

UCH-FC
Biotecnología
A 815
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO



**ESTUDIO DE LAS FUNCIONES EFECTORAS DE LAS CÉLULAS iNKT
PERIFÉRICAS EN PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Gabriel Antonio Ascui Gac

Directora de Seminario de Título:

Dra. Carolina Hager Ribeiro
Facultad de Medicina – Universidad de Chile

Co-Directora de Seminario de Título:

Dra. María Carmen Molina
Facultad de Medicina – Universidad de Chile

Directora Patrocinante:

Dra. Daniela Sauma
Facultad de Ciencias – Universidad de Chile

Marzo, 2017

Santiago - Chile





INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Gabriel Antonio Ascui Gac,

“ESTUDIO DE LAS FUNCIONES EFECTORAS DE LAS CÉLULAS iNKT PERIFÉRICAS EN PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Carolina Hager Ribeiro
Directora Seminario de Título

Dra. María Carmen Molina
Co-Directora Seminario de Título

Dra. Daniela Sauma
Patrocinante Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dr. Elias Utreras

Presidente Comisión

Dra. María Rosa Bono

Evaluador

Cuatro firmas manuscritas en tinta azul, cada una sobre una línea horizontal que indica el espacio para la firma. Las firmas corresponden a las personas mencionadas en el texto: Carolina Hager Ribeiro, María Carmen Molina, Daniela Sauma, y María Rosa Bono.

Santiago, Marzo de 2017.

A mis amigos, a mi pueblo.

BIOGRAFÍA



Desde la infancia, me interesé en la ciencia y en el cómo funcionaba el mundo a mi alrededor. Poco a poco, iba armando un puzle que no acababa, al aparecer nuevas preguntas con cada paso, y mayor era mi interés por entender, por comprender el “porqué”, pero también el “cómo” y el “para qué”. Esta inquietud me llevó, cuando joven, a recorrer aventurados caminos: elegir el electivo de biología de 3^{ero} y 4^{to} medio, estudiar un tiempo en Argentina, participar en política, hacer arte y música.

Llegar a la Universidad de Chile significó abrir nuevas sendas, a través de buenos amigos, compañeros y colegas, nuevos desafíos y más claridades de lo que quería hacer y saber. El objetivo se convirtió en transformar Chile, en aportar a resolver las grandes inquietudes de nuestro pueblo en todos los frentes que me fuese posible, ya fuera desde la vocería de la Asamblea de Estudiantes de la Facultad de Ciencias del 2011, la investigación científica crítica y avanzada en el Laboratorio, o desde alguna inocente conversación en los pastos del Campus Juan Gómez Millas.

Todo científico sabe que decidir hacer lo que hace no es fácil, que existen obstáculos y trabas constantes para avanzar, pero, con la misma ferviente pasión con que varios de mis profesores nos enseñaron las bases de la biología molecular, es que quiero dedicarme a cambiar nuestra realidad a través de la ciencia y el conocimiento, llegando un poco más cerca a responder algunos tantos de aquellos “porqué”, “cómo” y “para qué”.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a la Dra. Carolina Ribeiro, por su paciencia y confianza depositada en mí, por su apoyo incondicional hacia mi trabajo y mi persona. También le agradezco a la Dra. María Carmen Molina por aquellas tantas ricas instancias de discusión de resultados, y por apoyar este trabajo con espacios físicos, instrumentos y reactivos.

Le agradezco a nuestro grupo del Laboratorio de Inmunoedición del Cáncer, a Felipe, Josefina y a Víctor, al grupo del Laboratorio de Inmunovigilancia y Evasión Inmune, la Maca, la Caro, la Karina y la Suri, la Marce y la Vale, por su compañía y amistad, a las personas del Centro de InmunoBiotecnología (IBT), el Lorenzo, el Jaime ("El Inmune"), el Roberto, la Cami, y a todas las personas del Programa Disciplinario de Inmunología, en especial a la Gaby, el Bastián, la Leo, la Jaxi, la Eli, el Perry, el Javier, el Gerardo, la Katina y la Pauli, la Caro y el Mati, el Alfons', la Sra. Juani, la Sra. Ruth, la Sra. Nancy, quienes fueron un gran apoyo con sus consejos, enseñanzas y alegrías, que pasaron de ser mis colegas a mis amigos y amigas.

A La Dra. Bárbara Pesce, por su paciencia, su apoyo técnico y científico, por tantas veces que me ayudó con su buena disposición a enseñarme de la inmunología y de la vida, mientras procesábamos las células en el Citómetro de flujo.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias, con que compartimos nuestros mejores años en el Campus Juan Gómez Millas, el Mauro, el Wachi, la Jessa, la Viole, el Timmy, la Susana, la Cami, el Pancho, la Silvia, el Seba, la Clau, el Noé, la Joselyn (o Raquel), Mati, la Nico, la Favi, el Weymann y el Nahuel.

A mis amigos de la vida, que tantas aventuras pasamos y seguimos viviendo, el Tople, el Eisa, el Víctor, el Pika, el Alfredo, el Pardo, el Topo, el Webato, la Dani, La Nini, la Nata, el Car'e Laucha, la Paz, el Romano, la Java, la Xio, la Silvana, la Carola, el Diego, y tantos otros que faltan por mencionar.

A las personas que conocí en la Facultad de Medicina, la Dra. Mercedes López, la Dra. Inés Pepper, el Dr. Jonas Chnaiderman, a Paula Rojas, Camila Vásquez, Ximena Toro y Javier Morales, les agradezco esas tantas conversaciones de hacia dónde es que va la medicina y la ciencia en Chile.

Al Frente de Estudiantes Libertarios y la Izquierda Libertaria, que son mis escuelas de lucha, de desarrollo personal y político, y a mis compañeros y compañeras del sector público, el Mario, el Hans, el Paruski, el Marcelo, la Menchu, y a mis compañeros de la base de Ciencias el Guille, el Nico, a mis compañeros ya de varios años y trayecto, el Felipe, el Diego, el Sergio, el Martín, el Cristóbal, el Benja, el Jano, y finalmente, a los compañeros que me enseñaron lo que significa el compromiso militante, Juan Williams y Victor Vallejos.

También me gustaría hacer un agradecimiento especial a la Gisselle, mi compañera, por su apoyo en las etapas finales de mi tesis, por su compañía, su cariño y tantos buenos momentos que hemos pasado juntos, riéndonos de la adversidad, de la vida, y de todo.

A mi familia, y a todos, gracias.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunovigilancia y Evasión Inmune y el Laboratorio de Inmunoedición del Cáncer del Programa Disciplinario de Inmunología del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), ubicado en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El trabajo contó con el financiamiento de los proyectos Enlace ENL012/15 de la Universidad de Chile, FONDECYT 11110456 y FONDECYT 1130330.

TABLA DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
FINANCIAMIENTO.....	vi
TABLA DE CONTENIDOS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
Cáncer Gástrico.....	5
Inmunoección del Cáncer.....	8
Células Natural Killer T.....	13
Células iNKT en el cáncer.....	16
El receptor NKG2D.....	18
Inmunoterapias contra el cáncer.....	20
Inmunoterapias con células iNKT.....	24
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
METODOLOGÍA.....	28
Muestras de sangre de pacientes y controles sanos.....	28
Preparación de PBMC y suero.....	30
Líneas celulares.....	30
Extracción de RNA.....	31
Retro-transcripción.....	32
PCR convencional.....	32
PCR en tiempo real.....	33
Citometría de Flujo.....	33
Expansión de células iNKT y <i>cell sorting</i>	34
Ensayo de degranulación y análisis de la producción de IFN- γ por células iNKT.....	35
Estadística.....	36
RESULTADOS.....	37
Expresión del receptor NKG2D en células iNKT periféricas.....	37
Expansión <i>ex vivo</i> de células iNKT.....	44
Expresión de ligandos de NKG2D y CD1d en líneas celulares tumorales.....	47
Ensayos de degranulación y producción de IFN- γ	51
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....	67
ANEXOS.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1	Clasificación molecular del cáncer gástrico.	7
Figura N° 2	Célula iNKT.	14
Figura N° 3	Caracterización fenotípica de células iNKT periféricas analizadas por Citometría de Flujo.	38
Figura N° 4	Expresión del receptor NKG2D y de los marcadores CD4 y CD8a en la superficie de células iNKT de sangre periférica.	39
Figura N° 5	Frecuencia de células iNKT periféricas en pacientes con CG y donantes sanos.	40
Figura N° 6	Expresión del receptor de activación NKG2D en células iNKT periféricas de pacientes con CG y donantes sanos.	41
Figura N° 7	Grupos de pacientes con CG con diferentes niveles de expresión del receptor de activación NKG2D en células iNKT periféricas.	42
Figura N° 8	Expresión del receptor NKG2D en las subpoblaciones CD4+ y CD8a+ de células iNKT.	43
Figura N° 9	Expansión <i>in vitro</i> y purificación de células iNKT.	45
Figura N° 10	Fenotipos de las células iNKT periféricas antes y después del proceso de expansión <i>in vitro</i> .	46
Figura N° 11	Expresión de ligandos de NKG2D en células blanco.	48
Figura N° 12	Expresión de las moléculas CD1d y MHC de clase I en las células K562 y MKN-45.	49
Figura N° 13	Niveles de expresión de mRNA de CD1d en líneas celulares tumorales.	50
Figura N° 14	Ensayo de degranulación y producción de IFN- γ por células estimuladas con PMA y Ionomicina.	51
Figura N° 15	Ensayo de degranulación, producción de IFN- γ y expresión de NKG2D por células iNKT purificadas de un paciente con CG y un donante sano luego de co-cultivar con células K562.	53
Figura N° 16	Ensayo de degranulación, producción de IFN- γ y expresión de NKG2D por células iNKT purificadas de un paciente con CG y un donante sano luego de co-cultivar con células MKN-45.	54

Figura N° 17 Esquema de la activación de células iNKT en pacientes con CG y donantes sanos.

65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1	Ensayos clínicos recientes utilizando células iNKT como su blanco terapéutico.	25
Tabla N° 2	Características clínico-patológicas de los pacientes con cáncer gástrico.	29

LISTA DE ABREVIATURAS

ACK	<i>Ammonium-Chloride-Potassium Lysing Buffer</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
APC	<i>Allophycocyanin</i>
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
cDNA	<i>Copy DNA</i>
CG	<i>Cáncer gástrico</i>
CIK	<i>Cytokine-induced killer</i>
CIN	<i>Chromosome Instability</i>
CSF-1	<i>Colony stimulating factor 1</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 1</i>
DC	<i>Dendritic cell</i>
DGAC	<i>Diffuse gastric adenocarcinoma</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>deoxynucleoside triphosphate</i>
DS	<i>Donantes sanos</i>
dTT	<i>1,4-Dithiothreitol</i>
EBV	<i>Virus Epstein-Barr</i>
EDTA	<i>ácido etilendiaminotetraacético</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenquimal transition</i>
ER	<i>receptores de estrógeno</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FMO	<i>Fluorescence minus one</i>
FSC	<i>Foward Scatter Channel</i>
FVD	<i>Fixable Viability Dye</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GS	<i>Genomic Stability</i>
GVHD	<i>Graft-versus-host disease</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HPRT	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase</i>
IDO	<i>Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IGAC	<i>Intestinal gastric adenocarcinoma</i>
iGb3	<i>Isoglobotrihexosilceramida</i>
IL	<i>Interleuquina</i>
ILC	<i>Innate lymphoid cell</i>



iNKT	<i>Invariant natural killer T cell</i>
IPSC	<i>Induced pluripotent stem cell</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MICA/B	<i>MHC class I polypeptide-related sequence A/B</i>
MSI	<i>Microsatellite instability</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NKG2D	<i>Natural Killer Group 2, member D</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PET-CT	<i>Positron emission tomography-computed tomography</i>
PIM	<i>Fosfatidilinositol manosidos</i>
PMA	<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PR	<i>receptores de progesterona</i>
RAET	<i>Retinoic acid early transcript</i>
Rb	<i>Retinoblastoma protein</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPM	<i>Revoluciones por minuto</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
scFv	<i>Single chain variable fragment</i>
SSC	<i>Side Scatter Channel</i>
TAM	<i>Tumor-associated macrophage</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TGF-β	<i>Tumor growth factor β</i>
Th1	<i>Helper Type 1</i>
Th17	<i>Helper Type 17</i>
Th2	<i>Helper Type 2</i>
TIM-3	<i>T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i>
ULBP	<i>UL16 binding protein</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
XELOX	<i>Regimen de quimioterapia con capecitabina y oxaliplatina.</i>
α-GalCer	<i>α-Galactosilceramida</i>
α-GalDAG	<i>α-Galactosildiacylgliceroles</i>
α-GlcDAG	<i>α-Glucosildiacylglicerol</i>

RESUMEN

El cáncer gástrico (CG) es el tercer cáncer más letal a nivel mundial. Las células *natural killer* T invariantes (iNKT) tienen un rol fundamental en la inmunomodulación del cáncer. Estas reconocen células tumorales utilizando su receptor de célula T (TCR) invariante, el cual reconoce glicolípidos presentados por células tumorales que expresan CD1d, o a través del receptor de activación NKG2D, cuyos ligandos son inducidos en las células blanco por estrés asociado a la carcinogénesis. Ocurrido el reconocimiento de la célula blanco, las células iNKT pueden producir una gran cantidad de citoquinas que modulan la respuesta inmune anti-tumoral y/o directamente lisar las células tumorales. Resultados de nuestro laboratorio indican que pacientes con CG presentan mayores frecuencias de células iNKT circulantes que controles sanos; sin embargo, el potencial citotóxico de estas células no ha sido analizado. Se prepararon células mononucleares de sangre periférica de pacientes con CG y donantes sanos, y la expresión superficial de NKG2D en las células iNKT se determinó por Citometría de Flujo. Células iNKT se expandieron *in vitro* utilizando un pulso único de α -Galactosil Ceramida (α -GalCer), un antígeno exógeno que estimula específicamente a las células iNKT, y mantenidas en un medio de cultivo enriquecido con IL-2 e IL-7 por 4 semanas, y purificadas por *cell sorting* utilizando marcadores específicos para células iNKT humanas (CD3, TCR V α 24-J α 18, and TCR V β 11). Luego de co-cultivar las células iNKT por 5 h con líneas celulares de eritroleucemia K562 y adenocarcinoma gástrico MKN-45, los niveles de NKG2D, la producción de IFN- γ y la degranulación celular medida por el marcador CD107a se analizaron en las células iNKT por Citometría de Flujo. La mayoría de los pacientes con CG presentaron células iNKT con menores niveles de NKG2D que donantes sanos. Así mismo, células iNKT expandidas desde los pacientes con CG presentaron menor

potencial citotóxico y una disminución en la producción de IFN- γ que células iNKT de controles sanos. Estos resultados sugieren que las células iNKT de pacientes con CG presentan un compromiso en respuesta inmune anti-tumoral, lo que podría contribuir al escape inmune del tumor y afectar la capacidad del sistema inmune en orquestar una potente respuesta inmunológica contra esta enfermedad.

ABSTRACT

Gastric cancer (GC) is the third most common cause of cancer-related death worldwide. Invariant natural killer T (iNKT) cells have a major role in cancer immunoediting. They recognize tumor cells either using their invariant T cell receptor (TCR), which recognizes glycolipid antigens presented by CD1d-expressing tumors, or by sensing tumor-associated stress-induced ligands through the activating receptor NKG2D. Upon target cell recognition, iNKT cells can produce large amounts of cytokines, which modulate the anti-tumor immune response, and/or directly lyse tumor cells. Previous results in our Laboratory indicate that GC patients present higher frequency of peripheral iNKT cells than healthy controls. Nevertheless, their cytotoxic potential remained to be addressed. Peripheral blood mononuclear cells from GC patients and healthy donors were prepared, and iNKT cell-surface expression of NKG2D was determined by flow cytometry. iNKT cells were then expanded *in vitro* using a single pulse of α -Galactosylceramide, an exogenous antigen that specifically stimulates iNKT cells, and maintained in fresh medium containing IL-2 and IL-7 for 4 weeks, after which they were purified by cell sorting using iNKT cell specific markers (CD3, TCR V α 24-J α 18, and TCR V β 11). The degranulation marker CD107a, IFN- γ and NKG2D expression on iNKT cells were measured by flow cytometry after co-cultures with the human erythroleukemia cell line K562 and gastric adenocarcinoma cell line MKN-45 for 5 h. Most GC patients presented peripheral iNKT cells with low levels of NKG2D on the cell surface. Accordingly, expanded iNKT cells from GC patients showed decreased production of IFN- γ and reduced cytotoxic activity against tumor target cells. These results suggest that circulating iNKT cells from GC patients present compromised anti-tumor immune

response, which may contribute to tumor immune escape and affect the immune system capacity to orchestrate strong responses against this disease.

INTRODUCCIÓN

Cáncer Gástrico

El cáncer gástrico (CG) es la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo [1], presentando una incidencia geográfica variada, con prevalencia en Japón, Corea, China, y regiones de Centro y Sud América [2, 3]. En Chile, alrededor de 3.000 personas mueren anualmente a causa de esta enfermedad, siendo éste el cáncer con mayor índice de mortalidad entre hombres y mujeres en nuestro país [4].

En etapas tempranas de la enfermedad, pacientes con esta patología son prácticamente asintomáticos. Alrededor de la mitad de los pacientes presentan complicaciones gastrointestinales no específicas, como dispepsia [5]. En cambio, en etapas avanzadas del CG, los pacientes pueden presentar anorexia, pérdida de peso, dolor abdominal, náusea, vómitos, y, en caso de tumores grandes, falta de apetito y una distensión estomacal deficiente. Tumores con características ulcerantes pueden llegar a causar hemorragias gastrointestinales [5]. A pesar de los recientes avances en tratamientos (en particular, la inmunoterapia con anticuerpos monoclonales) y diagnóstico, además de políticas públicas en algunos países, como Japón, que realiza endoscopias preventivas para su población, el pronóstico para los pacientes con CG, en etapa avanzada, sigue siendo muy bajo, teniendo los pacientes una tasa de supervivencia de tan solo 25% a 5 años [6]. A nivel mundial, se proyecta que este tipo de cáncer aumentará su tasa de mortalidad, quedando entre las 10 mayores causas de muerte para el 2030 [7].

Debido a la falta de especificidad de la sintomatología, la detección de los tumores gástricos, por lo general, ocurre en estados avanzados de la enfermedad, donde

95% los pacientes presentan adenocarcinomas (tumores malignos del epitelio glandular) [5]. Estos tumores son clasificados en dos subtipos histológicos, de acuerdo a la clasificación de Lauren [8]: adenocarcinoma gástrico intestinal (IGAC), el cual está ligado a factores de riesgo ambientales, tales como la dieta o la patogénesis provocada por la bacteria *Helicobacter pylori*, mientras que el adenocarcinoma gástrico difuso (DGAC) está más bien asociado a factores genéticos, como la hipermetilación del gen CDH1 (*E-cadherin 1*) [8]. Lamentablemente, esta y otras clasificaciones no han logrado predecir de buena manera las respuestas a tratamiento ni el progreso de la enfermedad. Es por ello que la clasificación molecular del CG ha sido un avance importante en poder determinar tanto la etiología como la estrategia de tratamiento para pacientes específicos [9]. Un trabajo reciente, basado en diversas técnicas ómicas, ha definido 4 subgrupos de adenocarcinomas gástricos, según perfiles genómicos, transcriptómicos y proteómicos: un primer grupo comprende los pacientes positivos para el virus Epstein-Barr (EBV-positivo) (9% de los aproximadamente 300 casos estudiados), un segundo grupo definido por la inestabilidad de micro-satélites (MSI) (22%), un tercero grupo definido por su estabilidad genómica (GS) (20%), y, finalmente, un perfil con una alta inestabilidad cromosómica (CIN) (50%) (Figura N° 1) [10].

Altas ingestas de sal, así como de alimentos altos en nitrosaminas (presente en alimentos preservados, cervezas, pescado y alimentos fritos), además de fumar y beber alcohol han probado ser factores de riesgo que contribuyen al desarrollo del adenocarcinoma gástrico [5, 11, 12]. Además, la infección con *Helicobacter pylori* incrementa 6 veces el riesgo de contraer la enfermedad al gatillar una inflamación crónica, y hay factores de riesgo genéticos, como polimorfismos en citoquinas

involucradas en la respuesta inmune contra *H. pylori*, que pueden aumentar la susceptibilidad al CG [13].

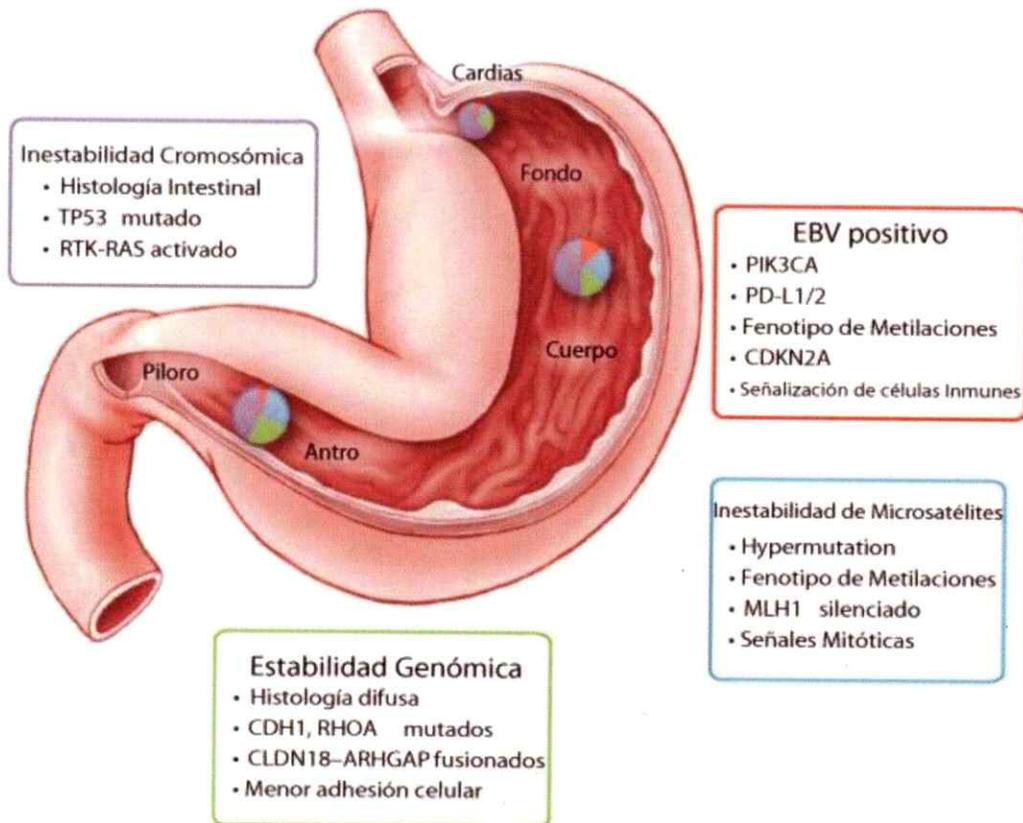


Figura N° 1: Clasificación molecular del cáncer gástrico. El cáncer gástrico puede tener variadas etiologías, histologías y desarrollos de la enfermedad, por lo que su clasificación ha sido un reto para los médicos e investigadores. Recientemente, se describieron 4 subtipos de CG, según diferentes características moleculares: Epstein-Barr (EBV-positivo) (9%), de inestabilidad de micro-satélites (MSI) (22%), con estabilidad genómica (GS) (20%) y un perfil con alta inestabilidad cromosómica (CIN) (50%). Figura modificada de [10].

La etiología misma de esta enfermedad se ha relacionado con una gastritis crónica ocasionada por factores ambientales, como *H. pylori*, o por una reacción inmune que cause lesiones en el estómago, creando un ambiente conducente a una inflamación gástrica [5, 13]. Este ambiente inflamatorio es el que finalmente conduce a una

acumulación de daños genéticos, afectando funciones cruciales para el desarrollo del cáncer, como, por ejemplo, autosuficiencia de señales de crecimiento, escape de señales de dormancia, resistencia a la apoptosis, potencial replicativo sostenido, inducción de angiogénesis, y potencial invasivo o metastásico [13, 14]. Las células epiteliales gástricas sufren de metaplasias intestinales, conducente a posteriores displasias e hiperplasia, considerándose como carcinomas al llegar éstas células a la lámina propia. Además, se ha observado que el microambiente tumoral pro-inflamatorio favorecería la transición epitelio-mesénquima (EMT) y, por tanto, la metástasis en los adenocarcinomas gástricos [15].

Debido a que la enfermedad se detecta en etapas avanzadas, el tratamiento más recurrente es la cirugía, generalmente una gastrectomía total, la cual, lamentablemente, genera una alta morbilidad y no aumenta significativamente la sobrevida de los pacientes. Otros países con alta incidencia de CG, como Japón, han incorporado otras técnicas de tratamiento quirúrgico, como las endoscopias para tumores de tamaños menores de 2 cm, y gastrectomías laparoscópicas en caso de CG en estados tempranos [13]. Aun así, en Chile no hay demasiadas alternativas terapéuticas otras que la gastrectomía total, además de ser uno de los tipos de cáncer menos estudiados a nivel nacional [16]. Debido a los recientes avances que la incorporación de diversas inmunoterapias ha tenido en varios tipos de cánceres, el estudiar la inmunología del CG se hace indispensable para diseñar nuevas políticas de salud pública para países con altas tasas de mortalidad e incidencia de esta enfermedad.

Inmunomodulación del Cáncer

Durante todo el proceso de establecimiento del tumor y su microambiente, las células del sistema inmune y las células tumorales interactúan constante y

dinámicamente, hasta que finalmente pueden ocurrir dos resultados: la eliminación de las células transformadas o la evasión de la respuesta inmune por parte del tumor. Este proceso dinámico de interacciones se ha descrito como inmunoección del cáncer [17, 18], el cual ha sido caracterizado en 3 etapas: eliminación, equilibrio y escape inmune [18].

Durante la etapa de eliminación, las células del sistema inmune innato, en particular macrófagos, neutrófilos y células *Natural Killer* (NK), son la primera barrera inmune ante células propias transformadas o estresadas, interactuando de forma directa con el tejido tumoral [19]. Asimismo, otras células inmunes también se ven involucradas en este proceso inicial, entre ellas las células *Natural Killer T* (NKT) y las células linfoides innatas (ILC) [20, 21]. Las células NK pueden discriminar entre células propias y transformadas a través de diversos mecanismos de vigilancia inmune [22], donde el correcto funcionamiento de las moléculas efectoras del hospedero, como Interferones (IFN)- α/β e IFN- γ , perforina, Fas/FasL, *Tumor Necrosis Factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) y *Natural Killer Group 2, member D* (NKG2D) son esenciales para montar una adecuada respuesta anti-tumoral [17, 23]. Una de estas moléculas es el receptor de activación NKG2D, el cual reconoce ligandos relacionados a estrés celular e infección viral, y cuya expresión también ha sido descrita en diversos tipos de células tumorales [24]. Luego de la respuesta inmune inmediata, ocurre la presentación de antígenos a linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺, células que reconocen antígenos tumor-específicos a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y II, respectivamente, expresados por las células presentadoras de antígenos. Paralelamente, los linfocitos B empiezan a producir anticuerpos que reconocen estos y otros antígenos para facilitar la eliminación de las células tumorales [18].

Si la eliminación no es completa, se progresa a la segunda fase: el equilibrio. Si bien durante esta etapa el tumor persiste, el sistema inmune impide que este se expanda, eliminando a las células tumorales más inmunogénicas, mientras que otras células entran en un estado de dormancia, que puede durar varios años [18]. Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria, que reconocen antígenos asociados al tumor o antígenos específicos al tumor (neo-antígenos), pueden detectarse en pacientes con melanoma [25]. A pesar de esto, diversos tumores también tienen la capacidad de secretar la quimioquina CCL22, entre otras, las cuales reclutan células inmunosupresoras, como linfocitos T reguladores, que expresan el receptor de quimioquina CCR4, y que son seleccionados según estos mismos antígenos, promoviendo tolerancia específica y secretando diversas señales inmunosupresoras, como interleuquina (IL)-10 y *transforming growth factor* (TGF)- β [26], impidiendo una eliminación total del tejido tumoral. Además, se ha establecido que, durante esta fase, existe una oposición entre las señales de IL-12, que promueve la eliminación del tumor, e IL-23 (que comparte con IL-12 la subunidad IL-12p40), la cual promueve la persistencia y mantención de los tumores [27]. Otras señales del perfil Th1, originalmente consideradas como pro-inflamatorias y anti-tumorales, en realidad pueden inducir la senescencia en algunos tumores, como es el caso de IFN- γ combinado con *tumor necrosis factor* (TNF)- α , los cuales generan una hipo-fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb), una proteína supresora de tumores que, al ser hipo-fosforilada, inhibe el factor de transcripción E2F, y, por tanto, el paso de la fase G1 a S del ciclo celular se detiene mientras se mantenga la presencia de estas 2 citoquinas [28].

En el caso de que el balance se rompa favorablemente para el tumor, debido a un agotamiento del sistema inmune, una inhibición de la respuesta inmune anti-tumoral

se establece a través del reclutamiento de células inmunosupresoras o la aparición de nuevas variantes celulares tumorales más agresivas o con alta capacidad regulatoria, lo que caracteriza la fase de evasión inmune por parte del tumor. Es en esta fase que finalmente llega la expresión clínica de la enfermedad [29]. Existen variadas estrategias de escape reportadas en diversos tipos tumorales, las cuales están basadas en la reducción de la capacidad del sistema inmune de reconocer a los tumores, como la disminución de los niveles de expresión de antígenos tumorales potentes, la pérdida de la expresión del MHC clase I y de moléculas co-estimuladoras, entre otras. Así, los tumores que escapan del sistema inmune, liberando citoquinas como *vascular endothelial growth factor* (VEGF) y TGF- β , así como también expresando moléculas inmunoregulatorias, como IDO (*Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase*), TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*) o PD-L1 (*Programmed death-ligand 1*), desarrollan un microambiente cada vez más regulatorio, lo que favorece la progresión del tumor [29].

En el caso específico del CG, variados tipos celulares parecen estar involucrados en los procesos de evasión [30]. El reclutamiento de granulocitos y neutrófilos, por medio de IL-8, hacia los tejidos lesionados o infectados por patógenos como *H. pylori*, promueve gastritis y lesiones del tejido epitelial debido a la generación de especies reactivas de oxígeno; a este fenómeno, además, contribuyen factores angiogénicos y diferentes metaloproteasas que promueven la EMT [31]. Al mismo tiempo, la liberación de quimioquinas desde el tejido tumoral, como CSF-1, GM-CSF y CCL2, promueve el reclutamiento y maduración de macrófagos asociados al tumor (TAM) [32], que promueven el establecimiento del microambiente tumoral al secretar ligandos de HER1-4 (EGFR) [33, 34], los cuales, a su vez, promueven la expresión de citoquinas

reguladoras, como IL-6 e IL-10 vía STAT3, tanto en el tejido tumoral como en los TAM [35]. Si bien la suma de estos factores parece presentar un escenario más bien regulatorio, la inflamación crónica, característica del CG [15], se encuentra mediada por la liberación conjunta de IFN- γ e IL-6 por células Th1 y Th2, respectivamente, las cuales promueven gastritis y atrofia de las células epiteliales [30]. Estudios *in vitro* con la línea celular de adenocarcinoma gástrico AGS demostraron que la inducción de NF- κ B e IL-8 está mediada por la exposición a IL-17A [36], una citoquina que normalmente está presente en el estroma y mucosa gastrointestinal para mantener la homeostasis con la flora intestinal bacteriana. Por otro lado, una mayor frecuencia de células B CD19⁺ ha sido correlacionada con una mayor supervivencia libre de enfermedad en pacientes con CG [37], y la frecuencia de células B reguladoras, definidas como células CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺, parecen disminuir durante quimioterapia en pacientes en los cuales el CG no progresa, indicando su relevancia en la enfermedad [38]. Recientemente, una subpoblación de células B reguladoras definidas como células CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} productoras de IL-10 fueron detectadas tanto en sangre periférica como en tumores gástricos, y su mayor presencia fue correlacionada con un peor pronóstico clínico [39]. En otro estudio, células T reguladoras infiltrantes de tumor demostraron también estar correlacionadas con un peor pronóstico clínico en pacientes con CG [40]. Todas estas células reguladoras disminuyen las capacidades de las células efectoras, entre ellas los linfocitos T.

Una subpoblación de linfocitos T que ha sido considerada como fundamental en los procesos de inmunomodulación del cáncer son los linfocitos *Natural Killer* T (NKT) y, en este estudio, nos focalizaremos en ellas.

Células Natural Killer T

Las células NKT están involucradas en variados procesos inmunológicos: en la inmunidad contra infecciones microbianas, autoinmunidad, tolerancia a trasplantes e inmunomodulación del cáncer [41]. Las células NKT son un grupo especializado de linfocitos T que poseen propiedades características tanto de linfocitos innatos como de linfocitos T de memoria [42], y, si bien poseen el receptor de células T (TCR), a la vez presentan varios marcadores característicos de células NK, como DNAM-1, CD94 o 2B4 [43]. El fenotipo de memoria está dado por la alta expresión de diversos co-receptores, como CD28, CD40L, OX40 y CD62L, así como también otras moléculas marcadoras de activación o de linfocitos T maduros, como CD56 y CD69, además de diversos receptores de citoquinas y quimioquinas, entre estos CD25, CD127 (IL-7R α), IL-17RB (IL-17), IL-12R, CCR2, CCR5 y CXCR3 [44, 45]. Una vez activadas por antígenos presentados a su TCR, las células NKT son capaces de producir rápidamente grandes cantidades de citoquinas de tipo Th1 y Th2, además de presentar una actividad citolítica directa al liberar moléculas citotóxicas, como granzima B y perforina, capaces de lisar células tumorales *in vitro* e *in vivo* [46].

La prevalencia de células NKT en humanos es baja y variada, llegando a representar entre el 0,001 al 3% de los leucocitos de la sangre periférica [42]. A pesar de esto, las células NKT tienen un rol crucial en la inmunidad anti-tumoral, lo que ha sido ampliamente corroborado en diversos estudios clínicos y pre-clínicos [41, 47]. En humanos, se han definido 2 tipos de células NKT: las de tipo I, o células NKT invariantes (iNKT), y las NKT tipo II, también denominadas no clásicas o diversas (dNKT). Las células iNKT tienen un TCR con una configuración restringida, formado por las variantes de la cadena α V α 24-J α 18 comúnmente asociada a la variante de la cadena β V β 11 [48].

En cambio, las células NKT de tipo II presentan una mayor diversidad en su repertorio de TCR, y son capaces de reconocer antígenos que no son agonistas de las células NKT de tipo I [48]; sin embargo, es poco lo que se conoce de esta subpoblación de células NKT, ya que, a la fecha, se carecen de marcadores específicos, lo que ha restringido su estudio.

En el esquema clásico de una respuesta inmune adaptativa, las células presentadoras de antígenos (APC) exhiben, a través de sus moléculas MHC clásicas de clase I o clase II, antígenos peptídicos reconocidos por el TCR de los linfocitos T, y, en el caso de que la recombinación y posterior selección tímica permita el reconocimiento del antígeno, los linfocitos se activan y pueden ejercer sus funciones efectoras. Sin embargo, en el caso de las células iNKT, el TCR no interactúa con MHC clásicos ni reconoce antígenos de naturaleza peptídica, sino que reconoce antígenos glicolipídicos presentados por la molécula CD1d presente en las APC [48].

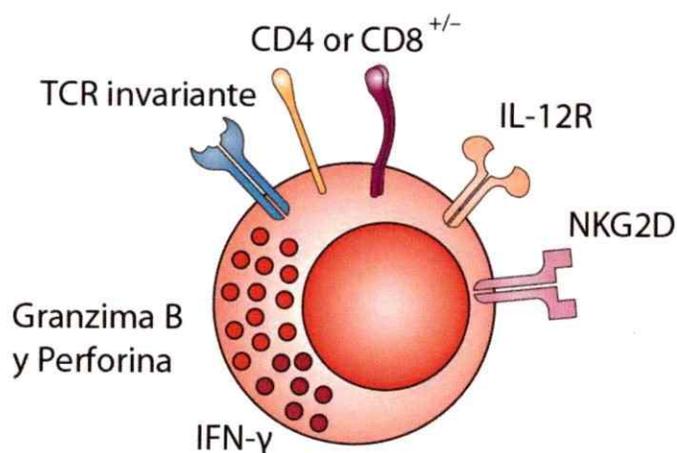


Figura N° 2: Célula iNKT. Las células iNKT expresan diversos marcadores típicos de células NK; además, presentan un fenotipo de células T maduras y de memoria. Pueden secretar rápidamente grandes cantidades de citoquinas tanto de tipo Th1 como Th2, ejercer citotoxicidad directa por medio de la liberación de gránulos con granzima B y perforina, y, además, reconocer, a través de su TCR invariante, antígenos de naturaleza glicolipídica presentados por la molécula CD1d. Debido a todas estas características, estas células son fundamentales para montar una respuesta inmune temprana.

Las moléculas CD1 son una familia de moléculas MHC de clase I no clásicas codificadas en el cromosoma 1 en humanos, a diferencia de las demás moléculas de MHC clase I y II, que están codificadas en el cromosoma 6 [49]. Similar al MHC de clase I, los miembros de la familia CD1 se asocian a la molécula β 2-microglobulina [49]. Por otro lado, a diferencia de las moléculas de MHC de clase I, estas son no polimórficas y presentan antígenos glicolípidos en vez de péptidos. En el ser humano, la familia CD1 está formada por 5 moléculas, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d y CD1e. La más común es CD1d, expresada principalmente en células APC, como células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, pero también se ha observado su presencia en células epiteliales intestinales y otros órganos, así como en células tumorales [49, 50]. Consecuentemente, en modelos murinos de cáncer, se ha observado que ratones *knock-out* para CD1d presentan menores capacidades de montar respuestas anti-tumorales [51].

Las células iNKT pueden discriminar entre antígenos glicolípidos propios, como isoglobotrihexosilceramida (iGb3), y foráneos, como los antígenos lipídicos asociados a tumores [52], así como lípidos de origen microbiano, como α -galacturonosilceramidas de *Sphingomonas* spp., α -galactosildiacylglicerol (α-GalDAG) de *Borrelia burgdorferi*, α -glucosildiacylglicerol (α-GlcDAG) de *Streptococcus pneumoniae* y fosfatidilinositol manosidos (PIM) de *Mycobacterium tuberculosis* [53]. Además, las células iNKT pueden ser activadas por colesterol α -glucosidos, uno de los principales lípidos de la pared celular de *H. pylori*, lo que podría estar jugando un rol en las inflamaciones gástricas mediadas por esta bacteria [54]. Se ha comprobado que las células iNKT responden con una fuerte producción de citoquinas ante la presentación del antígeno α -galactosilceramida (αGalCer), un glicosfingolípido producido por *Agelas mauritanus*, una esponja marina

[55], que es posible producir sintéticamente, el cual ha sido propuesto, incluso, como una posible terapia para diversos tipos de cáncer [56].

Al activarse, las células iNKT coordinan respuestas mediadas tanto por las células del sistema inmune innato como adaptativo a través de la secreción de citoquinas, la expresión de moléculas co-estimuladoras y citotoxicidad directa [57]. Su activación y la intensidad de la respuesta depende del tipo de antígeno que les son presentados por la molécula CD1d [58, 59], el estado de activación de las APC [60], y la presencia de citoquinas pro-inflamatorias [61]. Su activación puede inducir a la rápida liberación de una gran cantidad de citoquinas, dado que son capaces de almacenar una gran cantidad de mRNA preformados de estas citoquinas. Pueden liberar citoquinas tanto de tipo Th1, como IFN- γ y TNF- α , como Th2, incluyendo IL-4 e IL-13 [62], dependiendo del estímulo. Además, son capaces de inducir la maduración de células dendríticas a través de moléculas co-estimuladoras, como CD40L, y modular, a través de IFN- γ , la actividad de células NK y linfocitos T CD8⁺ [63].

Células iNKT en el cáncer

La expresión de CD1d en varios tipos de células tumorales convirtió a las células iNKT en candidatos para terapias anti-tumorales. CD1d se expresa en tumores de origen hematopoyético, mientras que gran parte de los tumores sólidos no expresan CD1d [50]. Si bien las células iNKT no pueden reconocer, mediante su TCR invariante, a tumores CD1d⁺, se ha demostrado que se localizan en el microambiente tumoral [64], y que son capaces de eliminar o inhibir macrófagos CD1d⁺ asociados a tumor y que presentan actividad pro-tumoral, los cuales realizan presentación cruzada de glicolípidos derivados del tumor vía CD1d [50]. Además, se sabe que se requieren bajos niveles de CD1d para

la presentación antigénica a células iNKT, lo que confiere a las células tumorales una mayor susceptibilidad a la actividad citotóxica mediada por las células iNKT.

Tal como mencionado anteriormente, las células iNKT presentan varias propiedades anti-tumorales relevantes. Una de las razones por las que el sistema inmune tiene problemas al montar una respuesta anti-tumoral, es el ambiente inmunosupresor del tumor, generando dificultades para inducir una respuesta de células T específicas contra el tumor [65]. La capacidad de las células iNKT de generar rápidamente altas cantidades de IFN- γ provoca la activación de células del sistema inmune innato, como células NK y neutrófilos, así como el sistema inmune adaptativo, favoreciendo la respuesta mediada por las células T CD8⁺ citotóxicas y células Th1 CD4⁺ [50, 66]. Asimismo, las células iNKT pueden activar a células dendríticas inmaduras por medio de moléculas co-estimuladoras, como CD40L, induciendo la maduración de éstas, lo que, además, genera una gran liberación de IL-12, la cual activa aún más las células iNKT, seguida de la activación de células T CD8⁺ y células NK [67].

Una baja frecuencia de células iNKT o una producción deficiente de citoquinas han sido asociadas al desarrollo de cáncer en pacientes y modelos murinos [68-72]. El número de células iNKT en sangre periférica de pacientes con melanoma, leucemia, cáncer de pulmón, de mama, de próstata y colon está claramente deficiente, y un bajo nivel de células iNKT circulantes ha sido asociado a un diagnóstico poco favorable en pacientes con cáncer [41, 73]. También puede ocurrir que el número de células iNKT circulantes no varíe, pero sí su capacidad de producir IFN- γ [68]. Esta citoquina es importante para la actividad anti-tumoral de las células iNKT, ya que puede inducir una amplificación autocrina o paracrina de la respuesta anti-tumoral directa o a través de otras células del sistema inmune [48, 74]. Por lo tanto, estos antecedentes sugieren que

deficiencias en la producción de IFN- γ por las células iNKT podrían ser condicionantes para el desarrollo de la enfermedad [41].

El efecto citotóxico directo de las células iNKT suele estar mediado por la interacción entre el TCR invariante de estas células y la presentación de antígenos por medio de la molécula CD1d en la célula tumoral, resultando en una citotoxicidad directa sobre células tumorales, la cual es dependiente de perforina [65]. A pesar de esto, existe otra vía de activación de la citotoxicidad mediada por las células iNKT, a través del receptor de activación NKG2D [75], el cual se expresa en varias células citotóxicas, incluyendo células NK, linfocitos T CD8⁺, células iNKT y linfocitos T $\gamma\delta$ [76].

El receptor NKG2D

El receptor NKG2D (*Natural Killer Group 2, member D*) es un receptor transmembrana similar a lectina tipo II tipo C que detecta ligandos propios inducidos bajo condiciones de estrés celular [77]. En humanos, sus ligandos incluyen las moléculas MICA (*MHC class I polypeptide-related sequence A*), MICB y 6 miembros de la familia ULBP (*UL16 binding protein*, también conocido como *retinóic acid early transcript protein*), todas glicoproteínas con dominios homólogos a las cadenas MHC clase I [78].

Durante el establecimiento y desarrollo del tumor y su microambiente, las células tumorales expresan diversos tipos de marcadores de estrés celular, debido a la alta presión metabólica que ocurre a partir de divisiones celulares repetidas y una señalización de crecimiento constante [14]. En condiciones normales, la mayoría de los tejidos expresa bajos niveles de los ligandos de NKG2D; sin embargo, al ser sometidas al estrés de la transformación celular, las células tumorales sobre-expresan estos ligandos [24]. La citotoxicidad de las células iNKT puede ser activada tanto por

estimulación del TCR invariante [79], como mencionado previamente, como por el receptor NKG2D [75]; además, el receptor NKG2D puede funcionar como un co-estimulador en caso de una interacción TCR-glicolípidos presentado por CD1d en células tumorales, exacerbando la respuesta a este estímulo [75].

La expresión de ligandos de NKG2D en diversos tipos de tumores humanos ha sido reportada [80]. En el contexto fisiológico, estos ligandos normalmente generan señales de activación en las células que expresan el receptor NKG2D, pero lo que se ha observado en cáncer son una multiplicidad de estrategias de evasión que utilizan primordialmente a estos ligandos. Por ejemplo, se ha descrito una disminución en la expresión de los ligandos de NKG2D en diversos tipos de tumores mediada por el corte proteolítico de estos ligandos debido a la sobre-expresión de diversas metaloproteasas relacionadas con estrés celular [81]. Además, la liberación de las variantes solubles de los ligandos de NKG2D por las células tumorales provoca la internalización vesicular del receptor NKG2D en células NK y células T citotóxicas, comprometiendo su capacidad citotóxica [82, 83]. Por otro lado, la sobre-expresión de los ligandos de NKG2D en la membrana de las células tumorales también ha demostrado disminuir la citotoxicidad y actividades de inmunovigilancia de las células NK [84, 85]. Otra estrategia de evasión inmune por parte del tumor involucra la liberación de exosomas cargados con citoquinas regulatorias y con ligandos de NKG2D en su superficie, lo cual finalmente reduce la expresión del receptor NKG2D en células NK y células T CD8⁺ [86, 87]. La presencia de las variantes solubles de MICA y MICB se ha detectado en sueros de pacientes con cáncer y han sido propuestos como marcadores de prognosis clínica [88-90].

En CG, se ha observado que los niveles de expresión de ligandos de NKG2D en el tumor están relacionados con parámetros clínicos y patológicos de la enfermedad [91].

Esto hace pensar que se puede relacionar la expresión de los ligandos de NKG2D con la prognosis del CG, y que las células tumorales podrían ser blancos de la actividad citotóxica mediada por NKG2D de las células iNKT y también de otras células inmunes, como las células NK y linfocitos T citotóxicos (ambas con subpoblaciones NKG2D positivas) [92].

Inmunoterapias contra el cáncer

Durante la última década, la investigación dedicada a la búsqueda por nuevas terapias anti-tumorales ha conducido a los investigadores a considerar el uso del sistema inmune como herramienta biológica para detectar y eliminar células tumorales, cambiando el foco desde una propuesta terapéutica de amplio espectro, a tratamientos más personalizados, tomando en cuenta variables genómicas, transcriptómicas y epigenéticas de los pacientes y sus tumores [29]. Múltiples aproximaciones experimentales buscaban mejorar las terapias basadas en citotoxicidad que existen en la actualidad, como las quimioterapias o radioterapias, al incorporar tecnologías moleculares que permitiesen aumentar la especificidad y eficacia hacia células malignas, disminuyendo el daño hacia los tejidos sanos. Algunos ejemplos son la incorporación de drogas citotóxicas en nanopartículas, en liposomas, o en transportadores moleculares que reconociesen tejidos transformados, siendo este el centro de la investigación anti-tumoral [93]. A pesar de estos esfuerzos, los resultados *in vivo* y ensayos clínicos no lograron mejorar la supervivencia global de los modelos animales y pacientes, respectivamente.

Esto fue finalmente superado por el uso de anticuerpos monoclonales para terapia anti-tumoral, las primeras inmunoterapias, los cuales demostraron tener una efectividad sobresaliente, y que, con los años, lograron sobrepasar problemas, como la

toxicidad de la terapia misma. La inmunoterapia, incluso, fue catalogada por la revista *Science* como el avance científico más relevante del año 2013 [94].

La primera generación de anticuerpos monoclonales para terapia anti-tumoral utilizaba marcadores moleculares tumorales como blancos para ser reconocidos por estos anticuerpos, como receptores de factores de crecimiento y angiogénesis [14]. Estos marcadores todavía se utilizan hoy en día para diferentes terapias de primera, segunda y tercera líneas, pero muchos tienen la limitación de que no todos los pacientes presentan tumores que expresen los mismos marcadores moleculares, por lo que estas terapias no son universales, si no que sirven en el caso de algunos pacientes, dependiendo de las características moleculares de su tumor [95]. Casos emblemáticos son los cánceres mamarios triple negativos, que no expresan receptores de estrógeno (ER), receptores de progesterona (PR) o HER2/neu, por lo que diferentes inmunoterapias de anticuerpos dirigidas hacia estos receptores no pueden emplearse en estos casos. Así mismo, el anticuerpo monoclonal Trastuzumab, solo puede usarse en el 15% de los pacientes con adenocarcinomas gástricos que expresan HER2/neu [96].

Una segunda generación de anticuerpos monoclonales se enfocó en el uso de *checkpoints* del sistema inmune [29], desde el descubrimiento del reclutamiento de una diversidad de células normales residentes y circulantes, que sirven como accesorias a las células neoplásicas y soportan su evolución [14]. Además, ya existía el antecedente de la mayor prevalencia de enfermedades neoplásicas en pacientes inmunocomprometidos [22]. Estos anticuerpos bloquean diversos frenos biológicos de la actividad de diversas células inmunes. Uno de los anticuerpos terapéuticos dirigidos hacia un *immune checkpoint* es el Ipilimumab, el cual bloquea el receptor CTLA-4 en las células T citotóxicas, impidiendo que estas reciban señales de co-estimulación

regulatorias, manteniendo, así, la activación de estas células. Los resultados de esta terapia han sido exitosos, por ejemplo, mejorando la supervivencia global de pacientes con melanomas metastásicos de 25% a 46% para el primer año, una media de ganancia de 10 meses de vida [97].

En el caso del CG, Nivolumab, anticuerpo monoclonal contra PD-1, se ha utilizado en ensayos clínicos contra este y otros tipos de cáncer [98]. Se ha observado, además, que, dentro de la reciente caracterización molecular de los subtipos de adenocarcinomas gástricos [10], pacientes positivos para el virus de Epstein-Barr presentaron niveles elevados de expresión de PD-L1, un ligando de PD-1, el cual ha sido relacionado con una peor prognosis en un estudio de pacientes no agrupados por subtipo de CG [99]. En la actualidad, varios ensayos clínicos se encuentran realizando con diferentes anticuerpos anti-PD-1, anti-PD-L1 y anti-CTLA-4 en pacientes con CG (NCT01928394, NCT02625623, NCT02494583, NCT02340975, NCT02443324 en ClinicalTrials.gov).

Aun así, no todos los pacientes responden a este tipo de terapia, y se especula que esto se debe a la falta de neo-antígenos que puedan ser presentados por APC para activar la respuesta inmune, por lo que solo pacientes con tumores altamente mutagénicos que generen una gran variedad de neo-antígenos serían respondedores a esta terapia [100]. Por lo mismo, hoy se están haciendo esfuerzos para caracterizar de mejor manera los tumores de los pacientes a nivel molecular, pero, además, desarrollar otras estrategias de inmunoterapia, como las vacunas anti-cancerígenas personalizadas.

Las vacunas anti-tumores personalizadas se pueden preparar a partir de la mezcla de células tumorales del mismo paciente irradiadas o muertas por calor con

sustancias adjuvantes. Estas vacunas estimulan al sistema inmune a responder a los neo-antígenos específicos presentes en el tumor de cada paciente. Este tratamiento se ha usado en varios ensayos clínicos, con buenos resultados, aunque éstos parecen depender del estado del sistema inmune de los pacientes [101].

Otra alternativa es la transferencia adoptiva autóloga de diferentes células inmunes, estimuladas y expandidas *ex vivo* para posteriormente ser re-inyectadas a los pacientes, potenciando la respuesta inmunológica [102]. Si bien se han generado variados protocolos y ensayos clínicos, los efectos clínicos de este tratamiento no presentan gran significancia, además de ser procesos con altos costos [22, 29].

Aun así, avances en esta estrategia han incorporado una nueva herramienta: la introducción de receptores quiméricos de antígenos (CAR), moléculas generadas por ingeniería genética que presentan un dominio de cadena única de fragmentos variables (scFv) unido a los dominios de señalización intracelular de los TCR [103]. El dominio scFv se comporta como la región variable de un anticuerpo, ya que tiene las mismas cadenas variables pesadas y livianas (V_H y V_L) de un anticuerpo unido por un *linker*. Este puede ser diseñado para unirse específicamente a diversos epítomos. Los primeros CAR contenían los mismos dominios ITAM de la subunidad ζ del complejo del TCR, pero los más modernos han incorporado otras señales activadoras o de *scaffold* [103]. Transferencias adoptivas de células T convencionales transducidas por lentivirus con CAR han sido exitosas al lograr la regresión de los tumores de algunos pacientes [104]. Moléculas CAR diseñadas contra CD19 han sido eficientes para tratar a pacientes con leucemia de células B refractarias [105]. Aun con este éxito, la elección del antígeno al cual el CAR debería ser dirigido sigue siendo el desafío para poder expandir este tipo de

terapia, así como también la pérdida de la expresión del mismo, o que este pudiese llegar a insertarse en el DNA genómico.

Inmunoterapias con células iNKT

Varios ensayos clínicos se han llevado a cabo utilizando terapias basadas en células iNKT [67]. Uno de los primeros intentos consistía en la administración intravenosa de α -GalCer en pacientes con tumores sólidos, y, si bien el tratamiento era bien tolerado, no se obtuvieron respuestas clínicas objetivas, e, incluso, una disminución en los números totales de células iNKT fue detectada luego de la inyección de α -GalCer [106]. En un segundo intento, células dendríticas derivadas de monocitos autólogos pulsadas con α -GalCer fueron administradas en pacientes con metástasis malignas, y, si bien se lograron incrementar los niveles séricos de IFN- γ e IL-12, el incremento de células iNKT totales fue más bien moderado y no sostenido [107]. Otros ensayos similares fueron realizados en pacientes con cáncer de pulmón, pero aun con resultados escuetos [108-110]. A pesar de esto, y debido a las cualidades únicas de las células iNKT, más esfuerzos se están realizando para ver la manera correcta de utilizar el potencial anti-tumoral de estas células para inmunoterapias; incluso, hay nuevos protocolos y ensayos clínicos programados para pacientes con tumores sólidos (NCT02562963 en ClinicalTrials.gov). Además, recientemente ha sido desarrollado un método para reprogramar células madres inducidas pluripotenciales (iPSC) humanas a células iNKT de alta actividad [111].

Una de las complicaciones que pueden haber presentado los anteriores ensayos clínicos utilizando protocolos de expansión y posterior re-inyección de células iNKT autólogas es que el cáncer es una enfermedad crónica; las células iNKT pueden cambiar la programación interna de las diferentes células del sistema inmune de manera más

potente, dígase a niveles de cambio en los perfiles transcriptómicos, pero también epigenéticos, los cuales no necesariamente son modificados durante el proceso de expansión, mediado principalmente por señales de la citoquina IL-2. Otro elemento a considerar es la versatilidad de estas mismas células, al no solo ser capaces de producir grandes cantidades de citoquinas de tipo Th1 y Th2, sino también señales inmunosupresoras a través de la producción de IL-2, IL-10, TGF- β [112-114], y la expresión de CTLA-4 y PD-1 [44, 115].

TIPO DE CÁNCER	REFERENCIA	ESTRATEGIA MOLECULAR	FASE	RESULTADOS	AÑO
Carcinoma de cuello y cabeza	Kunii et al., 2009 [116]	Infusión intra-arterial de células e inyecciones nasales de APC cargadas con α -GalCer.	I	Aumento de la producción de IFN- γ y expansión <i>in vitro</i> de células NKT.	2009
Linfoma refractario de células B	Qiu et al., 2016 [117]	5 dosis de células dendríticas autólogas cargadas con epítopos de α -Galactosilos membrana de linfoma combinado células killer inducidas por citoquinas (CIK).	I	Mejora en la calidad de vida, remisiones completas y parciales determinadas por PET-CT.	2016
Tumores Sólidos	NCT02562963	2 dosis de $4 \pm 0.5 \times 10^9$ células NKT autólogas.	I & II	Sin resultados publicados.	2015
Neuro-blastoma	NCT02439788	Células CAR-NKT autólogas de 3 ^o generación contra GD2.	I	Sin resultados publicados.	2016

Tabla N° 1: Ensayos clínicos recientes utilizando células iNKT como su blanco terapéutico. Ensayos anteriores presentaban pocos a nulos efectos objetivos, y solo algunos pacientes con respuestas clínicas. Estos ya fueron revisados en otras publicaciones [45].

El uso de células iNKT heterólogas también ha sido propuesto para terapias anti-tumorales, ya que estas células no se encuentran restringidas por las moléculas del MHC sino por CD1d, una molécula de alta conservación intra-especies [118], y a la evidencia de que una expansión *in vivo* de células iNKT de los donantes en modelos murinos de trasplantes alogeneicos generaban una mejor respuesta injerto-versus-leucemia (*graft-versus-leukemia*, GVL) y una disminución de la reacción injerto-versus-hospedero (*graft-versus-host disease*, GVHD) [119]. Una alternativa que se encuentra bajo intensa revisión en la actualidad es el uso de células iNKT transducidas con moléculas CAR [120], aprovechando las características fenotípicas de maduración y activación de estas células, la expresión de otros receptores característicos de las células NK, y su capacidad de rápida y abundante producción de citoquinas. Un ensayo clínico utilizando células iNKT autólogas transducidas con moléculas CAR de tercera generación se encuentra reclutando pacientes con neuroblastoma desde el año 2015 (NCT02439788 en ClinicalTrials.gov).

Con esta consideración, el conocer las capacidades de las células iNKT (y sus subpoblaciones) de producir citoquinas y ejercer citotoxicidad directa sobre las células tumorales en pacientes con CG cobra relevancia, al ser esta una de las enfermedades de las cuales hoy hay ensayos clínicos andando, utilizando expansiones celulares de los mismos pacientes.

Debido a la presencia de los ligandos del receptor NKG2D en células de adenocarcinoma gástrico de pacientes con CG, y al antecedente de una activación alternativa a través de este receptor de las células iNKT, es que se propone estudiar este tipo celular en pacientes con CG, explorando sus capacidades de ejercer funciones de liberación de citoquinas anti-tumorales y su capacidad citotóxica.

HIPÓTESIS

El potencial citotóxico, así como la producción de IFN- γ por las células iNKT en pacientes con cáncer gástrico se encuentran disminuidos en comparación a individuos sanos.

OBJETIVO GENERAL

Analizar las funciones efectoras *ex vivo* de células iNKT en pacientes con cáncer gástrico comparadas con individuos sanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar la frecuencia y fenotipo de las células iNKT en sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico y controles sanos.
2. Evaluar la citotoxicidad de células iNKT de sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico y controles sanos en co-cultivos con líneas celulares tumorales que no expresan CD1d.
3. Analizar la producción de IFN- γ por células iNKT periféricas de pacientes con cáncer gástrico, y también de controles sanos, enfrentadas con líneas celulares tumorales que no expresan CD1d.

METODOLOGÍA

Muestras de sangre de pacientes y controles sanos

Se reclutaron 10 pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a gastrectomía total en el Hospital del Salvador (Santiago, Chile) en colaboración con el Dr. Marco Bustamante, Director del Departamento de Cirugía de este hospital. Los pacientes reclutados autorizaron la recolección de muestras firmando un Consentimiento Informado (Anexo 1). Como criterio de inclusión al estudio, se consideró que los pacientes tuviesen tumores sólidos localizados, excluyendo aquellos pacientes sometidos a tratamientos de quimioterapia y/o radioterapia previa a la cirugía. Se obtuvieron muestras de 30 ml sangre periférica de cada paciente durante el proceso quirúrgico bajo condiciones de esterilidad. Además, se reclutaron 15 voluntarios sanos, quienes donaron 30 ml de sangre periférica luego de firmar un Consentimiento Informado (Anexo 2). Veinte ml de sangre se obtuvieron en tubos de vidrio con Heparina para la posterior preparación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), mientras que los otros 10 ml de la muestra se recolectaron en tubos de vidrio sin anticoagulante para posterior obtención de suero. El protocolo de estudio se aprobó por el Comité de Ética Científica del Servicio de Salud Metropolitano Oriente del Ministerio de Salud, 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). Los datos demográficos y clínico-patológicos de los pacientes reclutados se encuentran descritos en la Tabla N° 2. Los estadios TNM de la enfermedad se clasificaron según los criterios de la *American Joint Committee on Cancer/Union Internationale Contre le Cancer (AJCC/UICC)*.

	(n) pacientes	%
Género		
Masculino	6	60,00
Femenino	4	40,00
Edad Promedio	9*	67,78
Tamaño Tumor		
≤ 5 cm	2	22,22
> 5 cm	7	77,78
Diferenciación tumoral		
alta/mediana	7	77,78
baja/sin diferenciación	2	22,22
Profundidad de invasión ^a		
T1, T2	2	22,22
T3, T4	7	77,78
Metástasis a linfonodos		
Ausente	1	11,11
Presente	8	88,89
Estadio TNM ^b		
I, II	1	14,29
III, IV	8	85,71

Tabla N° 2: Características clínico-patológicas de los pacientes de cáncer gástrico.

^a Profundidad de invasión corresponde a la invasión del tumor hacia el epitelio o mucosa de la lámina propia, muscularis mucosae o submucosa (T1), muscularis propia o subserosa (T2), serosa (T3) y órganos adyacentes (T4). ^b Estadio de acuerdo a la clasificación TNM para el cáncer gástrico (AJCC). Datos de los pacientes varía según la información que era disponibles para cada paciente con CG. * Uno de los pacientes de la muestra, al ser entregado la información clínica-patológica, resultó no ser adenocarcinoma gástrico, por lo que sus datos no fueron considerados para este estudio.



Preparación de PBMC y suero

Las muestras de sangre obtenidas en tubos con Heparina se diluyeron 1:1 en solución buffer de fosfato (PBS) estéril y luego se centrifugaron sobre 12 ml de Ficoll-Paque (GE Healthcare, EEUU) a 18 °C y 300 g por 20 min, con frenado suave. Se obtuvo la nube de linfocitos del gradiente de densidades. Posteriormente, se lavaron las células con PBS estéril y se incubaron por 5 min en 5 ml de solución de cloruro de amonio y bicarbonato de potasio (ACK) (NH₄Cl 154 mM, KHCO₃ 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.2) a temperatura ambiente para lisar a los eritrocitos remanentes. Para eliminar plaquetas, las células se centrifugaron a 200 g por 15 min en PBS. Las células se contaron en un hematocitómetro estimando la viabilidad celular por tinción con Azul de Tripán. Luego, las células se congelaron en suero fetal de bovino (FBS) (Hyclone, EEUU) con 10% dimetil sulfóxido (DMSO) de a 3 x 10⁶ de células por 1 ml en nitrógeno líquido, hasta su uso.

Muestras de suero se generaron al centrifugar el tubo con sangre periférica a 500 g por 10 min, tomando el suero presente en el sobrenadante, con cuidado de no contaminar con eritrocitos ni grasa. Las muestras de suero se almacenaron a -80°C.

Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares MKN-45, de adenocarcinoma gástrico (Riken Bio Resource center®, Japón) donadas por el Dr. Andrew Quest, y K562, de eritroleucemia (ATCC®, EEUU) donadas por la Dra. Mercedes López. Se cultivaron ambas líneas celulares en medio RPMI 1640 (Corning™, Thermo Fisher Scientific, EEUU) suplementado con 10% FBS a 37°C y 5% CO₂. La línea celular HeLa, transformada con CD1d o Mock, fueron gentilmente donadas por el Dr. Derek Doherty (Trinity College,

Dublin, Irlanda) y cultivada en las mismas condiciones descritas para las demás líneas celulares.

Extracción de RNA

Aproximadamente 1 millón de células de cada línea celular (K562, MKN-45, HeLa-CD1d y HeLa-Mock) se utilizaron para realizar la extracción de RNA. Para ello, las células se centrifugaron y fueron resuspendidas en 1 ml de TRIzol® (Ambion RNA, Life Technologies™, EEUU) y lisadas por pipeteo repetitivo. Luego de ser incubadas por 5 min a temperatura ambiente, se añadió 0,2 ml de cloroformo, y el tubo se invirtió manualmente por 15 s, seguido de incubación a temperatura ambiente por 3 min. Las muestras se centrifugaron a 12000 g por 15 min a 4°C. La fase acuosa se removió cuidadosamente y fue almacenada a -20°C toda la noche. Luego, se incubó la fase acuosa con 0,5 ml de isopropanol 100% por 10 min a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó, y el *pellet* de RNA se resuspendió en 1 ml de etanol 75%. Las muestras se mezclaron brevemente en un vortex y luego centrifugaron a 7500 g por 5 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado, y el *pellet* de RNA secado a temperatura ambiente por 5 min. La muestra fue resuspendida en 20 µl de agua libre de RNAsas (HyClone™, EEUU). La concentración de las muestras de RNA se determinó utilizando una placa Take3 Micro-Volume Plate (BioTek, EEUU) en el equipo Synergy™HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, EEUU) y el software Gen5™ Data Analysis (BioTek, EEUU). Posteriormente, las muestras de RNA se trataron con la enzima DNAsa I (Thermo Scientific™, EEUU) más 1 µl de EDTA 50 mM por cada 2 µg de RNA e incubadas a 65°C por 10 min y luego almacenadas a -80°C.

Retro-transcripción

Las muestras de RNA se descongelaron para generar cDNA utilizando el kit *AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase* (Agilent Technologies, EEUU). Se añadieron la enzima transcriptasa más dNTPs, dTT y buffer (Agilent Technologies, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, las muestras se incubaron a 45°C por 1 h, y luego a 70°C por 15 min para inactivar la enzima. Las muestras de cDNA se almacenaron a -20°C.

PCR convencional

Para comprobar la presencia de transcritos en las muestras de cDNA generadas, se realizaron reacciones de PCR convencional para amplificar el gene β -actina (partidores F: 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3', R: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3') y se evaluó la amplificación del gen CD1d (partidores F: 5'-GAACAGTCATGAGGCAGCTT-3', R: 5'-TTGTCCCTGGTAGGTCTTCA-3'). Para ambas reacciones, se utilizó el Kit GoTaq® Green Master Mix (Promega, EEUU). Los productos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 1,5% con 0,2 μ g/ml de bromuro de etidio, utilizando un estándar de peso molecular, *100 bp DNA Ladder* (New England BioLabs, Inglaterra). Los geles se corrieron en Mini-Sub® Cell GT Cell (Bio-rad Laboratories, EEUU) a 100V suministrados por un PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-rad Laboratories, EEUU), y los geles fueron visualizados bajo luz ultra violeta (UV).

PCR en tiempo real

Muestras de cDNA de cada línea celular que amplificaran para el gen β -actina se utilizaron para realizar PCR en tiempo real y determinar la expresión relativa de CD1d utilizando los partidores anteriormente mencionados. Para ello, se utilizó, como gen *Housekeeping*, a HPRT (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase*), una transferasa involucrada en el reciclaje de purinas (partidores F: 5'-CAAGCTTGCTGGTAAAAGGAC-3', R: 5'-GTCAAGGGCATATCCTACAACAAA-3'), utilizando el Kit Brilliant III SYBR® Master Mix (Agilent Technologies, EEUU). Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron en triplicado, con controles negativos de reacciones sin enzima o sin transcritos, en el equipo Stratagene Mx3000P™ Real-Time PCR System (Agilent Technologies, EEUU), y los datos se analizaron en el software MxPro™ (Agilent Technologies, EEUU).

Citometría de Flujo

Se obtuvieron PBMC de pacientes con CG y donantes sanos, se descongelaron en un baño térmico a 37°C y fueron lavadas dos veces con PBS 2% FBS. Las células se distribuyeron en una placa de 96 pocillos con fondo V (Thermo Scientific™, EEUU) con 200.000 células por pocillo en 50 μ l de PBS 2% FBS, seguido de incubación con anticuerpos específicos por 30 min a 4°C en oscuridad. Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados a moléculas fluorescentes para caracterizar a las células iNKT: anti TCR-V α 24-J α 18 humano-FITC (clon 6B11, Biolegend, EEUU), anti TCR V β 11-PE (Beckman Coulter, Francia) y anti CD3-PerCP-Cy5.5 (BioLegend, EEUU). Concomitantemente, se agregaron anticuerpos monoclonales para evaluar los niveles del receptor NKG2D presentes en la superficie de las células iNKT utilizando el anticuerpo anti NKG2D-APC (BioLegend, EEUU); además, se discriminó la expresión de

este receptor en las células iNKT CD4⁺, CD8⁺ y doble negativas utilizando los anticuerpos anti CD4-V450 (BD Horizon™, EEUU) y anti CD8a-PE-Cy7 (BioLegend, EEUU). Para cada anticuerpo se utilizaron los respectivos controles de Isotipo o de FMO (*Fluorescence minus one*).

Luego, las células se lavaron 2 veces más y, enseguida, incubadas con Fixable Viability Dye eFluor® 780 (FVD) (Affimetrix eBioscience, EEUU) diluido 1:1000 por 10 min a 4°C en oscuridad. Después de 2 lavados, las células se traspasaron a 200 µl de FACS buffer (Becton-Dickinson®, EEUU) y evaluadas en el Citómetro de Flujo LSR Fortessa™ (Becton-Dickinson®, EEUU).

Para analizar las líneas celulares K562 y MKN-45, células se procesaron igual que las anteriores, y se incubaron por 1 h a 4°C con los anticuerpos monoclonales con IgG2b de ratón anti-MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2-5-6, ULBP-3 y ULBP-4 (R&D, EEUU). Posteriormente, células se lavaron en PBS 2% FBS 2 veces, y luego se incubaron por 30 min a 4°C en oscuridad con un anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado con FITC (R&D, EEUU).

Los datos obtenidos se analizaron posteriormente utilizando el software FlowJo VX (Tree Star, EE.UU).

Expansión de células iNKT y *cell sorting*

Para expandir y purificar las células iNKT a partir del PBMC obtenido de pacientes con CG y donantes sanos, el PBMC se descongeló rápidamente en un baño termorregulado a 37°C y lavado 2 veces en PBS 2% FBS para eliminar el DMSO. Las células se contaron nuevamente en un hematocitómetro y sembradas en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Becton-Dickinson®, EEUU) con 200.000 células por pocillo

(en 200 μ l de medio de cultivo por pocillo). Para estimular una proliferación selectiva de células iNKT, el PBMC se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS, 10% penicilina/estreptomicina, 1% anfotericina B, 0,05 mM L-glutamina, 25 mM HEPES, 100 μ M 2-mercapto-etanol, 1 mM piruvato de sodio, 1% de aminoácidos esenciales y 1% de aminoácidos no esenciales; además, se suplementó este medio con 100 ng/ml de α -Galactosil-Ceramida (α -GalCer) (Enzo Life Sciences, EE.UU), 200 UI/ml de IL-2 y 200 UI/ml de IL-7 (ambas citoquinas de Miltenyi Biotec, EEUU) al inicio del cultivo celular. Las células se cultivaron por 30 días, cambiando cada 5 días 100 μ l del medio consumido, por pocillo, por medio fresco suplementado con 200 UI/ml de IL-2 y 200 UI/ml de IL-7. Cada 10 días se inspeccionó el avance de la expansión por Citometría de Flujo, midiendo el porcentaje de células iNKT presentes en el cultivo.

Luego de 30 días de expansión, las células se lavaron 2 veces con PBS 2% FBS y teñidas con anticuerpos anti TCR-V α 24-J α 18 humano-FITC, anti TCR V β 11-PE, anti CD3-PE-Cy7 y 7-AAD (eBioscience, EEUU) por 30 min en oscuridad a 4°C y resuspendidas en 500 μ l de FBS. Enseguida, las células se purificaron por *cell sorting* utilizando el equipo FACS Aria III (Becton-Dickinson®, EEUU).

Ensayo de degranulación y análisis de la producción de IFN- γ por células iNKT

Las células iNKT purificadas se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo redondo con 100.000 células iNKT (células efectoras) por pocillo en medio RPMI 1640 sin suplementar y se co-cultivaron con las células blanco (K562 o MKN-45) a una razón efectores/blancos de 1:1, 2:1 y 10:1. Como control negativo, se utilizaron células iNKT en ausencia de células blanco. Como control positivo, las células iNKT se estimularon con 10 ng/ml de 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) (Sigma, EEUU) y 50 ng/ml de Ionomicina (Sigma, EEUU). Cada condición se realizó en triplicado. Al momento de

sembrar, se agregó 3 μ l del anticuerpo anti-CD107a-APC-Cy7 (Biolegend, EEUU), un marcador de degranulación celular también denominado *lysosomal-associated membrane protein-1* (LAMP-1), a cada pocillo. Se centrifugó la placa a 30 g por 1 min y, posteriormente, se incubaron las células por 1 h a 37°C y 5% CO₂. Enseguida, se agregó 3 μ M de Monensina (GolgiPlug™, BD Bioscience, EEUU) y 1 μ g/ml de Brefeldina A (GolgiStop™, BD Bioscience, EEUU), y las células se incubaron por más 5 h a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, las placas se centrifugaron a 300 g por 5 min y lavadas 2 veces con PBS 2% FBS. Luego de remover el sobrenadante, las células se resuspendieron en PBS 2% FBS y se traspasaron a placas de 96 pocillos de fondo "V" y teñidas con anticuerpos anti-TCR V α 24-J α 18-FITC, TCR V β 11-PE, CD3-PerCP-Cy5.5 y NKG2D-APC por 30 min en oscuridad a 4°C, y luego incubadas con FVD por 10 min en oscuridad a 4°C. Las células se lavaron 2 veces con PBS 2% FBS para luego ser fijadas y permeabilizadas con el Kit Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, EE.UU) por 20 min a 4°C. Las células se traspasaron al Buffer Wash/Perm 1 X (BD Biosciences, EE.UU) y se tiñeron intracelularmente con anticuerpo anti-IFN- γ -PE-Cy7 (BioLegend, EEUU) por 30 min en oscuridad a 4°C. La placa se lavó 3 veces con Buffer Wash/Perm, para posteriormente se traspasaron las células a PBS 2% FBS y se analizaron por Citometría de Flujo el equipo LSR Fortessa™ (Becton-Dickinson®, EEUU).

Estadística

Para todos los cálculos estadísticos, se utilizó el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, EEUU). Se utilizó el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y las pruebas *t* de Student y ANOVA de una vía, considerando estadísticamente significativos los resultados con un valor $p < 0,05$ en un intervalo de confianza de 95%.

RESULTADOS

Expresión del receptor NKG2D en células iNKT periféricas

Células iNKT de pacientes y controles sanos se identificaron por citometría de Flujo utilizando la estrategia explicada en la figura N° 3. Para el análisis de las poblaciones celulares, en primer lugar se descartaron los eventos que no fuesen *singlets*, dígase que no correspondían a una sola célula, a través de la selección de los eventos que no se escapaban de la recta en el *dot plot* FCS-A/FCS-H y por tanto, la altura (H) y el área (A) de la señal del FSC (que corresponde con el tamaño celular) no mantuviesen una relación lineal, ya que al pasar 2 o más células juntas, la relación entre la altura y el área de la señal debiese perderse. Posteriormente, las células iNKT periféricas se definieron en base a la selección de los linfocitos (según características de bajo tamaño y baja granularidad, este último correspondiendo a la señal del SSC), discriminadas en el *dot plot* (FCS-A/SSC-A). Se seleccionaron los eventos del *gate* de linfocitos que fuesen negativos para el marcador de viabilidad (FVD), y que fuesen CD3⁺.

Sobre ese *gate*, se seleccionaron las células TCR V α 24-J α 18⁺ y TCR V β 11⁺ (células doble positivas), marcadores distintivos de la población de células iNKT periféricas (Figura N° 3).

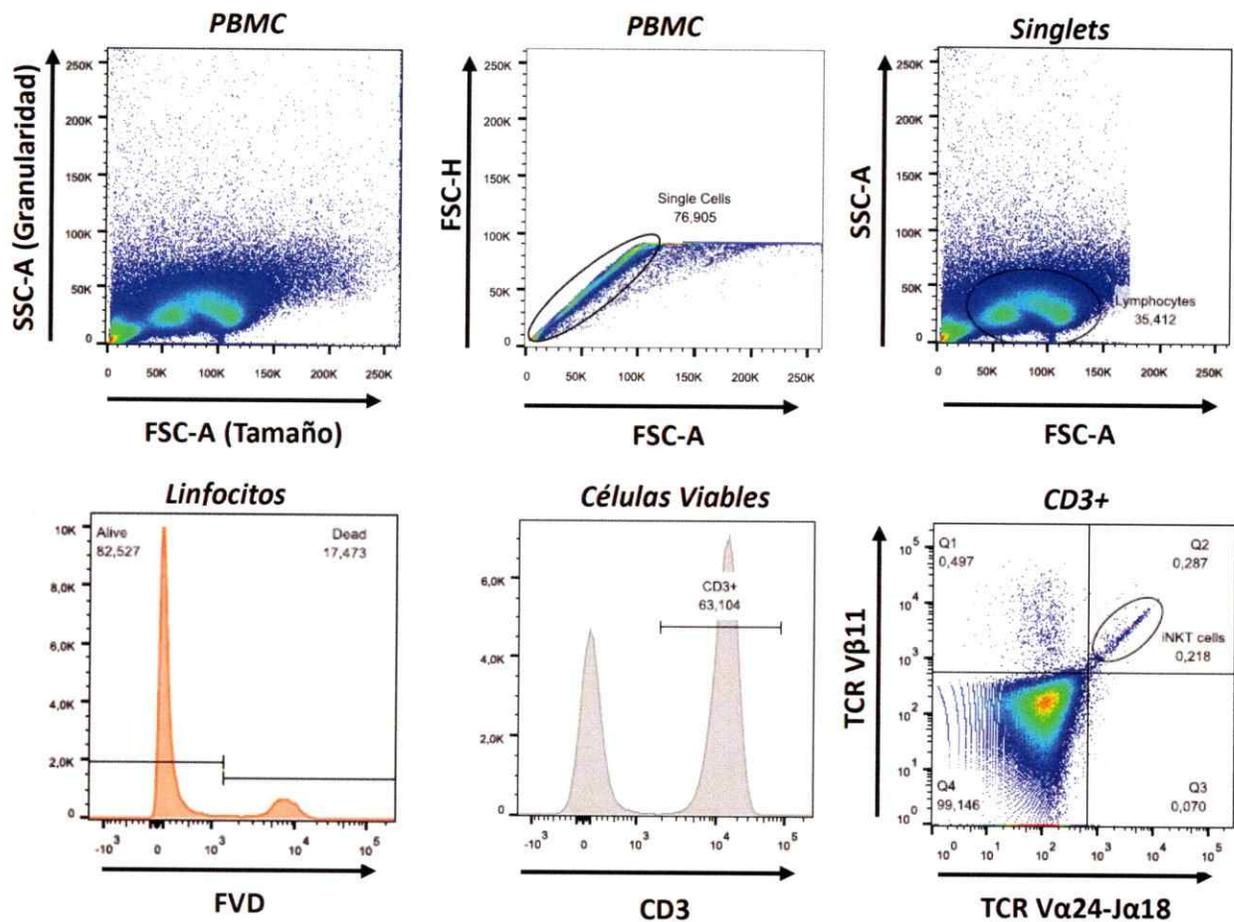


Figura N° 3: Caracterización fenotípica de células iNKT periféricas analizadas por citometría de flujo de un donante sano. *Dot plots* e histogramas representativos de cada paso del análisis de células iNKT de un individuo sano. Los *gates* respectivos están identificados arriba de cada *dot plot*, siendo el *gate* "PBMC" correspondiente a los datos brutos obtenidos por Citometría de Flujo. FSC: Foward Scatter Channel (tamaño); SSC: Side Scatter Channel (granularidad).

En esta población celular, se analizó la expresión del receptor de activación NKG2D, tanto para pacientes con CG como donantes sanos (Figura N° 4, A). Para analizar los niveles de expresión del receptor por cada célula, se utilizó el valor de la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) correspondiente a NKG2D en las células iNKT de los individuos analizados. También se analizó la proporción de células iNKT CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica (Figura N° 4, B).

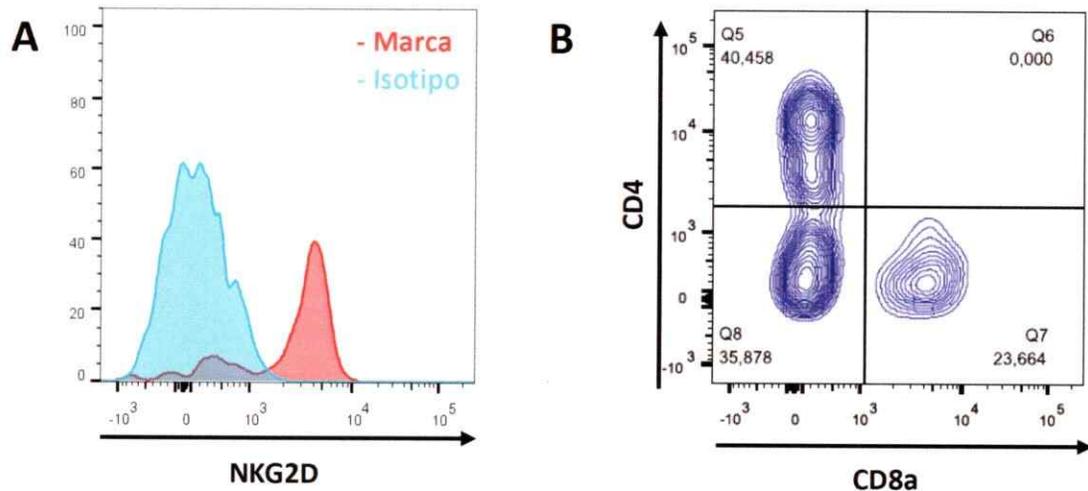


Figura N° 4: Expresión del receptor NKG2D y de los marcadores CD4 y CD8a en la superficie de células iNKT de sangre periférica de un donante sano. (A) Histograma representativo de la expresión en superficie del receptor de activación NKG2D (rojo) y su respectivo control de Isotipo (azul) en células iNKT de un donante sano. **(B)** *Dot plot* representativo de la expresión de los marcadores de superficie CD4 y CD8a en células iNKT de un individuo sano.

Los pacientes con CG presentaron una mayor frecuencia de células iNKT circulantes que los donantes sanos; además, los pacientes presentaron un porcentaje reducido de células iNKT CD4⁺ respecto a los controles, mientras que no se arrojaron diferencias significativas en el porcentaje de células iNKT CD8⁺ (Figura N° 5). Aun así, no se observó diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la expresión del receptor NKG2D en las células iNKT entre los pacientes con CG y donantes sanos (Figura N° 6).

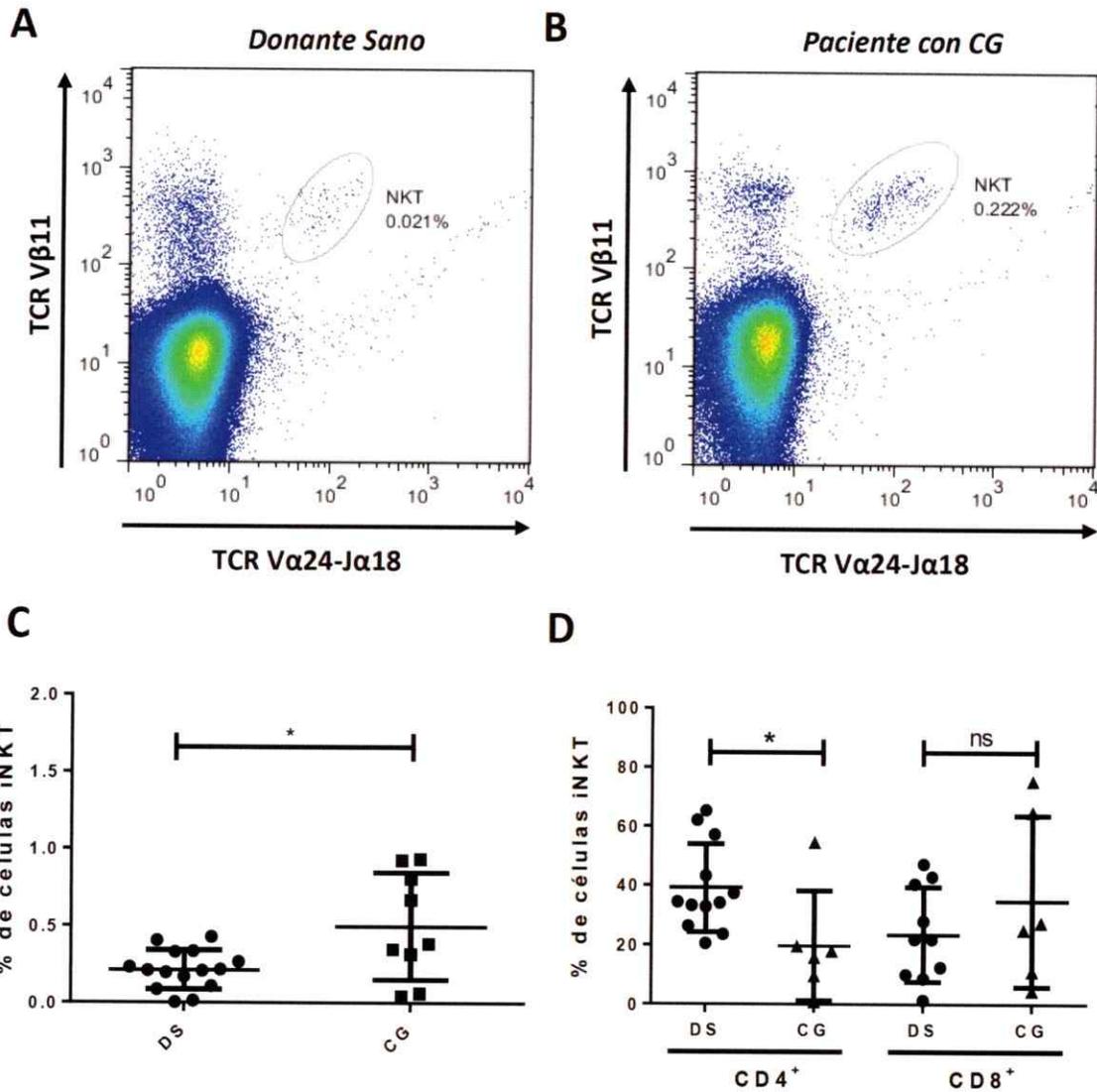


Figura N° 5: Frecuencia de células iNKT periféricas en pacientes con CG y donantes sanos. (A) *Dot plot* representativo del *gate* de linfocitos CD3⁺ de un donante sano y (B) un paciente con CG, indicando el porcentaje de células iNKT, TCR Va24-Jα18⁺ TCR Vβ11⁺. (C) Gráfico de los datos acumulados de frecuencia de células iNKT obtenidos a partir de 9 pacientes con CG (CG) y 15 donantes sanos (DS). El gráfico muestra el valor promedio de cada grupo estudiado ± desviación estándar (SD). El análisis estadístico se realizó con la prueba *t de Student*. *, $p = 0,0240$. (D) Porcentajes de células iNKT CD4⁺ y CD8⁺ de 6 pacientes con CG y 12 donantes sanos. *, $p = 0,0272$.

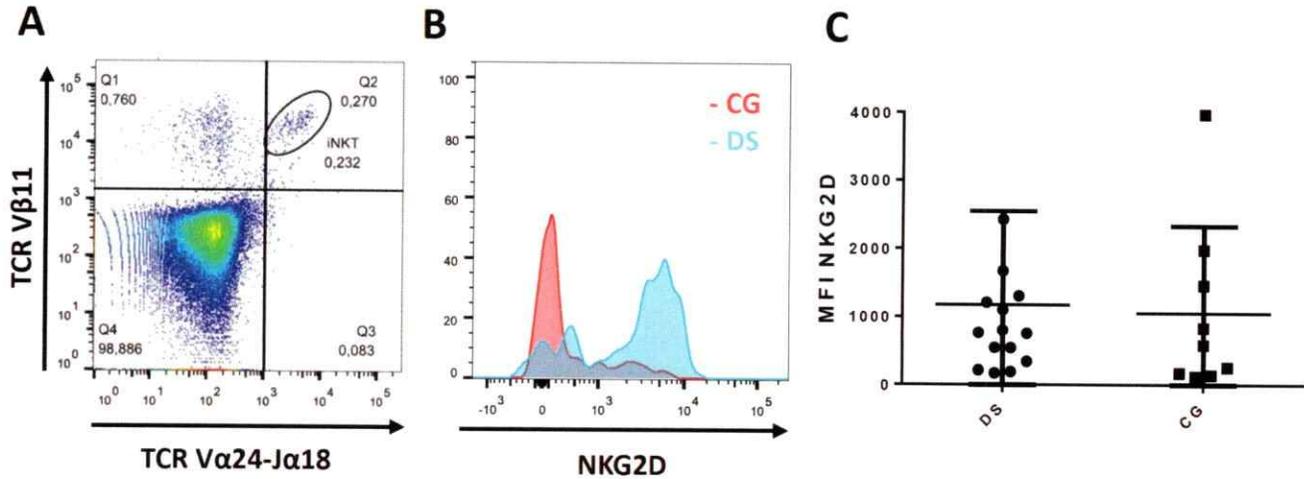


Figura N° 6: Expresión del receptor de activación NKG2D en células iNKT periféricas de pacientes con CG y donantes sanos. (A) *Dot plot* representativo del *gate* de linfocitos CD3⁺, donde se identifica la población de células iNKT TCR Va24Jα18⁺ TCR Vβ11⁺. **(B)** Histograma de la expresión del receptor NKG2D en células iNKT de pacientes con CG (rojo) y donantes sanos (DS) (azul). **(C)** Gráfico de los datos acumulados de expresión del receptor NKG2D en las células iNKT de 9 pacientes con CG (CG) y 15 donantes sanos (DS). El gráfico muestra el valor promedio de cada grupo estudiado ± SD. El análisis estadístico se realizó con la prueba *t de Student*. $p = 0,8354$.

Tal como se observa en la figura N° 6, C, algunos de los pacientes estudiados expresaban altos niveles de NKG2D en comparación con el promedio de expresión de este receptor por los donantes sanos, mientras que los demás pacientes expresaban un menor nivel de NKG2D en sus células iNKT, según el valor promedio de los datos acumulados de los controles sanos evaluados. Para determinar la significancia de este resultado, se separaron las muestras de pacientes con CG en 2 grupos: las muestras que presentan un MFI de NKG2D mayores al promedio de donantes sanos (CG NKG2D *high*), y las muestras de pacientes con menores niveles de MFI que este mismo valor (CG NKG2D *low*) (Figura N° 7). Dos tercios de los pacientes con CG presentaban NKG2D bajo (6 pacientes de 9).

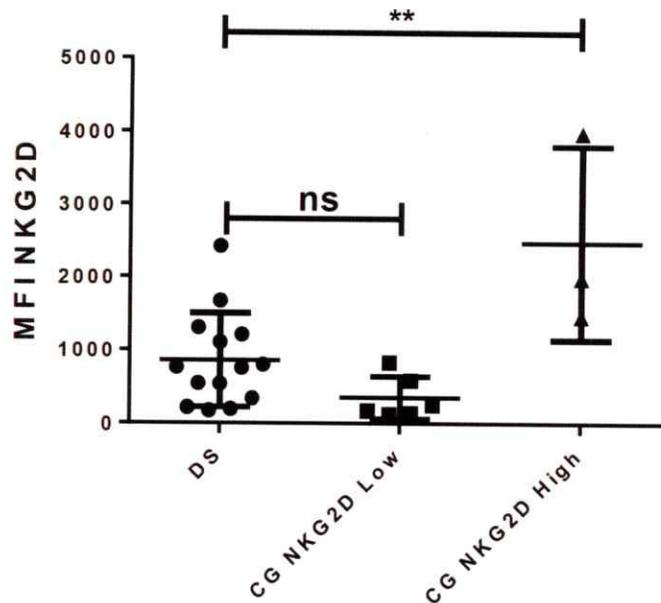


Figura N° 7: Grupos de pacientes con CG con diferente expresión del receptor de activación NKG2D en células iNKT periféricas. (A) El promedio de MFI de los 10 donantes sanos fue de 860,86 y la SD es 640,60. Los pacientes cuyas células iNKT arrojaban un MFI mayor que el promedio de los donantes sanos se clasificaron en el grupo NKG2D *high*, mientras que los pacientes con menores niveles se clasificaron en el grupo NKG2D *low*. Student's *t* test entre donantes sanos y pacientes con células iNKT con baja expresión de NKG2D: $p = 0,0807$; $n_{\text{pacientes}} = 6$. *t* test entre donantes sanos y pacientes con células iNKT con altos niveles de NKG2D: $p = 0,0049$, $n_{\text{pacientes}} = 3$.

Comparando estos resultados con los datos clínico-patológicos de cada paciente, no se observan particularidades entre los pacientes con altos niveles de NKG2D y los pacientes con bajos niveles de NKG2D en células iNKT de sangre periférica (datos no mostrados).

A continuación, se revisaron los niveles de NKG2D para las diferentes subpoblaciones de células iNKT, distinguiéndolas entre células CD4⁺ y CD8a⁺. Observamos que, tanto las células iNKT CD4⁺ como CD8a⁺ de pacientes con CG presentan niveles similares de expresión de NKG2D que las mismas subpoblaciones de

donantes sanos (Figura N° 8). Sin embargo, se observó que las subpoblaciones CD4⁻ y CD8a⁻ de las células iNKT de algunos donantes sanos presentan mayores niveles de expresión del receptor NKG2D que las mismas subpoblaciones en los pacientes con CG, donde ambas poblaciones CD4⁻/CD4⁺ y CD8a⁻/CD8a⁺ de células iNKT expresan niveles similares de NKG2D (Figura N° 8, A). Estas podrían ser subpoblaciones de células iNKT doble negativas (CD4⁻ CD8a⁻), por lo cual realizar dobles tinciones con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8a son necesarias para determinar si, efectivamente, es esta subpoblación la que presenta niveles disminuidos de NKG2D en pacientes con CG.

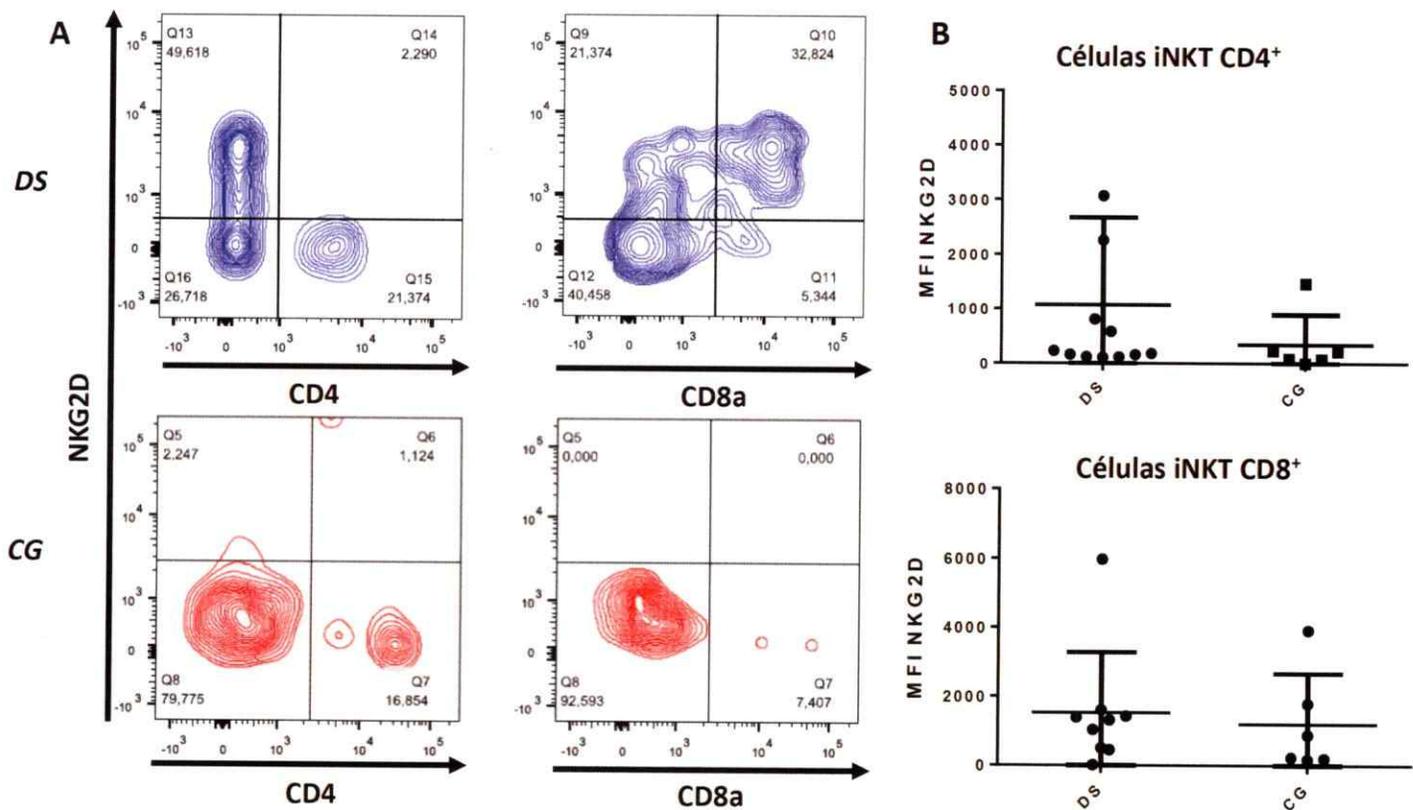


Figura N° 8: Expresión del receptor NKG2D en las subpoblaciones CD4⁺ y CD8a⁺ de células iNKT. (A) *Dot plots* representativos de la expresión de NKG2D en células iNKT de pacientes (rojo) y donantes sanos (azul) por células iNKT CD4⁺ y CD8a⁺. (B) Gráfico de datos acumulados de MFI de NKG2D en células iNKT CD4⁺ y CD8a⁺. Student's *t test*, $p > 0,05$.

Expansión *ex vivo* de células iNKT

Para estudiar la capacidad citotóxica de las células iNKT de pacientes con CG, las muestras de PBMC se cultivaron por 30 días en un medio de cultivo suplementado con α -GalCer, IL-2 e IL-7 para favorecer la expansión selectiva de células iNKT [121]. Cada 5 días se realizó un cambio de medio suplementado con 200 UI/ml de IL-2 e IL-7. Los pocillos se dividieron en 2 cada vez que se alcanzaban un gran número de núcleos proliferativos observados al microscopio (Figura N° 9, A).

Pasados los 30 días, las células se revisaron por citometría de flujo para comprobar el resultado de la expansión selectiva, y, finalmente, se purificaron por medio de *Cell Sorting* (Figura N° 9, B). Se obtuvo un rendimiento promedio de la expansión de 10 veces la cantidad de células inicial, y una expansión específica de hasta casi un 30% de células iNKT por total de células cosechadas luego de 30 días. No se presentaron mayores diferencias en el rendimiento de la expansión entre controles sanos y pacientes con CG. Luego del *cell sorting*, se obtuvieron células iNKT con una pureza promedio del 95%.

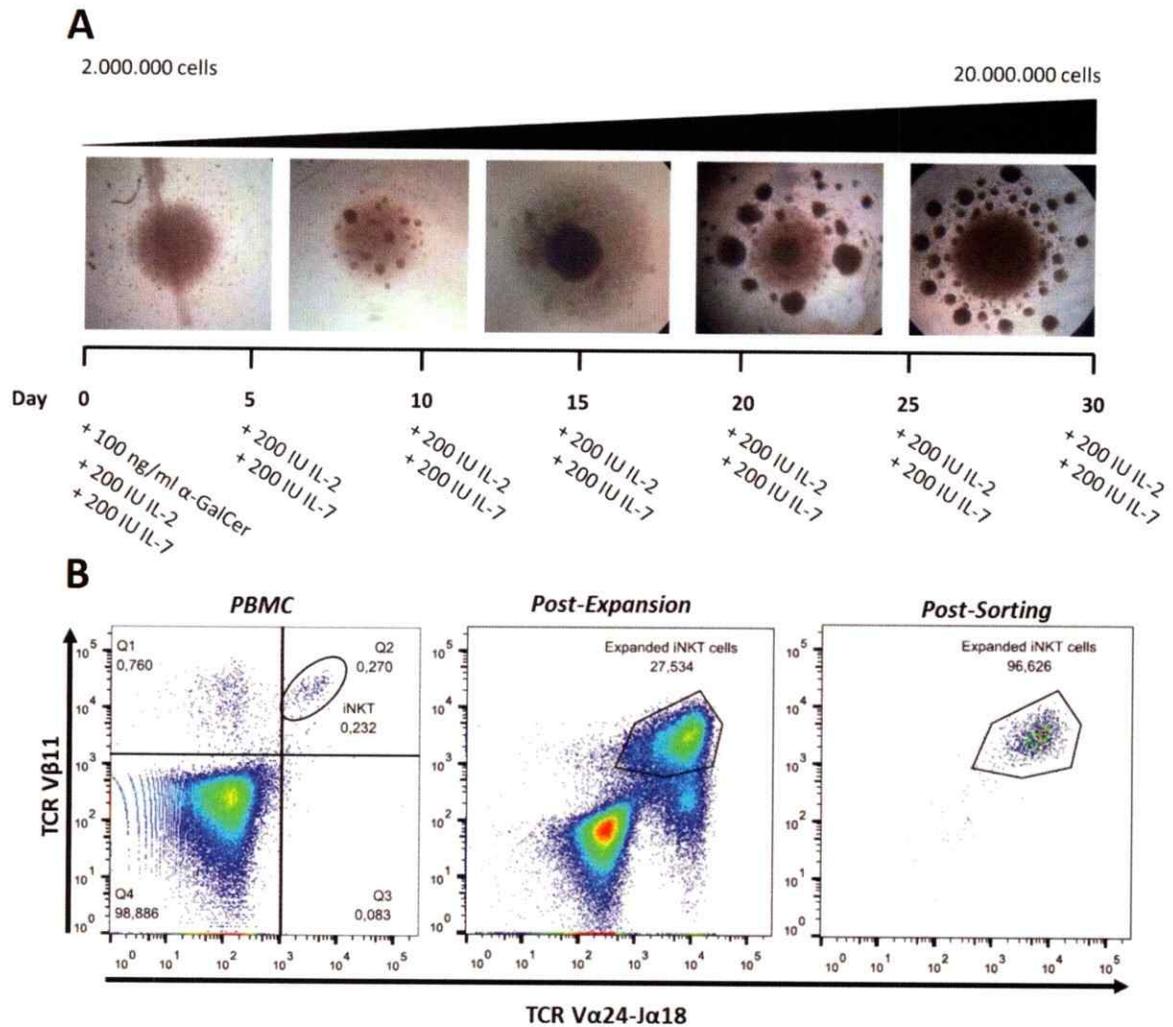


Figura N° 9: Expansión *in vitro* y purificación de células iNKT. (A) Amplificación de 100 x tomadas a diferentes tiempos a través de un microscopio óptico, donde se observan los núcleos de proliferación celular a medida que avanza el proceso de expansión. Las células en expansión eran resuspendidas y resembradas para mantener una concentración aproximada de 100.000 células por pocillo. (B) *Dot plot* representativos del proceso de expansión y purificación, así como de las condiciones iniciales de las células iNKT a expandir. De izquierda a derecha, el primer *dot plot* se obtuvo al día 0, antes de comenzar la expansión, desde muestras de PBMC recién descongelado; *dot plot* de la expansión se analizó al día 30; y el último *dot plot* se analizó *post-sorting*.

Las células iNKT purificadas fueron nuevamente sembradas en placas de 96 pocillos e incubadas *overnight* para posteriormente realizar el co-cultivo con las líneas celulares blanco, K562. Paralelamente, se utilizaron células iNKT expandidas y purificadas para su caracterización fenotípica y comparar con las mismas células antes de la expansión (Figura N° 10).

Se observó que, tanto en pacientes con CG como controles sanos, las células iNKT expandidas *in vitro* presentaron en general mayores niveles de expresión de NKG2D que las células iNKT periféricas (presentes en el PBMC) del mismo sujeto sin expandir (Figura N° 10). Además, las células iNKT expandidas presentaron una disminución en la subpoblación CD4⁺ y en la mayoría de las muestras un incremento en la subpoblación CD8a⁺.

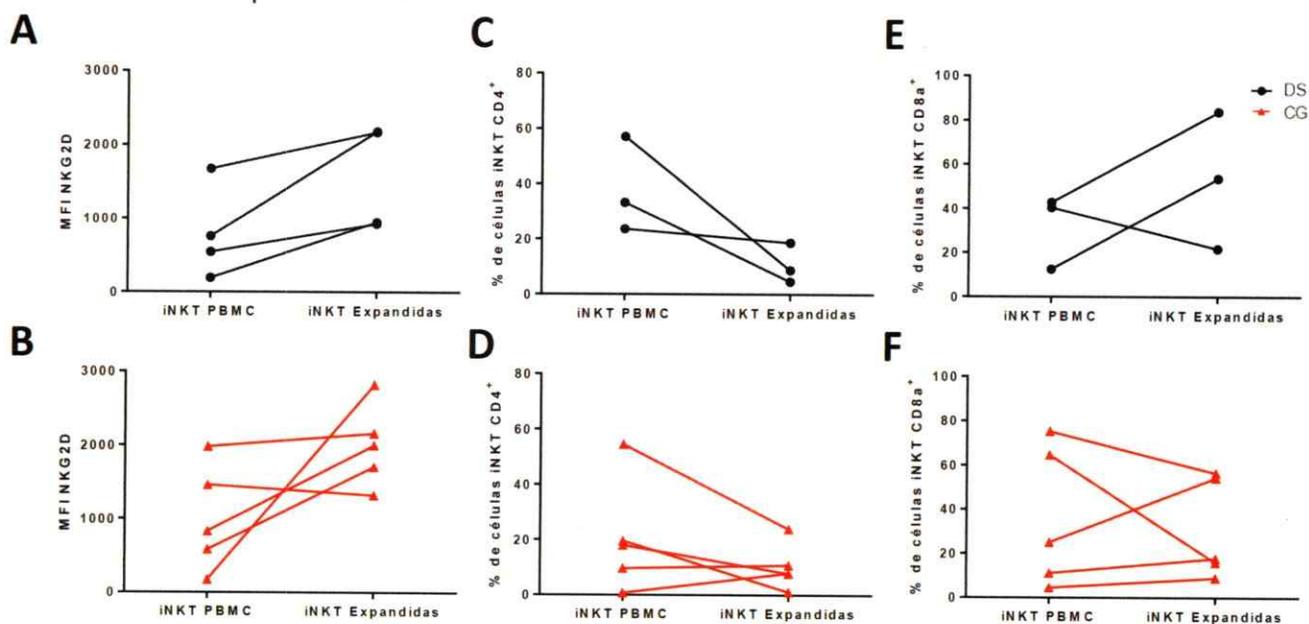


Figura N° 10: Fenotipos de las células iNKT periféricas antes y después del proceso de expansión *in vitro*. Expresión de NKG2D en superficie de células iNKT presentes en el PBMC y luego de la expansión *in vitro* de (A) donantes sanos y (B) pacientes con CG. Frecuencia de la subpoblación de células iNKT CD4⁺ de (C) donantes sanos y (D) pacientes con CG. Frecuencia de la subpoblación de células iNKT CD8a de (E) donantes sanos y (F) pacientes con CG. Células iNKT de donantes sanos (●) y pacientes con CG (▲).

Expresión de ligandos de NKG2D y CD1d en líneas celulares tumorales

Para determinar la actividad citotóxica de las células iNKT expandidas y purificadas, que pudiese estar siendo mediada por el receptor NKG2D, se utilizaron 2 líneas celulares cancerígenas que expresan los ligandos de NKG2D: células K562, de eritroleucemia, y células MKN-45, de adenocarcinoma gástrico. Las células K562 son células no adherentes que expresan altos niveles de varios ligandos de NKG2D [122], mientras que las células MKN-45 son adherentes, con características de células epiteliales [123]. Ambas líneas fueron analizadas, por citometría de flujo, para comprobar la expresión de los ligandos del receptor NKG2D. Observamos que ambas líneas celulares expresan ligandos del receptor NKG2D (Figura N° 11).

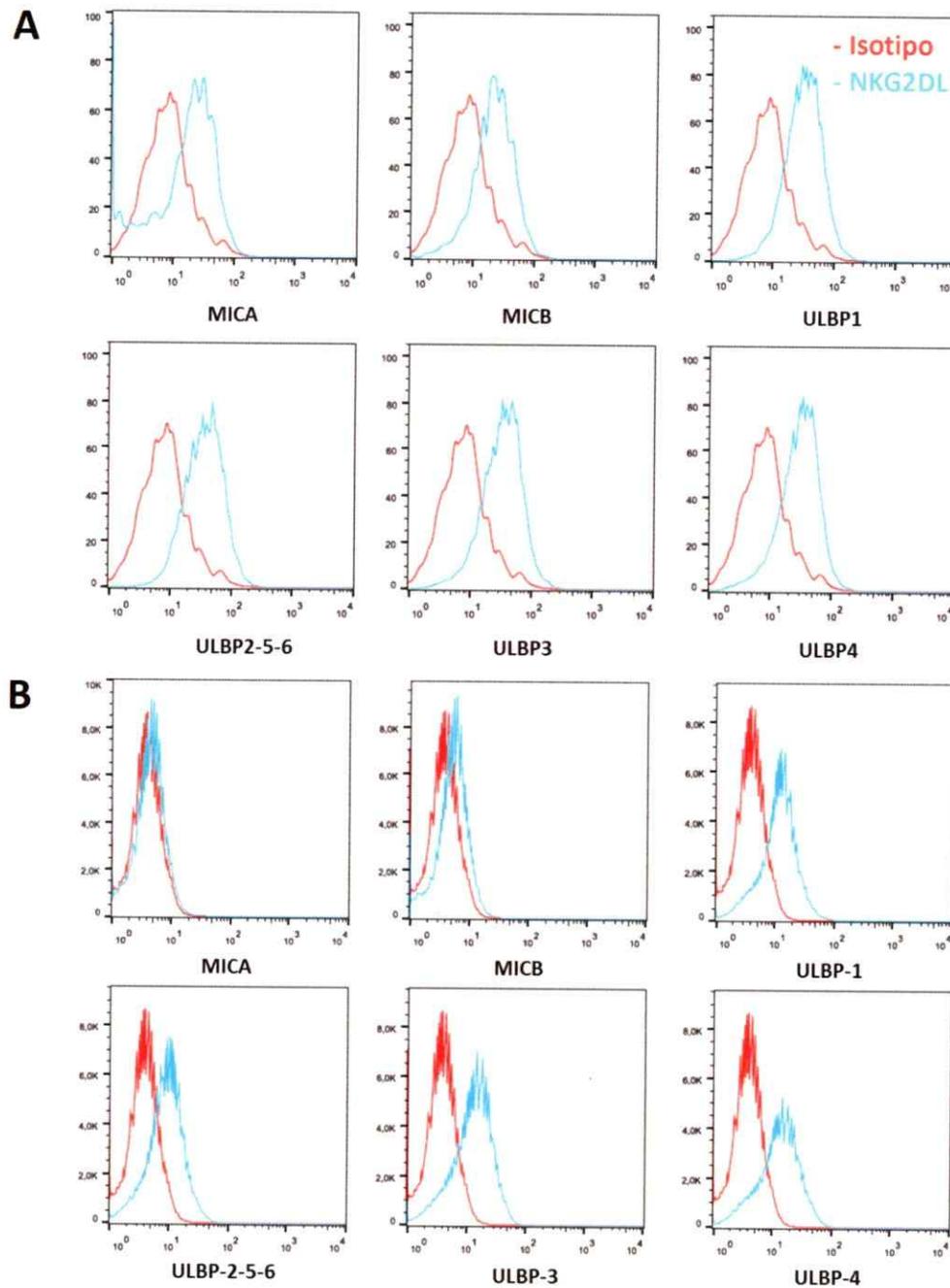


Figura N° 11: Expresión de ligandos de NKG2D en células blanco. (A) Histogramas representativos de la expresión de los ligandos de NKG2D en las células K562 y **(B)** células MKN-45. Para el ligando ULBP-2, se utilizó un anticuerpo primario (R&D, EEUU) que también se une a ULBP-5 y ULBP-6. Control de isotipo, rojo; marca, azul.

En este estudio, también se evaluó la expresión de CD1d en las células K562 y MKN-45 por citometría de flujo. Se observó que las células K562 no expresan CD1d ni MHC de clase I, mientras que las células MKN-45 sí expresan la molécula MHC de clase I, aunque muy bajos niveles de CD1d (Figura N° 12). La ausencia de expresión de la molécula CD1d en las células K562 fue corroborada a nivel de mRNA utilizando técnicas de PCR convencional y PCR en tiempo real, comparando con RNA extraído de células HeLa transfectadas con el gen de CD1d humano, usando como control negativo células HeLa transfectadas con una secuencia no codificante irrelevante (Mock).

No se observó expresión a nivel de mRNA de CD1d en las células blanco K562 o MKN-45 por PCR convencional ni por PCR en tiempo real (Figura N° 13). La expresión relativa al gen *housekeeping* HPRT mostró que los niveles de RNA mensajero del gen CD1d en las células K562 no eran detectables, por lo que la interacción de estas células blanco con las células iNKT privilegiarán la vía ligandos de NKG2D (Figura N° 13, B y C).

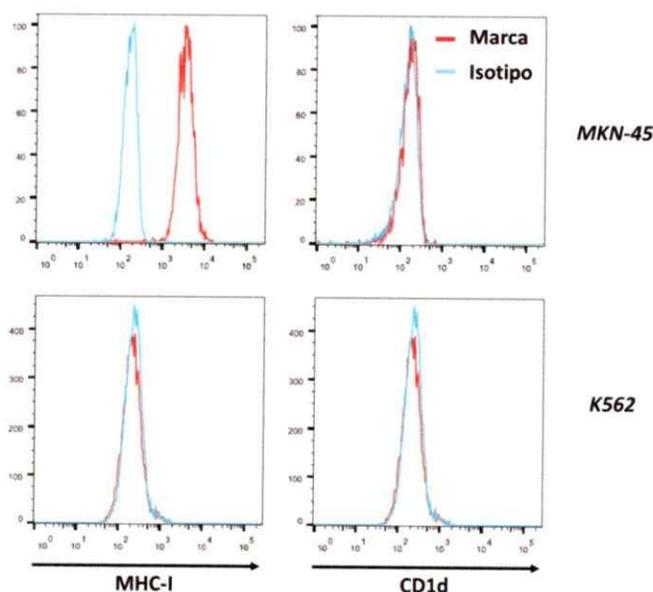


Figura N° 12: Expresión de las moléculas CD1d y MHC de clase I en las células K562 y MKN-45. Histograma de las citometrías de Flujo de ambas líneas celulares MKN-45 y K562. Control de isotipo, rojo; marca, azul.

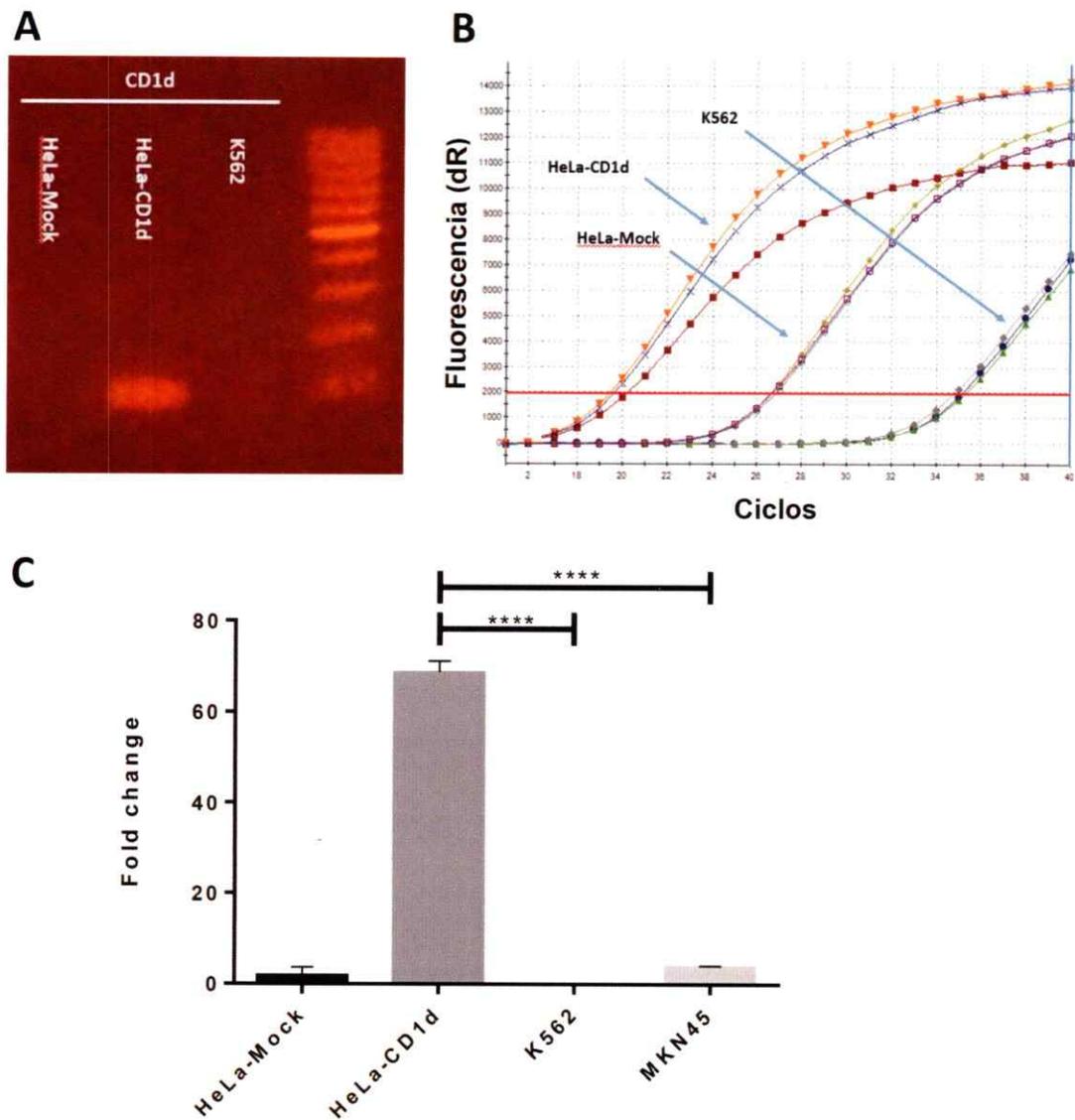


Figura N° 13: Niveles de expresión de mRNA de CD1d en líneas celulares tumorales. (A) Gel de agarosa de productos de amplificación obtenidos por PCR convencional de las muestras de mRNA de las líneas celulares HeLa-Mock, HeLa-CD1d y K562. (B) PCR en tiempo real, intensidad de fluorescencia en tiempo real de las reacciones de las muestras de mRNA de cada línea celular; reacciones de PCR realizadas por triplicado. (C) Gráfico de la expresión relativa del gen CD1d al gen *Housekeeping* HPRT (*fold change*) en las diferentes líneas celulares a partir de 3 reacciones independientes. Significancia estadística determinada por el test de ANOVA de una vía, método de comparación múltiple de Dunnett, **** = $p < 0,0001$.

Ensayos de degranulación y producción de IFN- γ

Para evaluar la capacidad citotóxica de las células iNKT, se realizaron co-cultivos de las células iNKT expandidas y purificadas, tanto de pacientes con CG como de individuos sanos, con las células blanco K562 en las razones efector/blanco (E:T) de 1:1, 2:1 y 10:1. Como estas líneas celulares no expresan la molécula CD1d, pero sí NKG2DL, la vía de activación alternativa mediada por el receptor NKG2D se ve favorecida. Luego de 5 h de co-cultivo, las células fueron colectadas y analizadas por citometría de flujo. Se analizó la capacidad de expresar el marcador de degranulación CD107a [124] en la superficie de las células efectoras y la producción de IFN- γ intracelular por las mismas células. Las células efectoras cultivadas en ausencia de células blanco fueron utilizadas como control negativo o sin estímulo. Como control positivo, se utilizaron las células iNKT cultivadas solas en presencia de PMA e Ionomicina (Figura N° 14).

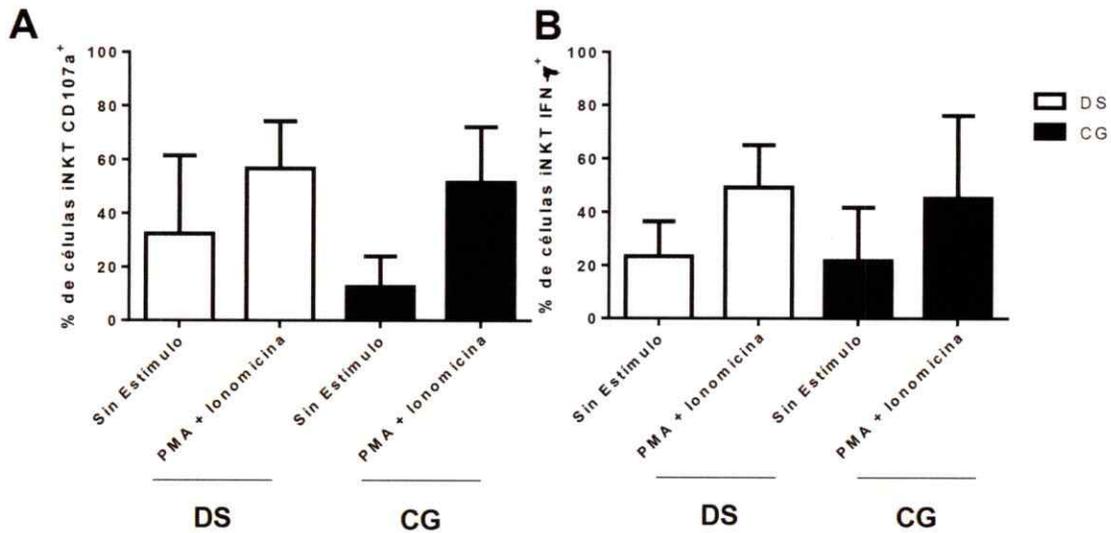


Figura N° 14: Ensayo de degranulación y producción de IFN- γ por células iNKT estimuladas con PMA y Ionomicina. Porcentaje de células iNKT que expresan CD107a (A) y porcentaje de células iNKT que producen IFN- γ (B) de pacientes con CG (negro) y donantes sanos (blanco) estimulados con PMA e Ionomicina por 5 h. Análisis realizado por Citometría de Flujo. $n_{\text{pacientes}} = 5$, $n_{\text{DS}} = 6$.

Los pacientes con CG presentaron a una menor frecuencia de células iNKT que expresaban CD107a comparado a los donantes sanos (Figura N° 15). Además, se observó una significativa menor frecuencia de células iNKT productoras de IFN- γ en pacientes con CG en comparación con las mismas células de los donantes sanos luego del desafío con células K562 (Figura N° 15). Interesantemente, las células iNKT de pacientes y controles sanos presentaron niveles similares de expresión del receptor NKG2D luego del co-cultivo con células blanco (Figura N° 15). Los efectos más preponderantes se observaron en las proporciones 1:1 y 2:1 en el caso de la degranulación y la producción de IFN- γ , por lo que son las interacciones entre efector-blanco las que más propician estas acciones, más que las interacciones efector-efector, que están mayormente presentes en la proporción 10:1.

A partir de esto, se puede establecer que las células iNKT de pacientes con CG presentan menores capacidades de degranulación y producción de IFN- γ al ser co-cultivadas con la línea celular tumoral K562, que las células iNKT provenientes de donantes sanos, pero tanto pacientes como donantes no presentan diferencias entre sus niveles del receptor de activación NKG2D.

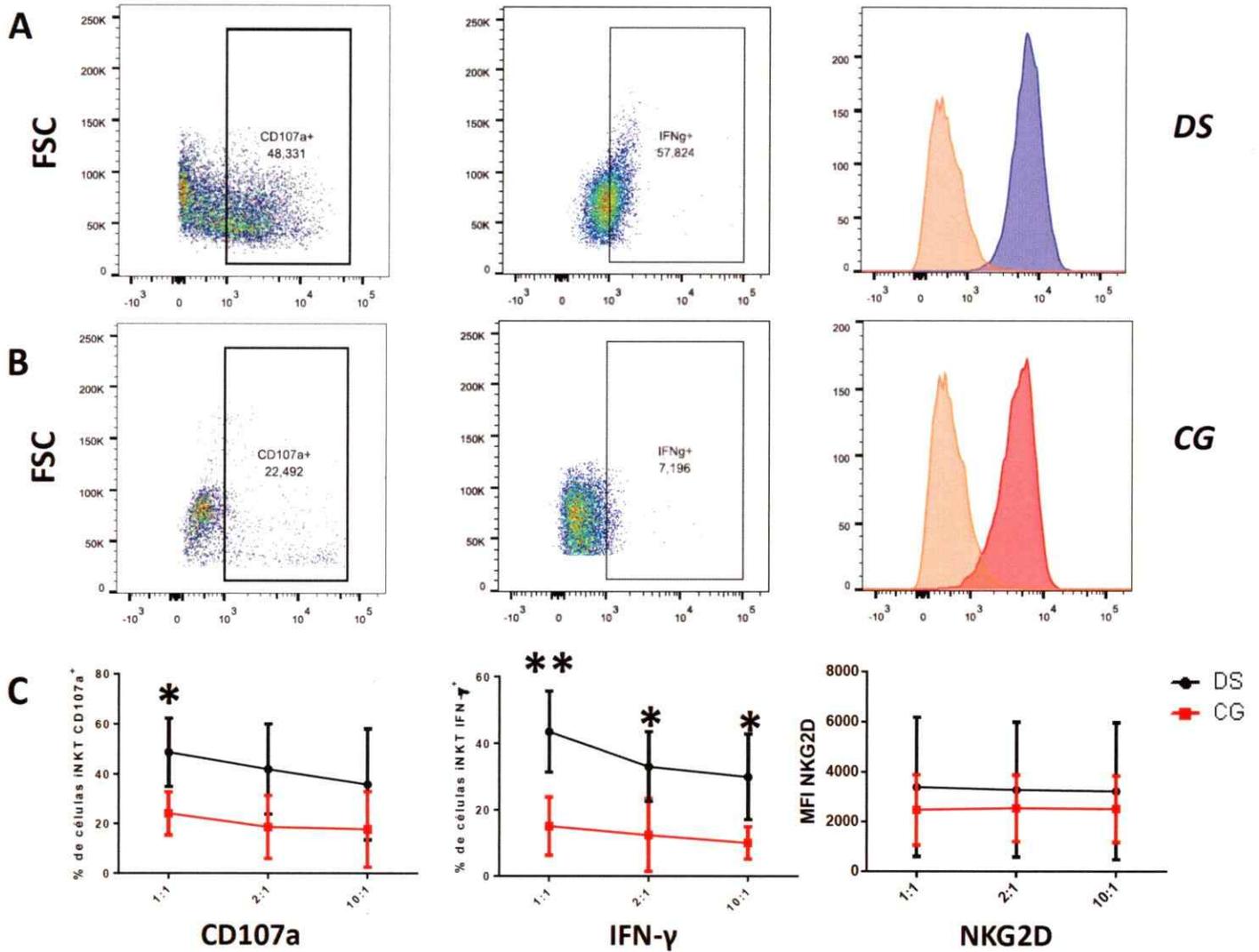


Figura N° 15: Ensayo de degranulación, producción de IFN- γ y expresión de NKG2D por células iNKT purificadas de pacientes con CG y donantes sanos luego de co-cultivar con células K562. (A) *Dot plots* representativos del marcador CD107a, producción de IFN- γ y la expresión de NKG2D en células iNKT de donantes sanos y (B) pacientes con CG. (C) Porcentajes de células iNKT degranulantes (CD107a⁺) y productoras de IFN- γ (IFN- γ ⁺) mostrados en *dot plots* representativos, además de los niveles de expresión de NKG2D (MFI) mostrados en histogramas representativos (Isotipo en amarillo) luego de 5 h de co-cultivo con células K562. Las células iNKT evaluadas fueron obtenidas de 4 pacientes con CG (■) y 5 donantes sanos (●). Resultados acumulados de experimentos independientes con 3 replicados para cada razón de E:T.

Se realizaron co-cultivos de las células iNKT de un paciente con CG y un donante sano con las células MKN-45, para revisar si el efecto observado para la línea K562 de eritroleucemia era el mismo al enfrentar a las células iNKT de los pacientes con CG a una línea celular de adenocarcinoma gástrico (Figura N° 16). Se observó que el paciente con CG analizado presentaba células iNKT con una menor capacidad de degranulación cuando co-cultivado con las células MKN-45 que el donante sano analizado, pero, además, este parecía mantener porcentajes estables de células iNKT CD107a⁺ a las diferentes razones E:T analizadas. Además, el paciente pareciera no tener grandes porcentajes de células iNKT productoras de IFN- γ , a diferencia del donante sano, cuya mayoría de células iNKT eran productoras de esta citoquina a una razón E:T 1:1. La mayor proporción de células MKN-45 parecía reducir los niveles de NKG2D en la superficie de las células iNKT del donante sano, mientras que en el paciente no presentan mayor variación.

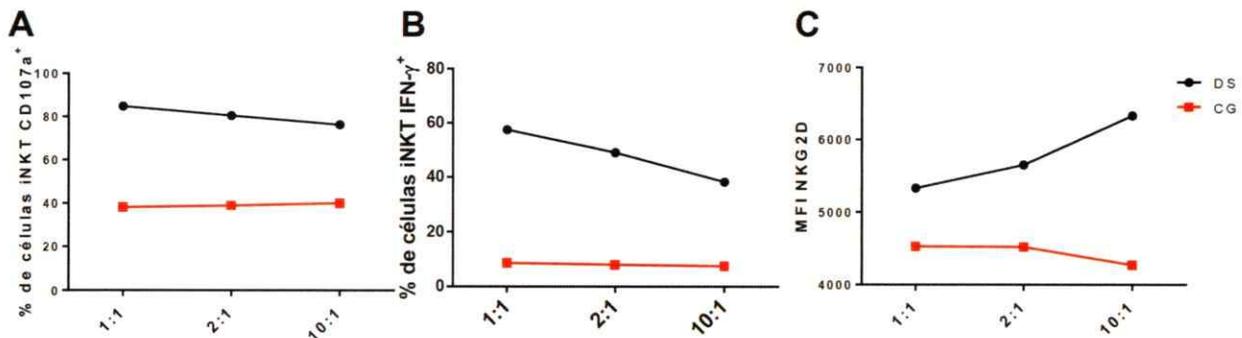


Figura N° 16: Ensayo de degranulación, producción de IFN- γ y expresión de NKG2D por células iNKT purificadas de un paciente con CG y un donante sano luego de co-cultivar con células MKN-45. (A) Porcentajes de células iNKT degranulantes (CD107a⁺), (B) productoras de IFN- γ (IFN- γ ⁺), y (C) los niveles de expresión de NKG2D (MFI) de células iNKT de un paciente con CG (rojo) y un donante sano (negro) luego de 5 h de co-cultivo con células MKN-45.

DISCUSIÓN

El cáncer es una enfermedad sistémica que, si bien en el caso de los tumores sólidos tiene una localización específica, el desarrollo del mismo está condicionado por una multiplicidad de factores a nivel del individuo, y, en particular, de la efectividad de la respuesta anti-tumoral del sistema inmune. Los pacientes con CG tienen tumores avanzados, que han logrado evadir al sistema inmune, generando un microambiente de inflamación crónica, el cual disminuye las capacidades de respuesta de las células efectoras tanto innatas como adaptativas, lo que también genera las diferentes sintomatologías de la enfermedad.

Las células iNKT tienen un rol primordial en la respuesta anti-tumoral, ya que permiten coordinar la acción tanto de células inmunes innatas como adaptativas, a través de la liberación temprana de grandes cantidades de citoquinas, pero también a través de la acción citotóxica directa [75]. En el caso del CG, no ha habido mayor investigación en cuanto al rol de las células iNKT en el contexto de la enfermedad, aunque se ha descrito una alta infiltración de diferentes células inmunes en el microambiente tumoral, así como la expresión de diversos ligandos del receptor NKG2D [91, 125]. Al ser posible la activación de la acción citotóxica de las células iNKT por medio de estos ligandos, independientemente de su activación vía TCR, y tomando en cuenta que, en general, los tumores sólidos tienen bajos o hasta nulos niveles de CD1d [50], lo que ha sido corroborado por datos de nuestro laboratorio, el analizar la vía de activación de las células iNKT por medio del receptor NKG2D toma una relevancia mayor, aunque no se puede concluir aun si la activación de estas células estaría ocurriendo exclusivamente por esta vía, al presentar estas células otros receptores como TRAIL, DNAM-1 y Fas.

La mayor frecuencia de células iNKT en sangre periférica detectada en pacientes con CG da indicios de un rol de estas células inmunes en la enfermedad de manera sistémica [41]. Además, resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran la presencia de células iNKT infiltrando los tumores de los pacientes en mayor proporción que en tejido de mucosa gástrica no-tumoral, adyacente al tumor (*manuscrito en preparación*). La mayor frecuencia de células iNKT periféricas en pacientes con CG puede ser particular de este tipo de cáncer, ya que, en numerosos otros tipos de cáncer, la tendencia es que esta frecuencia esté disminuida [68, 70, 73, 126, 127]. El rol que las células iNKT circulantes están cumpliendo en el contexto de la enfermedad puede ser variado, al estar estas células capacitadas para montar respuestas Th1, Th2 o más bien una respuesta inmune reguladora. Si bien no es posible atribuir causa y efecto, una hipótesis sobre la que se puede elaborar es que estas células iNKT estarían favoreciendo la sobrevida del tumor al mantener un ambiente regulatorio a nivel sistémico [114], e incluso que el mismo tumor estaría promoviendo su expansión en la periferia. En nuestro laboratorio hemos detectado que células iNKT expandidas de pacientes con CG, una vez estimuladas con PMA e Ionomicina, producen TGF- β en mayor proporción que las mismas células expandidas de donantes sanos (datos no publicados). Según datos obtenidos en nuestro laboratorio, la infiltración de células iNKT en el tumor estaría correlacionada con una menor sobrevida de los pacientes con CG (*manuscrito en preparación*), lo que se correlacionaría con este perfil inmunosupresor que presentarían estas células en el contexto de la enfermedad. Por otra parte, algunas subpoblaciones de células iNKT se caracterizarían por expresar diferentes receptores de integrinas y quimioquinas que promueven su permanencia y direccionamiento hacia el tracto gastrointestinal [128]. Además, las células iNKT son capaces de proliferar en periferia por presentar un fenotipo de linfocitos T de memoria, expresando los receptores

de IL-2 e IL-12, por lo que la mayor expresión de estas citoquinas podría estar promoviendo su expansión en periferia [45].

En cuanto a la expresión del receptor NKG2D en células iNKT, algunos de los pacientes con CG parecen presentar niveles disminuidos de este receptor en comparación con las mismas células de donantes sanos, mientras que otros parecieran tener mayores niveles de expresión que los donantes sanos. La expresión de este receptor en las células NK ha sido relacionada con el nivel de activación de las mismas [129], así como su disminución en superficie de células NK circulantes en pacientes con cáncer se ha relacionado con una menor capacidad de ejercer su función citotóxica [83], al ser este un receptor que media la activación de estas células al interactuar con ligandos expresados en células tumorales. Ensayos citotóxicos utilizando células NKT-like, definidas como linfocitos T CD3⁺CD56⁺ demostraron que estas células NKT-like circulantes de pacientes con cáncer de próstata, presentaban menores niveles de expresión de NKG2D, y tenían menor capacidad de ejercer su función citotóxica frente a la línea celular U937, que expresa MICA/B [130]. En un estudio reciente similar, demostró que estas células NKT-like infiltrantes de tumor de pacientes con CG presentaban menores niveles de NKG2D y DNAM-1, y también menores capacidades de producir IFN- γ y TNF- α [131]. Asimismo, linfocitos T $\gamma\delta$, una subpoblación de linfocitos T cuyo TCR no está conformado por las cadenas convencionales α/β , sino que por las cadenas γ y δ , infiltrantes de adenocarcinoma gástrico, presentan menores niveles de NKG2D y menor capacidad de producir IFN- γ [132]. Otros investigadores han demostrado que el bloquear las señalizaciones de NKG2D en las células iNKT impide que estas realicen su actividad citotóxica contra células tumorales que no expresen CD1d [75], por lo que la menor expresión de este receptor debiese condicionar la

capacidad de activación de las células iNKT en caso de los pacientes con CG con baja expresión de NKG2D.

Por otro lado, los pacientes con CG analizados que presentan altos niveles de NKG2D podrían tener células iNKT circulantes que se encuentren activadas y mediando la inflamación por medio de la secreción de diferentes factores pro-inflamatorios, esto considerando el antecedente de que, en presencia de IL-12, las señalizaciones vía NKG2D pueden acoplarse sinérgicamente para estimular una respuesta de tipo Th1 [133], que, si bien en principio ayudaría a llevar al sistema inmune hacia una respuesta anti-tumoral efectiva, también podría estar provocando una tormenta de citoquinas que mantengan al sistema inmune agotado y anérgico [18].

Nuestro laboratorio ha detectado niveles elevados de las formas solubles de MICA y MICB en el suero de pacientes con CG (*manuscrito en preparación*), y también niveles aumentados de MICA en tejidos tumorales comparados con mucosa gástrica adyacente al tumor [91]. En el caso de células NK y células NKT-like, se ha demostrado que el cultivo con suero de pacientes de cáncer con altos niveles de las formas solubles de MICA y MICB son capaces de disminuir los niveles de NKG2D en superficie de estos dos tipos celulares [80, 83, 130]. El caso de las células iNKT, esto no ha sido indagado, pero la respuesta observada en células NK y NKT-like hace suponer una respuesta similar en las células iNKT, ya que los mecanismos moleculares del transporte y reciclaje de NKG2D en las células NK son compartidos con las células iNKT [43]. Esto nos lleva a pensar que la exposición sostenida a ligandos de NKG2D solubles presentes en sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico (*manuscrito en preparación*) estaría afectando sobre todo a las poblaciones celulares más abundantes que presentan este receptor, como las células NK o las células T CD8⁺, y así también las células iNKT. En

particular, estos efectos pueden ser parte de los programas de escape de la respuesta inmune por parte del tumor mediados por ligandos de NKG2D.

Ambas subpoblaciones de células iNKT CD4⁺ y CD8⁺, parecen no tener diferencias en la expresión del receptor NKG2D, por lo que faltaría indagar los niveles de este receptor en la subpoblación doble negativa (DN), donde hay algunos indicios de diferencias en los pacientes con CG analizados.

En nuestro estudio, al revisar las subpoblaciones de células iNKT, se observa que hay diferencias entre las proporciones de células iNKT CD4⁺ pero no CD8⁺, comparando pacientes con CG a donantes sanos. Se ha observado que, en las células iNKT, la molécula CD4 puede funcionar como un co-estimulador al tener la capacidad de interactuar con CD1d [134]. La disminución de la frecuencia de células iNKT CD4⁺ en circulación podría dar cuenta de una reducción en la activación de estas células vía su TCR invariante.

El protocolo de expansión *in vitro* utilizado para obtener un mayor número de células iNKT fue modificado desde O'Reilly et al. [121]. Este protocolo fue escogido debido a que reporta que no se generan mayores alteraciones entre los niveles de activación y perfiles fenotípicos de las células iNKT entre antes y después de la expansión *in vitro*. La incorporación de IL-7 al medio de cultivo permite aumentar las señales proliferativas, al ser IL-7 una de las citoquinas responsables de la expansión homeostática de linfocitos T en la periferia y la inducción del fenotipo de memoria [135], similar al que presentan las células iNKT. A través de la vía JAK1/3 y posterior activación de STAT5, IL-7 estimula la proliferación de linfocitos T por medio del receptor de IL-7 (IL-7R). Este consiste de dos cadenas, IL-7R α o CD127, y el receptor de citoquinas putativo γ_c , también conocido como CD132 [136]. Las células iNKT, tanto de humano como de

ratón, requieren señales de IL-7R α para su desarrollo [136], y, en periferia, expresan altos niveles de este receptor [137]. Considerando que las señales de IL-2 pueden exacerbar la expansión de células regulatorias, como los linfocitos T reguladores [138], resulta ser importante utilizar IL-7 para estimular la proliferación de células iNKT, aunque también se debe considerar que las poblaciones que son más estimuladas por esta vía son los linfocitos T CD8⁺ de memoria [136]. En ratones, señales de IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 e interferones tipo I pueden aumentar los niveles de expresión en superficie de NKG2D [139]. Los resultados de la caracterización fenotípica de las poblaciones de células iNKT expandidas en este estudio demuestran generalmente una expansión de la subpoblación CD8⁺, una disminución de la subpoblación CD4⁺ y un aumento en los niveles de expresión de NKG2D. Este fenotipo ha sido relacionado con una mayor actividad citotóxica de las células iNKT [121], lo que, efectivamente, se busca obtener para posibles inmunoterapias con poblaciones celulares inmunes más específicas [121].

Posterior a la purificación de las células iNKT por medio de *cell sorting*, estas células se co-cultivaron con células tumorales blanco, K562. Este tipo celular expresa altos niveles de los ligandos de NKG2D, y no expresa MHC de clase I, tampoco la molécula CD1d (Figura N° 11 y 12). Diversos estudios han indicado que varios tumores sólidos no expresan CD1d [50]; sin embargo, resultados de citometría de flujo y qPCR, obtenidos en nuestro laboratorio, demuestran que células del microambiente tumoral e infiltrantes de la mucosa gástrica de pacientes con cáncer gástrico en estados avanzados expresan CD1d. En contraste, las líneas celulares de adenocarcinomas gástricos AGS y MKN-45, así como las células de tumores primarios que expresan el marcador de células madres cancerígenas CD44 o el marcador de células epiteliales EpCAM, no expresan esta molécula (datos no mostrados). Sería interesante averiguar

si CD1d se encuentra presente en las células epiteliales transformadas en etapas tempranas de la enfermedad o inducida por algún estímulo específico, como hipoxia vía HIF-1 α . También es posible que CD1d se exprese en TAM del tumor gástrico o en linfocitos B infiltrantes del tumor, las cuales podrían contribuir a la activación de las células iNKT en el tumor [50].

Los co-cultivos entre células iNKT y la línea tumoral K562 demostraron que células iNKT expandidas desde pacientes con CG presentan diferentes capacidades anti-tumorales que las células iNKT de donantes sanos (Figura N° 15). Por ejemplo, se detectaron diferencias en la capacidad de presentar en superficie el factor de degranulación CD107a entre células iNKT de pacientes con CG y donantes sanos (Figura N° 15), así como en la proporción de células iNKT capaces de producir IFN- γ . A pesar de esto, los pacientes con CG generaron células iNKT expandidas sin diferencias significativas en los niveles de NKG2D, pero se observa una gran dispersión en los niveles de este receptor entre las células iNKT tanto de pacientes con CG como donantes sanos. Esta dispersión puede deberse a que los niveles de expresión de NKG2D varían en gran medida en el caso de infecciones virales y bacterianas asintomáticas [140]. Los co-cultivos con la línea celular de adenocarcinoma gástrico MKN-45 también exhibieron diferencias entre las células iNKT de un paciente con CG y un individuo sano, con las células del paciente con CG presentando una población muy pequeña de células productoras de IFN- γ , con menos porcentaje de células degranulantes (CD107a⁺) y menores niveles de NKG2D que el individuos sano (Figura N° 16). La repetición de este experimento con otros individuos sanos y pacientes con CG sería necesario para comprobar si esta diferencia tiene significancia estadística. Además se observa que los porcentajes de células iNKT degranulantes y productoras

de IFN- γ son mayores cuando co-cultivadas con células MKN-45 que con células K562, en el caso del donante sano analizado (co-cultivos con células K562 se realizó con el mismo donante sano), además de observarse una disminución de los niveles de expresión superficial de NKG2D a una razón E:T 1:1 que a 10:1 de las células iNKT de este donante, lo que indica que este receptor podría estar interactuando con sus ligandos en las células MKN-45, o que alguna señal de estas células podría estar induciendo su internalización (Figura N° 16 C).

La incapacidad de degranular de las células iNKT de los pacientes con CG parece no estar condicionada por el pulso inicial del antígeno α -GalCer, ni por las señales de IL-2 o IL-7 que se mantienen durante las 4 semanas que las células son expandidas en cultivo, ya que, posterior a este tratamiento, y a pesar de aumentar sus niveles de expresión de NKG2D y la proporción de células iNKT CD8⁺, las células iNKT de los pacientes con CG presentan diferencias con las células iNKT de los donantes sanos cuando son co-cultivadas con células tumorales blanco K562. Estas diferencias se observan a diferentes proporciones entre células efectoras y blanco (razón E:T), donde las mayores diferencias se observan a una razón 1:1. Además, las células iNKT de pacientes con CG parecen no tener mayores alteraciones ante los cambios de razones E:T, presentando porcentajes similares de células iNKT CD107a⁺ e INF- γ ⁺, característico de una pérdida de función biológica al no reaccionar al estímulo de las células blanco K562.

Dadas las características fenotípicas de ambas células, con las células iNKT expandidas presentando mayores niveles de NKG2D y las células K562 expresando altos niveles de los diferentes ligandos de NKG2D, esta vía de señalización debiese estar exacerbada. Otros grupos de investigación han demostrado que células iNKT normales

presentan una actividad citotóxica contra este tipo celular vía NKG2D [75]. Aun así, las células iNKT de pacientes con CG no logran reaccionar ante las células blanco, pero si responden a la estimulación química con PMA e Ionomicina (Figura N° 14). Esto da a entender que, si bien la maquinaria molecular de las células iNKT parece estar funcionando a través de las vías de señalización PKC/IP₃ activadas por PMA sinérgicamente con la liberación de Ca²⁺ dependientes de calmodulina activadas por Ionomicina [141], la vía de activación alternativa por medio del receptor NKG2D parece no estar activando a las células iNKT de los pacientes con CG al ser enfrentadas a la línea celular K562 (Figura N°15).

La vía de señalización de NKG2D en humanos depende de una molécula adaptadora que se une a los dominios intracelulares del homodímero de NKG2D, conocida como DAP10 (*DNAX-activating protein 10 kDa*). DAP10 posee un motivo tirosina YXXM que recluta la subunidad p85 de la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) y también Grb2 [80]. Grb2 se asocia con las proteínas Vav-1 y Sos-1, las que colaboran para fosforilar a SLP-76 y PLC- γ 2, las que, en conjunto con PI3K, permiten la degranulación de células NK, que estas ejerzan su función citotóxica, que activen señales de sobrevivencia y producción de citoquinas [77, 78, 142, 143]. La activación de diferentes fosfatasas que impidan la transducción de señales de la vía de NKG2D pudiesen estar presentes en las células iNKT de los pacientes con CG, pero también hay que considerar que esta inhibición perduraría después de 4 semanas en cultivo celular, por lo que la inhibición de esta vía pudiera estar ocurriendo a nivel genético o epigenético, por lo cual las señales vía IL-2 o IL-7 no lograrían revertir esta inhibición, los cuales podrían haber sido condicionados a partir de señales crónicas de inhibición debido a la inflamación crónica (señales Th2 que aumenten la expresión de fosfatasas

o que bajen la expresión de diversos factores de la vía de señalización) o de moléculas inmunosupresoras, como TGF- β , liberado por las células tumorales [144]. Incluso, estas células iNKT de pacientes con CG podrían estar presentando un perfil más bien regulador, llegando a activar selectivamente linfocitos T reguladores [145].

La comprensión de la biología detrás del cáncer y mecánica de la vigilancia tumoral por parte del sistema inmune, así como la inmunoevasión, es importante para poder avanzar en proponer nuevos tratamientos para el CG. Avances clínicos importantes han ocurrido en términos del uso de inmunoterapias; incluso, se ha incorporado el uso del "Immunoscore" a la clasificación TNM de la AJCC/UICC en el caso de los cánceres colon-réctales para determinar la estrategia terapéutica, lo que demuestra la importancia de determinar el accionar del sistema inmune dentro de las enfermedades neoplásicas como información relevante para la clínica [146].

Tomando en cuenta que las células iNKT se encuentran aumentadas en pacientes con CG pero con capacidades disminuidas de liberar gránulos citotóxicos y producir IFN- γ (Figura N° 17), y la alta mortalidad de los pacientes con CG en el país, se hace imprescindible el realizar una mayor investigación científica acerca del rol específico de este brazo del sistema inmune en el proceso de inmunovigilancia y evasión de esta enfermedad.

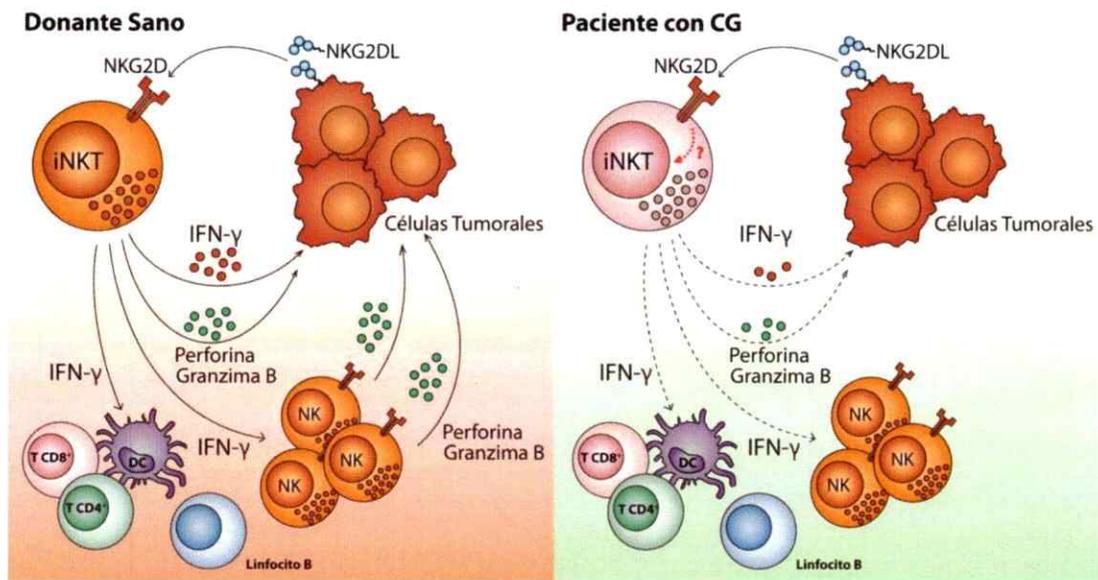


Figura N° 17: Esquema de la activación de células iNKT en pacientes con CG y donantes sanos. Células iNKT de individuos sanos (a la izquierda) son activadas al detectar los ligandos del receptor NKG2D, el cual transduce la señal por la vía PI3K para la liberación de IFN- γ y gránulos citotóxicos con Granzima B y Perforina. El IFN- γ liberado transactiva otras células del sistema inmune, como las células NK, las cuales ejercen su función citotóxica contra las células tumorales. En el caso de las células iNKT de los pacientes con CG (a la derecha), estos presentan menores niveles de producción de IFN- γ así como de liberación de gránulos citotóxicos (medido por CD107a en superficie), lo que pudiera estar comprometiendo la respuesta anti-tumoral, permitiendo el escape inmune del tumor.

CONCLUSIONES

- Pacientes con CG presentan mayores frecuencias de células iNKT en circulación que donantes sanos.
- En la mayoría de los casos analizados, las células iNKT circulantes de los pacientes con CG expresan menores niveles del receptor NKG2D que células iNKT circulantes de donantes sanos.
- El protocolo de expansión de células iNKT permite generar células iNKT con un fenotipo característico de un perfil citotóxico, con altos niveles de NKG2D, una mayor proporción de células iNKT CD8⁺, y menor proporción de CD4⁺, desde PBMC tanto de pacientes con CG como de donantes sanos.
- Células iNKT expandidas desde PBMC de pacientes con CG presentan menores porcentajes de células CD107a⁺ y menor capacidad de producir IFN- γ al ser co-cultivadas con células K562 que células iNKT expandidas desde PBMC de donantes sanos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
2. Kamangar, F., G.M. Dores, and W.F. Anderson, *Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world*. J Clin Oncol, 2006. **24**(14): p. 2137-50.
3. Garcia-Gonzalez, M.A., et al., *Gastric cancer susceptibility is not linked to pro- and anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms in whites: a Nationwide Multicenter Study in Spain*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(9): p. 1878-92.
4. MINSAL, *Guía Clínica Cáncer Gástrico*. Serie de Guías Clínicas, 2010. **0**(0).
5. Dicken, B.J., et al., *Gastric Adenocarcinoma*. Annals of Surgery, 2005. **241**(1): p. 27-39.
6. Yasui, W., et al., *Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review*. Gastric Cancer, 2005. **8**(2): p. 86-94.
7. Mathers, C.D. and D. Loncar, *Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030*. PLoS Med, 2006. **3**(11): p. e442.
8. Vauhkonen, M., H. Vauhkonen, and P. Sipponen, *Pathology and molecular biology of gastric cancer*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2006. **20**(4): p. 651-74.
9. Lin, X., et al., *Molecular classification and prediction in gastric cancer*. Comput Struct Biotechnol J, 2015. **13**: p. 448-58.
10. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. Nature, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
11. Tsugane, S. and S. Sasazuki, *Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence*. Gastric Cancer, 2007. **10**(2): p. 75-83.
12. Jakszyn, P. and C.A. Gonzalez, *Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(27): p. 4296-303.
13. Hartgrink, H.H., et al., *Gastric cancer*. Lancet, 2009. **374**(9688): p. 477-90.
14. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
15. Ma, H.Y., X.Z. Liu, and C.M. Liang, *Inflammatory microenvironment contributes to epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(29): p. 6619-28.
16. Jara, J.J.d.I., *Mapa de la Investigación en Cáncer en Chile - Cancer Research Map Chile*. 2010, http://foronacionaldecancer.cl/portal/wp-content/uploads/2013/01/Informe_CancerMap_BMRC.pdf; Biomedical Research Consortium.
17. Dunn, G.P., C.M. Koebel, and R.D. Schreiber, *Interferons, immunity and cancer immunoediting*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(11): p. 836-48.
18. Mittal, D., et al., *New insights into cancer immunoediting and its three component phases: elimination, equilibrium and escape*. Curr Opin Immunol, 2014. **27**: p. 16-25.
19. Morvan, M.G. and L.L. Lanier, *NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(1): p. 7-19.

20. Dadi, S., et al., *Cancer Immunosurveillance by Tissue-Resident Innate Lymphoid Cells and Innate-like T Cells*. *Cell*, 2016. **164**(3): p. 365-377.
21. Gasteiger, G. and A.Y. Rudensky, *Interactions between innate and adaptive lymphocytes*. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(9): p. 631-9.
22. Muenst, S., et al., *The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts*. *J Intern Med*, 2016. **279**(6): p. 541-62.
23. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. *Science*, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
24. Cheney, E.E., et al., *A dual function of NKG2D ligands in NK-cell activation*. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(9): p. 2452-8.
25. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. *Annu Rev Immunol*, 2011. **29**: p. 235-71.
26. Nishikawa, H. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in cancer immunotherapy*. *Curr Opin Immunol*, 2014. **27**: p. 1-7.
27. Teng, M.W., et al., *Opposing roles for IL-23 and IL-12 in maintaining occult cancer in an equilibrium state*. *Cancer Res*, 2012. **72**(16): p. 3987-96.
28. Braumuller, H., et al., *T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence*. *Nature*, 2013. **494**(7437): p. 361-5.
29. Palucka, A.K. and L.M. Coussens, *The Basis of Oncoimmunology*. *Cell*, 2016. **164**(6): p. 1233-47.
30. Lee, K., H. Hwang, and K.T. Nam, *Immune response and the tumor microenvironment: how they communicate to regulate gastric cancer*. *Gut Liver*, 2014. **8**(2): p. 131-9.
31. Treffers, L.W., et al., *Neutrophils in cancer*. *Immunol Rev*, 2016. **273**(1): p. 312-28.
32. Liu, H., et al., *Increased Expression of CSF-1 Associates With Poor Prognosis of Patients With Gastric Cancer Undergoing Gastrectomy*. *Medicine*, 2016. **95**(9): p. e2675.
33. Vlaicu, P., et al., *Monocytes/macrophages support mammary tumor invasivity by co-secreting lineage-specific EGFR ligands and a STAT3 activator*. *BMC Cancer*, 2013. **13**: p. 197.
34. Nielsen, T.O., et al., *Expression of the EGF Family in Gastric Cancer: Downregulation of HER4 and Its Activating Ligand NRG4*. *PLoS ONE*, 2014. **9**(4): p. e94606.
35. Lewis, C.E. and J.W. Pollard, *Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments*. *Cancer Res*, 2006. **66**(2): p. 605-12.
36. Zhou, Y., et al., *IL-17A versus IL-17F induced intracellular signal transduction pathways and modulation by IL-17RA and IL-17RC RNA interference in AGS gastric adenocarcinoma cells*. *Cytokine*, 2007. **38**(3): p. 157-64.
37. Yu, Q.M., C.D. Yu, and Z.Q. Ling, *Elevated circulating CD19+ lymphocytes predict survival advantage in patients with gastric cancer*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012. **13**(5): p. 2219-24.
38. Yang, J., et al., *Low percentage of CD24^{hi}CD27⁺CD19⁺ B cells decelerates gastric cancer progression in XELOX-treated patients*. *Int Immunopharmacol*, 2015. **26**(2): p. 322-327.
39. Wang, W.W., et al., *CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}Bregs involved in downregulate helper T cells and upregulate regulatory T cells in gastric cancer*. *Oncotarget*, 2015. **6**(32): p. 33486-99.

40. Shen, Z., et al., *Higher intratumoral infiltrated Foxp3+ Treg numbers and Foxp3+/CD8+ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer.* J Cancer Res Clin Oncol, 2010. **136**(10): p. 1585-95.
41. Berzins, S.P., M.J. Smyth, and A.G. Baxter, *Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease.* Nat Rev Immunol, 2011. **11**(2): p. 131-42.
42. Brennan, P.J., M. Brigl, and M.B. Brenner, *Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions.* Nat Rev Immunol, 2013. **13**(2): p. 101-17.
43. Cohen, N.R., et al., *Shared and distinct transcriptional programs underlie the hybrid nature of iNKT cells.* Nat Immunol, 2013. **14**(1): p. 90-9.
44. Tian, G., et al., *CD62L+ NKT cells have prolonged persistence and antitumor activity in vivo.* J Clin Invest, 2016. **126**(6): p. 2341-55.
45. Shissler, S.C., et al., *Immunotherapeutic strategies targeting natural killer T cell responses in cancer.* Immunogenetics, 2016.
46. Bassiri, H., et al., *iNKT cell cytotoxic responses control T-lymphoma growth in vitro and in vivo.* Cancer Immunol Res, 2014. **2**(1): p. 59-69.
47. Bassiri, H., R. Das, and K.E. Nichols, *Invariant NKT cells: Killers and conspirators against cancer.* Oncoimmunology, 2013. **2**(12): p. e27440.
48. Rossjohn, J., et al., *Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells.* Nat Rev Immunol, 2012. **12**(12): p. 845-57.
49. Van Kaer, L., L. Wu, and S. Joyce, *Mechanisms and Consequences of Antigen Presentation by CD1.* Trends Immunol, 2016.
50. Metelitsa, L.S., *Anti-tumor potential of type-I NKT cells against CD1d-positive and CD1d-negative tumors in humans.* Clin Immunol, 2011. **140**(2): p. 119-29.
51. Wu, L., et al., *Activation of CD1d-restricted natural killer T cells can inhibit cancer cell proliferation during chemotherapy by promoting the immune responses in murine mesothelioma.* Cancer Immunology, Immunotherapy, 2014. **63**(12): p. 1285-1296.
52. Borg, N.A., et al., *CD1d-lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor.* Nature, 2007. **448**(7149): p. 44-9.
53. Kohlgruber, A.C., et al., *Activation strategies for invariant natural killer T cells.* Immunogenetics, 2016. **68**(8): p. 649-63.
54. Ito, Y., et al., *Helicobacter pylori cholesteryl alpha-glucosides contribute to its pathogenicity and immune response by natural killer T cells.* PLoS One, 2013. **8**(12): p. e78191.
55. Kawano, T., et al., *CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides.* Science, 1997. **278**(5343): p. 1626-9.
56. Chang, D.H., et al., *Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T cells after injection of alpha-galactosyl-ceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients.* J Exp Med, 2005. **201**(9): p. 1503-17.
57. Van Kaer, L., V.V. Parekh, and L. Wu, *Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity.* Cell Tissue Res, 2011. **343**(1): p. 43-55.
58. Carreño, L.J., S.S. Kharkwal, and S.A. Porcelli, *Optimizing NKT cell ligands as vaccine adjuvants.* Immunotherapy, 2014. **6**(3): p. 309-20.
59. Brutkiewicz, R.R., *CD1d ligands: the good, the bad, and the ugly.* J Immunol, 2006. **177**(2): p. 769-75.
60. Arora, P., et al., *A single subset of dendritic cells controls the cytokine bias of natural killer T cell responses to diverse glycolipid antigens.* Immunity, 2014. **40**(1): p. 105-16.

61. Kawakami, K., et al., *Enhanced Gamma Interferon Production through Activation of V α 14(+) Natural Killer T Cells by α -Galactosylceramide in Interleukin-18-Deficient Mice with Systemic Cryptococcosis*. *Infection and Immunity*, 2001. **69**(11): p. 6643-6650.
62. Seino, K. and M. Taniguchi, *Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes*. *J Exp Med*, 2005. **202**(12): p. 1623-6.
63. Neparidze, N. and M.V. Dhodapkar, *Harnessing CD1d-restricted T cells toward antitumor immunity in humans*. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. **1174**: p. 61-7.
64. Song, L., et al., *Valpha24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(6): p. 1524-36.
65. Seino, K., et al., *Natural killer T cell-mediated antitumor immune responses and their clinical applications*. *Cancer Sci*, 2006. **97**(9): p. 807-12.
66. Vivier, E., et al., *Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer*. *Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(4): p. 239-52.
67. Fujii, S., et al., *NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 409.
68. Tahir, S.M., et al., *Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer*. *J Immunol*, 2001. **167**(7): p. 4046-50.
69. Motohashi, S., et al., *Preserved IFN-alpha production of circulating Valpha24 NKT cells in primary lung cancer patients*. *Int J Cancer*, 2002. **102**(2): p. 159-65.
70. Molling, J.W., et al., *Peripheral blood IFN-gamma-secreting Valpha24+Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load*. *Int J Cancer*, 2005. **116**(1): p. 87-93.
71. Montoya, C.J., et al., *Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11*. *Immunology*, 2007. **122**(1): p. 1-14.
72. Jadidi-Niaragh, F., et al., *Reduced frequency of NKT-like cells in patients with progressive chronic lymphocytic leukemia*. *Med Oncol*, 2012. **29**(5): p. 3561-9.
73. Molling, J.W., et al., *Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(7): p. 862-8.
74. Dhodapkar, M.V., et al., *A reversible defect in natural killer T cell function characterizes the progression of premalignant to malignant multiple myeloma*. *J Exp Med*, 2003. **197**(12): p. 1667-76.
75. Kuylenstierna, C., et al., *NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d*. *Eur J Immunol*, 2011. **41**(7): p. 1913-23.
76. Raulet, D.H., et al., *Regulation of Ligands for the NKG2D Activating Receptor*. *Annual Review of Immunology*, 2013. **31**(1): p. 413-441.
77. Le Bert, N. and S. Gasser, *Advances in NKG2D ligand recognition and responses by NK cells*. *Immunol Cell Biol*, 2014. **92**(3): p. 230-6.
78. Raulet, D.H., *Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(10): p. 781-90.
79. Nagarajan, N.A. and M. Kronenberg, *Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide*. *J Immunol*, 2007. **178**(5): p. 2706-13.
80. Zhang, J., F. Basher, and J.D. Wu, *NKG2D Ligands in Tumor Immunity: Two Sides of a Coin*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 97.

81. Salih, H.R., H.G. Rammensee, and A. Steinle, *Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4098-102.
82. Groh, V., et al., *Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation*. Nature, 2002. **419**(6908): p. 734-8.
83. Molfetta, R., et al., *c-Cbl regulates MICA- but not ULBP2-induced NKG2D down-modulation in human NK cells*. Eur J Immunol, 2014. **44**(9): p. 2761-70.
84. Oppenheim, D.E., et al., *Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance*. Nat Immunol, 2005. **6**(9): p. 928-37.
85. Osaki, T., et al., *Decreased NKG2D expression on CD8+ T cell is involved in immune evasion in patients with gastric cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(2 Pt 1): p. 382-7.
86. Clayton, A., et al., *Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression*. J Immunol, 2008. **180**(11): p. 7249-58.
87. Mincheva-Nilsson, L. and V. Baranov, *Cancer exosomes and NKG2D receptor-ligand interactions: Impairing NKG2D-mediated cytotoxicity and anti-tumour immune surveillance*. Semin Cancer Biol, 2014.
88. Salih, H.R., D. Goehlsdorf, and A. Steinle, *Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients*. Hum Immunol, 2006. **67**(3): p. 188-95.
89. Holdenrieder, S., et al., *Soluble MICB in malignant diseases: analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA*. Cancer Immunol Immunother, 2006. **55**(12): p. 1584-9.
90. Holdenrieder, S., et al., *Soluble MICA in malignant diseases*. Int J Cancer, 2006. **118**(3): p. 684-7.
91. Ribeiro, C.H., et al., *Clinical significance of tumor expression of major histocompatibility complex class I-related chains A and B (MICA/B) in gastric cancer patients*. Oncol Rep, 2016. **35**(3): p. 1309-17.
92. Liu, X., et al., *Potential therapeutic strategy for gastric cancer peritoneal metastasis by NKG2D ligands-specific T cells*. Onco Targets Ther, 2015. **8**: p. 3095-104.
93. Peer, D., et al., *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*. Nat Nano, 2007. **2**(12): p. 751-760.
94. Couzin-Frankel, J., *Cancer Immunotherapy*. Science, 2013. **342**(6165): p. 1432.
95. Walther, Z. and J. Sklar, *Molecular Tumor Profiling for Prediction of Response to Anticancer Therapies*. The Cancer Journal, 2011. **17**(2): p. 71-79.
96. Park, S., et al., *The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity*. Cancer Cell, 2010. **18**(2): p. 160-70.
97. Hodi, F.S., et al., *Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma*. New England Journal of Medicine, 2010. **363**(8): p. 711-723.
98. Raufi, A.G. and S.J. Klempner, *Immunotherapy for advanced gastric and esophageal cancer: preclinical rationale and ongoing clinical investigations*. Journal of Gastrointestinal Oncology, 2015. **6**(5): p. 561-569.
99. Qing, Y., et al., *Upregulation of PD-L1 and APE1 is associated with tumorigenesis and poor prognosis of gastric cancer*. Drug Des Devel Ther, 2015. **9**: p. 901-9.
100. McGranahan, N., et al., *Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade*. Science, 2016. **351**(6280): p. 1463.

101. Melief, C.J.M., et al., *Therapeutic cancer vaccines*. The Journal of Clinical Investigation, 2015. **125**(9): p. 3401-3412.
102. Rosenberg, S.A. and N.P. Restifo, *Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer*. Science, 2015. **348**(6230): p. 62-8.
103. Haji-Fatahaliha, M., et al., *CAR-modified T-cell therapy for cancer: an updated review*. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2016. **44**(6): p. 1339-49.
104. Morgan, R.A., et al., *Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes*. Science, 2006. **314**(5796): p. 126-9.
105. Maude, S.L., et al., *CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2015. **125**(26): p. 4017.
106. Giaccone, G., et al., *A Phase I Study of the Natural Killer T-Cell Ligand α -Galactosylceramide (KRN7000) in Patients with Solid Tumors*. Clinical Cancer Research, 2002. **8**(12): p. 3702-3709.
107. Nieda, M., et al., *Therapeutic activation of V α 24+V β 11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity*. Blood, 2004. **103**(2): p. 383-9.
108. Ishikawa, A., et al., *A Phase I Study of α -Galactosylceramide (KRN7000)-Pulsed Dendritic Cells in Patients with Advanced and Recurrent Non-Small Cell Lung Cancer*. Clinical Cancer Research, 2005. **11**(5): p. 1910-1917.
109. Motohashi, S., et al., *A Phase I Study of In vitro Expanded Natural Killer T Cells in Patients with Advanced and Recurrent Non-Small Cell Lung Cancer*. Clinical Cancer Research, 2006. **12**(20): p. 6079-6086.
110. Motohashi, S., et al., *A Phase I-II Study of α -Galactosylceramide-Pulsed IL-2/GM-CSF-Cultured Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Advanced and Recurrent Non-Small Cell Lung Cancer*. The Journal of Immunology, 2009. **182**(4): p. 2492-2501.
111. Yamada, D., et al., *Efficient Regeneration of Human V α 24+ Invariant Natural Killer T Cells and Their Anti-Tumor Activity In Vivo*. STEM CELLS, 2016: p. n/a-n/a.
112. Wilson, S.B. and T.L. Delovitch, *Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumour immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 211-22.
113. Sag, D., et al., *IL-10-producing NKT10 cells are a distinct regulatory invariant NKT cell subset*. J Clin Invest, 2014. **124**(9): p. 3725-40.
114. McEwen-Smith, R.M., M. Salio, and V. Cerundolo, *The Regulatory Role of Invariant NKT Cells in Tumor Immunity*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(5): p. 425-435.
115. Huijts, C.M., et al., *mTOR Inhibition Per Se Induces Nuclear Localization of FOXP3 and Conversion of Invariant NKT (iNKT) Cells into Immunosuppressive Regulatory iNKT Cells*. The Journal of Immunology, 2015. **195**(5): p. 2038-2045.
116. Kunii, N., et al., *Combination therapy of in vitro-expanded natural killer T cells and α -galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma*. Cancer Science, 2009. **100**(6): p. 1092-1098.
117. Qiu, Y., et al., *Combination of cytokine-induced killer and dendritic cells pulsed with antigenic α -1,3-galactosyl epitope enhanced lymphoma cell membrane for effective B-cell lymphoma immunotherapy*. Cytotherapy, 2016. **18**(1): p. 91-98.
118. Reinink, P. and I. Van Rhijn, *Mammalian CD1 and MR1 genes*. Immunogenetics, 2016. **68**(8): p. 515-23.

119. Morris, E.S., et al., *NKT cell-dependent leukemia eradication following stem cell mobilization with potent G-CSF analogs*. Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(11): p. 3093-3103.
120. Heczey, A., et al., *Invariant NKT cells with chimeric antigen receptor provide a novel platform for safe and effective cancer immunotherapy*. Blood, 2014. **124**(18): p. 2824-33.
121. O'Reilly, V., et al., *Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4+, CD8alpha+ and CD4-CD8alpha- invariant natural killer T cells*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28648.
122. Hernández, C.J., et al., *Heat killed Helicobacter pylori augments NK cell cytotoxicity through induction of NKG2DL surface expression on gastric adenocarcinoma cells*. Frontiers in Immunology, 2015.
123. Tanahashi, T., et al., *Cytokine Expression and Production by Purified Helicobacter pylori Urease in Human Gastric Epithelial Cells*. Infection and Immunity, 2000. **68**(2): p. 664-671.
124. Aktas, E., et al., *Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity*. Cell Immunol, 2009. **254**(2): p. 149-54.
125. Mimura, K., et al., *Therapeutic potential of highly cytotoxic natural killer cells for gastric cancer*. Int J Cancer, 2014.
126. Yoneda, K., et al., *The peripheral blood Valpha24+ NKT cell numbers decrease in patients with haematopoietic malignancy*. Leuk Res, 2005. **29**(2): p. 147-52.
127. Najera Chuc, A.E., et al., *Low number of invariant NKT cells is associated with poor survival in acute myeloid leukemia*. J Cancer Res Clin Oncol, 2012. **138**(8): p. 1427-32.
128. Zhu, S., et al., *CCL25/CCR9 Interactions Regulate the Function of iNKT Cells in Oxazolone-Induced Colitis in Mice*. PLOS ONE, 2014. **9**(6): p. e100167.
129. Pardoll, D.M., *Distinct mechanisms of tumor resistance to NK killing: of mice and men*. Immunity, 2015. **42**(4): p. 605-6.
130. Wang, H., et al., *Tumor-derived soluble MICs impair CD3(+)/CD56(+) NKT-like cell cytotoxicity in cancer patients*. Immunol Lett, 2008. **120**(1-2): p. 65-71.
131. Peng, L.S., et al., *Altered phenotypic and functional characteristics of CD3+CD56+ NKT-like cells in human gastric cancer*. Oncotarget, 2016.
132. Kuroda, H., H. Saito, and M. Ikeguchi, *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, 2012. **15**(4): p. 433-9.
133. Joshi, S.K. and M.L. Lang, *Fine tuning a well-oiled machine: Influence of NK1.1 and NKG2D on NKT cell development and function*. Int Immunopharmacol, 2013. **17**(2): p. 260-6.
134. Thedrez, A., et al., *CD4 engagement by CD1d potentiates activation of CD4+ invariant NKT cells*. Blood, 2007. **110**(1): p. 251-8.
135. Zwang, N.A. and L.A. Turka, *Homeostatic expansion as a barrier to lymphocyte depletion strategies*. Curr Opin Organ Transplant, 2014. **19**(4): p. 357-62.
136. Mazzucchelli, R. and S.K. Durum, *Interleukin-7 receptor expression: intelligent design*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 144-54.
137. Abe, A., et al., *An Enhancer of the IL-7 Receptor alpha-Chain Locus Controls IL-7 Receptor Expression and Maintenance of Peripheral T Cells*. J Immunol, 2015. **195**(7): p. 3129-38.

138. Zarogoulidis, P., et al., *Interleukin-7 and interleukin-15 for cancer*. J Cancer, 2014. 5(9): p. 765-73.
139. Marcais, A., et al., *Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines*. Front Immunol, 2013. 4: p. 450.
140. Molfetta, R., et al., *Regulation of NKG2D Expression and Signaling by Endocytosis*. Trends in Immunology, 2016. 37(11): p. 790-802.
141. Chatila, T., et al., *Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin*. J Immunol, 1989. 143(4): p. 1283-9.
142. Upshaw, J.L., et al., *NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells*. Nat Immunol, 2006. 7(5): p. 524-532.
143. Giurisato, E., et al., *Phosphatidylinositol 3-Kinase Activation Is Required To Form the NKG2D Immunological Synapse*. Molecular and Cellular Biology, 2007. 27(24): p. 8583-8599.
144. Crane, C.A., et al., *TGF-beta downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8+ T cells in glioma patients*. Neuro Oncol, 2010. 12(1): p. 7-13.
145. La Cava, A., L. Van Kaer, and S. Fu Dong, *CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators*. Trends Immunol, 2006. 27(7): p. 322-7.
146. Kirilovsky, A., et al., *Rational bases for the use of the Immunoscore in routine clinical settings as a prognostic and predictive biomarker in cancer patients*. International Immunology, 2016. 28(8): p. 373-382.

ANEXOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Titulo del Proyecto: **“Uniendo la inmunidad innata y adaptativa: rol de las células NKT y linfocitos T reguladores en la regulación de la respuesta inmune contra el cáncer gástrico”**

Investigador principal: Dra. Carolina Hager Ribeiro

Institución: Universidad de Chile

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 regulación 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 para 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 cáncer.

El estudio y 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 constituyen ninguna intervención en su organismo.

Este estudio se hará con un número de 30 pacientes del Hospital Salvador, Santiago, Chile.

Si Ud. acepta participar en este estudio, se le pedirá que acepte **donar una pequeña muestra del tumor**, del tamaño de una tableta de paracetamol obtenida en la operación. El procedimiento no tendrá más riesgos para Ud. que la cirugía misma.

Además, se le pedirá una **muestra de sangre** equivalente a una cucharadita de té, lo que tampoco 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.

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

Las muestras de tumor y sangre donadas por Ud. no se rotularán con su nombre o identidad, sino que con códigos utilizados en el laboratorio (por ejemplo, “CG20” más la fecha de la operación).

La Investigadora Principal de este estudio se responsabilizará por el almacenamiento y uso de las muestras donadas por Ud.

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 y a su médico tratante,

sin que ello signifique modificaciones en el estudio o 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**

Teléfono: (2) 978-6088

Autoridad de la Institución: **Dr. Marco Bustamante Zamorano**

Teléfono: (2) 269-9278

En caso que Ud. lo necesite, también puede contactar a los representantes de los Comités de Ética que aprobaron este estudio:

Dr. Manuel Oyarzún

Departamento de Bioética y Humanidades Médicas

Facultad de Medicina - Universidad de Chile

Teléfono: (2) 274-1560

Dr. Andrés Stuardo

Centro de Bioética del S.S.M. Oriente

Teléfono: (2) 575-3735

Este documento resume lo que los médicos me explicaron 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 NKT y linfocitos T reguladores en la regulación de la respuesta inmune contra el cáncer gástrico".

_____ Nombre del Paciente	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Nombre del Informante	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Carolina Hager Ribeiro	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Nombre del Investigador Responsable	_____ Firma	_____ Fecha

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



Comisión Nacional de Investigación
Científica y Tecnológica -- CONICYT

018/FONDECYT/BIOLOGÍA 2 / 361

Santiago, 2 ABR 2012

Señora
Carolina Ribeiro
Investigadora Responsable Proyecto N°11110456
Universidad de Chile
Facultad de Medicina / ICBM
Prog. Disciplinario de Inmunología
Avda. Independencia 1027
Santiago.

Estimada Sra. Ribeiro:

Me dirijo a Ud., a fin de informar que en su sesión del 30 de Enero de 2012, el Comité Asesor de Bioética de Fondecyt-Conicyt ha revisado los antecedentes enviados en respuesta a las observaciones realizadas y ha considerado que la información presentada subsana los reparos planteados.

Adjunto se envía copia del consentimiento informado visado, el cual deberá ser utilizado durante su investigación.

Estos antecedentes pasarán a formar parte de su proyecto.

Sin otro particular, saluda atentamente a Ud.,

MARÍA ELENA BOISIER
Directora
Programa FONDECYT

cc: UGC
Archivo

LFF/nnj.





CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto: "Uniendo la inmunidad innata y adaptativa: rol de las células NKT y linfocitos T reguladores en la regulación de la respuesta inmune contra el cáncer gástrico"

Investigador principal: Dra. Carolina Hager Ribeiro

Institución: Universidad de Chile

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 regulación 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 para 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 cáncer.

El estudio y 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 constituyen ninguna intervención en su organismo.

Este estudio se hará con un número de 30 pacientes del Hospital Salvador, Santiago, Chile.

Si Ud. acepta participar en este estudio, se le pedirá que acepte donar una pequeña muestra del tumor, del tamaño de una tableta de paracetamol obtenida en la operación. El procedimiento no tendrá más riesgos para Ud. que la cirugía misma.

Además, se le pedirá una muestra de sangre equivalente a una cucharadita de té, lo que tampoco 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.

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

Las muestras de tumor y sangre donadas por Ud. no se rotularán con su nombre o identidad, sino que con códigos utilizados en el laboratorio (por ejemplo, "CG20" más la fecha de la operación).

La Investigadora Principal de este estudio se responsabilizará por el almacenamiento y uso de las muestras donadas por Ud.

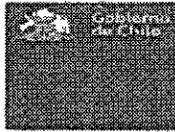
Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada con estricta confidencialidad. A sus datos solo tendrán el acceso los investigadores y los Comités de Ética Científicos.

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 y a su médico tratante,

COMITE ASESOR
DE BIOÉTICA
FONDECYT

30/01/2012



Servicio de Salud Metropolitano Oriente
Comité de Ética Científico

PROTOCOLO DE APROBACIÓN DE PROYECTOS CLÍNICOS

Con fecha 24 de Enero de 2012, el CEC del S.S.M. Oriente analizó y aprobó el Proyecto de Investigación Concurso FONDECYT 2011, titulado:

“Uniendo la inmunidad innata y adaptativa: rol de las células NKT y linfocitos T reguladores de la inmunoregulación de la respuesta inmune contra el cáncer gástrico;”

y que conducirá como Investigador Principal la **Dra. Carolina Hager Ribeiro** en el Laboratorio de Inmunovigilancia y Evasión Inmune, Programa Disciplinario de Inmunología, ICBM, 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:

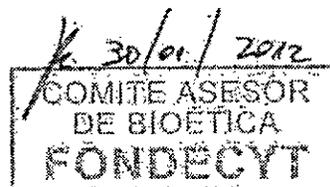
- Proyecto FONDECYT N°11110456 in extenso, en inglés;
- Consentimiento Informado, firmado por el CEC del S.S.M. Oriente el 24 de Enero de 2012;
- CV del Investigador Principal: Dra. Carolina Hager R.

Además tomó conocimiento de:

- Informe de aspectos bioéticos Concurso Nacional de Proyectos FONDECYT Iniciación 2011;
- Acta de Aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina -Universidad de Chile; fechada 08 Julio 2011;
- Carta de Autorización del Dr. Juan Lombardi Jefe Servicio de Cirugía -Hospital del Salvador, fechada 08 Noviembre 2011;
- V/B de la Directora del Hospital del Salvador Q.F. María Elena Sepúlveda; 08 Noviembre 2011.

Consideraciones éticas:

- Los Investigadores poseen experiencia en el tema y calidad como Investigadores;
- La fundamentación del proyecto es adecuada y se considera que constituye un aporte para la comunidad científica;

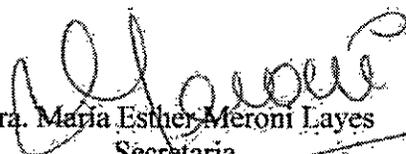


- Los participantes del estudio no enfrentan riesgo innecesario y hay salvaguarda de sus datos;
- El documento Consentimiento Informado entrega información pertinente y relevante a las participantes del estudio, quienes entregan libremente su declaración de participar en él.

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

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

#: No participó en la discusión


 Dra. María Esther Meroni Layes
 Secretaria

30/01/2012
 COMITE ASESOR
 DE BIOÉTICA
 FONDECYT



Santiago, 26 de Enero de 2012



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



1/2

ACTA DE APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS

Con fecha 07 de julio de 2011, 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 O., Médico Genetista
Sra. Nina Horwitz C., Sociólogo, Mg. Bioética
Dra. María Eugenia Pinto C., Médico Infectólogo
Sra. Claudia Marshall F., Representante de la comunidad

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **"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"** y cuyo investigador responsable es la **Dra. Carolina Hager**, quien desempeña funciones en el **Laboratorio de Inmunovigilancia y Evasión Inmune, Programa Disciplinario de Inmunología, ICBM, 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

2/2

08 JUL. 2011



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: Población no cautiva, investigación no terapéutica.
- b) Utilidad del Proyecto: Estudio de los factores que permiten a las células de Cáncer Gástrico, eludir la vigilancia inmunológica.
- c) Riesgos y Beneficios: Riesgos mínimos, ya que los investigadores trabajarán en muestras de Cáncer Gástrico obtenidas en la intervención quirúrgica realizada en razón de la patología, y con muestras de sangre periférica.
- d) Protección de los participantes: Existe un formulario de Consentimiento Informado bien redactado para pacientes y para donantes de muestra de sangre sin Cáncer Gástrico.
- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: no aplica.
- f) La investigadora 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 05 de julio de 2011, 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.

Santiago, 07 de julio de 2011.

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

MGH/mva.
c.c.: Archivo Proy. 025-2011

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

CONSENTIMIENTO INFORMADO

08 JUL. 2011



TÍTULO DEL PROYECTO: "Uniando 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 "Uniando 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 estudio y 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 constituyen ninguna intervención en su organismo.

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 acepte donar una pequeña muestra del tumor, del tamaño de una tableta de paracetamol obtenida en la biopsia u operación. El procedimiento no tendrá más riesgos para Ud. que la cirugía misma.

Además, se le pedirá una muestra de sangre equivalente a una cucharadita de té, lo que tampoco 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.

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. 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 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.

08 JUL 2011



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

Autoridad de la Institución: Dr. Marco Bustamante Zamorano

Teléfono: (2) 269-9278

Este documento resume lo que los médicos me explicaron 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 paciente	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Nombre del Informante	_____ Firma	_____ Fecha
CAROLINA HAGER RIBEIRO Nombre del Investigador	_____ Firma	_____ Fecha

CONSENTIMIENTO INFORMADO



08 JUL. 2011

TÍTULO 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

08 JUL. 2011



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