones de sMICA en el suero obtenido de pacientes con CG y controles sanos fueron de 196,5 y 49,5 pg/ml, respectivamente. Sin embargo, cuando tratamos las células NK de controles sanos con MICA recombinante en el orden de los picogramos, no se observó un efecto en los niveles de NKG2D, aunque sí pudimos observar una pequeña disminución en los niveles del receptor en superficie celular cuando la concentración de rMICA era de 50 ng/ml (Figura 14A). Más aun, los niveles de sMICA séricos en algunos pacientes no fueron detectables; sin embargo, al cultivar un trozo de sus respectivos tumores en medio de cultivo, sí se pudo detectar la presencia de sMICA en el sobrenadante. Por lo tanto, en el torrente sanguíneo, la concentración de sMICA

sería menor que en el micro ambiente tumoral, lo que también podría explicar porque las células NK infiltrantes de tumor poseen menores niveles de NKG2D en superficie que las células NK circulantes de sangre periférica (Figura 8).

Por lo mismo, para evaluar el efecto de los sobrenadantes de cultivo de tumores gástricos sobre los niveles del receptor NKG2D, se incubaron tumores primarios de CG en medio de cultivo celular por 24 h; se recuperó el sobrenadante y se pudo demostrar, por ELISA, la liberación de sMICA y sMICB en el sobrenadante por parte de los tumores (Figura 15A y B), en los cuales la concentración promedio es de 316,5 y 310,7 $\mu\text{g/ml}$ para MICA y MICB, respectivamente. Al evaluar el efecto de estos sobrenadantes sobre los niveles del receptor NKG2D en superficie de células NK de controles sanos, pudimos demostrar que, efectivamente, se produce una leve pero significativa disminución en los niveles de este receptor en en superficie de células NK (Figura 16I). Sin embargo, es probable que esta disminución no sea debido a la presencia de sMICA en el sobrenadante, ya que, al incubar con el anticuerpo anti-MICA AMO1, no se observó inhibición de la disminución en los niveles del receptor (Figura 16I).

También se utilizó un anticuerpo anti MICA/B para evaluar su efecto bloqueante tanto de sMICA como de sMICB al pre tratar el sobrenadante con este anticuerpo. Sin embargo se observó la misma reducción en el receptor NKG2D en las células NK con estos sobrenadantes pre-tratados que con sobrenadante solo. Sin embargo, no podemos descartar que esta reducción sea debida a sMICB, ya que es posible que este anticuerpo no sea un buen bloqueante de esta molécula. Esto lo podríamos comprobar utilizando MICB recombinante y evaluando su efecto en la disminución de NKG2D y utilizando el anticuerpo anti MICA/B para evaluar si se bloquea este efecto.

Una manera de comprobar que esta disminución sea debido a un NKG2DL soluble, sería mediante la utilización de una proteína de fusión NKG2D-Fc para neutralizar los NKG2DL solubles en el suero, tal como se ha utilizado en otros trabajos (Hilpert y col, 2012).

Por otro lado, la disminución de los niveles de NKG2D en la superficie de las células NK periféricas de individuos sanos cultivadas con sobrenadante de cultivo de trozos de tumor no es tan pronunciada como los bajos niveles de este receptor que se observa en las células NK infiltrantes de tumor del mismo paciente (Figura 16H). Quizás esta disminución podría aumentar si el tiempo de incubación fuera de 48 h en vez de 24 h. Aunque también observamos que los niveles de NKG2D en superficie de las células NK en el tejido de cáncer gástrico fue significativamente menor que en las células NK circulantes (Figura 8). Además, los niveles del receptor NKG2D en superficie de células NK infiltrantes de tumor son significativamente menores en comparación a células NK infiltrantes de mucosa gástrica, no así para la expresión de NKG2D en linfocitos T CD8⁺ (Fig 6A y C). Estos datos sugieren que, en pacientes con CG, dentro del microambiente tumoral, el contacto directo entre las células NK y las células tumorales y/o los factores que secretan las células tumorales participarían en la disminución de los niveles del receptor NKG2D en la superficie de las células NK.

Lamentablemente, no se pudieron evaluar las células NK ni linfocitos T CD8⁺ infiltrantes para todos los pacientes con CG debido a que se necesitaba muestras de tumor de gran tamaño para disgregar el tejido y así poder observar una población definida de células NK por citometría de flujo. Además, tuvimos problemas con el tamaño de la muestra de algunos pacientes, ya que, como el tumor era muy pequeño en diversos pacientes reclutados para este estudio, la mayor parte de la masa tumoral

se debe utilizar para los análisis patológicos correspondientes del hospital, y, por lo tanto, la cantidad de muestra que se pudo extraer para nuestro estudio fue muy reducida.

Más aun, pudimos observar que mayores niveles en superficie celular de MICA en las células tumorales están asociados con menores niveles del receptor NKG2D en superficie tanto en las células NK como linfocitos T CD8⁺ (Figura 9B). Por lo tanto, los niveles de MICA en superficie celular podría ser responsable de la disminución del receptor NKG2D, ya que también se ha descrito que una exposición crónica a los ligandos de NKG2D de superficie llevaría a una regulación negativa del receptor y una menor respuesta funcional (Ogasawara y col, 2003; Oppenheim y col, 2005).

Se ha demostrado que MICA, MICB y ULBP-2 presentes en la superficie de células tumorales reducen la expresión del receptor NKG2D (Salih y col, 2002a; Waldhauer & Steinle, 2006). Por esta razón, sería interesante cultivar PBMC de controles sanos y pacientes con CG con células tumorales derivadas del tejido tumoral, y evaluar los niveles de NKG2D en superficie de las células NK y linfocitos T CD8⁺ y determinar si la presencia de MICA en superficie celular y/o MICA soluble liberado por las células tumorales o algún otro ligando de NKG2D producen un efecto sobre la disminución en los niveles del receptor NKG2D, aunque es posible que los tumores usen una combinación de mecanismos para regular negativamente la expresión del receptor NKG2D. Siguiendo la línea de este estudio, hubiera sido interesante generar cultivos primarios de los tumores gástricos, lo que no se pudo realizar debido al tamaño de las muestras, ya que la gran mayoría del tejido tumoral se utilizó para los análisis por citometría de flujo y otros experimentos. Sin embargo, se intentó generar cultivos primarios con algunas muestras de tejidos tumorales, pero sin éxito, debido a

contaminaciones presentes. Además, para evaluar si la disminución del receptor NKG2D se debe a la producción de sNKG2DL y/o el contacto directo entre las células NK y las células tumorales, se debería desarrollar un ensayo con Transwell utilizando células tumorales derivadas del tejido tumoral gástrico e inhibiendo el contacto directo entre estas y PBMC de donantes sanos, para evaluar si es que algún factor soluble afecta los niveles de NKG2D en la superficie las células NK.

4.3. Expresión de sMICA y del receptor NKG2D y su correlación con parámetros clínico-patológicos en cáncer gástrico

En este estudio, no se observó ninguna correlación entre los niveles séricos de sMICA con los parámetros clínico-patológicos en los pacientes con cáncer gástrico analizados, tampoco con la supervivencia de estos pacientes (Figura 19 y 21C), lo cual nos indicaría que la presencia de sMICA en el suero de pacientes con CG podría no asociarse con la progresión del tumor. Por lo tanto, este ligando soluble no debiera ser utilizado como marcador para evaluar la progresión tumoral, tampoco en un diagnóstico diferencial en pacientes con CG.

Estudios han demostrado que, en algunos tipos de cáncer, como el de ovario, carcinoma de cuello y cabeza, mieloma múltiple y leucemia, los niveles elevados de sMICA en el suero están asociados con un peor pronóstico para los pacientes (Jinushi y col, 2008; Li y col, 2009; Salih y col, 2003; Tamaki y col, 2008). También se ha demostrado que los niveles séricos de sMICA aumentan con la progresión tumoral para el cáncer de próstata y hepatocarcinoma, entre otros (Holdenrieder y col, 2006a; Jinushi y col, 2005; Jinushi y col, 2008; Wu y col, 2004b). En algunos tumores, como el

cáncer de pulmón, altos niveles de sMICA son detectables ya en etapas tempranas de la enfermedad, sin un aumento considerable durante la progresión de la misma (Holdenrieder y col, 2006a), por lo que es posible que este también pueda ser el caso del cáncer gástrico, cuyos niveles de sMICA no se correlacionan con la progresión de la enfermedad. También es posible que la presencia de sMICA en el suero se deba a la inflamación de la mucosa gástrica que presentan los pacientes, ya que se ha demostrado que, en condiciones de inflamación crónica, hay un aumento moderado de sMICA en el suero (Groh y col, 2003; Holdenrieder y col, 2007). En este estudio, de hecho, pudimos comprobar la liberación de sMICA y sMICB hacia el medio extracelular por la mucosa gástrica al cultivar un trozo de mucosa alejada al tumor (Figura 15), lo que nos daría base para la hipótesis que la mucosa inflamada de los pacientes con CG también contribuiría a la generación de sMICA.

Por otro lado, hemos observado que menores niveles del receptor NKG2D en la superficie de células NK se asocian con tumores de mayor tamaño, también a estadios más tardíos de la enfermedad, a una mayor extensión tumoral, y a una baja diferenciación tumoral (Figura 18). Distintos estudios han relacionado a los tumores gástricos de mayor tamaño con un peor pronóstico (Guo y col, 2013; Zu y col, 2013). Además, se ha determinado, en algunos trabajos, que los pacientes con adenocarcinoma gástrico bien y moderadamente diferenciados tienen un mejor pronóstico que los adenocarcinomas poco diferenciados (Adachi y col, 2000; Wang y col, 2010).

Debido a que la disminución de NKG2D está asociada con la progresión del tumor y la severidad de la enfermedad, se analizó la supervivencia de pacientes agrupados según los niveles de NKG2D en superficie de células citotóxicas (altos y bajos). Sin

embargo, no se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa en la sobrevida entre ambos grupos de pacientes, pero sí se observa una tendencia a que los pacientes con menor niveles del receptor NKG2D en células NK poseen una menor sobrevida, lo cual podría resultar significativo si se aumentara el número de pacientes estudiados. Como vimos, esta disminución de NKG2D está asociada a mayores niveles de MICA en superficie de células tumorales y, además, altos niveles de MICA se asocian a una mayor extensión tumoral. Por otro lado, no se observó una asociación significativa con otros parámetros clínico patológicos, lo cual podría resultar significativo probablemente si se aumentara el número de pacientes que se encuentran en un estado temprano de la enfermedad y sin metástasis en los linfonodos. Generalmente, el cáncer gástrico es detectado en etapas más tardías de la enfermedad; además, cuando los tumores son muy pequeños, no es posible tomar muestras en cantidad suficiente para realizar el procedimiento experimental, debido a que toda esta es requerida por el hospital para los análisis respectivos.

En este estudio, no pudimos observar una diferencia significativa en la sobrevida entre grupos de pacientes que presentaban bajos niveles de MICA y aquellos con altos niveles de MICA en superficie celular (MFI < 3,4 y MFI > 3,4, respectivamente) (Figura 21D). Sin embargo, se puede observar, claramente, una tendencia a que el grupo con mayores niveles de MICA posee una menor sobrevida, lo cual también podría resultar significativo si aumentáramos el número de pacientes estudiados y también si se evaluara la sobrevida post-operatoria por un periodo más largo. Es interesante hacer notar que la expresión de los NKG2DL en cáncer ha sido asociada a distintos resultados para los diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, en cáncer de ovario, una alta expresión de ULBP-2 resulta en un peor pronóstico para los pacientes (McGilvray y col, 2010), mientras que en cáncer de colon rectal y de mama

una alta expresión de MIC y/o ULBPs se correlaciona con un mejor pronóstico (de Kruijff y col, 2012; McGilvray y col, 2009).

Saito et al. describieron que la disminución del receptor NKG2D en células NK y T CD8⁺ podría ser uno de los mecanismos claves responsables de la disfunción de células NK en CG (Saito y col, 2012). Sin embargo, estos autores no demostraron una diferencia significativa en los niveles de sMICA entre pacientes japoneses con CG y controles normales (Osaki y col, 2007; Saito y col, 2012). Por otro lado, Bai et al. demostraron que, en pacientes chinos con CG, los niveles séricos de sMICA era significativamente mayor que en controles sanos; además, sus resultados indicaron que sMICA sérico se correlacionaba con el estadio del cáncer y la presencia de metástasis (Bai & Wang, 2009). En este estudio, nosotros también encontramos una diferencia significativa en los niveles de sMICA entre pacientes con CG y controles normales (Figura 10). Es posible, entonces, que no sólo sMICA, sino que también otros ligandos del receptor NKG2D estén presentes en el suero, y que esta disminución en la expresión de este receptor se deba a más de un ligando soluble, ya que, además de sMICA, también pudimos detectar sMICB en el suero de pacientes. Sin embargo, no detectamos una diferencia significativa entre los niveles de sMICB séricos entre los pacientes con CG y controles sanos, pero sí pudimos comprobar que mayores niveles de MICA en superficie de las células tumorales se correlacionaba con menores niveles de NKG2D en superficie las células NK y linfocitos T CD8⁺. Además, altos niveles de MICA en superficie celular están asociados a una mayor extensión tumoral, por lo que la expresión de MICA en las células tumorales podría corresponder a un mecanismo de evasión inmune en etapas más avanzadas del desarrollo tumoral, en donde una interacción prolongada con el receptor NKG2D con MICA en las células tumorales,

podría llevar a una regulación negativa del receptor NKG2D, disminuyendo la actividad citotóxica de las células NK.

Los mecanismos por los cuales los NKG2DL median la función o disfunción inmune pueden ser diversos en diferentes tumores o diferir de acuerdo al estadio de la enfermedad y las circunstancias. Por lo tanto, futuros estudios dirigidos a otros ligandos solubles del receptor NKG2D en CG y el análisis del efecto de MICA de superficie en las células tumorales sobre el receptor NKG2D son necesarios para poder entender los mecanismos por los cuales los niveles del receptor NKG2D disminuye en células citolíticas, lo que favorecería el crecimiento tumoral.

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

- El 80% de los pacientes con CG analizados presenta MICA en la superficie de las células tumorales, y mayores niveles de MICA de superficie en células tumorales se asociaron con menores niveles del receptor NKG2D en células NK de pacientes con CG. Además, mayores niveles de MICA en la superficie en células tumorales se correlacionaron con una mayor extensión tumoral. Por lo tanto, MICA presente en las células tumorales podría mediar la reducción de los niveles del receptor NKG2D, favoreciendo la progresión tumoral. Sin embargo, es necesaria más investigación para poder confirmar que MICA expresado en las células tumorales sea responsable directo de la regulación negativa de los niveles NKG2D de superficie en las células NK.
- Se detectó tanto sMICA como sMICB en el suero del 70% de los pacientes evaluados, y solo los niveles de sMICA séricos fueron significativamente más elevados en pacientes con CG en comparación con controles sanos. Sin embargo, los niveles del receptor NKG2D en la superficie de células NK no se correlacionaron con altos niveles séricos de sMICA en pacientes con CG. Además, pudimos comprobar que sMICA presente en los sueros o producido por los tumores de CG no regularía negativamente los niveles del receptor NKG2D en la superficie de células NK de controles sanos. Por lo tanto, la presencia de sMICA en el suero de pacientes con cáncer gástrico no interferiría con la inmunidad antitumoral por medio de la regulación negativa del receptor NKG2D en los

linfocitos citotóxicos, siendo posible que otro factor soluble, abordado en este estudio, , esté afectando los niveles del receptor NKG2D en células citolíticas.

- Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren que las células tumorales de cáncer gástrico podrían escapar de la inmunovigilancia de las células NK, NK al inducir una reducción en los niveles del receptor NKG2D de superficie celular, lo que resultaría en una menor susceptibilidad de estas células a la citotoxicidad mediada por las células NK, favoreciendo la progresión tumoral en los pacientes con CG.

6. ANEXOS

Anexo 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

22 SET. 2009



TITULO DEL PROYECTO: "Estudio de células T regulatorias y su efecto en la regulación de la función de células NK y expresión de ligandos de NKG2D en cáncer gástrico"

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. Carolina Hager Ribeiro
INSTITUCIÓN: Universidad de Chile
TELÉFONO: (2) 978-6724

Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación "Estudio de células T regulatorias y su efecto en la regulación de la función de células NK y expresión de ligandos de NKG2D en cáncer gástrico".

Esta investigación pretende estudiar algunos mecanismos que estarían involucrados en la formación de tumores, lo que permitiría a largo plazo mejorar los tratamientos que se aplicarán en esta enfermedad.

El objetivo de este proyecto es verificar si células T regulatorias y la molécula IL-10 modulan la función de las células NK durante la respuesta inmune contra el cáncer gástrico.

Este estudio se hará con un número total de 30 pacientes del Hospital Salvador, Santiago, Chile. Si Ud. acepta participar en este estudio, se le pedirá que done una pequeña muestra de tejido de estómago, del tamaño de una pastilla de paracetamol, que será extraída durante la cirugía. El procedimiento no tendrá más riesgos para Ud. que la cirugía misma.

Además, se le pedirá una muestra de sangre del tamaño de una cuchara de té, lo que tampoco presenta riesgos para Ud., salvo en algunos casos un pequeño hematoma.

La participación en este estudio no le significará a Ud. ningún beneficio directo. Sin embargo, su contribución a esta iniciativa beneficiará el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes.

Ud. es libre de no participar en esta investigación. Si Ud. decide no participar, no habrá consecuencias negativas para Ud. y recibirá la misma atención previamente acordada con su médico tratante.

Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en este estudio.

Confidencialidad: Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada con estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o de agencias supervisoras de la investigación.

La eventual publicación de los resultados de la investigación en revistas científicas no incluirá su nombre o identidad.

Su participación en esta iniciativa es totalmente voluntaria. Por lo tanto, Ud. es libre de retirarse del estudio en cualquier momento, comunicándolo al investigador y a su médico tratante, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento de su enfermedad.

En el caso de que se estime necesario utilizar las muestras donadas por Ud. en otros estudios, se pedirá nuevamente su autorización, o de su representante legal.

Si Ud. necesita cualquier otra información sobre este estudio o acerca de su participación, puede llamar a:



Investigador responsable: Dra. Carolina Hager Ribeiro (o Dra. Maria Carmen Molina)
Teléfonos: (2) 978-6347
(2) 978-6724

Autoridad de la Institución: Dr. Marco Bustamante Zamorano
Teléfono: (2) 269-9278

En caso que Ud. lo necesite, también puede contactar al representante del Comité de Ética que aprobo este estudio:

Dr. Manuel Oyarzún
Departamento de Bioética y Humanidades Médicas
Facultad de Medicina - Universidad de Chile
Teléfono: (2) 274-1560

Este documento resume lo que los médicos me explicaron anteriormente, resolviendo todas mis dudas, y teniendo yo todos los procedimientos que se me serán realizados absolutamente claros.

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento voluntario para participar en el proyecto "Estudio de células T regulatorias y su efecto en la regulación de la función de células NK y expresión de ligandos de NKG2D en cáncer gástrico".

_____	_____	_____
Nombre del paciente	Firma	Fecha
_____	_____	_____
Nombre del Informante	Firma	Fecha
_____	_____	_____
CAROLINA HAGER RIBEIRO Nombre del Investigador	Firma	Fecha

Anexo 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO

TITULO DEL PROYECTO: "Uniendo la inmunidad innata y adaptativa: rol de las células NKT y linfocitos T reguladores en la inmunoregulación de la respuesta inmune contra el cáncer gástrico"

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. Carolina Hager Ribeiro
INSTITUCIÓN: Universidad de Chile
TELÉFONO: (2) 978-6088

Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación "Uniendo la inmunidad innata y adaptativa: rol de las células NKT y linfocitos T reguladores en la inmunoregulación de la respuesta inmune contra el cáncer gástrico".

Esta investigación pretende estudiar algunos mecanismos que estarían involucrados en la formación de tumores, lo que permitiría a largo plazo mejorar los tratamientos que se aplicarán en esta enfermedad.

Se pretende estudiar si unos tipos determinados de células (llamadas células T reguladoras y células "natural killer T" (NKT)) y otras sustancias llamadas "moduladoras" influyen en la respuesta del organismo frente al tumor.

El análisis de estas células y sustancias moduladoras se hará "in vitro", esto es, en un laboratorio de investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, y no constituye ninguna intervención en su organismo.

Este estudio se hará con un número total de 30 individuos sanos. Si Ud. acepta participar en este estudio, se le pedirá una muestra de sangre equivalente a una cucharadita de té, lo que no presenta riesgos para Ud., salvo en algunos casos un pequeño moretón, dolor y rara vez infección.

La participación en este estudio no le significará a Ud. ningún beneficio directo. Su contribución a esta iniciativa beneficiará el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes con cáncer.

Ud. es libre de no participar en esta investigación. Si Ud. decide no participar, no habrá consecuencias negativas para Ud. Adicionalmente, Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en este estudio.

Confidencialidad: Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada con estricta confidencialidad. A sus datos solo tendrán el acceso los investigadores y los Comités de Ética Científicos.

La eventual publicación de los resultados de la investigación en revistas científicas no incluirá su nombre o identidad.

Su participación en esta iniciativa es totalmente voluntaria. Por lo tanto, Ud. es libre de retirarse del estudio en cualquier momento, comunicándolo al investigador responsable, sin que ello signifique modificaciones en el estudio.

En el caso de que se estime necesario utilizar la muestra donada por Ud. en otros estudios, se pedirá nuevamente su autorización o de su representante legal.

Si Ud. necesita cualquier otra información sobre este estudio o acerca de su participación, puede llamar a:

Investigador responsable: Dra. Carolina Hager Ribeiro

Teléfono: (2) 978-6088

Este documento resume lo que la Investigadora responsable me explicó anteriormente, resolviendo todas mis dudas, y teniendo yo conocimiento de todos los procedimientos que me serán realizados.

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento voluntario para participar en el proyecto "Uniendo la inmunidad innata y adaptativa: rol de las células INKT y linfocitos T reguladores en la inmunoregulación de la respuesta inmune contra el cáncer gástrico".

_____ Nombre del donante	_____ Firma	_____ Fecha
-----------------------------	----------------	----------------

_____ Nombre del informante	_____ Firma	_____ Fecha
--------------------------------	----------------	----------------

CAROLINA HAGER RIBEIRO _____ Nombre del Investigador	_____ Firma	_____ Fecha
--	----------------	----------------

Anexo 3



GOBIERNO DE CHILE
Servicio de Salud Metropolitano Oriente
Comité de Ética Científico

PROTOCOLO DE APROBACIÓN DE PROYECTOS CLÍNICOS

Con fecha 03 de Noviembre de 2009, el CEC del S.S.M. Oriente aprobó definitivamente el Proyecto de Investigación Concurso FONDECYT 2010, titulado:

“Estudio de células T regulatorias y su efecto en la regulación de la función de células NK y expresión de ligandos de NKG2D en cáncer gástrico”

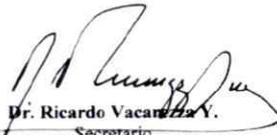
y que conducirá como Investigador Principal la **Dra. Carolina Hager Ribeiro** en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y la colaboración del Dr. Marco Bustamante Jefe del Equipo de Cirugía Digestivo Alto del Servicio de Cirugía del Hospital del Salvador.

Se analizó y aprobó los siguientes documentos del estudio:

- Proyecto FONDECYT in extenso, en inglés;
- Consentimiento Informado, firmado por el CEC del S.S.M. Oriente el 03 de Noviembre de 2009;
- CV del Investigador Principal: Dra. Carolina Hager R.

Envío la nómina de los miembros permanentes del CEC del S.S.M. Oriente que participaron del análisis y aprobación del Proyecto antes señalado:

Dra. María Esther Meroni	Geriatra	Inst. Nac. de Geriatria
Dr. Manuel Sedano Lorca	Gineco-Obstetra	Hospital Dr. Luis Tisné
Dr. Jorge Plasser Troncoso	Cirujano- Oncólogo	Hospital del Salvador
Dr. Luis Soto Román	Utiólogo	Inst. Nacional del Tórax
Dr. Andrés Stuardo Luengo	Neurólogo- Presidente	Hospital del Salvador
Dr. Ricardo Vacarezza Yávar	Hematólogo- Secretario	Hospital del Salvador
Dra. Liliana Vicherat Mauro	Inmunóloga	Inst. Nac. del Tórax #
Sra. Elena Núñez Migone	Enfermera- Coordinadora	S.S.M.O.
Sra. Angélica Sotomayor	Abogado	No institucional
Sr. Hugo Gutiérrez Guerra	Representante de la Comunidad	No institucional


Dr. Ricardo Vacarezza Y.
Secretario

Santiago, 03 de Noviembre de 2009



Anexo 4



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS



ACTA DE APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS

Con fecha 07 de julio de 2009, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente
Sra. Marianne Gaudlitz H., Enfermera, Mg. Humanidades, Vicepresidente
Dr. Hugo Amigo C., Ph. D., Especialista en Salud Pública
Dr. Leandro Biagini A., Médico Internista
Dra. Lucía Cifuentes, Médico Genetista
Sra. Nina Horwitz, Sociólogo, Mg. Bioética
Dr. Miguel O'Ryan, Médico Pediatra Infectólogo
Dr. Julio Pallavicini, Médico Psiquiatra

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: "**ESTUDIO DE CÉLULAS T REGULATORIAS Y SU EFECTO EN LA REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE CÉLULAS NK Y EXPRESIÓN DE LIGANDOS DE NKG2D EN CÉLULAS DE CÁNCER GÁSTRICO**" y cuya investigadora responsable es la **Dra. Carolina Hager R.**, quien desempeña funciones en el **Laboratorio de Inmunovigilancia y Evasión Inmune, Programa Disciplinario de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.**

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- *Proyecto de investigación in extenso*
- *Consentimiento informado*
- *CV del investigador responsable y de los Co-investigadores*
- *Carta compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado éste.*

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2002, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS



09 JUL. 2009

Sobre la base de esta información el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

- a) Carácter de la población estudiada: No cautiva, investigación no terapéutica.
- b) Utilidad del Proyecto: Conocimiento de interrelación entre inmunidad celular y cáncer con mira a inmunoterapia.
- c) Riesgos y Beneficios: Riesgos mínimos (muestra de sangre), Beneficio: no individual.
- d) Protección de los participantes: Esta bien asegurada en el consentimiento informado corregido con fecha 08 de julio de 2009.
- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: no aplica.
- f) El investigador responsable se ha comprometido a entregar los resultados del estudio a este Comité al finalizar el proyecto.

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión corregida del 08 julio de 2009, que se adjunta firmado, fechado y timbrado por el CEISH.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.



Sra. Marianne Gauditz H.
Vicepresidenta
Comité de Ética en Investigación
en Seres Humanos

MGH/mva.
c.c.: Proy. 017-2009
Santiago, 08 de julio de 2009.

Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi Y., Yasuda K., Inomata M., Sato K., Shiraishi N., y Kitano S. 2000. Pathology and prognosis of gastric carcinoma: well versus poorly differentiated type. *Cancer* **89**: 1418-24.
- Alter G., Malenfant J.M., y Altfeld M. 2004. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* **294**: 15-22.
- Arkenau H.T. 2009. Gastric cancer in the era of molecularly targeted agents: current drug development strategies. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **135**: 855-66.
- Arreygue-Garcia N.A., Daneri-Navarro A., del Toro-Arreola A., Cid-Arregui A., Gonzalez-Ramella O., Jave-Suarez L.F., Aguilar-Lemarroy A., Troyo-Sanroman R., Bravo-Cuellar A., Delgado-Rizo V., Garcia-Iglesias T., Hernandez-Flores G., y Del Toro-Arreola S. 2008. Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer* **8**: 16.
- Aruffo A., Stamenkovic I., Melnick M., Underhill C.B., y Seed B. 1990. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* **61**: 1303-13.
- Baeuerle P.A., y Gires O. 2007. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer* **96**: 417-23.
- Bai W., y Wang S.-c. 2009. Study of the soluble MICA in gastric cancer patients in different stages and relation with prognosis. *Cancer Research and Clinic* **21**: 750-752.
- Balzar M., Winter M.J., de Boer C.J., y Litvinov S.V. 1999a. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med (Berl)* **77**: 699-712.
- Balzar M., Winter M.J., de Boer C.J., y Litvinov S.V. 1999b. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *Journal of Molecular Medicine* **77**: 699-712.
- Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J.H., Lanier L.L., y Spies T. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* **285**: 727-9.
- Benitez A.C., Dai Z., Mann H.H., Reeves R.S., Margineantu D.H., Gooley T.A., Groh V., y Spies T. 2011. Expression, signaling proficiency, and stimulatory function of the NKG2D lymphocyte receptor in human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 4081-6.
- Burgess S.J., Marusina A.I., Pathmanathan I., Borrego F., y Coligan J.E. 2006. IL-21 down-regulates NKG2D/DAP10 expression on human NK and CD8+ T cells. *Journal of Immunology* **176**: 1490-7.
- Caligiuri M.A. 2008. Human natural killer cells. *Blood* **112**: 461-9.
- Cerwenka A., Baron J.L., y Lanier L.L. 2001. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 11521-6.
- Cerwenka A., y Lanier L.L. 2001. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nature Reviews Immunology* **1**: 41-9.
- Champsaur M., y Lanier L.L. 2010. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunological Reviews* **235**: 267-85.

- Chan C.J., Andrews D.M., y Smyth M.J. 2008. Can NK cells be a therapeutic target in human cancer? *European Journal of Immunology* **38**: 2964-8.
- Chang C., Dietrich J., Harpur A.G., Lindquist J.A., Haude A., Loke Y.W., King A., Colonna M., Trowsdale J., y Wilson M.J. 1999. Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties. *Journal of Immunology* **163**: 4651-4.
- Chen T., Yang K., Yu J., Meng W., Yuan D., Bi F., Liu F., Liu J., Dai B., Chen X., Wang F., Zeng F., Xu H., Hu J., y Mo X. 2012. Identification and expansion of cancer stem cells in tumor tissues and peripheral blood derived from gastric adenocarcinoma patients. *Cell Res* **22**: 248-58.
- Collado A., de Andres A., Canadas E., Ruiz-Cabello F., Gomez O., Pedrinaci S., y Garrido F. 1991. Characterization of CD44 antigen during lymphoid ontogeny. *Immunobiology* **183**: 1-11.
- Compare D., Rocco A., y Nardone G. 2010. Risk factors in gastric cancer. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* **14**: 302-8.
- Cosman D., Mullberg J., Sutherland C.L., Chin W., Armitage R., Fanslow W., Kubin M., y Chalupny N.J. 2001. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* **14**: 123-33.
- Crane C.A., Han S.J., Barry J.J., Ahn B.J., Lanier L.L., y Parsa A.T. 2010. TGF-beta downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8+ T cells in glioma patients. *Neuro Oncol* **12**: 7-13.
- da Cunha C.B., Oliveira C., Wen X., Gomes B., Sousa S., Suriano G., Grellier M., Huntsman D.G., Carneiro F., Granja P.L., y Seruca R. 2010. De novo expression of CD44 variants in sporadic and hereditary gastric cancer. *Lab Invest* **90**: 1604-14.
- Dasgupta S., Bhattacharya-Chatterjee M., O'Malley B.W., Jr., y Chatterjee S.K. 2005. Inhibition of NK cell activity through TGF-beta 1 by down-regulation of NKG2D in a murine model of head and neck cancer. *J Immunol* **175**: 5541-50.
- de Kruijf E.M., Sajet A., van Nes J.G., Putter H., Smit V.T., Eagle R.A., Jafferji I., Trowsdale J., Liefers G.J., van de Velde C.J., y Kuppen P.J. 2012. NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. *BMC Cancer* **12**: 24.
- Dennert G., Anderson C.G., y Prochazka G. 1987. High activity of N-alpha-benzyloxycarbonyl-L-lysine thiobenzyl ester serine esterase and cytolytic perforin in cloned cell lines is not demonstrable in in-vivo-induced cytotoxic effector cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 5004-8.
- Dicken B.J., Bigam D.L., Cass C., Mackey J.R., Joy A.A., y Hamilton S.M. 2005. Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. *Annals of surgery* **241**: 27-39.
- Diefenbach A., Jensen E.R., Jamieson A.M., y Raulet D.H. 2001. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* **413**: 165-71.
- Dobrovina E.S., Dobrovin M.M., Vider E., Sisson R.B., O'Reilly R.J., Dupont B., y Vyas Y.M. 2003. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *J Immunol* **171**: 6891-9.

- Duan X., Deng L., Chen X., Lu Y., Zhang Q., Zhang K., Hu Y., Zeng J., y Sun W. 2011. Clinical significance of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule A and NKG2D receptor on NK cells in pancreatic cancer. *Med Oncol* **28**: 466-74.
- Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J., y Schreiber R.D. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* **3**: 991-8.
- Dunn G.P., Old L.J., y Schreiber R.D. 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology* **22**: 329-60.
- Eisele G., Wischhusen J., Mittelbronn M., Meyermann R., Waldhauer I., Steinle A., Weller M., y Friese M.A. 2006. TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain* **129**: 2416-25.
- El-Gazzar A., Groh V., y Spies T. 2013. Immunobiology and conflicting roles of the human NKG2D lymphocyte receptor and its ligands in cancer. *Journal of Immunology* **191**: 1509-15.
- Farag S.S., y Caligiuri M.A. 2006. Human natural killer cell development and biology. *Blood Reviews* **20**: 123-37.
- Ferlazzo G., Thomas D., Lin S.L., Goodman K., Morandi B., Muller W.A., Moretta A., y Munz C. 2004. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *Journal of Immunology* **172**: 1455-62.
- Fernandez-Messina L., Ashiru O., Boutet P., Aguera-Gonzalez S., Skepper J.N., Reyburn H.T., y Vales-Gomez M. 2010. Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. *The Journal of Biological Chemistry* **285**: 8543-51.
- Friese M.A., Wischhusen J., Wick W., Weiler M., Eisele G., Steinle A., y Weller M. 2004. RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antiglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* **64**: 7596-603.
- Fuertes M.B., Girart M.V., Molinero L.L., Domaica C.I., Rossi L.E., Barrio M.M., Mordoh J., Rabinovich G.A., y Zwirner N.W. 2008a. Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* **180**: 4606-14.
- Fuertes M.B., Girart M.V., Molinero L.L., Domaica C.I., Rossi L.E., Barrio M.M., Mordoh J., Rabinovich G.A., y Zwirner N.W. 2008b. Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunology* **180**: 4606-14.
- Garrity D., Call M.E., Feng J., y Wucherpfennig K.W. 2005. The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 7641-6.
- Gasser S., Orsulic S., Brown E.J., y Raulet D.H. 2005. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* **436**: 1186-90.
- Ghaffarzadehgan K., Jafarzadeh M., Raziee H.R., Sima H.R., Esmaili-Shandiz E., Hosseinezhad H., Taghizadeh-Kermani A., Moaven O., y Bahrani M. 2008. Expression of cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinoma and its prognostic importance. *World Journal of Gastroenterology* **14**: 6376-81.



- Ghiringhelli F., Menard C., Terme M., Flament C., Taieb J., Chaput N., Puig P.E., Novault S., Escudier B., Vivier E., Lecesne A., Robert C., Blay J.Y., Bernard J., Caillat-Zucman S., Freitas A., Tursz T., Wagner-Ballon O., Capron C., Vainchencker W., Martin F., y Zitvogel L. 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *The Journal of Experimental Medicine* **202**: 1075-85.
- Girardi M., Oppenheim D.E., Steele C.R., Lewis J.M., Glusac E., Filler R., Hobby P., Sutton B., Tigelaar R.E., y Hayday A.C. 2001. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* **294**: 605-9.
- Globocan. 2008. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide 2008. World Health Organization International Agency for Resesarch on Cancer.
- Groh V., Bruhl A., El-Gabalawy H., Nelson J.L., y Spies T. 2003. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 9452-7.
- Groh V., Rhinehart R., Randolph-Habecker J., Topp M.S., Riddell S.R., y Spies T. 2001a. Costimulation of CD8 alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nature Immunology* **2**: 255-260.
- Groh V., Rhinehart R., Randolph-Habecker J., Topp M.S., Riddell S.R., y Spies T. 2001b. Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nature Immunology* **2**: 255-60.
- Groh V., Rhinehart R., Secrist H., Bauer S., Grabstein K.H., y Spies T. 1999. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *PNAS* **96**: 6879-84.
- Groh V., Wu J., Yee C., y Spies T. 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* **419**: 734-8.
- Guerra N., Tan Y.X., Joncker N.T., Choy A., Gallardo F., Xiong N., Knoblaugh S., Cado D., Greenberg N.M., y Raulet D.H. 2008. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* **28**: 571-80.
- Guo P., Li Y., Zhu Z., Sun Z., Lu C., Wang Z., y Xu H. 2013. Prognostic value of tumor size in gastric cancer: an analysis of 2,379 patients. *Tumor Biology* **34**: 1027-35.
- Hayakawa Y., Kelly J.M., Westwood J.A., Darcy P.K., Diefenbach A., Raulet D., y Smyth M.J. 2002. Cutting edge: tumor rejection mediated by NKG2D receptor-ligand interaction is dependent upon perforin. *Journal of Immunology* **169**: 5377-81.
- Hilpert J., Grosse-Hovest L., Grunebach F., Buechele C., Nuebling T., Raum T., Steinle A., y Salih H.R. 2012. Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses. *J Immunol* **189**: 1360-71.
- Holdenrieder S., Eichhorn P., Beuers U., Samtleben W., Stieber P., Nagel D., Peterfi A., Steinle A., y Salih H.R. 2007. Soluble NKG2D ligands in hepatic autoimmune diseases and in benign diseases involved in marker metabolism. *Anticancer Research* **27**: 2041-5.
- Holdenrieder S., Stieber P., Peterfi A., Nagel D., Steinle A., y Salih H.R. 2006a. Soluble MICA in malignant diseases. *International Journal of Cancer* **118**: 684-7.
- Holdenrieder S., Stieber P., Peterfi A., Nagel D., Steinle A., y Salih H.R. 2006b. Soluble MICB in malignant diseases: analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **55**: 1584-9.

- Homg T., Bezbradica J.S., y Medzhitov R. 2007. NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway. *Nature Immunology* **8**: 1345-52.
- Houchins J.P., Yabe T., McSherry C., y Bach F.H. 1991. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine* **173**: 1017-20.
- Huergo-Zapico L., Gonzalez-Rodriguez A.P., Contesti J., Gonzalez E., Lopez-Soto A., Fernandez-Guizan A., Acebes-Huerta A., de Los Toyos J.R., Lopez-Larrea C., Groh V., Spies T., y Gonzalez S. 2012. Expression of ERp5 and GRP78 on the membrane of chronic lymphocytic leukemia cells: association with soluble MICA shedding. *Cancer Immunol Immunother* **61**: 1201-10.
- IARC. 1994. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. **61**.
- Jamieson A.M., Diefenbach A., McMahon C.W., Xiong N., Carlyle J.R., y Raulet D.H. 2002. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* **17**: 19-29.
- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., y Forman D. 2011. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **61**: 69-90.
- Jinushi M., Takehara T., Tatsumi T., Hiramatsu N., Sakamori R., Yamaguchi S., y Hayashi N. 2005. Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. *Journal of Hepatology* **43**: 1013-20.
- Jinushi M., Takehara T., Tatsumi T., Kanto T., Groh V., Spies T., Kimura R., Miyagi T., Mochizuki K., Sasaki Y., y Hayashi N. 2003. Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. *International Journal of Cancer* **104**: 354-61.
- Jinushi M., Vanneman M., Munshi N.C., Tai Y.T., Prabhala R.H., Ritz J., Neuberg D., Anderson K.C., Carrasco D.R., y Dranoff G. 2008. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 1285-90.
- Kandulski A., Malfertheiner P., y Wex T. 2010. Role of regulatory T-cells in H. pylori-induced gastritis and gastric cancer. *Anticancer Research* **30**: 1093-103.
- Ko Y.H., Won H.S., Jeon E.K., Hong S.H., Roh S.Y., Hong Y.S., Byun J.H., Jung C.K., y Kang J.H. 2011. Prognostic significance of CD44s expression in resected non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* **11**: 340.
- Kohga K., Takehara T., Tatsumi T., Ohkawa K., Miyagi T., Hiramatsu N., Kanto T., Kasugai T., Katayama K., Kato M., y Hayashi N. 2008. Serum levels of soluble major histocompatibility complex (MHC) class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* **99**: 1643-9.
- Kuroda H., Saito H., y Ikeguchi M. 2012. Decreased number and reduced NKG2D expression of Vdelta1 gammadelta T cells are involved in the impaired function of Vdelta1 gammadelta T cells in the tissue of gastric cancer. *Gastric cancer* **15**: 433-439.
- Lee K., Cáceres D., Varela N., Csendes D.A., y Ríos R.H., Quiñones, S. L. 2006. Cytochrome P4501A1 (CYP1A1), glutathione S transferase M1 (GSTM1) polymorphisms and their association with smoking and alcohol consumption as gastric cancer susceptibility biomarkers. *Revista Médica de Chile* **134**: 1107-1115.

- Li K., Mandai M., Hamanishi J., Matsumura N., Suzuki A., Yagi H., Yamaguchi K., Baba T., Fujii S., y Konishi I. 2009. Clinical significance of the NKG2D ligands, MICA/B and ULBP2 in ovarian cancer: high expression of ULBP2 is an indicator of poor prognosis. *Cancer Immunology Immunotherapy* **58**: 641-52.
- Li P., Morris D.L., Willcox B.E., Steinle A., Spies T., y Strong R.K. 2001. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nature Immunology* **2**: 443-51.
- Lopez-Larrea C., Suarez-Alvarez B., Lopez-Soto A., Lopez-Vazquez A., y Gonzalez S. 2008. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends in Molecular Medicine* **14**: 179-89.
- Lorenz H.M., Lagoo A.S., y Hardy K.J. 1994. The cell and molecular basis of leukocyte common antigen (CD45)-triggered, lymphocyte function-associated antigen-1-/intercellular adhesion molecule-1-dependent, leukocyte adhesion. *Blood* **83**: 1862-70.
- Lozzio C.B., y Lozzio B.B. 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**: 321-34.
- Marten A., von Lilienfeld-Toal M., Buchler M.W., y Schmidt J. 2006. Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing gammadelta T cell cytotoxicity. *Int J Cancer* **119**: 2359-65.
- Mayer B., Jauch K.W., Gunthert U., Figdor C.G., Schildberg F.W., Funke I., y Johnson J.P. 1993. De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet* **342**: 1019-22.
- McGilvray R.W., Eagle R.A., Rolland P., Jafferji I., Trowsdale J., y Durrant L.G. 2010. ULBP2 and RAET1E NKG2D ligands are independent predictors of poor prognosis in ovarian cancer patients. *International Journal of Cancer* **127**: 1412-20.
- McGilvray R.W., Eagle R.A., Watson N.F., Al-Attar A., Ball G., Jafferji I., Trowsdale J., y Durrant L.G. 2009. NKG2D ligand expression in human colorectal cancer reveals associations with prognosis and evidence for immunoediting. *Clinical Cancer Research* **15**: 6993-7002.
- Medina E., y Kaempffer A. 2001. Mortalidad por cáncer en Chile: consideraciones epidemiológicas. *Revista Médica de Chile* **129**: 1195-1202.
- Minsal. 2010. Guía Clínica Cáncer Gástrico.
- Mistry A.R., y O'Callaghan C.A. 2007. Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. *Immunology* **121**: 439-47.
- Moldenhauer G., Momburg F., Moller P., Schwartz R., y Hammerling G.J. 1987. Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker. *Br J Cancer* **56**: 714-21.
- Nausch N., y Cerwenka A. 2008. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* **27**: 5944-58.
- Nishimura M., Mitsunaga S., Akaza T., Mitomi Y., Tadokoro K., y Juji T. 1994. Protection against natural killer cells by interferon-gamma treatment of K562 cells cannot be explained by augmented major histocompatibility complex class I expression. *Immunology* **83**: 75-80.
- Nuckel H., Switala M., Sellmann L., Horn P.A., Durig J., Duhrsen U., Kuppers R., Grosse-Wilde H., y Rebmann V. 2010. The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **24**: 1152-9.
- Ogasawara K., Hamerman J.A., Hsin H., Chikuma S., Bour-Jordan H., Chen T., Pertel T., Carnaud C., Bluestone J.A., y Lanier L.L. 2003. Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity* **18**: 41-51.

- Okayama H., Kumamoto K., Saitou K., Hayase S., Kofunato Y., Sato Y., Miyamoto K., Nakamura I., Ohki S., Sekikawa K., y Takenoshita S. 2009. CD44v6, MMP-7 and nuclear Cdx2 are significant biomarkers for prediction of lymph node metastasis in primary gastric cancer. *Oncol Rep* **22**: 745-55.
- Oppenheim D.E., Roberts S.J., Clarke S.L., Filler R., Lewis J.M., Tigelaar R.E., Girardi M., y Hayday A.C. 2005. Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nature Immunology* **6**: 928-37.
- Osaki T., Saito H., Yoshikawa T., Matsumoto S., Tatebe S., Tsujitani S., y Ikeguchi M. 2007. Decreased NKG2D expression on CD8+ T cell is involved in immune evasion in patients with gastric cancer. *Clinical Cancer Research* **13**: 382-7.
- Podack E.R., y Dennert G. 1983. Assembly of two types of tubules with putative cytolytic function by cloned natural killer cells. *Nature* **302**: 442-5.
- Raffaghello L., Prigione I., Airoldi I., Camoriano M., Levreri I., Gambini C., Pende D., Steinle A., Ferrone S., y Pistoia V. 2004. Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia* **6**: 558-68.
- Robertson M.J. 2002. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Journal of Leukocyte Biology* **71**: 173-83.
- Saito H., Osaki T., y Ikeguchi M. 2012. Decreased NKG2D expression on NK cells correlates with impaired NK cell function in patients with gastric cancer. *Gastric cancer* **15**: 27-33.
- Salih H.R., Antropius H., Gieseke F., Lutz S.Z., Kanz L., Rammensee H.G., y Steinle A. 2003. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* **102**: 1389-96.
- Salih H.R., Goehlsdorf D., y Steinle A. 2006. Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. *Human Immunology* **67**: 188-95.
- Salih H.R., Holdenrieder S., y Steinle A. 2008. Soluble NKG2D ligands: prevalence, release, and functional impact. *Frontiers in Bioscience* **13**: 3448-56.
- Salih H.R., Rammensee H.G., y Steinle A. 2002a. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* **169**: 4098-102.
- Salih H.R., Rammensee H.G., y Steinle A. 2002b. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *Journal of Immunology* **169**: 4098-102.
- Schrambach S., Ardizzone M., Leymarie V., Sibilia J., y Bahram S. 2007. In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. *PLoS ONE* **2**: e518.
- Schwinn N., Vokhminova D., Sucker A., Textor S., Striegel S., Moll I., Nausch N., Tuettenberg J., Steinle A., Cerwenka A., Schadendorf D., y Paschen A. 2009. Interferon-gamma down-regulates NKG2D ligand expression and impairs the NKG2D-mediated cytotoxicity of MHC class I-deficient melanoma by natural killer cells. *Int J Cancer* **124**: 1594-604.
- Serrano A.E., Menares-Castillo E., Garrido-Tapia M., Ribeiro C.H., Hernandez C.J., Mendoza-Naranjo A., Gatica-Andrades M., Valenzuela-Diaz R., Zuniga R., Lopez M.N., Salazar-Onfray F., Aguillon J.C., y Molina M.C. 2010. Interleukin 10 decreases MICA expression on melanoma cell surface. *Immunology & Cell Biology*.
- Sers C., Kuner R., Falk C.S., Lund P., Sueltmann H., Braun M., Bunes A., Ruschhaupt M., Conrad J., Mang-Fatehi S., Steinle I., Krapfenbauer U., Poustka A., y Schafer R. 2009. Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of

- MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells. *International Journal of Cancer* **125**: 1626-39.
- Smyth M.J., Hayakawa Y., Takeda K., y Yagita H. 2002. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* **2**: 850-61.
- Smyth M.J., Swann J., Cretney E., Zerafa N., Yokoyama W.M., y Hayakawa Y. 2005. NKG2D function protects the host from tumor initiation. *The Journal of Experimental Medicine* **202**: 583-8.
- Song H., Hur D.Y., Kim K.E., Park H., Kim T., Kim C.W., Bang S., y Cho D.H. 2006. IL-2/IL-18 prevent the down-modulation of NKG2D by TGF-beta in NK cells via the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *Cell Immunology* **242**: 39-45.
- Stagg J., y Smyth M.J. 2007. NK cell-based cancer immunotherapy. *Drug News & Perspectives* **20**: 155-63.
- Steinle A., Li P., Morris D.L., Groh V., Lanier L.L., Strong R.K., y Spies T. 2001. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* **53**: 279-87.
- Sutherland C.L., Rabinovich B., Chalupny N.J., Brawand P., Miller R., y Cosman D. 2006. ULBPs, human ligands of the NKG2D receptor, stimulate tumor immunity with enhancement by IL-15. *Blood* **108**: 1313-9.
- Szczepanski M.J., Szajnik M., Welsh A., Whiteside T.L., y Boyiadzis M. 2011. Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor-beta1. *Haematologica* **96**: 1302-9.
- Tamaki S., Kawakami M., Yamanaka Y., Shimomura H., Imai Y., Ishida J., Yamamoto K., Ishitani A., Hatake K., y Kirita T. 2009. Relationship between soluble MICA and the MICA A5.1 homozygous genotype in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clinical Immunology* **130**: 331-7.
- Tamaki S., Sanefuzi N., Kawakami M., Aoki K., Imai Y., Yamanaka Y., Yamamoto K., Ishitani A., Hatake K., y Kirita T. 2008. Association between soluble MICA levels and disease stage IV oral squamous cell carcinoma in Japanese patients. *Human Immunology* **69**: 88-93.
- Trinchieri G. 1989. Biology of natural killer cells. *Advances in Immunology* **47**: 187-376.
- Upshaw J.L., Arneson L.N., Schoon R.A., Dick C.J., Billadeau D.D., y Leibson P.J. 2006. NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nature immunology* **7**: 524-32.
- Vivier E., Tomasello E., y Paul P. 2002. Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Curr Opin Immunol* **14**: 306-11.
- Waldhauer I., y Steinle A. 2006. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res* **66**: 2520-6.
- Wang W., Li Y.F., Sun X.W., Chen Y.B., Li W., Xu D.Z., Guan X.X., Huang C.Y., Zhan Y.Q., y Zhou Z.W. 2010. Prognosis of 980 patients with gastric cancer after surgical resection. *Chinese Journal of Cancer* **29**: 923-30.
- Washington K. 2010. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. *Ann Surg Oncol* **17**: 3077-9.
- Watson N.F., Spendlove I., Madjd Z., McGilvray R., Green A.R., Ellis I.O., Scholefield J.H., y Durrant L.G. 2006. Expression of the stress-related MHC class I chain-related protein

- MICA is an indicator of good prognosis in colorectal cancer patients. *International Journal of Cancer* **118**: 1445-52.
- Wenqi D., Li W., Shanshan C., Bei C., Yafei Z., Feihu B., Jie L., y Daiming F. 2009. EpCAM is overexpressed in gastric cancer and its downregulation suppresses proliferation of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **135**: 1277-85.
- Whang M.I., Guerra N., y Raulet D.H. 2009. Costimulation of dendritic epidermal gammadelta T cells by a new NKG2D ligand expressed specifically in the skin. *J Immunol* **182**: 4557-64.
- Wiemann K., Mittrucker H.W., Feger U., Welte S.A., Yokoyama W.M., Spies T., Rammensee H.G., y Steinle A. 2005a. Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *Journal of Immunology* **175**: 720-9.
- Wiemann K., Mittrucker H.W., Feger U., Welte S.A., Yokoyama W.M., Spies T., Rammensee H.G., y Steinle A. 2005b. Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J Immunol* **175**: 720-9.
- Wu J., Cherwinski H., Spies T., Phillips J.H., y Lanier L.L. 2000. DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine* **192**: 1059-68.
- Wu J., Song Y., Bakker A.B., Bauer S., Spies T., Lanier L.L., y Phillips J.H. 1999. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* **285**: 730-2.
- Wu J.D., Higgins L.M., Steinle A., Cosman D., Haugk K., y Plymate S.R. 2004a. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. *J Clin Invest* **114**: 560-8.
- Wu J.D., Higgins L.M., Steinle A., Cosman D., Haugk K., y Plymate S.R. 2004b. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. *The Journal of Clinical Investigation* **114**: 560-8.
- Xiao P., Xue L., Che L.H., Peng J.J., Wu H.X., Li Y., y Qiao H. 2008. Expression and roles of MICA in human osteosarcoma. *Histopathology* **52**: 640-2.
- Yokota S.J., Facciponte J.G., Kelleher R.J., Jr., Shultz L.D., Loyall J.L., Parsons R.R., Odunsi K., Frelinger J.G., Lord E.M., Gerber S.A., Balu-lyer S.V., y Bankert R.B. 2013. Changes in ovarian tumor cell number, tumor vasculature, and T cell function monitored in vivo using a novel xenograft model. *Cancer Immun* **13**: 11.
- Zamai L., Ahmad M., Bennett I.M., Azzoni L., Alnemri E.S., y Perussia B. 1998. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *The Journal of Experimental Medicine* **188**: 2375-80.
- Zhang C., Zhang J., Niu J., Zhou Z., y Tian Z. 2008. Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Human Immunology* **69**: 490-500.
- Zoller M. 2011. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer* **11**: 254-67.
- Zu H., Wang F., Ma Y., y Xue Y. 2013. Stage-stratified analysis of prognostic significance of tumor size in patients with gastric cancer. *PLoS ONE* **8**: e54502.