

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“Análisis de la expresión de CD1d y producción de
citoquinas por Linfocitos B estimulados con células
iNKT en adenocarcinoma gástrico”**

María Josefina Siña Barriga

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN INMUNOLOGIA

Directora de Tesis: Dra. Carolina Hager Ribeiro

Co-directora de Tesis: Dra. María Carmen Molina

2017

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

MARIA JOSEFINA SIÑA BARRIGA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Inmunología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el viernes 9 de Junio de 2017

**Prof. Carolina Hager Ribeiro
Directora de Tesis**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Dr. Rodrigo Naves

Dr. Alejandro Escobar

Dr. Diego Catalan

Dr. Juan Carlos Aguilón

**Dr. Juan Carlos Aguilón
Presidente Comisión**

A mi familia, por confiar en mí y apoyarme
de todas las maneras posibles.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a la Dra Carolina Hager Ribeiro por su dedicación, comprensión, apoyo incondicional y ayuda infinita en todo momento. Ella es el pilar fundamental de nuestro laboratorio y gracias a ella todo esto es posible. También quiero agradecer a la Dra. María Carmen Molina por sus aportes a enriquecer la discusión de nuestros resultados y por su gran conocimiento que siempre está dispuesta a compartir.

Es necesario agradecer a mis compañeros y amigos del Laboratorio de Inmunoedición del Cáncer, especialmente a Felipe y Gabriel, que con mucha paciencia me enseñaron prácticamente todo acerca del funcionamiento del laboratorio. También quiero agradecer a Karina, Caro, Víctor, Jaime, Perry, Alex, Bastián, Marce, Vale, Lorenzo, Sra. Nancy, Sra. Ruth, Sra. Juani, Alvaro y Bárbara por su increíble disposición a ayudarme durante todos estos años.

Finalmente, quiero agradecer a Pablo, Pablito, Tomás y Emilia, mi familia, porque generosamente dejaron de lado sus necesidades para apoyarme y acompañarme en esta aventura, porque la energía y alegría que me regalan son el motor de este proyecto, y porque gracias a ellos, todo este esfuerzo tiene sentido.

¡¡¡Muchas gracias a todos!!!

Indice de Contenidos

1.	Indice de Tablas	2
2.	Indice de Figuras	3
3.	Resumen	5
4.	Abstract	8
5.	Introducción	10
6.	Hipótesis	25
7.	Objetivo General	26
8.	Objetivos Específicos	26
9.	Materiales y Métodos	27
10.	Resultados	35
11.	Discusión	55
12.	Conclusiones	64
13.	Bibliografía	65
14.	Anexos	75

Indice de Tablas

Tabla N°1 Características clinico-patológicas de los pacientes con adenocarcinoma gástrico

27

Indice de Figuras

Figura N°1	Selección de la población de linfocitos B CD19 ⁺ CD1d ⁺ en control sano y en paciente con adenocarcinoma gástrico por citometría de flujo	35
Figura N°2	Frecuencia de linfocitos B CD19 ⁺ en sangre periférica de controles sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico	36
Figura N°3	Frecuencia y nivel de expresión de CD1d en linfocitos B CD19 ⁺	36
Figura N°4	Frecuencia y nivel de expresión de CD40 en linfocitos B CD19 ⁺	38
Figura N°5	Frecuencia y nivel de expresión de CD80 en linfocitos B CD19 ⁺	38
Figura N°6	Frecuencia y nivel de expresión de CD86 en linfocitos B CD19 ⁺	39
Figura N°7	Frecuencia y nivel de expresión de CD40 en linfocitos B CD19 ⁺ CD1d ⁺ en sangre periférica de controles sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico	40
Figura N°8	Frecuencia y nivel de expresión de CD80 en linfocitos B CD19 ⁺ CD1d ⁺ en sangre periférica de controles sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico	40
Figura N°9	Frecuencia y nivel de expresión de CD86 en linfocitos B CD19 ⁺ CD1d ⁺ en sangre periférica de controles sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico	41
Figura N°10	Relación entre los porcentajes de linfocitos B de sangre periférica que expresan CD40, CD80 y CD86	42
Figura N°11	Relación entre los porcentajes de linfocitos B CD1d ⁺ de sangre periférica que expresan CD40, CD80 y CD86	43
Figura N°12	Enriquecimiento de linfocitos B CD19 ⁺ periféricos a partir del PBMC de un control sano	45
Figura N°13	Protocolo de expansión <i>in vitro</i> de linfocitos iNKT	46
Figura N°14	Selección de linfocitos B CD19 ⁺ y CD19 ⁺ CD1d ⁺ que producen IL-10 y TNF-	48
Figura N°15	Frecuencia de linfocitos B CD19 ⁺ que producen IL-10 en sangre periférica de controles sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico	50

Figura N°16 Frecuencia de linfocitos B CD19 ⁺ CD1d ⁺ que producen IL-10 en sangre periférica de controles sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico	51
Figura N°17 Frecuencia de linfocitos B CD19 ⁺ producen TNF- en sangre periférica de controles sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico	52
Figura N°18 Frecuencia de linfocitos B CD19 ⁺ CD1d ⁺ producen TNF- en sangre periférica de controles sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico	53
Figura N°19 Frecuencia de linfocitos B totales y linfocitos B CD1d ⁺ circulantes que producen IL-10 y TNF- en controles sanos y en pacientes con adenocarcinoma gástrico	54
Figura N°20 Esquema propuesto de la activación y participación de linfocitos B CD1d ⁺ en cáncer gástrico	63

Resumen

El cáncer gástrico (CG) es una enfermedad de alta prevalencia y mortalidad a nivel mundial, y, en Chile, corresponde a la segunda causa de muerte después de las causas cardiovasculares. Existe una estrecha relación entre el sistema inmune y el cáncer a través de un proceso denominado inmunomodulación del cáncer. Diversos tipos celulares participan en este proceso, como los linfocitos Natural Killer T invariantes (iNKT) y linfocitos B (LB). Los linfocitos iNKT corresponden a una subpoblación de linfocitos T que expresan un TCR invariante que reconoce antígenos glicolípidicos presentados por la molécula CD1d, presente en la superficie de células presentadoras de antígenos, como los linfocitos B. A su vez, los linfocitos B, así como las células iNKT, pueden modular la respuesta inmune anti-tumoral a través de diversos mecanismos, los cuales necesariamente requieren de señales intracelulares gatilladas por la interacción de las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86, que se expresan en la superficie de linfocitos B, con sus respectivos ligandos, presentes en la superficie de linfocitos T y células iNKT activadas.

Los objetivos de esta investigación fueron determinar el porcentaje de linfocitos B que expresan CD1d y los niveles de expresión de esta molécula en linfocitos B de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma gástrico, como también evaluar la expresión de CD40, CD80 y CD86 en estas mismas células presentadoras de antígeno, y compararlos con linfocitos B de controles sanos. Además, se analizó la producción de interleuquina 10 (IL-10) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) por linfocitos B extraídos de sangre periférica tanto de pacientes como de controles sanos, al ser co-

cultivados con células iNKT de un control sano.

Dentro de los resultados obtenidos, se pudo determinar que el porcentaje de linfocitos B CD19⁺ circulantes de pacientes se encuentran significativamente disminuidos en comparación a los controles sanos. Por otro lado, no se encontró diferencia en el porcentaje ni en el nivel de expresión de la molécula CD1d entre linfocitos B CD19⁺ de pacientes con CG y controles sanos. Al evaluar la expresión de moléculas co-estimuladoras, pudimos observar que los linfocitos B CD19⁺ circulantes de pacientes presentan menor expresión de CD40, pero no se encontraron diferencias significativas en la expresión de CD80 o CD86 respecto a los controles sanos. Al analizar la posible relación entre la expresión de moléculas de co-estimulación, pudimos detectar, en los pacientes con CG, una correlación positiva entre los linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ que expresan CD40 y linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ que expresan CD80 y CD86, mientras que esta correlación no se observó en los linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ de controles sanos. Al evaluar la producción de IL-10 y de TNF- α por parte de los linfocitos B CD19⁺ o CD19⁺CD1d⁺ en pacientes con CG, no pudimos encontrar una diferencia significativa al compararlos con controles sanos; sin embargo, pudimos observar un mayor porcentaje de linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ que producen TNF- α respecto a los linfocitos B totales que producen esta citoquina en pacientes con CG, y no así en los controles sanos.

Estos resultados sugieren que la comunicación entre los linfocitos B y las células iNKT, vía CD1d, no está comprometida, pero sí que los linfocitos B CD1d⁺ de los pacientes con adenocarcinoma gástrico logran una activación más potente, dado que expresan CD40, CD80 y CD86; además, estas células producen más TNF- α que los

linfocitos B totales. Por lo tanto, nuestros resultados indican que, en cáncer gástrico, los linfocitos B de sangre periférica cumplirían un rol pro-inflamatorio, posiblemente como consecuencia del estímulo por linfocitos iNKT.

Abstract

Gastric cancer (GC) is a prevalent disease, with high rates of mortality worldwide. In Chile, it is the second most common cause of death after cardiovascular complications. There is a close link between the immune system and cancer, which is mediated by a process named “cancer immune edition”. Different types of cells participate in this process, including Invariant Natural Killer T (iNKT) cells and B cells. iNKT cells are a sub-population of T cells that express an invariant T cell receptor (TCR), which recognizes glycolipid antigens presented by CD1d, an antigen-presenting molecule expressed on the surface of antigen presenting cells, including B cells. As iNKT cells, B lymphocytes can modulate the anti-tumor immune response through different mechanisms that require intracellular signals triggered by the interaction of the co-stimulatory molecules CD40, CD80 and CD86, on the surface of B cells, and their respective ligands, on the surface of activated T cells and iNKT cells.

The aim of this investigation was to estimate the percentage of B cells that express CD1d and the level of expression of CD1d on circulating B cells in patients with gastric adenocarcinoma, as well as to assess the expression of CD40, CD80 and CD86 on these B cells, and compare them with B cells from healthy donors. We also analyzed the production of interleukin 10 (IL-10) and tumoral necrosis factor alpha (TNF-) by peripheral blood B cells from both, patients and healthy controls, upon co-culture with iNKT cells from a healthy donor.

We observed that the percentage of circulating CD19⁺ B cells was significantly reduced in patients with gastric cancer. However, neither the percentage of CD19⁺CD1d⁺ B cells nor the level of CD1d expression on CD19⁺ B cells varied between patients with

GC and healthy donors. Although the expression of CD40 on CD19⁺ B cells was significantly decreased in patients with GC, no differences in the expression of CD80 or CD86 could be detected. On the other hand, we observed that CD19⁺CD1d⁺ B cells from GC patients that express CD40 presented a significant positive correlation with CD19⁺CD1d⁺ B cells expressing CD80 or CD86, whereas such correlation was not observed on B cells from healthy volunteers. Finally, in this study, we also determined the production of IL-10 and TNF- α by B cells in the presence of iNKT cells from a healthy donor. Although no differences in the percentage of cytokine-expressing total CD19⁺ B lymphocytes or CD19⁺CD1d⁺ B cells could be detected between patients and healthy volunteers, we found there was a significant increase in the percentage of CD19⁺CD1d⁺ B cells expressing TNF- α as compared to total CD19⁺ B cells in GC patients.

These results suggest that the communication between B cells and iNKT cells, through CD1d, may not be compromised in patients with GC. On the other hand, CD19⁺CD1d⁺ B cells in patients with GC may present a more potent activation state due to the expression of CD40, CD80 and CD86, as these B cells produce higher levels of TNF- α than total CD19⁺ B cells. Therefore, our results indicate that, in the peripheral blood, B cells expressing CD1d play a pro-inflammatory role in patients with GC, possibly as a consequence of iNKT cells interaction.

Introducción

Cáncer Gástrico

El cáncer gástrico es una patología muy frecuente en todo el mundo y que tiene una alta morbi-mortalidad. En el año 2012, se calculó una incidencia de 952.000 nuevos casos, y las muertes debido a este cáncer, este mismo año, alcanzaron los 723.000 casos a nivel mundial (Globocan., 2012). En Chile, el cáncer gástrico es la primera causa de muerte por cáncer en hombres y la segunda causa de muerte en ambos sexos, después de aquellas provocadas por accidentes cardiovasculares (DEIS, 2011). La distribución geográfica de esta enfermedad no es homogénea, siendo países de alta prevalencia Corea, Japón, Chile y China. En general, tiene un mal pronóstico debido a que su diagnóstico es tardío, dado que su progresión es asintomática. Solamente el 10% de los pacientes se diagnostica en etapa incipiente, y la sobrevida a los 5 años alcanza a un 20-30% en aquellos pacientes a los que se les resecó el tumor (Dicken y cols., 2005).

Existen distintos tipos de cáncer gástrico, siendo el más frecuente el adenocarcinoma gástrico, que corresponde al 95% de los casos, mientras que el 5% restante corresponde a otros tipos de tumores malignos como linfomas, sarcomas, carcinoides y carcinoma escamoso (Dicken y cols., 2005). La clasificación de Lauren divide al adenocarcinoma gástrico en 2 tipos desde el punto de vista histológico: cáncer gástrico intestinal o difuso. Esta clasificación se basa en la configuración microscópica y el patrón de crecimiento del tumor. El adenocarcinoma gástrico difuso se caracteriza por tener células tumorales no cohesivas que infiltran el estroma de manera difusa y que no presentan formación glandular. En general, este tipo de adenocarcinoma exhibe

desmoplasia e inflamación de la mucosa subyacente y, en comparación con el adenocarcinoma intestinal, tiene poca relación con influencias ambientales. En cambio, el adenocarcinoma intestinal se caracteriza por presentar una marcada formación de glándulas a la microscopía, muy similar a la mucosa del colon. Se piensa que este tipo de cáncer gástrico se desarrolla secundariamente a gastritis crónica atrófica (Dicken y cols., 2005).

Se han descrito múltiples causas asociadas al desarrollo del cáncer gástrico, dentro de las cuales cabe destacar la infección por *Helicobacter pylori*. Esta bacteria coloniza la mucosa gástrica y la mayoría de las veces se localiza extracelularmente, pero, en algunos casos, ésta puede encontrar la manera de invadir el citoplasma de las células epiteliales gástricas y llegar hasta la lámina propia, para luego inducir gastritis crónica severa, atrofia y metaplasia intestinal (Wang y cols., 2008). Pese a que aproximadamente la mitad de la población se encuentra infectada por *H. pylori*, sólo 3 de cada 10.000 personas infectadas desarrollan cáncer gástrico, y esto se debe a que existen otros factores que intervienen en la etiología del cáncer gástrico, como la susceptibilidad genética y otros factores ambientales. Se observa que existe un agrupamiento familiar en el 10% de los casos y que entre 1 y 3% de los casos son hereditarios (Wang y cols., 2008). Por otro lado, se han identificado varios factores dietarios asociados con el desarrollo de cáncer gástrico, como dietas ricas en sal, comidas ahumadas o pobremente preservadas; en cambio, el consumo de frutas y vegetales se asocia con menor incidencia de cáncer gástrico (Dicken y cols., 2005). Por último, existen factores conductuales que también se relacionan con mayor incidencia de cáncer gástrico, como el hábito tabáquico, en donde los fumadores presentan 2 a 3

veces mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico proximal que los no fumadores, resultado que fue apoyado por Haung *et al*, quienes han demostrado que los fumadores tienen un Odds Ratio de 2,53 (Haung y cols., 2000).

El diagnóstico de cáncer gástrico se basa en una buena anamnesis y prolijo examen físico, y se confirma con una endoscopia digestiva alta. Como ya se mencionó, inicialmente los síntomas están ausentes o son inespecíficos, como distensión y dolor abdominal. En los casos más avanzados, aparecen baja de peso, masa abdominal palpable y anemia ferropriva. La endoscopia digestiva alta permite detectar la presencia del tumor y su localización, permitiendo así la toma de muestras para biopsias. Luego, se debe realizar una endosonografía para determinar el grado de infiltración de la pared gástrica (Dicken y cols., 2005).

Actualmente, el único tratamiento potencialmente curativo del cáncer gástrico es la cirugía. Sin embargo, en muchos casos, ésta sólo puede ser paliativa para mejorar la calidad de vida del paciente. La quimioterapia y la radioterapia, tratamientos que se pueden utilizar de manera prequirúrgica (neoadyuvante) o postquirúrgica (adyuvante), aún son motivo de estudio, pero se ha visto que ambos procedimientos conducidos en el postoperatorio mejorarían la sobrevida de los pacientes (Li y cols., 2012). En los últimos años, la inmunoterapia y terapias dirigidas hacia ciertos agentes, como al receptor 2 de crecimiento epidermal humano (HER2) o al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), ya han sido aceptadas para el tratamiento adyuvante a la cirugía en las etapas avanzadas del cáncer gástrico (Sun W y cols, 2016).

Respuesta inmune anti-tumoral

El sistema inmune, frente al cáncer, activa una respuesta anti-tumoral tanto innata como adaptativa. La respuesta inmune se encarga de realizar la inmunovigilancia, concepto que incluye mecanismos de reconocimiento de células propias transformadas o dañadas y consecuente eliminación de las mismas para evitar su crecimiento y multiplicación descontrolada (Ostrand-Rosenberg, 2008). Las células de la respuesta inmune innata responsables de llevar a cabo la inmunovigilancia son principalmente las células *natural killer* (NK), que son capaces de reconocer, a través de receptores específicos, la presencia de proteínas que se sobreexpresan en la superficie de la célula transformada y la disminución de otras moléculas, como el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I. Una vez detectadas las células dañadas, las células NK se activan y son capaces de eliminarlas mediante procesos citotóxicos que incluyen la liberación de gránulos que contienen perforina y granzima (Chávez-Galán et al, 2009). Al igual que el sistema inmune innato, la respuesta inmune adaptativa también participa en las respuestas anti-tumorales para impedir la progresión de la enfermedad, y los linfocitos T son los encargados de reconocer antígenos de las células tumorales y promover su eliminación por diversos mecanismos efectoros. En los últimos años, ha cobrado importancia una subpoblación de linfocitos T que también se relaciona con la respuesta inmune anti-tumoral, llamados linfocitos NKT.

Linfocitos NKT

Los linfocitos *Natural Killer T* (NKT) son una subpoblación de linfocitos T y constituyen un puente entre la inmunidad innata y la adaptativa debido a su habilidad de activar a diversos tipos celulares, como las células NK, células dendríticas y linfocitos T,

además de ser capaces de secretar citoquinas y regular la respuesta inmune humoral (Van Kaer y cols., 2010; O'Reilly y cols., 2011). Estos linfocitos se generan en la médula ósea y maduran en el timo, y tienen la capacidad de promover o suprimir la inmunidad celular sin la necesidad de expansión clonal (Rossjohn y cols., 2012). Como su nombre lo indica, los linfocitos NKT presentan tanto características de los linfocitos T CD3⁺ [incluyendo la expresión del receptor de célula T (TCR)], como de células NK (dado que expresa receptores del mismo linaje que estas células, como el Natural Killer Group 2, member D (NKG2D), que es un receptor de activación que reconoce a diferentes ligandos expresados en células transformadas). Adicionalmente, las células NKT expresan otros marcadores, como CD56, CD161 y CD94 (Tahir y cols., 2001).

Como mencionado anteriormente, los linfocitos NKT expresan el receptor de antígenos específico de linfocitos T, llamado TCR. Este receptor se genera por recombinación somática y está compuesto por dos cadenas, la cadena α y la cadena β . Cada cadena contiene un dominio variable (V) y uno constante (C). El dominio V de la cadena α está codificado por los segmentos génicos V y J; en cambio, el dominio V de la cadena β es codificado por los segmentos génicos V, D y J (Rossjohn y cols., 2012). Una de las características más relevantes del TCR de las células NKT es su capacidad de reconocer únicamente antígenos glicolipídicos, a diferencia de los linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, que reconocen antígenos proteicos. Esto se debe a que el TCR de los linfocitos NKT presenta una estructura especializada, en donde la cadena α del TCR reconoce al antígeno glicolipídico y a la molécula presentadora de antígeno glicolipídico, CD1d, mientras que la cadena β del TCR interactúa solamente con CD1d (Wun et al, 2008).

En humanos, la frecuencia de las células NKT es baja, alcanzando un 0,1-0,2% de los

linfocitos T en sangre periférica, 1-2% en hígado y 10% en omento (Brennan y cols., 2013). Estas células tienen la capacidad de producir rápidamente gran cantidad de citoquinas de tipo T helper 1 (Th1) como, por ejemplo, interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), o T helper 2 (Th2), como interleuquina (IL)-4 e IL-13. Además, bajo determinados estímulos, las células NKT son inducidas para producir citoquinas inmunosupresoras, como IL-10, y citoquinas de tipo T helper 17 (Th17), como IL-17 e IL-22 (Zeng y cols., 2013). Por ejemplo, en un estudio realizado por O'Reilly y cols. (2011), se observa que, cuando los linfocitos NKT son estimulados por células dendríticas o células HeLa transfectadas con CD1d, ambas cargadas con antígeno, se liberan más citoquinas del tipo Th1 y Th2, mientras que cuando las células NKT son tratadas con un estímulo inespecífico (como phorbol-myristate acetate (PMA) e ionomicina), éstas tienden a producir más IL-10, resaltando la importancia del estímulo antigénico y el microambiente de citoquinas en la activación y respuesta inmune de las células NKT.

Según las características del TCR que expresen, las células NKT humanas se pueden dividir en dos grupos: el grupo I o NKT invariantes (iNKT) y el grupo II o NKT no-clásicas. Las células iNKT se caracterizan por presentar un TCR semi-invariante compuesto por una cadena α que posee el segmento V 24J 18; ésta se asocia a una cadena β que contiene el segmento V 11 (Rossjohn y cols., 2012). Otro parámetro usado para definir a las células iNKT es la habilidad de reconocer α -galactosilceramida (α GalCer), un antígeno glicolípido presente en la esponja marina *Agelas mauritanus*. El descubrimiento de α GalCer ocurrió durante la búsqueda por compuestos anti-metastáticos. Es un potente agonista de las células iNKT, y presenta actividades

inmunomoduladoras y propiedades terapéuticas, incluso para el cáncer (Van Kaer y cols., 2010; Sidore y cols., 2002; Silk y cols., 2008). El grupo II o NKT no-clásicas presenta un repertorio de TCR más diverso que las células iNKT y no reconocen GalCer, sino que reconocen a otros antígenos glicolipídicos (Rossjohn y cols., 2012). De fundamental importancia es que, para que los antígenos glicolipídicos sean reconocidos por el TCR de los linfocitos iNKT, éstos deben ser presentados por una molécula MHC de clase I no clásica llamada CD1d.

Molécula CD1d

La familia CD1 corresponde a un grupo de moléculas de transmembrana similares a las moléculas MHC de clase I, pero con algunas diferencias estructurales y funcionales. Por ejemplo, en CD1, el sitio de unión al antígeno es hidrofóbico, lo que le permite unir antígenos glicolipídicos, a diferencia de las moléculas MHC de clase I, que sólo pueden unir antígenos peptídicos (Rossjohn y cols., 2012). La familia CD1 se subdivide en tres grupos: el grupo 1, que incluye a CD1a, CD1b y CD1c, el grupo 2, que corresponde a CD1d, y el grupo 3, que comprende a CD1e. La isoforma más estudiada es CD1d, que se expresa en diversas células de origen hematopoiético, como células dendríticas, macrófagos, granulocitos y linfocitos B (Brennan y cols., 2013). También se ha demostrado que CD1d se expresa en otros linajes celulares, como células epiteliales intestinales, hepatocitos, células de riñón, páncreas y útero, y en células tumorales de meduloblastoma y gliomas malignos, lo que sugiere un rol para esta molécula en la respuesta inmune anti-tumoral (Toura y cols., 1999). En el estudio realizado por Exley y cols. en el año 2000, se evaluó la expresión de CD1d en linfocitos T, B y monocitos de sangre periférica de donantes sanos. En este estudio, se

observó que la expresión de CD1d en linfocitos T sólo puede ser inducida *in vitro* a través de la estimulación y activación de los mismos con fitohemaglutinina (PHA), pero que estas células no expresan CD1d de manera constitutiva. En cambio, tanto los monocitos como los linfocitos B expresan constitutivamente altos niveles de CD1d, y esta expresión no aumenta tras la estimulación *in vitro* con el mitógeno anti-inmunoglobulina M (anti-IgM) o lipopolisacárido (LPS), en el caso de los linfocitos B, o con factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e IL-4, con o sin LPS, en el caso de los monocitos (Exley y cols., 2000).

Junto con lo anteriormente descrito, es importante recordar que la transformación celular maligna se puede asociar a estados de infección crónica e inflamación, especialmente en los cánceres del tracto gastrointestinal. Ejemplos de esto son el cáncer hepático, que se asocia al consumo excesivo de alcohol e infección por el virus de la hepatitis B y C, el cáncer de colon, que se asocia con enfermedades inflamatorias intestinales (EII), y el cáncer gástrico, el cual se asocia con infección crónica por *Helicobacter pylori* (Coussens y cols., 2002). Hasta la fecha, se conoce que la molécula CD1d aumenta su expresión en algunos estados inflamatorios, como en el estudio realizado por Page y cols. (2000), que demuestra que, en los pacientes con EII, los tejidos intestinales inflamados presentan mayor expresión de CD1d que los controles sanos, lo que activaría a linfocitos de sangre periférica, promoviendo más inflamación y aparición de síntomas extra intestinales.

Se ha demostrado que CD1d tiene un rol importante en la respuesta inmune contra el cáncer. En un estudio realizado por Lynch y cols. (2009), se observó que los pacientes con carcinoma colorectal tienen 2 a 3 veces menos células hematopoiéticas del omento

que expresan CD1d en comparación con los controles sanos. Junto con esto, en modelos murinos de melanoma, metástasis pulmonar y eritroleucemia, se ha confirmado que los linfocitos iNKT restringidos por CD1d participan en la respuesta anti-tumoral, ya que la inyección de GalCer logró prevenir y disminuir el crecimiento tumoral en ratones normales, mientras que los ratones deficientes en CD1d no lograron el rechazo de tumores mediado por IL-12 (Cui J y cols., 1997). En concordancia con lo anterior, estudios realizados con líneas celulares de mieloma demuestran que la expresión de CD1d por parte de estas células va disminuyendo a medida que la enfermedad progresa, e, incluso, pierden la expresión de CD1d, lo que sugiere que CD1d impacta de manera negativa en la supervivencia de las células de mieloma, y que su disminución en la superficie de la célula tumoral favorecería la evasión inmune por parte del tumor (Spanoudakis y cols., 2008). Esta diferencia en la expresión de CD1d por distintas células podría deberse por el entorno en el cual se desarrollan, debido a que las células tumorales se encuentran insertas en un microambiente con características inmunosupresoras, en donde las células tumorales activan STAT3, que favorece la secreción de citoquinas inmunosupresoras como IL-10, y también disminuye la expresión de moléculas necesarias para la respuesta inmune anti-tumoral, como IL-12, IFN- γ e IFN- α (Bhardwaj, 2007).

Linfocitos B y células NKT

Convencionalmente, la respuesta de linfocitos B dependiente de linfocitos T, en los órganos linfoides secundarios, incluye la unión del antígeno peptídico en forma soluble al receptor de linfocito B (BCR), la internalización del antígeno, su procesamiento y luego la presentación en la superficie celular por una molécula MHC (Zeng y cols.,

2013). En tanto, los linfocitos T que hayan sido activados por el mismo antígeno, reconocen el complejo péptido-MHC presentado por el linfocito B, resultando en el aumento en la expresión de superficie de CD40L en los linfocitos T. Esta molécula interactúa con el receptor CD40 de los linfocitos B, se gatilla la secreción de citoquinas específicas, y, de esta manera, el linfocito B prolifera y se diferencia en una célula plasmática productora de anticuerpos (Bosma y cols., 2008).

En humanos, los linfocitos B que expresan CD1d se encuentran en la sangre periférica y en los folículos linfoides secundarios (Brigl y cols., 2004). Diversos estudios *in vitro* han demostrado que las células iNKT estimulan la proliferación y producción de anticuerpos por los linfocitos B que expresan CD1d (Galli y cols., 2003). Por otro lado, los linfocitos B son esenciales para la activación y proliferación de células iNKT en individuos sanos (Bialecki y cols., 2009), sugiriendo que las células B juegan un rol imprescindible en la homeostasis de los linfocitos iNKT (Bosma y cols., 2012).

La interacción entre las células iNKT y los linfocitos B ocurre cuando el linfocito B reconoce un antígeno glicolipídico a través de su BCR, lo internaliza y lo procesa, para luego presentarlo a través de la molécula CD1d. El linfocito iNKT reconoce el complejo antígeno-CD1d a través de su TCR y se activa (Allan y cols., 2011). Esta activación logra que las células iNKT liberen rápidamente citoquinas y aumenten la expresión de CD40L, la cual se une a CD40 del linfocito B, resultando en su activación y diferenciación en células plasmáticas que producen anticuerpos o linfocitos B de memoria (Lang y cols., 2011). Por otro lado, se sabe que los linfocitos B expresan otras moléculas de co-estimulación, como CD80 y CD86 (Collins y cols., 2005), y algunos

estudios han abordado el rol de la co-estimulación mediada por estas moléculas en el desarrollo y función de las células iNKT. Por ejemplo, en el estudio realizado por Zheng y cols. en el 2008, se observa que ratones que poseen mutaciones en CD80, CD86 y/o CD28 presentan disminución en la frecuencia de células iNKT en el timo, bazo e hígado. Además, en este estudio, se observa que los ratones deficientes de CD80, CD86 y/o CD28 presentan menor susceptibilidad a desarrollar hepatitis inducida por el mitógeno Con A. Con esto, se demuestra que la co-estimulación modula el desarrollo, maduración y función de los linfocitos iNKT. Cabe mencionar también que se ha visto que, en algunos cánceres, como en el caso de linfoma de No-Hodgkin, las células B expresan mayores niveles de moléculas de co-estimulación, como el receptor CD40, CD80 y CD86, de manera de facilitar su interacción con linfocitos T, y, así, promover una respuesta anti-tumoral (Vyth-Dreese y cols., 1995).

En el estudio realizado por Zeng y cols. (2013), se demuestra que el mayor determinante del resultado de la interacción del linfocito B con las células iNKT, *in vitro*, es la presencia de GalCer. En presencia de este glicolípido, el linfocito B induce la secreción de citoquinas por parte de las células iNKT, lo que potencia la inmunidad mediada por células T. En cambio, en ausencia de GalCer, la activación de las células iNKT por parte de los linfocitos B resulta en una respuesta inmune mediada por anticuerpos y se suprime la respuesta inmune mediada por células T. Estas diferencias, que resultan de la interacción entre los linfocitos B y las células iNKT en presencia o ausencia de un antígeno exógeno y potente, como el aGalCer, confieren diversas implicancias, ya que, en el caso del cáncer, es necesario que se favorezca una respuesta inmune mediada por células T (Brigl y cols., 2004).

En estudios realizados en ratones, se demuestra, *in vivo*, que los linfocitos B B220⁺ actuarían de manera tolerogénica sobre las células iNKT suprimiendo su activación cuando GalCer se administra libremente (Bezbradica y cols., 2005), sugiriendo que los antígenos solubles presentados por linfocitos B son pobremente inmunogénicos para las células iNKT. En este estudio, además, se demostró que las células iNKT de ratones que no tienen linfocitos B, al ser estimuladas con GalCer, se activan más potentemente a través de células dendríticas, con mayor secreción de IL-2, IL-4 e IFN- γ , que las iNKT de los ratones *wild type* (salvajes). Por otro lado, en el estudio realizado por Chung *et al* (2006) se demuestra que, cuando los linfocitos B B220⁺ son cargados con GalCer, éstos activan directamente a los linfocitos iNKT *in vivo* e *in vitro*. En este estudio, se utilizan vacunas con GalCer asociado a linfocitos B en modelos murinos de melanoma, y se observa una supresión del crecimiento tumoral y una respuesta citotóxica anti-tumoral de memoria cuando los ratones son desafiados nuevamente con el tumor. Esta diferencia en la activación de los linfocitos iNKT por parte de los linfocitos B se debería a las distintas formas de administración GalCer, sugiriendo que, cuando el antígeno se administra libremente, los linfocitos B inducirían una respuesta más tolerogénica, mientras que, cuando el antígeno está asociado a linfocitos B, previamente a su administración, se induciría una respuesta inmunogénica.

Linfocitos B y cáncer

Los linfocitos B se caracterizan por su capacidad de producir anticuerpos y se dividen en 3 grupos: linfocitos B B-1, linfocitos B foliculares (FO) y linfocitos B de la zona marginal (MZ), y cada uno tiene diferencias en su fenotipo. Los linfocitos B B-1 son $CD5^{+/-} CD43^+ CD11b^+ IL-5R^+$, los linfocitos B FO son $CD24^+ CD21^+ B220^+$ y, por último, los linfocitos B MZ son $CD1d^{hi} CD21^{hi}$ (Bao y cols., 2014). Sin embargo, en el último tiempo, también ha cobrado importancia la capacidad de los linfocitos B de producir citoquinas y modular la actividad de otras células inmunes. Con esto, los linfocitos B se han diferenciado en distintos subgrupos: un grupo que estimula la respuesta inmune y otro que regula negativamente la respuesta inmune. Esto es importante a la hora de comprender las funciones duales que tienen los linfocitos B en la respuesta anti-tumoral. Por ejemplo, en el estudio realizado por Di Lillo y cols. (2010), los ratones deficientes de linfocitos B maduros $CD20^+$ presentaron un mayor crecimiento de melanoma B16 en comparación con ratones *wild type*. En concordancia, Sorrentino y cols. (2011) demostraron que la ausencia de linfocitos B $CD20^+$ favorece el crecimiento tumoral en cáncer pulmonar en ratones. Por otro lado, en el estudio realizado por Olkhanud y cols. el 2011, se observa que existe una subpoblación de linfocitos B, cuyo fenotipo es $CD19^+ B220^+ CD25^+$, llamados linfocitos B reguladores, los cuales favorecen la progresión del adenocarcinoma mamario 4T1 en ratones. En este mismo estudio, se demuestra que, al eliminar la población de linfocitos B $B220^+$, existe una disminución del número de metástasis pulmonares. Junto con esto, se observa que esta población de linfocitos es capaz de inhibir la proliferación de linfocitos T e inducir la conversión de linfocitos T $CD4^+$ a linfocitos T reguladores,

favoreciendo así la metástasis tumoral.

En humanos, también se ha visto la presencia de una subpoblación de linfocitos B que se caracteriza por secretar IL-10, llamados linfocitos B reguladores (Breg) (Mauri y cols., 2012). Estos linfocitos presentan distintos marcadores que los permiten identificar fenotípicamente. De hecho, recientemente se describió, en humanos, un subtipo de Breg con un fenotipo $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}CD5^+CD1d^{hi}$, que corresponde a los linfocitos B de sangre periférica que más secretan IL-10 después de la estimulación *in vitro* de CD40 (Blair y cols., 2010). La secreción de IL-10 tiene un efecto anti inflamatorio y pro-tumoral, dado que inhibe la secreción de IFN- por parte de linfocitos T $CD8^+$ y células NK, como también disminuye el desarrollo de linfocitos T $CD8^+$ de memoria (Mauri y cols., 2007). Por otro lado, en el estudio realizado por Lindner y cols. en el 2013, se pudo determinar la presencia de linfocitos Breg infiltrantes de tumores sólidos, como carcinomas mamario, ovárico, cervicouterino, colorrectal y prostático. El fenotipo de estos linfocitos correspondía a linfocitos B $CD19^+CD38^+CD1d^+IgM^+CD147^+$, los que, además, expresaban IL-10, CD25 e indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO). Notablemente, este grupo de linfocitos B contribuía a la supresión de la respuesta inmune anti-tumoral, lo que sugiere que estas células podrían favorecer el desarrollo y progresión del tumor.

Efectivamente, los linfocitos Breg se encargan de modular la respuesta inmune anti-tumoral (Candado y cols., 2014). En el estudio realizado por Horikawa y cols. (2011), en ratones, se logra determinar el efecto que tiene esta subpoblación de linfocitos B en el desarrollo tumoral, donde a ratones con linfoma se les realiza una transferencia adoptiva de linfocitos B $CD20^{-/-}CD1d^{hi}CD5^+$, linfocitos B $CD20^{-/-}CD1d^{hi}CD5^+IL-10^{-/-}$

$^{-/-}$ o linfocitos B $CD20^{-/-} CD1d^{lo} CD5^{-}$ previo al tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-CD20 (CD20 mAb) para depletar a los linfocitos B endógenos. Se observó que los ratones a los cuales se les transfirió linfocitos B $CD20^{-/-} CD1d^{hi} CD5^{+}$ se les veía anulado el efecto benéfico de CD20 mAb, mientras que, a los ratones a los cuales se les transferían los linfocitos B $CD20^{-/-} CD1d^{hi} CD5^{+} IL-10^{-/-}$ o linfocitos B $CD20^{-/-} CD1d^{lo} CD5^{-}$, no se les afectaba el crecimiento tumoral ni la sobrevida. En humanos, también se ha podido establecer una estrecha relación entre la presencia de linfocitos Breg en sangre periférica y el desarrollo de enfermedades malignas linfocíticas, donde se ve que el número de linfocitos B $IL-10^{+}$ en estos pacientes es hasta 30 veces más alto en comparación con controles sanos (Candado y cols., 2014).

Aunque diversos estudios han entregado importantes evidencias respecto a la participación de los linfocitos B en la respuesta inmune frente al cáncer, no existen antecedentes acerca del rol específico de los linfocitos B $CD1d^{+}$ en la activación de células iNKT en cáncer gástrico. En el estudio realizado por Qi-Ming Yu y cols en el 2012, se demostró que los pacientes con cáncer gástrico que presentaban mayores niveles de linfocitos B $CD19^{+}$ circulantes tenían una mayor sobrevida post-gastrectomía. Datos preliminares del Laboratorio de Inmunoección del Cáncer (ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile) indican que las células iNKT cumplen un rol en la respuesta inmune contra el cáncer gástrico. Hemos observado que las células iNKT de pacientes con cáncer gástrico favorecen la diferenciación de linfocitos T $CD4^{+}$ a linfocitos T reguladores (Treg), que existe una mayor infiltración de linfocitos iNKT en tumor que en la mucosa gástrica no tumoral adyacente al tumor, y que las células iNKT periféricas provenientes de pacientes con cáncer gástrico tienen menor capacidad de producir $IFN-{\gamma}$ e inducir lisis de células

tumorales que las células iNKT de controles sanos (datos no publicados). Sin embargo, a la fecha, no existen estudios que relacionen la frecuencia de linfocitos B CD1d⁺, tampoco los niveles de expresión de CD1d en linfocitos B y su capacidad de producir citoquinas inmunomoduladoras en adenocarcinoma gástrico. Por esta razón, en este proyecto, pretendimos estudiar la frecuencia y expresión de CD1d en linfocitos B de sangre periférica en pacientes con adenocarcinoma gástrico y analizar la producción de citoquinas por los linfocitos B cultivados en presencia de células iNKT. Así, consideramos que este estudio podría ayudar a delinear aún más el papel de los linfocitos B en el desarrollo y progresión del tumor.

Hipótesis

En pacientes con adenocarcinoma gástrico, existe un mayor porcentaje de linfocitos B circulantes que expresan la molécula CD1d comparado a individuos sanos, los cuales son capaces de interactuar con células iNKT y que presentan un perfil de citoquinas inmunoreguladoras, lo que favorecería la progresión de la enfermedad.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar, en sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma gástrico, la frecuencia de linfocitos B CD1d⁺, los niveles de CD1d en linfocitos B y su producción de citoquinas luego del estímulo con células iNKT, con el objetivo de comprender mejor el rol de los linfocitos B en los mecanismos efectores de la respuesta inmune contra esta patología.

Objetivos Específicos

1. Evaluar el porcentaje de linfocitos B CD1d⁺ y los niveles de expresión de CD1d en linfocitos B de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma gástrico y compararlos con linfocitos B de individuos sanos.
2. Evaluar el nivel de expresión de CD40, CD80 y CD86 en linfocitos B de sangre periférica de pacientes y compararlo con linfocitos B de individuos sanos.
3. Evaluar la producción de IL-10 y TNF- por parte de los linfocitos B CD1d⁺ de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de controles sanos, co-cultivados con linfocitos iNKT de un individuo sano.

Materiales y Métodos

Obtención de muestras

Los pacientes con adenocarcinoma gástrico fueron reclutados del Departamento de Cirugía Digestiva del Hospital del Salvador (Santiago, Chile) gracias a la colaboración del Dr. Marco Bustamante y la Dra. Paula Fluxá. Para poder ingresar al estudio, estos pacientes tuvieron que firmar un Consentimiento Informado (Anexo 1). Los criterios de inclusión para este estudio consistieron en no haber recibido quimioterapia, radioterapia ni otro tratamiento médico para el cáncer gástrico previo a la cirugía. Los pacientes reclutados fueron sometidos a gastrectomía, y las muestras de sangre (30 ml) fueron tomadas por punción venosa justo antes de realizarse la cirugía en condiciones estériles. Las características clínico patológicas de los pacientes están resumidas en la Tabla 1.

Para la realización de este trabajo, se calculó el tamaño muestral en base al tamaño poblacional de pacientes con adenocarcinoma gástrico en el Hospital del Salvador entre los años 2007 y 2011, el cual corresponde a 192 pacientes. De esta manera, anualmente, hay aproximadamente 48 nuevos casos de cáncer gástrico en dicho Hospital. Además, se usó un intervalo de confianza de 95%, y se consideró un error muestral de 0,05. Con estos datos, se calculó que el tamaño muestral necesario, para este estudio, era de 43 pacientes. Sin embargo, por razones de tiempo y dificultad para obtener esta cantidad de muestras, se finalmente utilizamos muestras de sangre periférica de 13 pacientes con adenocarcinoma gástrico. Asimismo, se obtuvieron muestras de sangre periférica de 14 individuos sanos, quienes fueron pareados por edad (mayores de 40 años) con respecto a los pacientes con adenocarcinoma gástrico. Los

donantes sanos también firmaron un Consentimiento Informado previo a la recolección de la muestra (Anexo 2). Este estudio se realizó en el Laboratorio de Inmunovigilancia y Evasión Inmune y en el Laboratorio de Inmunoedición del Cáncer, ambos pertenecientes al Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El protocolo de este estudio fue aprobado por el Comité de Ética Científico del Servicio de Salud Metropolitano Oriente del Gobierno de Chile (Anexo 3) y por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Anexo 4).

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

	Número de Pacientes
Género	
Masculino	9
Femenino	4
Tamaño tumoral	
< 5 cms	7
≥ 5 cms	6
Diferenciación tumoral	
Alto/Moderado	7
Bajo/Ninguno	6
Metástasis a Linfonodos	
Si	10
No	3
Estadio TNM *	
I/II	4
III/IV	8
Profundidad de la Invasión**	
T1/T2	6
T3/T4	6

*: Estadio de acuerdo a la clasificación TNM para el cáncer gástrico.

** : Profundidad de invasión corresponde a la invasión del tumor hacia el epitelio o mucosa de la lámina propia, muscular de la mucosa o submucosa (T1), muscular propia o subserosa (T2), serosa (T3) u órganos adyacentes (T4) (American Joint Committee Cancer 7ª edición).

Por motivos externos a este proyecto, hubo un paciente al cual no se le pudo determinar la profundidad de la invasión ni el estadio TNM.

Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Las muestras de sangre periférica se tomaron por punción venosa, tanto de pacientes con adenocarcinoma gástrico como de individuos sanos, y se colocaron en tubos de vidrio heparinizados (BD Vacutainer, BD, EEUU). Luego, se traspasó la sangre a un tubo Falcon de 50 ml y se agregó igual volumen de tampón fosfato salino (PBS) (Hyclone, EEUU) 1X estéril, para lograr una dilución de sangre 1:2. A continuación, se agregó Ficoll (Ficoll-Paque, GE Healthcare, Suecia), un polímero de carbohidrato y metrizamida que permite obtener un gradiente de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), a un volumen que corresponda a 1/3 del volumen de sangre, y se centrifugó a 1200 rpm por 20 minutos a 18°C sin freno. De esta manera, se obtuvieron las células mononucleares, que quedaron entre el plasma y el Ficoll, las que se transfirieron a un tubo Falcon de 50 ml. Luego, se realizó un lavado con 45 ml de PBS 1X y se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos. Se obtuvo un pellet, al cual se le eliminó el sobrenadante y se le agregó 10 ml de tampón amonio-cloruro de potasio (ACK) filtrado para lisar los eritrocitos por 10 minutos. A continuación, se le agregó al pellet 10 ml de medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium 1640) suplementado con 3% de suero fetal bovino (SFB) (Hyclone, EEUU) y 1% de penicilina/estreptomicina (todos de Hyclone, EEUU), y, nuevamente, se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos. Al sedimento se le agregó 5 ml de PBS para posterior cuantificación de las células y determinación de su viabilidad mediante exclusión con azul de tripán. Finalmente, el PBMC se dispensó en criotubos (Nunc Thermo Fisher Scientific, EEUU) con medio para congelar células (DMSO (Dimetil Sulfóxido) al 10% en SFB), y las células se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Análisis de la expresión de CD1d, CD40, CD80 y CD86 en linfocitos B

Una vez descongelado, el PBMC fue lavado con PBS suplementado con SFB al 2%, y las células se llevaron a una placa de poliestireno de 96 pocillos con fondo en “V”. Posteriormente, las células se incubaron por 30 minutos a 4°C con anticuerpos monoclonales conjugados a distintos fluoróforos. Se usó un anticuerpo monoclonal anti-CD19 humano conjugado a ficoeritrina-cianina 7 (PeCy7) (eBioscience) para identificar a los linfocitos B. Para evaluar la expresión de las moléculas CD1d, CD40, CD80 y CD86 en los linfocitos B CD19⁺, se utilizaron anticuerpos anti-CD1d conjugados a ficoeritrina (PE) (eBioscience, EEUU), anti-CD40 conjugados a fluoresceína-isotiocianato (FITC), anti-CD80 conjugados a alo-ficocianina (APC) (Biolegend, EEUU) y anti-CD86 conjugados a APC (Biolegend, EEUU). A modo de control de especificidad, se usaron controles de isotipo para todos los anticuerpos utilizados.

Las células marcadas con anticuerpos se lavaron por 3 veces con PBS y SFB al 2% y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 2% en PBS. La lectura de los datos se realizó con el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton-Dickinson®, EE.UU.) por medio del software CellQuest (BD Biosciences, Alemania), y luego se analizaron utilizando el software FlowJo (versión v10) (Tree Star, EE.UU.).

Aislamiento de linfocitos B

Para aislar los linfocitos B periféricos, tanto de pacientes como de controles sanos, a partir del PBMC total obtenido de cada individuo, se utilizó un *kit* de separación celular por selección negativa (EasySep Human CD19⁺, StemCell Technologies, Canadá), donde todas las células no deseadas se eliminan a través de complejos de

anticuerpos tetraméricos que corresponden a una combinación de anticuerpos monoclonales IgG1 de ratón, los cuales se unen biespecíficamente a CD2, CD3, CD14, CD16, CD36, CD43, CD 56, CD66b y glicoforina A en la superficie de las células humanas no deseadas. Las células no marcadas, es decir, los linfocitos B CD19⁺, son vertidas en un tubo nuevo, mientras que las demás células permanecen unidas al tubo original a través de un campo magnético (StemCell Technologies, Canadá). Se determinó la eficiencia del enriquecimiento celular luego del proceso de separación a través de un análisis de citometría de flujo, donde se obtuvo una pureza de 97% aproximadamente. Los linfocitos B enriquecidos fueron criopreservados hasta su uso o mantenidos durante 24 horas en medio para células iNKT, que consiste en RPMI 1640 con 0.05 mM L-glutamina, 10% v/v HyClone FBS (Thermo-Scientific Logan, UT), 25 mM buffer HEPES, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 2.5 µg/ml anfotericina B, 50 uM beta-mercaptoetanol, 1 mM piruvato de sodio, 1 X MEM aminoácidos no esenciales y 1 X aminoácidos esenciales.

Expansión y purificación de células iNKT

Para expandir y purificar las células iNKT, se obtuvo 100 ml de sangre venosa periférica de un único control sano, y, de esta sangre, se separó el PBMC. Luego, el PBMC se sembró en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Becton-Dickinson®, EEUU) con una densidad de 2×10^5 células/pocillos y se cultivó durante un mes en una estufa de cultivo a 37°C y 5% CO₂ en un medio preparado para células iNKT, el cual contiene RPMI 1640 suplementado con 10 % suero fetal bovino, 1% estreptomicina, 1% anfotericina B, 50 uM 2- mercaptoetanol, 1 mM piruvato de sodio, 1% aminoácidos esenciales y 1% aminoácidos no esenciales, en presencia de

100 ng/ml de GalCer (KRN7000, Funakoshi, Japón), 200 UI/ml de IL-2 y 200 UI/ml de IL-7 (ambas de Miltenyi Biotec, Alemania), de manera de expandir la población de linfocitos iNKT. Las células eran resuspendidas y resembradas para mantener una concentración aproximada de 100.000 células por pocillo durante todo el período de cultivo. El sobrenadante del cultivo se cambiaba cada 4-5 días con medio iNKT suplementado con 200 UI/ml de IL-2 y 200 UI/ml de IL-7; después de transcurrido el mes de cultivo, se lavaron 2 veces las células con PBS 2% y SFB, y luego se aislaron las células iNKT mediante *cell sorting* utilizando por 30 minutos en oscuridad a 4°C anticuerpos anti-CD3 APC (eBioscience, EEUU), anti-TCR-V 24J 18 FITC (eBioscience, EEUU) y anti-TCR-V 11 PE (eBioscience, EEUU) y el equipo FACS Aria III (Becton-Dickinson, EEUU).

Co-cultivo de células iNKT con linfocitos B

Una vez aislados los linfocitos B de pacientes y controles sanos, y expandidas las células iNKT, se co-cultivaron ambos tipos celulares por 3 días en una relación 1:1 en una placa de poliestireno de 96 pocillos con fondo en “U (Nunc Thermo Fisher Scientific, EEUU) a una densidad celular de 10^6 células/ml. Luego de transcurrido el co-cultivo, en las últimas 5 horas se agregó 10 ng/ml de forbol-12-miristato acetato (PMA) y 50 ng/ml de ionomicina (ambos de Sigma-Aldrich). Posteriormente, se determinó el patrón de citoquinas producidas por los linfocitos B a través de citometría de flujo.

Al mismo tiempo que se co-cultivaron los linfocitos B con linfocitos iNKT, se cultivaron los linfocitos B solos con PMA/Ionomicina, a modo de estímulo inespecífico,

así como bajo el estímulo de un anti-BCR (AffiniPure Goat Anti-Human IgG + IgM) (Jackson Immuno Research Laboratories, EEUU), como control positivo. Luego, se determinó la producción de citoquinas por los linfocitos B mediante citometría de flujo.

Determinación de la producción de IL-10 y TNF- por parte de los linfocitos B

Se determinó, por citometría de flujo, la producción de estas citoquinas por los linfocitos B al ser co-cultivados con linfocitos iNKT (objetivo específico 3). Para ello, se agregó, durante las últimas 5 horas de co-cultivo, 1 mM de Brefelfina A (BD Biosciences, EEUU), inhibidor del transporte de proteínas intracelulares, para posterior detección de citoquinas en el citoplasma. Luego de la incubación, las células fueron lavadas con PBS al 2% SFB y trasladadas a una placa de poliestireno en fondo “V” (Nunc ThermoFisher Scientific, EEUU) para proceder a la tinción para citometría de flujo. Esta se realizó, primeramente, utilizándose anticuerpos específicos para marcadores de linfocitos B: CD19⁺ en Alexa700 y CD1d⁺ en BV510. Luego, se incubaron las células, durante 30 min a 4°C y protegidas de la luz, con solución Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, EEUU), la cual promueve fijación y permeabilización celular, al mismo tiempo en que permite la conservación de las características morfológicas de las células. Luego, se lavó con una solución de lavado (Perm/Wash Buffer) (BD Biosciences, EEUU) e, inmediatamente, se agregó, por separado, anticuerpos dirigidos a citoquinas intracelulares: anti-IL-10 APC y anti-TNF-PeCy7. Se incubaron las células con los anticuerpos durante 30 min a 4°C, protegidos de la luz. Después de la tinción, las células se lavaron tres veces con la solución de lavado, se agregó FACS Buffer (Becton-Dickinson, EEUU) para luego ser analizadas por citometría de flujo en el citómetro de flujo LSR Fortessa (Becton-Dickinson, EEUU).

Análisis Estadístico

Para analizar las diferencias en la expresión de CD1d, CD40, CD80 y CD86 en linfocitos B de pacientes y controles sanos, así como en la producción de citoquinas por los linfocitos B en co-cultivo con células iNKT, entre pacientes o controles sanos, primariamente se analizó la distribución de normalidad de todos los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias en cada grupo se calcularon a través de la prueba *t* de Student, considerando como estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$, con un intervalo de confianza de 95%. El análisis de los datos fue realizado utilizando el software GraphPad Prism 5.0 (EE.UU).

Para realizar el análisis de correlación lineal simple de nuestros datos, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson, que se representa por r , y que toma valores entre -1 y +1, siendo +1 una relación lineal perfecta positiva, -1 una relación lineal perfecta negativa y 0 una relación lineal nula.

Resultados

Objetivo específico 1: Evaluar el porcentaje de linfocitos B CD1d⁺ y los niveles de expresión de CD1d en linfocitos B de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma gástrico y comparar con linfocitos B de individuos sanos.

CD1d es una molécula que se encuentra en la superficie de células presentadoras de antígenos, como los linfocitos B, y que presenta antígenos glicolípidicos a los linfocitos iNKT. De esta manera, consideramos relevante analizar el porcentaje y el nivel de expresión de CD1d en los linfocitos B de voluntarios sanos y en pacientes con adenocarcinoma gástrico de manera a evaluar la participación de los linfocitos B, al interactuar con linfocitos iNKT, en la respuesta inmune anti-tumoral.

Para cumplir este objetivo, se obtuvo células mononucleares de sangre periférica (PBMC), tanto de controles sanos como de pacientes con adenocarcinoma gástrico. Se determinó el porcentaje de linfocitos B CD19⁺ que expresan CD1d y el nivel de expresión de esta molécula presentadora de antígeno mediante la tinción del PBMC con anticuerpos monoclonales. En la Figura 1 se observa la estrategia utilizada para el análisis, por citometría de flujo, de los linfocitos B presentes en el PBMC. En la muestra de PBMC, se selecciona la población de linfocitos según tamaño (FSC-H) y granularidad (SSC-H); en esta población se analiza la expresión de CD19, seleccionando así, a la población de linfocitos B. Luego, para analizar el porcentaje de linfocitos B que expresan CD1d, se evalúa en la población de linfocitos CD19⁺ la expresión de CD1d, utilizando un control de isotipo para CD19 y CD1d. Al evaluar el PBMC de 9 pacientes con CG y 11 controles sanos, observamos que pacientes con

adenocarcinoma gástrico presentan un menor porcentaje de linfocitos B CD19⁺ circulantes en comparación a los controles sanos (Figura 2); mientras que al evaluar la expresión de CD1d no se detecta una diferencia significativa en el porcentaje o en el nivel de expresión de esta molécula en los linfocitos B CD19⁺ entre los pacientes y los controles sanos (Figuras 3a y 3b).

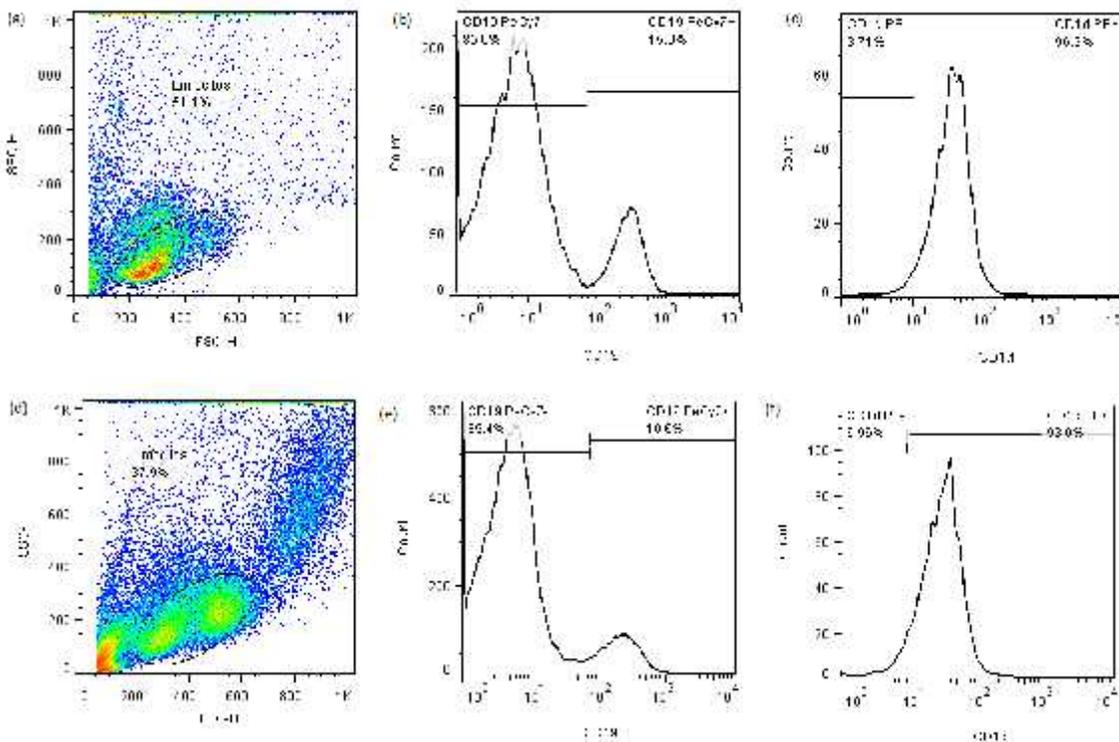


Figura 1: Selección de la población de linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ en control sano y en paciente con adenocarcinoma gástrico por citometría de flujo. (a) Dot plot representativo de un control sano, donde se selecciona la población de linfocitos mediante sus características de tamaño (FSC-H) y granularidad (SSC-H). (b) Histograma representativo de la selección de linfocitos B que expresan CD19 dentro de la población de linfocitos seleccionados en (a). (c) Histograma representativo de la selección de los linfocitos B CD19⁺ que expresan CD1d dentro de la población de linfocitos B seleccionada en (b). (d) Dot plot representativo de un paciente con adenocarcinoma gástrico donde se selecciona la población de linfocitos mediante SSC-H y FSC-H. (e) Histograma representativo de la selección de linfocitos B que expresan CD19 dentro de la población de linfocitos seleccionados en (d). (f) Histograma representativo de la selección de los linfocitos B CD19⁺ que expresan CD1d dentro de la población de linfocitos B seleccionada en (e).

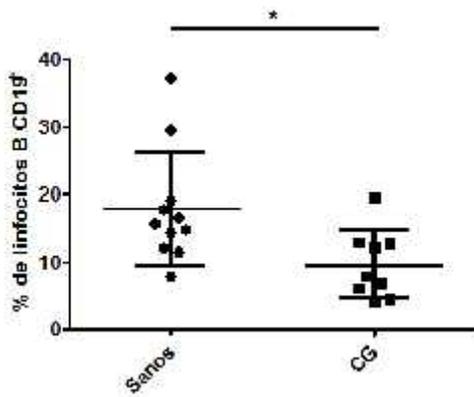


Figura 2: Frecuencia de linfocitos B CD19⁺ en sangre periférica de controles sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico. Gráfico de dispersión que muestra el porcentaje de linfocitos B CD19⁺ en controles sanos (n=11), el cual fue significativamente mayor que en pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=9), $p=0,0151$. Los gráficos muestran el valor promedio \pm la desviación estándar (Prueba de Mann-Whitney, GraphPad Prism v5.0).

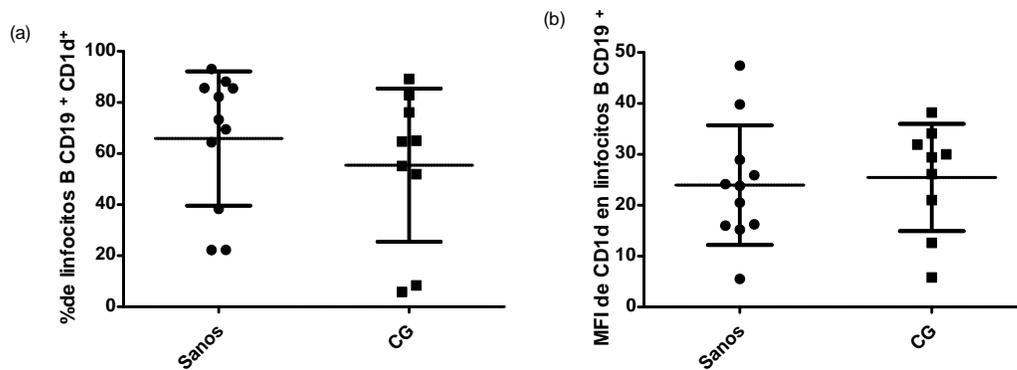


Figura 3: Frecuencia y nivel de expresión de CD1d en linfocitos B CD19⁺. (a) Gráfico de dispersión que muestra el porcentaje de linfocitos B CD19⁺ periféricos que expresan CD1d en controles sanos (n=11) y pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=9), $p=0,4187$ (Unpaired t Test). (b) Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MFI) de la molécula CD1d en linfocitos B CD19⁺ de controles sanos (n=11) y pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=9) $p=0,7681$ (Unpaired t Test). Los gráficos muestran el valor promedio \pm desviación estándar.

Objetivo específico 2: Evaluar el nivel de expresión de CD40, CD80 y CD86 en linfocitos B de sangre periférica de pacientes y compararlo con linfocitos B de individuos sanos.

CD40 es un receptor presente en la superficie de los linfocitos B y que participa en la co-estimulación de linfocitos iNKT, permitiendo la activación de estas células al unirse a CD40L presente en la superficie de los linfocitos iNKT. CD80 y CD86 son ligandos que se encuentran en la superficie de los linfocitos B, y que, al unirse a su receptor CD28 o CTLA-4, modula la activación de los linfocitos iNKT. De esta manera, decidimos analizar la expresión de estas moléculas de co-estimulación con el objetivo de evaluar el potencial de activación de los linfocitos B en pacientes con cáncer gástrico.

Para cumplir este objetivo, se incubó el PBMC obtenido de pacientes y controles sanos con anticuerpos monoclonales conjugados a distintos fluoróforos y dirigidos contra las moléculas CD19, CD1d, CD40, CD80 y CD86. Luego, mediante citometría de flujo, se determinó la expresión de dichas moléculas en la superficie celular, y los datos fueron analizados usando el software FlowJo. Dentro de los resultados obtenidos, observamos que pacientes con adenocarcinoma gástrico presentan un menor porcentaje de linfocitos B CD19⁺ CD40⁺ en sangre periférica que los controles sanos (Figuras 4a y 4b). Esta diferencia no se observa respecto a la expresión de las moléculas CD80 (Figuras 5a y 5b) o CD86 (Figuras 6a y 6b).

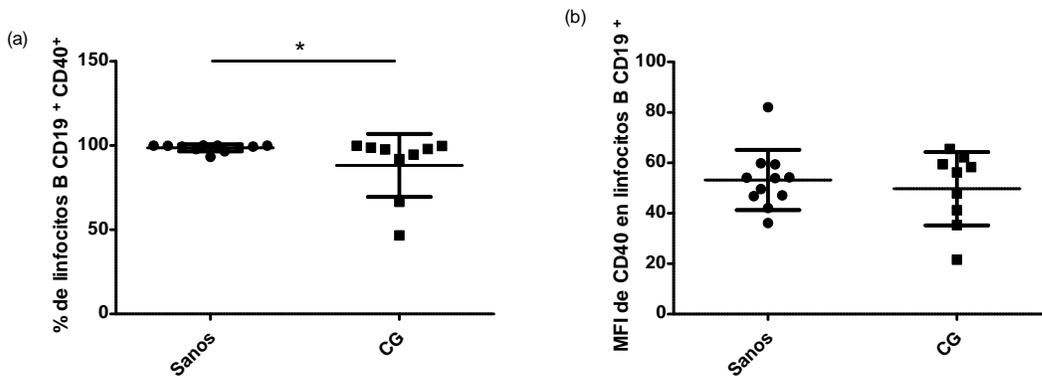


Figura 4: Frecuencia y nivel de expresión de CD40 en linfocitos B CD19⁺. (a) Gráfico de dispersión que muestra el porcentaje de linfocitos B CD19⁺ que expresan CD40 en controles sanos (n=11) y pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=9), $p=0,0439$ (prueba de Mann-Whitney). (b) Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MFI) de la molécula CD40 en linfocitos B CD19⁺ de controles sanos (n=11) y pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=9), $p=0,5650$. Los gráficos muestran el valor promedio \pm desviación estándar (Unpaired t Test).

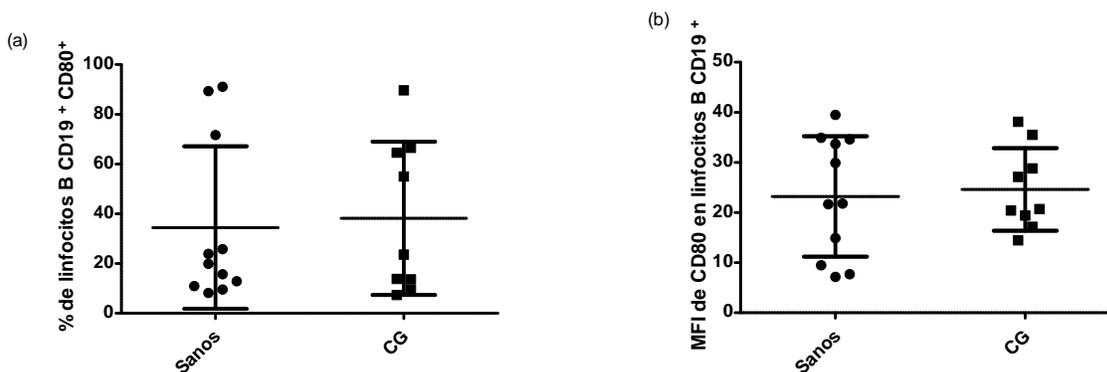


Figura 5: Frecuencia y nivel de expresión de CD80 en linfocitos B CD19⁺. (a) Gráfico de dispersión que muestra el porcentaje de linfocitos B CD19⁺ que expresan CD80 en controles sanos (n=11) y pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=9), $p=1,0000$ (prueba de Mann-Whitney). (b) Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MFI) de la molécula CD80 en linfocitos B CD19⁺ de controles sanos (n=11) y pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=9), $p=0,7684$. Los gráficos muestran el valor promedio \pm desviación estándar (Unpaired t Test).

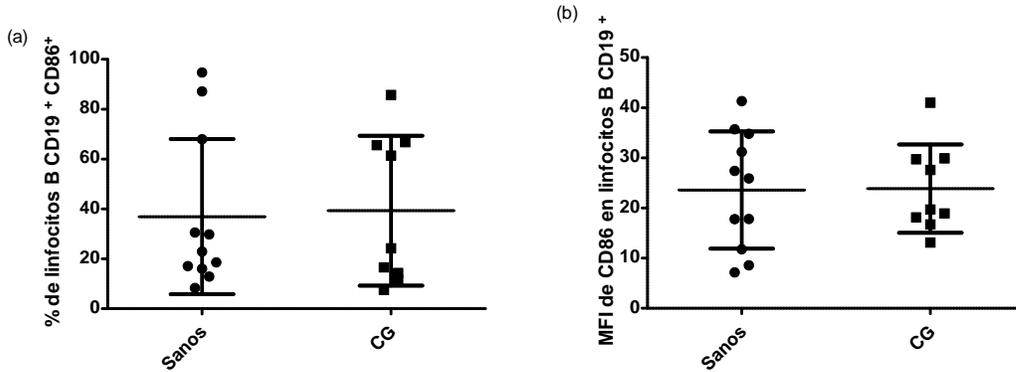


Figura 6: Frecuencia y nivel de expresión de CD86 en linfocitos B CD19⁺. (a) Gráfico de dispersión que muestra el porcentaje de linfocitos B CD19⁺ que expresan CD86 en controles sanos (n=11) y pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=9), p=0,7612 (prueba de Mann-Whitney). (b) Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MFI) de la molécula CD86 en linfocitos B CD19⁺ de controles sanos (n=11) y pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=9), p=0.9541. Los gráficos muestran el valor promedio \pm desviación estándar (Unpaired *t* Test).

En el caso de los linfocitos B CD19⁺ CD1d⁺, no se observaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de células que expresan CD40, CD80 o CD86 (Figuras 7a, 8a y 9a), tampoco con relación a los niveles de expresión de estas moléculas co-estimuladoras (Figuras 7b, 8b y 9b).

Se analizaron los resultados de los porcentaje de linfocitos B totales y linfocitos B CD1d⁺ que expresan CD40, CD80 y CD86 en base a las características clínico patológicas resumidas en la tabla 1, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con adenocarcinoma gástrico.

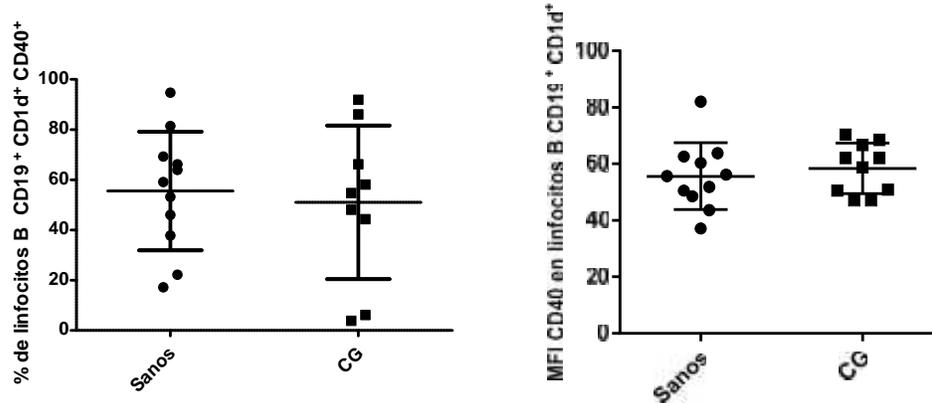


Figura 7: Frecuencia y nivel de expresión de CD40 en linfocitos B CD19+CD1d+ en sangre periférica de controles sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico. a) Gráfico de dispersión que muestra el porcentaje de linfocitos B CD19+CD1d+ que expresan CD40+ en controles sanos (n=11) y pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=9), $p=0,7143$. Los gráficos muestran el valor promedio \pm desviación estándar (Unpaired *t* Test). b) Mediana de intensidad de fluorescencia de CD40 en linfocitos B CD19+CD1d+ en controles sanos (n=11) y pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=9) $p=0,5615$. Los gráficos muestran el valor promedio \pm desviación estándar (Unpaired *t* Test).

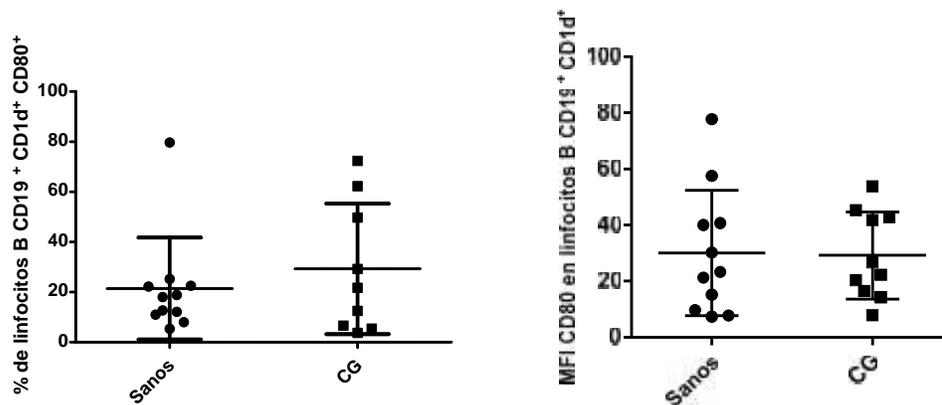


Figura 8: Frecuencia y nivel de expresión de CD80 en linfocitos B CD19+CD1d+ en sangre periférica de controles sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico. a) Gráfico de dispersión que muestra el porcentaje de linfocitos B CD19+CD1d+ que expresan CD80+ en controles sanos (n=11) y pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=9), $p=0,7143$. Los gráficos muestran el valor promedio \pm desviación estándar (Unpaired *t* Test). b) Mediana de intensidad de fluorescencia de CD80 en linfocitos B CD19+CD1d+ en controles sanos (n=11) y pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=9) $p=0,9179$. Los gráficos muestran el valor promedio \pm desviación estándar (Unpaired *t* Test).

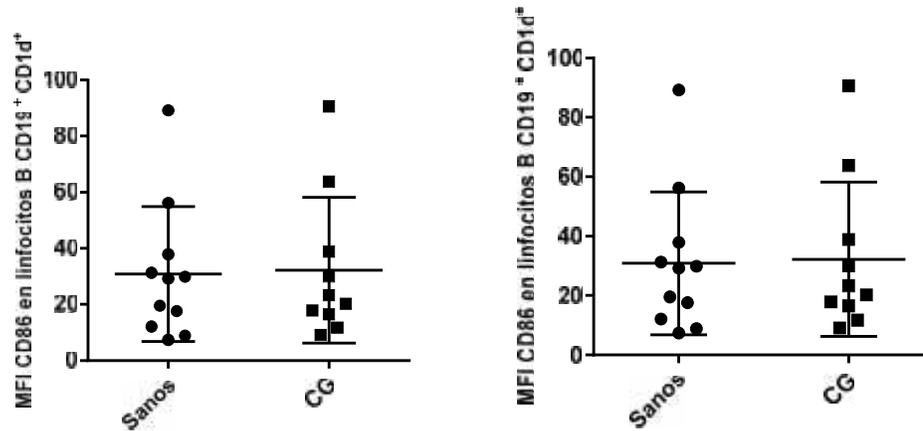


Figura 9: Frecuencia y nivel de expresión de CD86 en linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ en sangre periférica de controles sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico. a) Gráfico de dispersión que muestra el porcentaje de linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ que expresan CD86⁺ en controles sanos (n=11) y pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=9), $p=0,7143$. Los gráficos muestran el valor promedio \pm desviación estándar (Unpaired *t* Test, GraphPad Prism v5.0). b) Mediana de intensidad de fluorescencia de CD86 en linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ en controles sanos (n=11) y pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=9) $p=0,9015$. Los gráficos muestran el valor promedio \pm desviación estándar (Unpaired *t* Test, GraphPad Prism v5.0).

Al buscar una relación entre la expresión de las moléculas de co-estimulación, realizamos un análisis de correlación entre el porcentaje de linfocitos B que expresan CD40 y aquellos que expresan CD80 o CD86, tanto en linfocitos B totales como en linfocitos B que expresan CD1d, en controles sanos y en pacientes con cáncer gástrico. Se observa que los linfocitos B CD1d⁺ que expresan CD40 en su superficie, también expresan, en mayor porcentaje, CD80 y CD86 en los pacientes con adenocarcinoma gástrico, y no así en los controles sanos (Figuras 10 y 11).

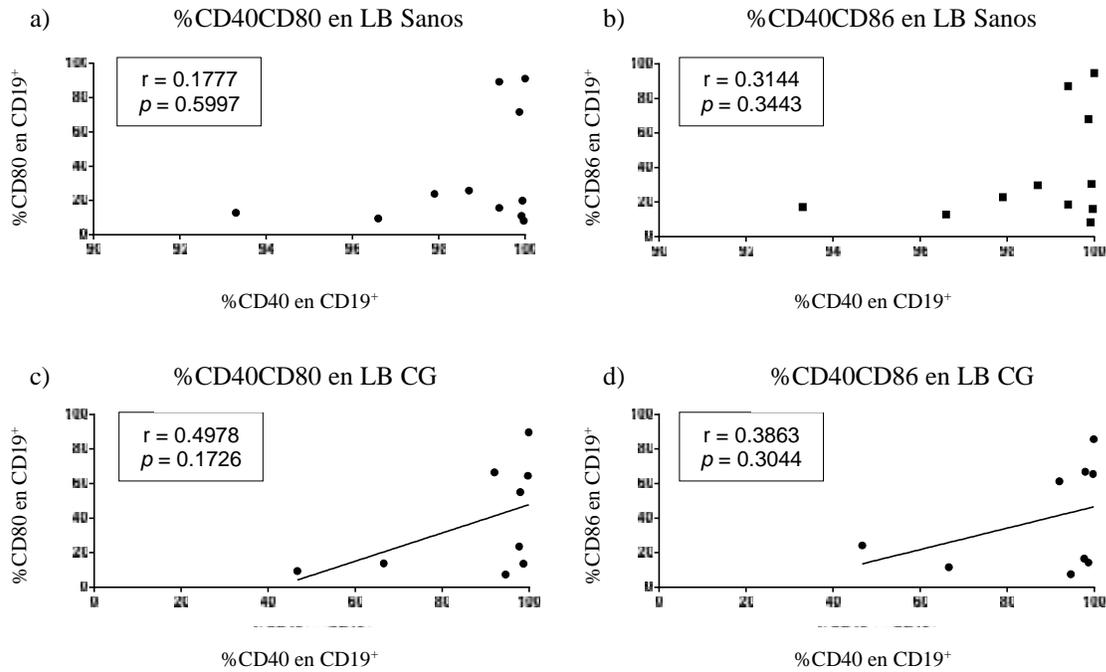


Figura 10: Relación entre los porcentajes de linfocitos B de sangre periférica que expresan CD40, CD80 y CD86. Los gráficos de correlación muestran los porcentajes de linfocitos B CD19⁺ de controles sanos que expresan CD40 y CD80 (a) y CD40 y CD86 (b). También se muestran los gráficos de correlación entre los porcentajes de linfocitos B CD19⁺ de pacientes con adenocarcinoma gástrico que expresan CD40 y CD80 (c) y CD40 y CD86 (d).

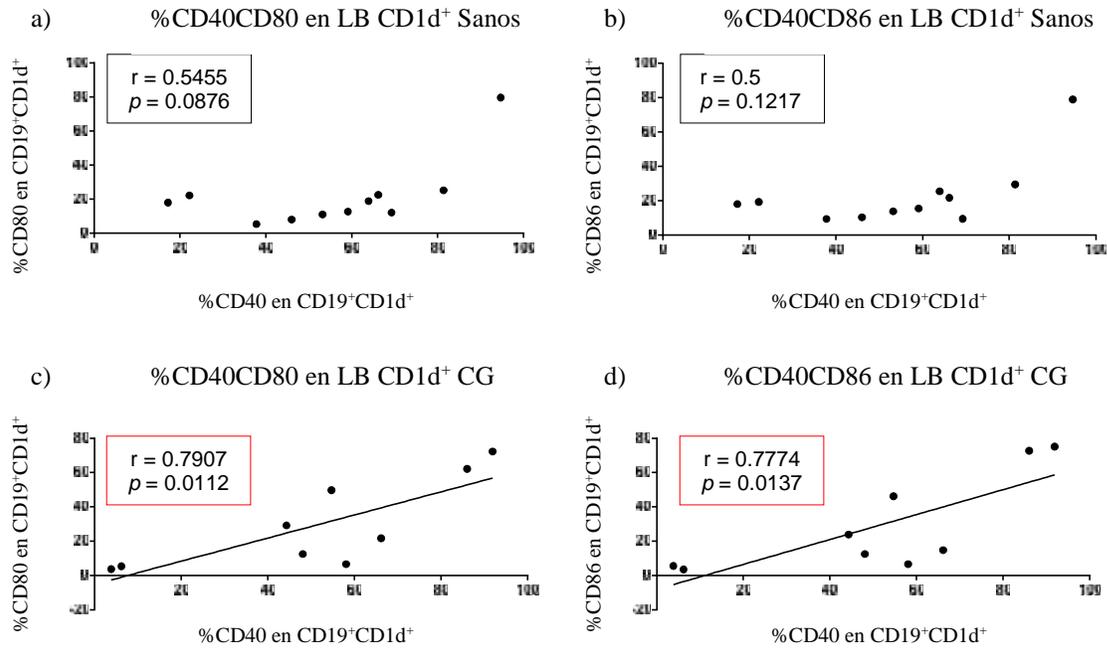


Figura 11: Relación entre los porcentajes de linfocitos B CD1d⁺ de sangre periférica que expresan CD40, CD80 y CD86. Los gráficos de correlación muestran los porcentajes de linfocitos B CD19⁺ CD1d⁺ de controles sanos que expresan CD40 y CD80 (a) y CD40 y CD86 (b). También se observan los gráficos de correlación entre los porcentajes de linfocitos B CD19⁺ CD1d⁺ de pacientes con adenocarcinoma gástrico que expresan CD40 y CD80 (c), $p = 0,0112$, y CD40 y CD86 (d), $p = 0,0137$.

Objetivo específico 3: Evaluar la producción de IL-10 y TNF- por parte de los linfocitos B CD1d+ de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma gástrico y de controles sanos, bajo un estímulo inespecífico y co-cultivados con linfocitos iNKT.

De modo de comprender o caracterizar mejor la respuesta de los linfocitos B frente a la activación mediante linfocitos iNKT en cáncer gástrico, se decidió estudiar la producción de dos citoquinas: IL-10, que es una citoquina inmunoreguladora, y TNF- , una citoquina pro-inflamatoria. Se ha visto que distintos tipos celulares, como linfocitos B reguladores, producen IL-10, lo que promueve la progresión del cáncer (Shen et al, 2016). En el caso de TNF- , se ha visto que esta citoquina presenta efectos duales en la respuesta inmune frente al cáncer; por un lado, actúa de manera anti-tumoral debido a que promueve la muerte celular o apoptosis de células tumorales mediante la activación de la vía c-Jun N-terminal kinasa (JNK); por otro lado, actúa de manera pro-tumoral, ya que la inflamación crónica inducida por esta citoquina promueve el daño del ADN celular, tiene un efecto anti-apoptótico actuando sobre la vía NF-kB y aumenta la expresión de quimioquinas (Wang et al, 2008). Por lo tanto, al evaluar la producción de estas dos citoquinas por parte de los linfocitos B de pacientes con adenocarcinoma gástrico, se intenta comprender cuál es el rol que cumplen estas células en la respuesta inmune frente al cáncer.

Para cumplir este objetivo, se utilizó un kit de selección negativa para aislar linfocitos B a partir de PBMC de sangre periférica de pacientes y controles sanos (Figura 12). Una vez aislados, se indujo la producción de citoquinas incubando a los linfocitos B con PMA/Ionomicina en presencia de monensina y brefeldina A por 5 horas; luego, se tiñeron las células con anticuerpo anti-CD19-Alexa700, seguido de fijación y

permeabilización celular. Enseguida, se realizó una tinción intracelular con anticuerpo anti-IL-10-APC o anti-TNF- β -PeCy7.

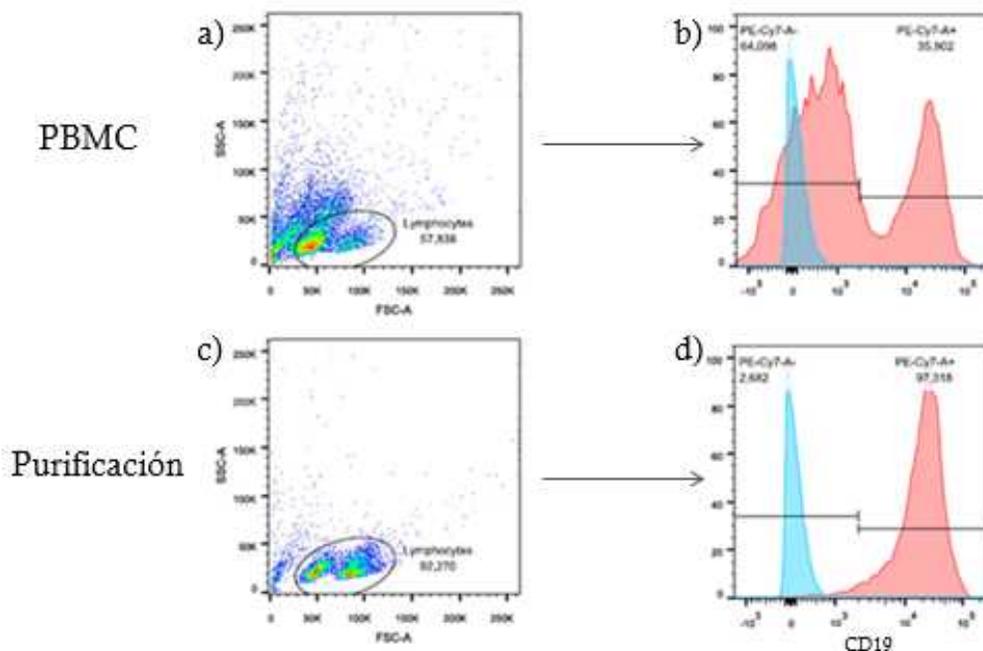
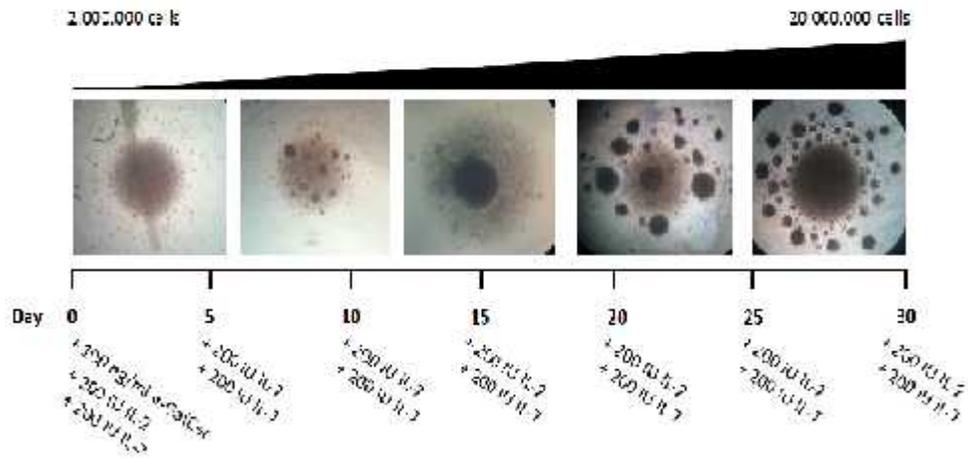


Figura 12: Enriquecimiento de linfocitos B CD19⁺ periféricos a partir del PBMC de un control sano. (a) Dot plot representativo que muestra la población de linfocitos que se selecciona por tamaño (FSC-A) y granularidad (SSC-A) antes de realizar el aislamiento de linfocitos B con un kit de selección negativa. (b) Histograma que representa el porcentaje de linfocitos B CD19⁺ en la población de linfocitos totales seleccionada en (a), la que corresponde a 35,9%. La curva azul corresponde al control de isotipo para CD19. (c) Dot plot representativo que muestra la población de linfocitos seleccionada por tamaño y granularidad después del enriquecimiento de linfocitos B. (d) Histograma que representa el porcentaje de linfocitos B CD19⁺ en la población linfocitaria seleccionada en (c), que corresponde a 97,3%. La curva azul corresponde al control de isotipo.

Además, para cumplir el objetivo 3 se expandieron y purificaron células iNKT de un único control sano (Figura 13), y estas células se co-cultivaron con los linfocitos B periféricos enriquecidos, tanto de pacientes con adenocarcinoma gástrico como de controles sanos. El co-cultivo se realizó a una proporción celular de 1:1 durante 3 días, para luego realizar la tinción de los linfocitos B con los anticuerpos anti-CD19, anti-CD1d, anti-IL-10 y anti-TNF- β .

(a) iNKT cells Expansion Protocol



(b)

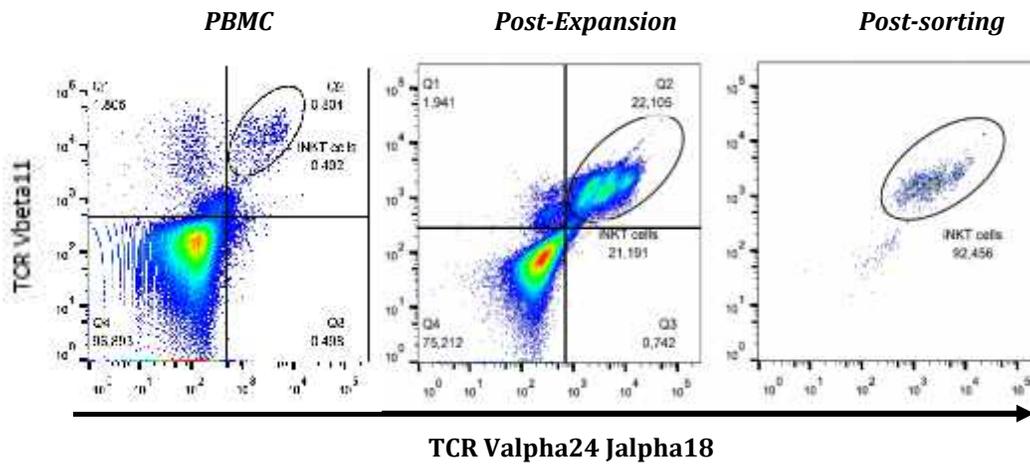


Figura 13: Protocolo de expansión *in vitro* de linfocitos iNKT. (a) Amplificación 100 x de fotografías tomadas a diferentes tiempos a través de microscopía óptica. Este protocolo de expansión de linfocitos iNKT se realiza a partir de PBMC de un individuo sano. En el día cero, se agrega GalCer, IL-2 e IL-7 y, cada 4-5 días, se realiza cambio de medio de cultivo y se adiciona IL-2 e IL-7. (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* muestra el porcentaje de células iNKT en el PBMC antes de la expansión, en el día 0 (0,402 %); el segundo *Dot Plot* muestra el porcentaje de células iNKT después de 30 días en cultivo (22,105 %), y el último *Dot Plot* muestra las células iNKT después del *cell sorting*, y se obtiene una pureza de 92%.

Luego del co-cultivo entre células iNKT purificadas y LB enriquecidos de controles sanos o pacientes con CG, se seleccionó la población de linfocitos a estudiar como se muestra en la figura 14. Dentro de los resultados obtenidos observamos que no existe una diferencia significativa en la producción de IL-10 o TNF- α por parte de los linfocitos B CD19 $^{+}$, tampoco de los linfocitos B CD19 $^{+}$ CD1d $^{+}$ entre los pacientes con cáncer gástrico (n=4) y los controles sanos (n=3) (Figuras 15, 16, 17 y 18).

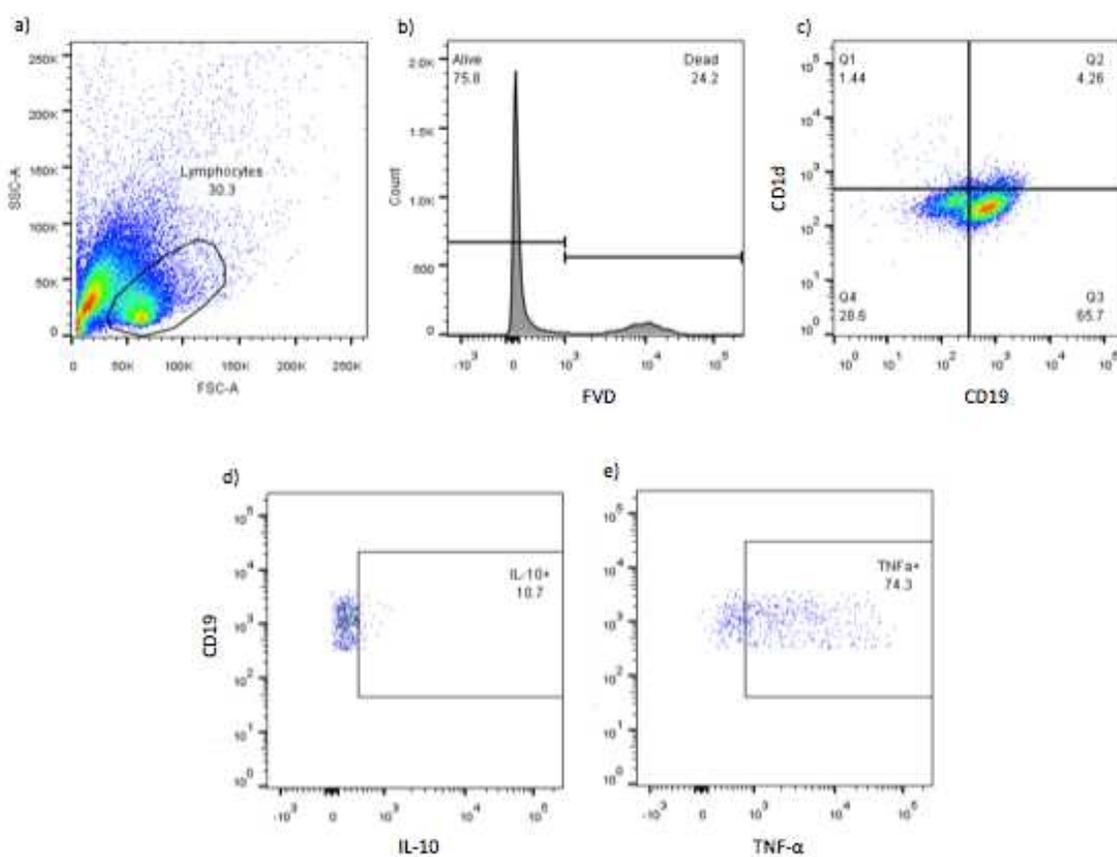


Figura 14: Selección de linfocitos B CD19 $^{+}$ y CD19 $^{+}$ CD1d $^{+}$ que producen IL-10 y TNF- α . a) Dot plot representativo de un voluntario sano, donde se selecciona la población de linfocitos según tamaño (FSC-A) y granularidad (SSC-A). b) En la población de linfocitos se excluyen las células muertas del análisis mediante el uso de Fixable Viability Dye (FVD), que se une irreversiblemente a las células muertas. c) En la población de linfocitos vivos, se selecciona la población que CD19 $^{+}$ o CD19 $^{+}$ CD1d $^{+}$ y se mide la producción de IL-10 (d) y TNF- α (e).

Pese a este resultado, al comparar el porcentaje de células productoras de ambas citoquinas entre los linfocitos B CD19⁺ totales y linfocitos B CD19⁺ que expresan CD1d, se observa que los pacientes con adenocarcinoma gástrico presentan un mayor porcentaje de linfocitos B CD1d⁺ que producen TNF- que los linfocitos B totales (Figura 19). Esta diferencia es estadísticamente significativa en las tres condiciones estudiadas, es decir, con un estímulo inespecífico con PMA/Ionomicina, con el control positivo con el anti-BCR y en el co-cultivo con linfocitos iNKT. Esta diferencia no se observa en las subpoblaciones de linfocitos B de controles sanos (Figura 19a y 19c), como tampoco en las subpoblaciones de voluntarios sanos ni con cáncer gástrico que producen IL-10 (Figura 19b).

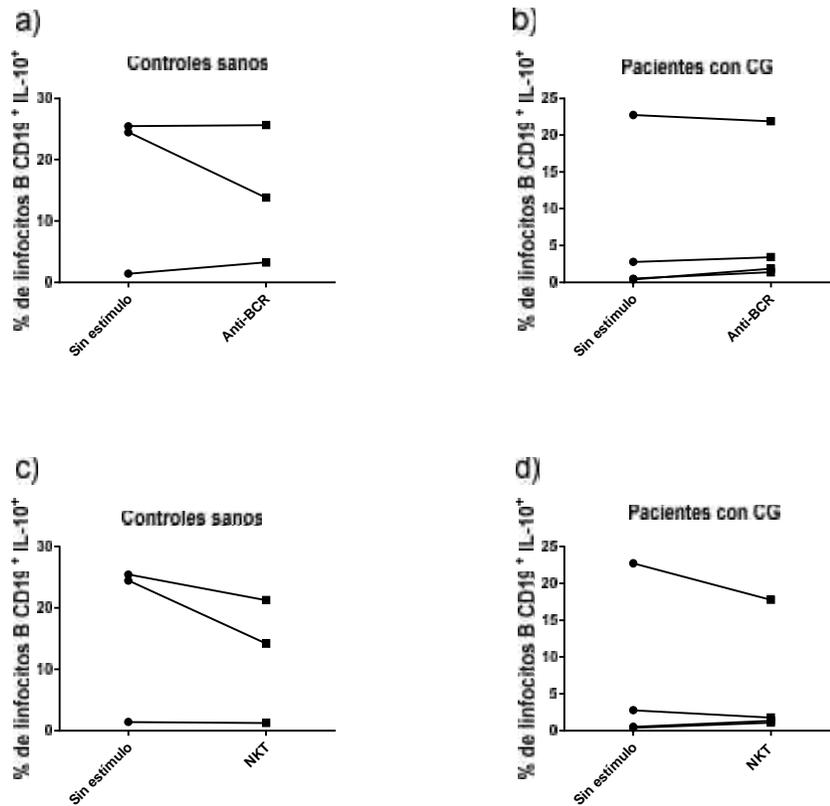


Figura 15: Frecuencia de linfocitos B CD19⁺ que producen IL-10 en sangre periférica de controles sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico. Los gráficos muestran los porcentajes de linfocitos B CD19⁺ que producen IL-10 bajo estímulo con PMA/Ionomicina, con el control positivo (anti-BCR) y en co-cultivo con células iNKT purificadas de un donante sano a una relación 1:1, en controles sanos (n=3) en comparación a pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=4). a) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺ de controles sanos que producen IL-10 con estímulo inespecífico (S/E) en comparación a el control positivo (anti-BCR). b) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺ de pacientes con cáncer gástrico que producen IL-10 con estímulo inespecífico (S/E) en comparación a el control positivo (anti-BCR). c) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺ de controles sanos que producen IL-10 con estímulo inespecífico (S/E) en comparación a el co-cultivo con linfocitos iNKT. d) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺ de pacientes con cáncer gástrico que producen IL-10 con estímulo inespecífico (S/E) en comparación a el co-cultivo con linfocitos iNKT.

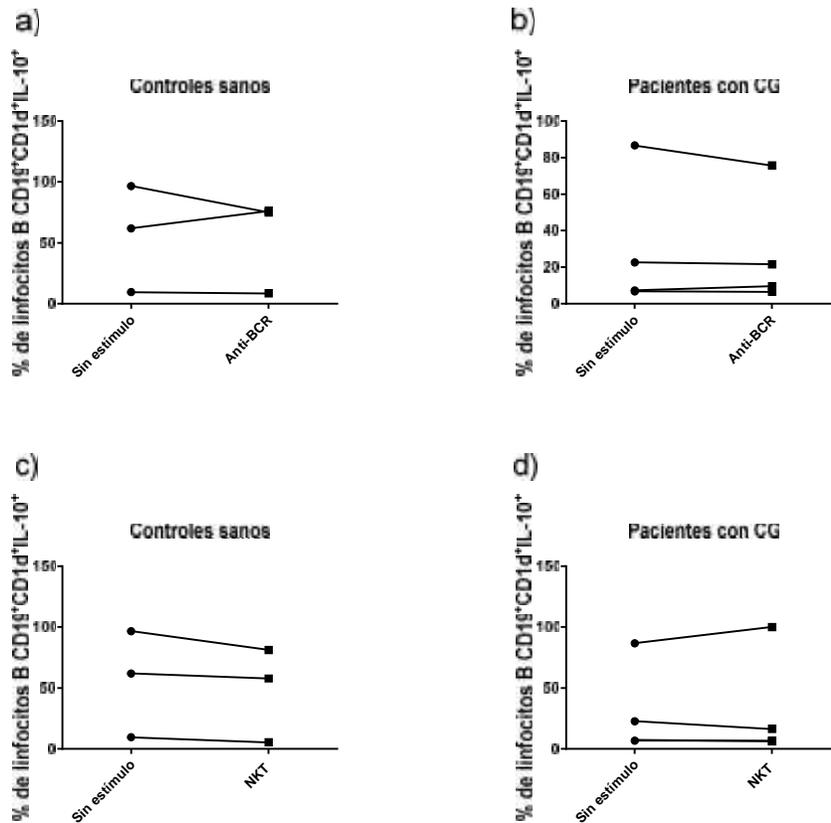


Figura 16: Frecuencia de linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ que producen IL-10 en sangre periférica de controles sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico. Los gráficos de líneas muestran los porcentajes de linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ que producen IL-10 bajo estímulo con PMA/Ionomomicina, con el control positivo (anti-BCR) y en co-cultivo de linfocitos B con células iNKT purificadas de un donante sano a una relación 1:1, en controles sanos (n=3) en comparación a pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=4). a) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ de controles sanos que producen IL-10 con estímulo inespecífico (S/E) en comparación a el control positivo (Anti-BCR). b) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ de pacientes con cáncer gástrico que producen IL-10 con estímulo inespecífico (S/E) en comparación a el control positivo (Anti-BCR). c) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ de controles sanos que producen IL-10 con estímulo inespecífico (S/E) en comparación a el co-cultivo con linfocitos iNKT. d) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ de pacientes con cáncer gástrico que producen IL-10 con estímulo inespecífico (S/E) en comparación a el co-cultivo con linfocitos iNKT.

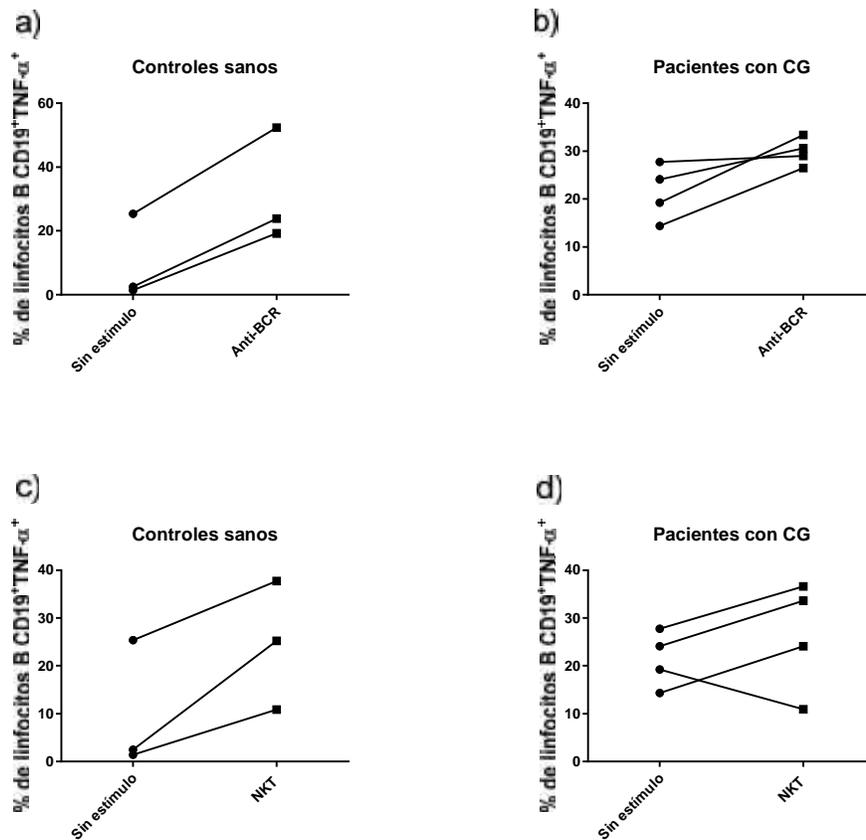


Figura 17: Frecuencia de linfocitos B CD19⁺ producen TNF- α en sangre periférica de controles sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico. Los gráficos de líneas muestran los porcentajes de linfocitos B CD19⁺ que producen TNF- α bajo estímulo con PMA/Ionomicina, con el control positivo (anti-BCR) y en co-cultivo de linfocitos B con células iNKT de un único donante sano a una relación 1:1, en controles sanos (n=3) en comparación a pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=4). a) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺ de controles sanos que producen TNF- α con estímulo inespecífico (S/E) en comparación a el control positivo (Anti-BCR). b) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺ de pacientes con cáncer gástrico que producen TNF- α con estímulo inespecífico (S/E) en comparación a el control positivo (Anti-BCR). c) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺ de controles sanos que producen TNF- α con estímulo inespecífico (S/E) en comparación a el co-cultivo con linfocitos iNKT. d) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺ de pacientes con cáncer gástrico que producen TNF- α con estímulo inespecífico (S/E) en comparación a el co-cultivo con linfocitos iNKT.

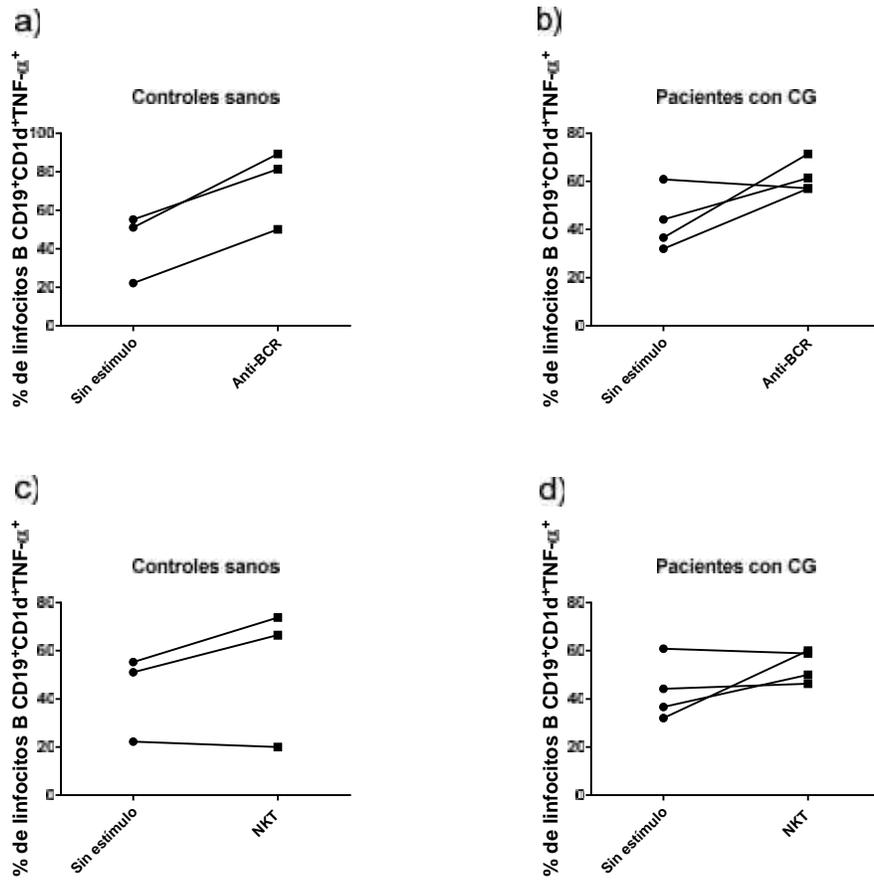


Figura 18: Frecuencia de linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ que producen TNF- α en sangre periférica de controles sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico. Los gráficos de líneas muestran los porcentajes de linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ que producen TNF- α bajo estímulo con PMA/Ionomicina, con el control positivo (anti-BCR) y en co-cultivo de linfocitos B con células iNKT de un único donante sano a una relación 1:1, en controles sanos (n=3) en comparación a pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=4). a) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ de controles sanos que producen TNF- α con estímulo inespecífico (S/E) en comparación a el control positivo (Anti-BCR). b) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ de pacientes con cáncer gástrico que producen TNF- α con estímulo inespecífico (S/E) en comparación a el control positivo (Anti-BCR). c) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ de controles sanos que producen TNF- α con estímulo inespecífico (S/E) en comparación a el co-cultivo con linfocitos iNKT. d) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ de pacientes con cáncer gástrico que producen TNF- α con estímulo inespecífico (S/E) en comparación a el co-cultivo con linfocitos iNKT.

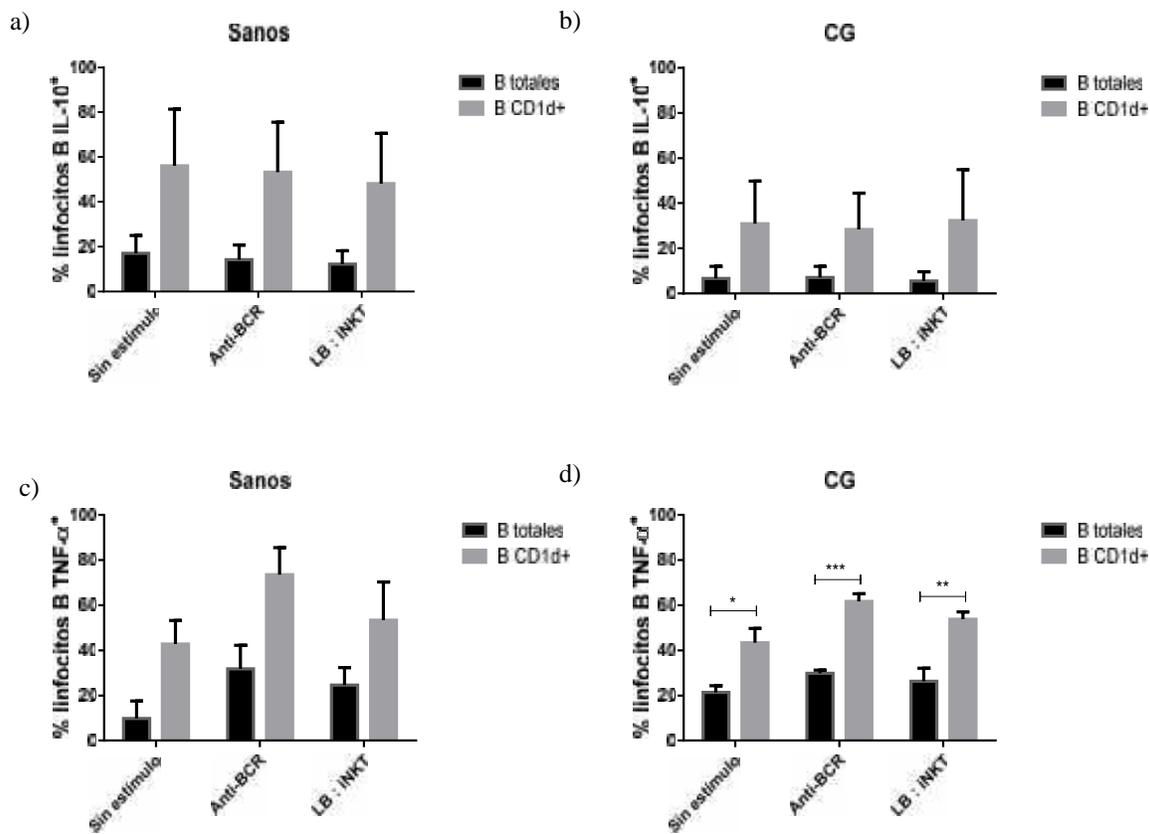


Figura 19: Frecuencia de linfocitos B totales y linfocitos B CD1d⁺ circulantes que producen IL-10 y TNF- en controles sanos y en pacientes con adenocarcinoma gástrico. Los gráficos muestran los porcentajes de linfocitos B CD19⁺ en comparación a los porcentajes de linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ que producen IL-10 y TNF- bajo estímulo con PMA/Ionomomicina, con el control positivo anti-BCR y en co-cultivo con células iNKT a una relación 1:1, en controles sanos (n=3) y en pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=4). Las células fueron incubadas solas, con anti-BCR o en presencia de células iNKT durante tres días, y se agregaron PMA/Ionomomicina más brefeldina A y monensina a todas las condiciones experimentales por 5 horas antes del análisis de la producción de TNF- por los linfocitos B por citometría de flujo. a) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺ que producen IL-10 con estímulo inespecífico (S/E), con anti-BCR y en co-cultivo con linfocitos iNKT en comparación al porcentaje de linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ en voluntarios sanos. b) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺ que producen IL-10 con estímulo inespecífico (S/E), con anti-BCR y en co-cultivo con linfocitos iNKT en comparación a linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ en pacientes con adenocarcinoma gástrico. c) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺ que producen TNF- con estímulo inespecífico (S/E), con anti-BCR y en co-cultivo con linfocitos iNKT en comparación a linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ en controles sanos. d) Porcentaje de linfocitos B CD19⁺ que producen TNF- con estímulo inespecífico (S/E), con anti-BCR y en co-cultivo con linfocitos iNKT en comparación a linfocitos B CD19⁺CD1d⁺ en pacientes con cáncer gástrico.

Discusión

Durante el desarrollo de este proyecto, quisimos evaluar algunas características fenotípicas y funcionales de linfocitos B circulantes en pacientes con adenocarcinoma gástrico. Vimos que los pacientes con cáncer gástrico presentan menor frecuencia de linfocitos B CD19⁺ totales que los controles sanos. Se ha descrito, en la literatura, que los linfocitos B CD19⁺ de sangre periférica son un predictor de sobrevida en pacientes con cáncer gástrico, donde pacientes con mayor porcentaje de linfocitos CD19⁺ presentan una mayor sobrevida post-gastrectomía (Qi-Ming Yu, et al, 2012). Nuestros resultados indican que no hay diferencias en la sobrevida en los pacientes con cáncer gástrico estudiados según el nivel de linfocitos B CD19⁺ circulantes (datos no mostrados). Es posible que esta disminución en la frecuencia de linfocitos B periféricos se deba a que estas células migren a la zona del tumor para ejercer una acción anti-tumoral; por otro lado, es posible que algunos pacientes con cáncer gástrico presenten leucopenia. Este fenómeno ya ha sido descrito en la literatura, donde un estudio realizado por Xiao-Feng Chen y col. en el 2016 concluye que un 8,8% de los pacientes con cáncer gástrico presentan leucopenia antes de la cirugía, y que ésta se asocia de manera inversamente proporcional al estadio tumoral, compromiso de ganglios linfáticos, estadio TNM y sobrevida.

Además, en este proyecto, evaluamos la frecuencia de linfocitos B que expresan CD1d, como también el nivel de expresión de CD1d en estas células entre pacientes y controles sanos. CD1d es una molécula presente en la membrana de los linfocitos B que presenta antígenos glicolípidicos a las células iNKT. De esta manera, los linfocitos iNKT reconocen, mediante su TCR, el antígeno glicolípido y se activa como

respuesta. A su vez, la interacción entre CD40L presente en la superficie de los linfocitos iNKT y el CD40 en la superficie de linfocitos B, permite la activación de estos últimos, resultando en una secreción de anticuerpos, cambio de clase o switch isotípico, coestimulación de linfocitos T y la generación de memoria inmunológica (Hostager et al, 1999). Sin embargo, esta activación resulta en una regulación negativa de la expresión de CD1d de manera de evitar citotoxicidad por parte de los linfocitos iNKT (Allan et al, 2011). En nuestros resultados, no se observa una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de CD1d entre linfocitos B de voluntarios sanos comparado con pacientes con cáncer gástrico, pese a que se observa una tendencia a que los pacientes presenten un menor porcentaje de linfocitos B CD1d⁺. El hecho de que los grupos estudiados (controles sanos y pacientes) tengan una frecuencia de expresión y una intensidad de fluorescencia similar de CD1d, sugiere que la capacidad de activar a células iNKT por parte de los linfocitos B, a través de CD1d, no se encuentra comprometida. Por lo tanto, la enfermedad no afectaría la expresión de CD1d, tampoco la capacidad de activar linfocitos iNKT mediante esta vía.

Por otro lado, pudimos observar que el porcentaje de linfocitos B CD19⁺ circulantes que expresan CD40, un receptor de co-estimulación necesario para la activación, maduración y producción de anticuerpos por parte de linfocitos B, se encuentra disminuido de manera significativa en los pacientes con adenocarcinoma gástrico. Sin embargo, creemos que esta disminución de la expresión de CD40 podría estar dada porque existen dos pacientes que tienen un menor porcentaje de linfocitos B CD19⁺ en sangre periférica que expresan CD40 en comparación al resto de los pacientes estudiados, por lo tanto, creemos que es necesario aumentar el tamaño muestral para

evaluar que ocurre realmente en cáncer gástrico y determinar si esos dos pacientes son representativos o no de la población en estudio.

Cuando el receptor CD40, presente en la superficie de los linfocitos B, se une a su ligando CD40L (CD154), presente en la superficie de los linfocitos T y linfocitos iNKT, los linfocitos B se activan y aumentan la expresión de moléculas co-estimuladoras y otros mediadores inmunes (Zippelius, 2015). En el presente estudio, quisimos buscar una relación entre la expresión de CD40, CD80 y CD86 en los linfocitos B totales y los linfocitos B CD1d⁺. Dentro de los resultados obtenidos, pudimos observar que, en los pacientes con cáncer gástrico, los linfocitos B CD1d⁺ que expresan CD40, también expresan mayor porcentaje de CD80 y CD86 de manera estadísticamente significativa, lo que es concordante con la literatura (Zippelius, 2015). Los ligandos de co-estimulación, como lo son CD80 y CD86, se pueden unir a dos tipos de proteínas en la superficie de los linfocitos T: el receptor CD28 y el receptor CTLA-4. CD28 es un receptor de activación de los linfocitos T, es la segunda señal (después de la unión del receptor de linfocitos T o TCR) necesaria para que los linfocitos T se activen. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que los linfocitos B CD1d⁺ de cáncer gástrico se encuentran más activados que en controles sanos debido a que éstas células, al parecer, expresan concomitantemente CD40 y CD80/CD86. Sin embargo, no sabemos si esta activación de los linfocitos B CD1d⁺ se traduce en una mayor activación de los linfocitos iNKT, para lo cual sería necesario medir la expresión de CD28 y CTLA-4 en la superficie celular, como también evaluar la respuesta efectora, como la producción de citoquinas inducida por la interacción entre los receptores y sus ligandos.

Dado que la interacción entre los linfocitos B y los linfocitos iNKT resulta en la activación de ambas células, nosotros decidimos evaluar si los linfocitos iNKT son capaces de estimular la producción de citoquinas por parte de los linfocitos B. Para esto, analizamos la producción de dos citoquinas antagónicas secretadas por los linfocitos B, de manera basal y al co-cultivar los linfocitos B, durante tres días, con células iNKT. Dentro de los resultados obtenidos, observamos que la producción basal de IL-10 por parte de los linfocitos B totales y los linfocitos B CD1d⁺ es muy similar entre los voluntarios sanos y los pacientes con adenocarcinoma gástrico, y esta producción tiende a disminuir con el co-cultivo con linfocitos iNKT en los dos grupos de linfocitos B estudiados, pero los resultados no fueron estadísticamente significativos. La IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria, supresora o inmunoreguladora, que contribuye al desarrollo de células T reguladoras, induce la expansión de células Bregs, suprime la diferenciación de linfocitos Th1 y Th17 mediante la disminución de citoquinas pro-inflamatorias, e inhibe la actividad efectora de los linfocitos B (Rosser, 2015). Nuestros resultados sugieren que los linfocitos B totales y CD1d⁺ de sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico no actuarían de manera inmunoreguladora mediante la secreción de IL-10. Sin embargo, sería interesante evaluar la producción de otras citoquinas inmunoreguladoras como TGF- β o IL-35, que también son producidas por linfocitos B reguladores, y que inducen apoptosis de linfocitos T CD4⁺, anergia de linfocitos T CD8⁺ y bloquean las respuestas Th1 (Rosser, 2015).

En el último tiempo, se ha visto que la citoquina TNF- α participa en la respuesta inmune tumoral, pero sus funciones pueden ser antagónicas. El TNF- α , que es una

citoquina multifuncional, cumple importantes roles en la supervivencia celular, proliferación, diferenciación y muerte celular. Como mencionamos previamente, el TNF- α actúa de manera dual en la carcinogénesis. Por un lado, puede ejercer una función pro-tumoral, promoviendo el crecimiento tumoral en ciertos tipos de cánceres, como carcinoma de células renales (Sun KH, et al, 2016). Por otro lado, se ha visto que, en ensayos experimentales con modelos murinos de sarcomas de piel inducidos por 3'-metilcolantrene, se observa que los ratones que no presentan TNF- α eran más susceptibles a presentar sarcomas de piel (Swann JB, et al, 2008). La regulación del rol pro o anti-tumoral del TNF- α no está del todo clara, pero se considera que depende del órgano y el contexto donde se genere (Wang et al, 2008). Es por este motivo que, en este estudio, decidimos analizar la producción de TNF- α por parte tanto de linfocitos B totales como linfocitos B CD1d⁺ de sangre periférica, en pacientes y en voluntarios sanos. Pudimos observar que la producción de TNF- α frente a un estímulo inespecífico con PMA/Ionomicina, por parte de los linfocitos B totales y linfocitos B CD1d⁺, es muy similar en ambos grupos de estudio. Asimismo, al co-cultivar los linfocitos B con células iNKT, la producción de esta citoquina tiende a aumentar, pero no de manera estadísticamente significativa. Sin embargo, al comparar la producción de TNF- α entre los linfocitos B totales y los linfocitos B CD1d⁺ de los pacientes con cáncer gástrico, se observa un mayor porcentaje de linfocitos B CD1d⁺ que producen TNF- α , tanto con un estímulo inespecífico como al co-cultivarlos con células iNKT, de manera estadísticamente significativa. Interesantemente, esta diferencia no se observa en los linfocitos B de los controles sanos, aunque, en estos individuos, se observa una tendencia a la presencia de un mayor porcentaje de linfocitos B CD1d⁺ productores de TNF- α en comparación a los linfocitos B totales. El aumento en el número de linfocitos

B que producen esta citoquina podría estar contribuyendo al desarrollo tumoral en los pacientes con adenocarcinoma gástrico, mediante la inducción de una inflamación crónica, favoreciendo, así, la progresión de la enfermedad, tal como se ha visto en el estudio realizado por Popivanova et al en el 2008, donde se bloquea el receptor de TNF- α y esto disminuye la carcinogénesis colorrectal asociada a colitis crónica. Junto con esto, se ha visto que las diferentes subpoblaciones de linfocitos B secretan diferentes citoquinas. Por ejemplo, los linfocitos B *naive* tienden a producir más IL-10, mientras que los linfocitos B de memoria producen más citoquinas pro-inflamatorias, como linfotoxina y TNF- α (Duddy et al, 2007). Por lo tanto, sería interesante identificar subpoblaciones de linfocitos B que predominan en los pacientes con cáncer gástrico, y, así, estudiar sus funciones efectoras, como la producción de citoquinas, en presencia de células iNKT, de modo a comprender los efectos decurrentes de la interacción entre ambos tipos celulares. Por otro lado, se ha visto que la acción conjunta de TNF- α e IFN- γ en cánceres de células (como cáncer pancreático o de mama) detienen el crecimiento tumoral (Braumuller et al, 2013). En este proyecto, no evaluamos la producción de IFN- γ por los linfocitos B, pero consideramos que sería importante, a futuro, evaluar si los linfocitos B, en cáncer gástrico, producen ambas citoquinas en conjunto o pueden recuperar su producción *ex vivo*, con el objetivo de poder generar una nueva herramienta en el tratamiento de esta enfermedad.

Finalmente, se ha descrito que el TNF- α participa en los eventos tempranos del desarrollo de otros cánceres, como el cáncer de piel y un modelo experimental de cáncer de colon inducido por colitis crónica, como también en la progresión experimental de un modelo de adenocarcinoma de colon con metástasis a pulmón

(Frances Balkwill, 2006). Estos mecanismos de promoción y progresión del cáncer se explicarían debido a que el TNF- α puede dañar directamente el ADN de las células por acción de una inflamación crónica, porque puede tener un efecto anti-apoptótico actuando en la vía NF- κ B y porque aumenta la expresión de algunas quimioquinas y sus receptores, lo que favorece la metástasis (Balkwill, 2006). Es por esto, que el TNF- α se ha convertido en un posible blanco terapéutico para intentar controlar el desarrollo y progresión del cáncer. Como vimos en nuestros resultados, los linfocitos B CD1d⁺ producen TNF- α en los pacientes con cáncer gástrico, lo que abre una nueva posibilidad a investigar esta población celular y generar armas terapéuticas dirigidas específicamente a estas células, con el fin de disminuir algunos de los efectos secundarios que se dan con el uso de antagonistas de TNF- α .

En nuestro estudio, sólo evaluamos la activación de linfocitos B al ser co-cultivados con células iNKT, pero sería interesante analizar si existe activación de las células iNKT al ser co-cultivadas con linfocitos B, mediante la evaluación de producción de citoquinas por parte de las células iNKT, así como evaluar la relevancia de la molécula CD1d, expresada por los linfocitos B, en la activación de las células iNKT utilizando, por ejemplo, anticuerpos bloqueantes para esta molécula presentadora de antígeno.

También consideramos importante poder determinar, de manera más específica, el fenotipo de los linfocitos B, porque, como ya se sabe, existen distintas subpoblaciones de estas células, y cada una tiene un fenotipo y función específica. Por ejemplo, los linfocitos Bregs se caracterizan por secretar IL-10; sin embargo, se ha descrito dos fenotipos de estas células en humanos: CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}CD1d^{hi} y CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ (Rosser et al, 2015). Por otro lado, como mencionamos

anteriormente, los linfocitos B *naive* (CD27⁻) tienden a producir más IL-10 y los linfocitos B de memoria (CD27⁺) producen más TNF- α .

Dados los resultados obtenidos en este estudio, hemos podido proponer un esquema que intenta explicar la participación que tienen los linfocitos B CD1d⁺ en la respuesta inmune frente al cáncer gástrico. En estos pacientes, los linfocitos B que expresan CD1d se encontrarían más activados, lo que se refleja en la expresión concomitante de CD40 y CD80 o CD40 y CD86. Esta activación puede ser llevada a cabo mediante determinadas moléculas, citoquinas o patrón molecular asociado a daño (DAMP) producidas por las células tumorales. Al activarse, los linfocitos B CD1d⁺ activarían a las células iNKT a través de CD1d que es reconocido por el TCR presente en los linfocitos iNKT y mediante CD28, que se une a CD80 y CD86 presente en la superficie de los linfocitos B. De esta manera, los linfocitos iNKT aumentan la expresión de CD40L, que se une a CD40 expresado en la membrana de los linfocitos B, y así se estimula la producción de TNF- α , citoquina que, como hemos visto, participa activamente en el desarrollo y progresión del cáncer (Figura 20). Este aumento en la expresión de moléculas de co-estimulación y en la producción de TNF- α no se observa en los voluntarios sanos debido a que ellos no presentan células tumorales que estarían activando a los linfocitos B.

Cáncer Gástrico

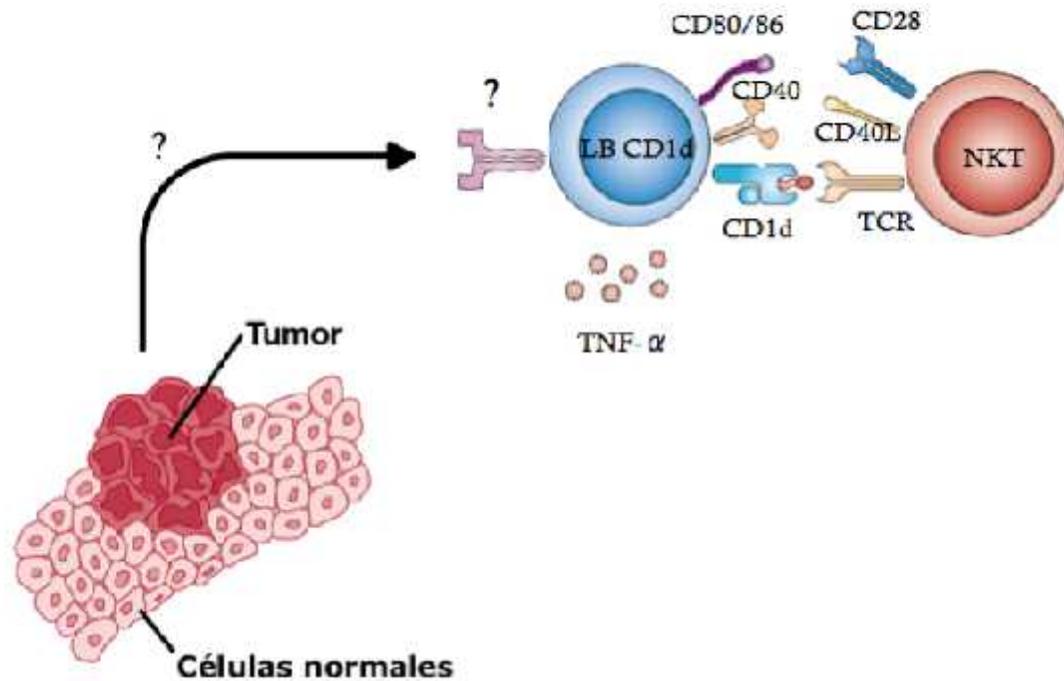


Figura 20: Esquema propuesto de la activación y participación de linfocitos B CD1d⁺ en cáncer gástrico. Las células tumorales activan a linfocitos B CD1d⁺ mediante la expresión y producción de moléculas, citoquinas o DAMP's. Los linfocitos B CD1d⁺ aumentan la expresión de CD40/CD80 y CD40/CD86, de esta manera podrían activar a las células iNKT a través de CD1d que presenta un antígeno glicolipídico que es reconocido por el TCR invariante y CD80/CD86 que es reconocido por CD28 en la superficie de las células iNKT. Una vez que las células iNKT se activan, aumentan la expresión de CD40L, que se une a CD40 presente en la superficie de los linfocitos B, y de esta manera se estimula la secreción de TNF- α por parte de los linfocitos B.

Sería un nuevo desafío para el futuro el poder caracterizar mejor las subpoblaciones de linfocitos B circulantes en cáncer gástrico que expresan CD1d⁺, que tienen mayor capacidad de activarse y de producir mayores niveles de TNF- α , como también comprender de manera más integral el rol que cumplen los linfocitos B CD1d⁺ en la respuesta inmune frente al cáncer gástrico, con el fin de evaluar y elaborar nuevas herramientas terapéuticas para combatir esta enfermedad tan prevalente y letal.

Conclusiones

- Los pacientes con cáncer gástrico tienen un menor porcentaje de linfocitos B totales en sangre periférica, pero no presentan diferencias en el porcentaje de linfocitos B CD1d⁺ en comparación a controles sanos.
- Los pacientes con cáncer gástrico presentan un mayor porcentaje de linfocitos B CD1d⁺ circulantes que expresan CD40/CD80 y CD40/CD86 que voluntarios sanos.
- En pacientes con cáncer gástrico, los linfocitos B CD1d⁺ producen más TNF- α que linfocitos B totales de sangre periférica, al ser estimulados con células iNKT. No se observó diferencias en la producción de IL-10 entre los grupos estudiados ni entre las subpoblaciones de LB.

Bibliografía

1. Berzins Stuart, Smyth Mark, Baxter Alan. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nature reviews Immunology*. 2011, 11: 131-142
2. Bezbradica JS, Stanic AK, Matsuki N, et al. Distinct roles of dendritic cells and B cells in Val4Ja18 natural T cells activation in vivo. *Journal of Immunology*. 2005, 174(8): 4696-4705
3. Bhardwaj Nina. Harnessing the immune system to treat cancer. *The journal of clinical investigation*. 2007, 117(5): 1130-1136
4. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients. *Immunity*. 2010, 32:129-40
5. Bosma A, Gadir A, Mauri C, et al. Lipid-Antigen Presentation by CD1d+ B Cells is Essential for the Maintenance of Invariant Natural Killer T Cells. *Immunity*. 2012, 20(3): 477-490
6. Braumuller Heidi, Wieder Thomas, Brenner Ellen, et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*. 2013, 494: 361-367
7. Brennan Patrick, Brig Manfred, Brenner Michael. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nature reviews Immunology*. 2013, 13:101-117
8. Brigl Manfred and Brenner Michael. CD1: Antigen presentation and T cell

- Function. Annual reviews of Immunology. 2004, 22:817-890
9. Buchbinder Elizabeth and Desai Anupam. CTLA-4 and PD-1 Pathways. American Journal of Clinical Oncology. 2016, 39(1): 98-106
 10. Candando KM, Lykken JM, Tedder TF. B10 cell regulation of health and disease. Immunological reviews. 2014, 259(1): 259-272
 11. Chaudhry Mohammed and Karadimitris Anastasios. Role and Regulation of CD1d in normal and pathological B cells. 2014, 193 (10): 4761-4768
 12. Chavéz-Galán L, Arenas-del Angel MC, Zenteno E, et añl. Cell Deaths Mechanisms Induced by Cytotoxic Lymphocytes. Cellular and Molecular Immunology. 2009, 6:15-25
 13. Chung Yeonseok, Kim Byung-Seok, Kim Yeon-Jeong, et al. CD1d-Restricted T Cells License B Cells to Generate Long-Lasting Citotoxic Antitumor Immunity *in vivo*. Cancer Research. 2006, 66:6843-6850
 14. Collins Mary, Ling Vincent and Carreno Beatriz. The B7 Family of immune-regulatory ligands. Genome Biology. 2005, 6(6): 223
 15. Coussens Lisa and Werb Zena. Inflammation and cancer. Nature. 2002, 420(6917): 860-867
 16. Cui J, Shin T, Kawano T, et al. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12 mediated rejection of tumors. Science. 1997, 278(5343): 1623-6
 17. Dicken Bryan, Bigam David, Cass Carol, et al. Gastric Adenocarcinoma. Annals of Surgery. 2005, 241: 27-39

18. DiLillo DJ, Yanaba K, Tedder TF. B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice. *J Immunol.* 2010;184:4006–16
19. Esensten Jonathan, Helou Ynes, Chopra Guarav, et al. CD28 Coestimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity.* 2016, 44(5): 973-988
20. Exley M, Garcia J, Balk SP, et al. CD1d structure and regulation on human thymocytes, peripheral blood T cells, B cells and monocytes. *Immunology.* 2000, 100(1): 37-47
21. Frances Balkwill. TNF- in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Reviews.* 2006, 25: 409-416
22. Frances Balkwill. Tumor necrosis factor and cancer. *Nature reviews in cancer.* 2009, 9: 361-372
23. Fremd Carlo, Schuetz Florian, Domschke Christoph, et al. B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *Oncoimmunology.* 2013, 2(7): e25443
24. Fremd Carlo, Schuetz Florian, Domschke Christoph, et al. B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *Oncoimmunology.* 2013, 2(7): e25443
25. Galli G, Nuti S, Tavarini S, et al. CD1d-restricted help to B cells by human invariant natural killer T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine.* 2003, 197(8): 1051-1057

26. Gentilini Virginia, Pérez Eugenia, Fernández Pablo Mariano, et al. The tumor antigen N-glycolyl-GM3 is a human CD1d ligand capable of mediating B cell and natural killer T cell interaction. *Cancer Immunol Immunother.* 2016, 65: 551-562
27. Haung Xin-En, Tajima Kazuo, Hamajima Nobuyuki, et al. Effects of Dietary, Drinking, and Smoking on the Prognosis of Gastric Cancer. *Nutrition and Cancer.* 2000, 35:1, 30-36
28. Horikawa M, Minard-Collin V, Matsushita T, et al. Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. *The Journal of Clinical Investigation.* 2011, 121(11): 4268-4280
29. Hostager Bruce and Bishop Gail. Cutting the edge: Contrasting roles of TNF Receptor-Associated Factor 2 (TRAF2) and TRAF3 in CD40-activated B lymphocyte differentiation. *Journal of immunology.* 1999, 162:6307-6311
30. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
31. <http://www.deis.cl/?p=2541>
32. Jadidi-Niaragh F, Jeddi-Tehrani M, Ansari-pour B, et al. Reduced frequency of NKT-like cells in patients with progressive chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol.* 2012, 29:3561–3569
33. Kaer Luc Van, Parekh Vrajesh, Wu Lan. Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity. *Cell Tissue Res.* 2010
34. Kawaguchi Kosuke, Suzuki Eiji, Yamaguchi Ayane, et al. Altered expression of major immune regulatory molecules in peripheral blood immune cells

- associated with breast cancer. *Breast Cancer*. 2017, 24(1): 111-120
35. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of α 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997, 278(5343): 1626-1629
 36. Lang Mark. How do natural killer T cells help B cells?. *Expert Rev Vaccines*. 2009, 8:1109-1121
 37. Lenka Allan, Annelein Stax, Dong-Jun Zheng, et al. CD1d and CD1c expression in human B cells is regulated by activation and retinoic acid receptor signaling. *The Journal of Immunology*. 2011, 186 (9): 5261-5272
 38. Li JH, Zhang SW, Liu J, et al. Review of clinical investigation on recurrence of gastric cancer following curative resection. *Chinese Medical Journal*. 2012, 125(8): 1479-1495
 39. Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, et al. Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Research*. 2013, 73(8), 2468-79
 40. Lynch L, O'Shea D, Winter DC, Geoghegan J, Doherty DC, et al. Invariant NKT and CD1d(+) cells amass in human omentum and are depleted in patients with cancer and obesity. *European Journal of Immunology*. 2009, 39: 1893-1901
 41. Mallevaey Thierry, Clarke Andrew, Scott-Browne James, et al. A molecular basis for NKT cells recognition of CD1d self-antigen. *Immunity*. 2011, 34:315-326

42. Mauri Claudia and Bosma Anneleen. Immune Regulatory Function of B Cells. *Annual Review of Immunology*. 2012. 30:221-41
43. Ministerio de Salud. Guía clínica cáncer gástrico. Santiago: Minsal, 2010
44. Muhhamad Syed, Cheng Olivia, Shaulov Angela, et al. Loss of IFN-production by invariant NKT cells in advanced cancer. *The Journal of Immunology*. 2001, 167: 4046-4050
45. O'Reilly Vincent, Zeng Shijuan, Bricard Gabriel, et al. Distinct and Overlapping Effector Functions of Expanded Human CD4⁺, CD8⁺, and CD4⁺CD8⁻ Invariant Natural Killer T cells. *Plos One*. 2011, Vol 6, Issue 12, e28648
46. Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, et al. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res*. 2011;71:3505–15
47. Ostrand-Rosenberg Suzanne. Immune Surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2008, 18:11-18
48. Page MJ, Poritz LS, Tilberg AF y cols. CD1d-restricted cellular lysis by peripheral blood lymphocytes: relevance to the inflammatory bowel disease. *The journal of surgical research*. 2000, 92(2): 214-221
49. Rosser Elizabeth and Mauri Claudia. Regulatory B cells: Origin, Phenotype and Function. *Immunity*. 2015, 42: 607-612
50. Rossjohn Jamie, Pellicci Daniel, Patel Onisha, et al. Recognition of CD1d-

- restricted antigens by natural killer T cell. *Nature reviews Immunology*. 2012, 12:845-857
51. Schneiders Fanke, Bruin Renée, Santegoets Saskia, et al. Activated iNKT cells promotes V 9V 2 T cell anti-tumor effector functions through the production of TNF- . *Clinical Immunology*. 2012, 142: 194-200
 52. Shen Meng, Sun Qian, Wang Jian, et al. Positive and negative functions of B lymphocytes in tumors. *Oncotarget*. 2016, 1-8
 53. Shimizu Kanako, Hidaka Mishihiko, Kadowaki Norimitsu, et al. Evaluation of function of human Invariant NKT cells from Cancer patients using - Galactosylceramide-Loaded murine Dendritic cells. *The Journal of Immunology*. 2006, 177: 3484-3492
 54. Sidobre S, Kronenberg M. CD1 tetramers: a powerful tool for the analysis of glycolipid-reactive T cells. *Journal of immunological methods* 2002, 268(1): 107
 55. Silk JD, Salio M, Reddy BG, Shepherd D, Gileadi U, Brown J, et al. Cutting edge: nonglycosidic CD1d lipid ligands activate human and murine invariant NKT cells. *Journal of immunology* 2008, 180(10): 6452-6456
 56. Sorrentino R, Morello S, Forte G, et al. B cells contribute to the antitumor activity of CpG-oligodeoxynucleotide in a mouse model of metastatic lung carcinoma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183:1369–79
 57. Spanoudakis E, Hu M, Naresh K, et al. Regulation of multiple myeloma survival and progression by CD1d

58. Tahir S., Cheng O., Shaulov A., et al. Loss of IFN- Production by Invariant NKT Cells in Advanced Cancer. *The Journal of Immunology*. 2001 1;167:4046-4050
59. Tahir SMA, Cheng O, Shaulon A, et al. Loss of IFN- Production by Invariant NKT Cells in Advanced Cancer. *Journal of Immunology*. 2001, 167:4046-4050
60. Toura I, Kawano T, Akutsu Y, et al. Cutting edge: inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide. *Journal of Immunology*. 1999, 163(5): 2387-91
61. Van Kaer Luc, Parekh Vrajesh, Wu Lan. Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptative immunity. *Cell Tissue Res*. 2010, DOI 10.1007/s00441-010-1023-3
62. Vesely Matthew, Kershaw Michael, Schreiber Robert, Smyth Mark. Natural Innate and adaptive Immunity to Cancer. *Annu. Rev. Immunol*. 2011, 29:235-71
63. Vliet Hans, Wang Ruojie, Yue Simon, et al. Circulating myeloid dendritic cells of advanced cancer patients results in reduced activation and a biased cytokine profile in invariant NKT cells. *The journal of Immunology*. 2008, 180: 7287-7293
64. Vomhof-DeKrey Emilie E, Yates Jennifer and Leadbetter Elizabeth A. Invariant NKT cells provide innate and adaptative help for B cells. *Current Opinion of Immunology*. 2014, 28:12-17

65. Vomhof-DeKrey Emilie, Yates Jennifer, Hagglof Thomas, et al. Cognate interaction with iNKT expands IL-10-producing B regulatory cells. PNAS. 2015, 1-6
66. Vyth-Dreese FA, DelleMijn TA, Van Oostveen, et al. Functional expression of adhesion receptors and costimulatory molecules by fresh and immortalized B-cell non-Hodgkin's lymphoma cells. Blood. 1995, 85(10)
67. Wang Meimei, Yuan Xiangliang, Chen Hui, 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): 33486-33499
68. Wang Timothy, Fox James, Giraud Andy. The biology of Gastric Cancers. ISBN: 978-0-387-69181-7
69. Wun KS, Borg NA, Kjer-Nielsen L, et al. A minimal binding footprint on CD1d-glycolipid is a basis for selection of the unique human NKT TCR. Journal of Experimental Medicine. 2008, 205 (4): 939-949
70. Xiao-FEng Chen, Jing Qian, Dong Pei, et al. Prognostic value of perioperative leukocyte count in resectable gastric cancer. World Journal of Gastroenterology. 2016, 22(9): 2818-2827
71. Yu Qi-Ming, Yu Chuan-Ding, Ling Zhi-Qiang. Elevated Circulating CD19⁺ Lymphocytes Predict Survival Advantage in Patients with gastric Cancer. Asian pacific Journal of Cancer Prevention. 2012, 13: 2219-2224
72. Zeng Shijuan Grace, Ghnewa Yasmeen, O'Reilly Vincent, et al. Human

Invariant NKT Cell Subsets Differentially Promote Differentiation, Antibody Production and T Cell Stimulation by B Cells In Vitro. *Journal of Immunology*. 2013, 191(4): 1666-167

73. Zheng Xincheng, Zhang Huiming, Zheng Pan, et al. Modulation of NKT Cells Development by B7-CD28 Interaction: An Expanding Horizon for Costimulation. *Plos One*. 2008, 3(7): e2703
74. Zippelius Alfred, Schreiner Jens, Herzig Petra, et al. Induced PD-L1 expression mediates acquired resistance to agonistic anti-CD40 treatment. *Cancer Immunology Research*. 2015, 3: 236-244

Anexo 1

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,

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
_____	_____	_____
Nombre del Investigador Responsable	Firma	Fecha

Anexo 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Investigador responsable: Dra. Carolina Hager Ribeiro

Teléfono: (2) 978-6088

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

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

_____	_____	_____
Nombre del donante	Firma	Fecha

_____	_____	_____
Nombre del informante	Firma	Fecha

CAROLINA HAGER RIBEIRO	_____	_____
Nombre del Investigador	Firma	Fecha

Anexo 3



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.



Anexo 4



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: **"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"** 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



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 la 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. Mariamne Sandoz H.
Vicepresidenta
Comité de Ética en Investigación
en Seres Humanos

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