

UCH-FC  
Biotecnología  
K 896  
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS LIGANDOS DE NKG2D EN  
TUMOR DE PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO Y SU  
CORRELACIÓN CON PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DE LA  
ENFERMEDAD”**

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

**KARINA LORETO KRAMM VERGARA**

Directora de Seminario de Título: Dra. María Carmen Molina  
Co-Directora de Seminario de Título: Dra. Carolina H. Ribeiro  
Profesor Patrocinante: Dra. María Rosa Bono

Marzo de 2014  
Santiago - Chile



### INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Karina Loreto Kramm Vergara.

#### “ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS LIGANDOS DE NKG2D EN TUMOR DE PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO Y SU CORRELACIÓN CON PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DE LA ENFERMEDAD”

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

*Dra. María Carmen Molina*  
**Directora Seminario de Título**

Firma manuscrita en tinta azul de Dra. María Carmen Molina, sobre una línea horizontal.

*Carolina Hager Ribeiro*  
**Co-Directora**

#### **Comisión de Evaluación**

*Dra. Daniela Sauma*  
**Presidente (a) Comisión**

Firma manuscrita en tinta azul de Dra. Daniela Sauma, sobre una línea horizontal.

*Dr. Alejandro Roth*  
**Evaluador**

Firma manuscrita en tinta verde de Dr. Alejandro Roth, sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, marzo 2014

**DEDICATORIA**



A mi mamá, papá, mi hermana y a la Edelcita

## BIOGRAFÍA



Nací el 16 de agosto de 1986 en Puerto Montt, fui la primera hija de mis padres Soledad Vergara y Jorge Kramm. Al año después nació mi hermana Verónica. Por cosas de trabajo de mi padre el año 1993 nos fuimos a vivir a Chillán, donde entre a estudiar al colegio English School en el cual cursé hasta séptimo básico. Luego me cambie al colegio Padre Hurtado donde terminé la enseñanza media. Debido a que me gustaba el área de biología en el colegio decidí estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile. Ya habiendo cursado los últimos ramos, decidí desarrollar mi tesis en el área de Inmunología, en el laboratorio de Evasión inmune en la Facultad de Medicina, bajo la tutela de la Dra. María Carmen Molina.

Actualmente me encuentro terminando el Magister en Ciencias Biológicas que imparte la Universidad de Chile, con el cual espero adquirir más experiencia en el área de la ciencia.

## AGRADECIMIENTOS

Primero quisiera agradecer el financiamiento del Proyecto FONDECYT Regular 1130330 y del Proyecto FONDECYT de Iniciación 11110456.

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

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

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

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

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

Al IBT, especialmente a Roberto y Norberto por ayudarme al comienzo con los experimentos.

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

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

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

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

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

A la Edel por hacerme siempre compañía.

A todos ustedes, **MUCHAS GRACIAS!**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	viii
RESUMEN.....	x
ABSTRACT .....	xii
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Cáncer gástrico.....	1
1.2. Sistema Inmune y células NK.....	3
1.3. Activación de las células NK.....	5
1.4. Receptor NKG2D (Natural Killer Group 2, type D) .....	5
1.5. Ligandos del receptor NKG2D.....	6
1.6. MICA.....	8
1.7. Expresión de NKG2DLs.....	10
1.8. Evasión del sistema inmune .....	11
1.9. Hipótesis .....	14
1.10. Objetivos .....	14
1.11. Objetivo general.....	14
1.12. Objetivos específicos.....	14
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
2.1. Pacientes.....	15
2.2. Análisis de expresión de NKG2DLs en la superficie de células tumorales y de mucosa gástrica.....	17
2.2.1. Preparación de suspensiones celulares desde el tejido tumoral y de mucosa gástrica adyacente al tumor .....	17
2.2.2. Citometría de flujo.....	17
2.3. Análisis de los niveles de mRNA de NKG2DLs por RT-PCR semicuantitativo .....	18
2.3.1. Extracción de RNA total .....	18
2.3.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa-formaldehído .....	19
2.3.3. Reacción semicuantitativa en cadena de la polimerasa retrotranscrita (sqRT-PCR).....	19
2.3.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa .....	20
2.4. Determinación de la expresión de MICA soluble en el suero de pacientes con cáncer gástrico.....	21
2.4.1. Cepa de <i>Escherichia coli</i> y plasmidio .....	21
2.4.2. Expresión de rMICA en <i>E. coli</i> BL21(DE3) [pET15b-sMICA].....	21
2.4.3. Purificación de rMICA .....	23
2.4.4. SDS-PAGE.....	24

2.4.5. Western Blot .....	24
2.4.6. Tinción con azul de Coomassie .....	25
2.4.7. Cuantificación de proteínas .....	25
2.5. Estandarización de ensayo de ELISA para la detección de MICA soluble en suero de pacientes con cáncer gástrico .....	26
2.5.1. Estandarización de anticuerpos de captura y detección del ensayo de ELISA .....	26
2.5.2. Estandarización de solución de bloqueo para ELISA .....	27
2.5.3. Optimización del anticuerpo de captura .....	27
2.5.4. Estandarización de anticuerpo de detección y estreptavidina-HRP .....	27
2.5.5. ELISA estandarizado para detección de MICA soluble .....	28
2.5.6. Kit de ELISA para detectar MICA humano (BAMOMAB).....	28
2.6. Correlación entre los niveles de expresión de los ligandos del receptor NKG2D con parámetros clínico-patológicos de la enfermedad.....	29
2.7. Análisis estadístico .....	30
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
3.1. Expresión de ligandos de NKG2D, a nivel de proteico y de mRNA, en células derivadas del tumor primario de pacientes con cáncer gástrico .....	31
3.2. Medición de la expresión de MICA soluble en el suero de pacientes con cáncer gástrico .....	36
3.2.1. Expresión y purificación de sMICA .....	36
3.2.2. Purificación de sMICA recombinante .....	38
3.2.3. Estandarización de ELISA de captura para detectar sMICA en suero de pacientes con cáncer gástrico .....	39
3.2.4. Detección de sMICA en el suero de pacientes con CG .....	44
3.2.5. Correlación de la expresión de sMICA y la expresión MICA en la superficie de células derivadas del tejido tumoral. ....	44
3.3. Correlación de la expresión de NKG2DL y sMICA con los parámetros clínico patológicos de la enfermedad .....	45
3.4. Correlación de la expresión de NKG2DL y sMICA con la supervivencia de los pacientes con CG .....	48
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>51</b>
4.1. Expresión de NKG2DL en CG .....	51
4.2. Evasión de la respuesta inmune en CG .....	53
4.3. Expresión NKG2DL y su correlación con parámetros clínico patológicos en CG .....	58
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>6. ANEXOS .....</b>	<b>63</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>70</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características clínico-patológicas de los pacientes con cáncer gástrico .....	16
Tabla 2. Partidores y condiciones de amplificación usados para el análisis de RT-PCR semicuantitativo. ....	20



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema representativo de señalización del receptor NKG2D. ....	7
Figura 2.	Ilustración representativa de los NKG2DL humanos en comparación con la molécula MCH de clase I. ....	9
Figura 3.	Organización exón/intrón del gen MICA. ....	9
Figura 4.	Representación esquemática del vector de expresión pET15b-sMICA. ....	22
Figura 5.	NKG2DLs son expresados en células tumorales y de mucosa de estómago de pacientes con CG. ....	32
Figura 6.	Expresión de NKG2DLs en células derivadas del tumor primario y de la mucosa adyacente al tumor de pacientes con CG. ....	34
Figura 7.	Expresión de mRNA de NKG2DLs en células tumorales y de mucosa gástrica en pacientes con CG. ....	35
Figura 8.	Expresión de sMICA en <i>E. coli</i> BL21(DE3) [pET15b-sMICA]. ....	37
Figura 9.	Distribución de sMICA en <i>E. coli</i> BL21(DE3) [pET15b-sMICA]. ....	38
Figura 10.	Expresión y purificación de sMICA por autoinducción por SDS-PAGE al 12%. ....	39
Figura 11.	Combinaciones de ELISA de tipo <i>sandwich</i> utilizando distintos anticuerpos de captura. ....	40
Figura 12.	Estandarización de ELISA de tipo <i>sandwich</i> . ....	42
Figura 13.	Curva estándar de rMICA. ....	43
Figura 14.	Detección de sMICA en el suero de pacientes con CG. ....	43
Figura 15.	Correlación entre la expresión de MICA en la superficie celular de células derivadas del tumor y los niveles de sMICA en el suero de pacientes con CG. ....	45
Figura 16.	Razón de la expresión y frecuencia de NKG2DLs entre tejido tumoral y la mucosa de pacientes con CG asociados con el estadio tumoral. ....	47
Figura 17.	Curvas de sobrevida en pacientes con CG después de la gastrectomía total. ....	49
Figura 18.	Sobrevida de pacientes con CG. ....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcMo	Anticuerpo monoclonal
AcPo	Anticuerpo policlonal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Akt	Proteína quinasa B
BSA	Albúmina sérica bovina
cDNA	DNA codificante
CG	Cáncer gástrico
DAP10	Proteína de activación de DNAX de 10 kDa
dNTPs	Desoxirribonucleotido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EpCAM	Molécula de adhesión celular epitelial
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERK	Quinasa reguladas por señales extracelulares
Fas	Receptor 6 de la superfamilia TNF
FITC	Isocianato de Fluoresceína
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
Grb2	Proteína 2 de unión al receptor del factor de crecimiento
HBSS	Solución salina equilibrada de Hanks
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IPTG	Isopropil tio- $\beta$ -galactosido
ITAMs	Motivos de activación en inmuno receptores basados en tirosina
kDa	Kilodalton
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
MEK	MAPK/ERK quinasa
MHC-I	Complejo principal de histocompatibilidad de clase I
MICA/B	Proteína relacionada con la cadena A/B de la molécula de clase I del MHC

MFI	Mediana de la intensidad de fluorescencia
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
mRNA	RNA mensajero
NK	Natural Killer
NKG2D	Receptor de activación de células NK, grupo 2, miembro D
NKG2DL	Ligando de NKG2D
NKT	Natural Killer T
p85	Subunidad regulatoria p85 de la PI3K
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
Rac	Proteína G monomérica de la familia Rho
rMICA	MICA recombinante
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	PCR de transcripción reversa
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
SFB	Suero Fetal Bovino
sMICA	MICA soluble
TBE	Tris Borato EDTA
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alpha
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
ULBP	Proteínas de unión a UL16

## RESUMEN

El cáncer gástrico (CG) es la segunda causa de muerte más común por cáncer en todo el mundo. Las células natural killer (NK) desempeñan un papel importante en la defensa inmune del huésped contra las células transformadas. Estas células expresan el receptor activador NKG2D, cuyos ligandos (NKG2DL), expresados en la superficie celular, pertenecen a las familias MIC (MICA y MICB) y ULBP/RAET (ULBP-1-6). Aunque está bien establecido que estos ligandos son generalmente sobreexpresados en las células tumorales, los tumores son capaces de crecer en huéspedes inmunocompetentes debido a mecanismos de escape del tumor a la inmunovigilancia mediada por el receptor NKG2D. Por ejemplo, el corte proteolítico de MICA a partir de células tumorales constituye una estrategia de escape inmune que disminuye la reactividad antitumoral de los linfocitos citotóxicos que expresan el receptor NKG2D. En consecuencia, los niveles séricos de MICA soluble con frecuencia se encuentran elevados en pacientes con cáncer. El objetivo de este trabajo fue determinar una asociación entre los niveles de expresión de NKG2DL en las células tumorales y niveles séricos de MICA soluble y los parámetros clínicos de pacientes con cáncer gástrico. Dieciséis pacientes con cáncer gástrico del Departamento de Cirugía Digestiva del Hospital del Salvador se incluyeron en este estudio. La expresión de MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2, y ULBP-3 en células derivadas del tumor primario y de la mucosa circundante del estómago se evaluó por citometría de flujo y RT-PCR, y se analizó la correlación de estos resultados con los datos clínicos de los pacientes. Los niveles séricos de MICA soluble (sMICA) se determinaron por ELISA. Se demostró que MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3 se expresan en las células tumorales y de la

mucosa derivadas de adenocarcinoma gástrico, tanto a nivel de membrana celular como de mRNA. Al comparar los niveles de expresión de NKG2DL entre ambos tejidos, se observó que solo el porcentaje de células positivas para ULBP-1 y ULBP-3 es significativamente mayor en la mucosa gástrica que en el tejido tumoral, siendo la expresión de los demás ligandos similar entre ambos tejidos en todos los pacientes evaluados. Los niveles séricos promedio de sMICA en los pacientes con cáncer gástrico y los donantes sanos fueron de 106,1  $\mu\text{g/ml}$  y 60,0  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la concentración de sMICA sérico entre los pacientes con cáncer gástrico y controles sanos. Los niveles de sMICA se correlacionaron inversamente con la expresión de MICA en la superficie de las células tumorales. Por otra parte, cuando las muestras se agruparon según los niveles NKG2DL, los tumores que mostraron mayores niveles de expresión de MICB y ULBP-1 en relación a su respectiva mucosa correspondían a tumores en estados avanzados de la enfermedad, mientras que los tumores cuya expresión de MICB y ULBP-1 fue menor o similar a la mucosa gástrica se encontraban en etapas tempranas de la enfermedad. Nuestras observaciones sugieren que una disminución de NKG2DL en superficie de las células tumorales, mediante la proteólisis de MICA y posiblemente de otros ligandos, podría corresponder a una estrategia de evasión inmune desarrollada por células de adenocarcinoma gástrico, favoreciendo así el establecimiento y desarrollo del tumor.

## ABSTRACT

Gastric cancer (GC) is the second most common cause of cancer death worldwide. Natural killer (NK) cells play an important role in the immune defense of the host against transformed cells. NK cells express the activating receptor NKG2D, whose ligands (NKG2DL), expressed on the cell surface, belong to the MIC (MICA and MICB) and ULBP/RAET (ULBP-1-6) families. Although it is well established that these ligands are generally overexpressed in tumor cells, they can grow in immunocompetent hosts due to mechanisms of tumor escape from NKG2D-mediated immunosurveillance. For instance, proteolytic shedding of MICA from cancer cells represents an immune escape strategy that diminishes antitumor reactivity mediated by NKG2D-bearing cytotoxic lymphocytes. As a consequence, serum levels of soluble MICA are frequently elevated in cancer patients. The aim of this work was to determine an association between the expression levels of NKG2DL on tumor cells and soluble MICA in the serum and clinical parameters of gastric cancer. Sixteen gastric cancer patients from the Departamento de Cirugía Digestiva, Hospital del Salvador, were enrolled in this study. Expression of MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2, and ULBP-3 on cells derived from both, the primary tumor tissue and the surrounding gastric mucosa of patients with gastric adenocarcinoma was evaluated by flow cytometry and RT-PCR, and the correlation of these results to relevant clinical patient data was analyzed. The levels of soluble MICA (sMICA) in the serum were determined by ELISA. Here, we demonstrated that MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2, and ULBP-3 are expressed at the cell membrane and mRNA levels on tumor and mucosal cells derived from gastric adenocarcinoma. Comparing the NKG2DL expression levels in both tissues, we observed that only the percentage of

positives cells for ULBP-1 and ULBP-3 were significantly higher in the gastric mucosa than in the tumor tissue. The average serum levels of sMICA in GC patients and healthy donors were 106,1 pg/ml and 60 pg/ml, respectively. No statistically significant difference was found between sMICA concentration in GC patients and healthy controls. However, sMICA levels were inversely correlated with the expression of cell surface MICA on tumor cells. Moreover, when patient samples were grouped according to each NKG2D ligand expression level, tumors that showed higher expression levels of MICB and ULBP-1 in relation to their matched surrounding mucosa corresponded to tumors at advanced stages of the disease, while tumors whose MICB and ULBP-1 expression was lower or similar than that of the gastric mucosa were at earlier stages of the disease. Our observations suggest that a decrease on surface NKG2DL expression on tumor cells, by proteolysis of MICA and possibly other ligands, might reflect an immune evasion strategy evolved by gastric adenocarcinoma cells, which may contribute to tumor establishment and development.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Cáncer gástrico

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

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

Las opciones de tratamiento para el CG incluyen cirugía, quimioterapia, radioterapia o una combinación de ellas. La cirugía es el único tratamiento potencialmente curativo, lo cual involucra la resección quirúrgica, más comúnmente



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

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

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

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

## **1.2. Sistema Inmune y células NK**

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

Dentro del sistema inmune innato, uno de los componentes más importantes son las células "natural killer" (NK) (células citolíticas naturales), las cuales corresponden a la primera línea de defensa contra ciertas infecciones virales y tumores (Trinchieri, 1989). Estas células son capaces de reconocer y lisar células tumorales e infectadas con virus sin sensibilización previa (Cerwenka & Lanier, 2001). Las células NK son linfocitos derivados de la médula ósea, y la mayoría se encuentra localizada en la sangre periférica, linfonodos, bazo y médula ósea (Ferlazzo y col, 2004), aunque pueden ser inducidas a migrar hacia el sitio de inflamación por diferentes quimioattractantes (Robertson, 2002). En humanos, las células NK comprenden entre un 5-20% de los linfocitos de sangre periférica. De acuerdo a sus marcadores de

superficie celular, normalmente están definidas como CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> y se pueden dividir en dos sub-poblaciones principales: CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> y CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>. La población CD56<sup>dim</sup> predomina en la sangre periférica (aproximadamente 95% de las células NK) y en los sitios de inflamación, y presenta un alto potencial citotóxico. Al contrario, la células de la población CD56<sup>bright</sup> predominan en los linfonodos (aproximadamente 75% de las células NK). Una vez activadas, producen principalmente citoquinas y poseen baja actividad citotóxica (Farag & Caligiuri, 2006).

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

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

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

### **1.3. Activación de las células NK**

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

### **1.4. Receptor NKG2D (Natural Killer Group 2, type D)**

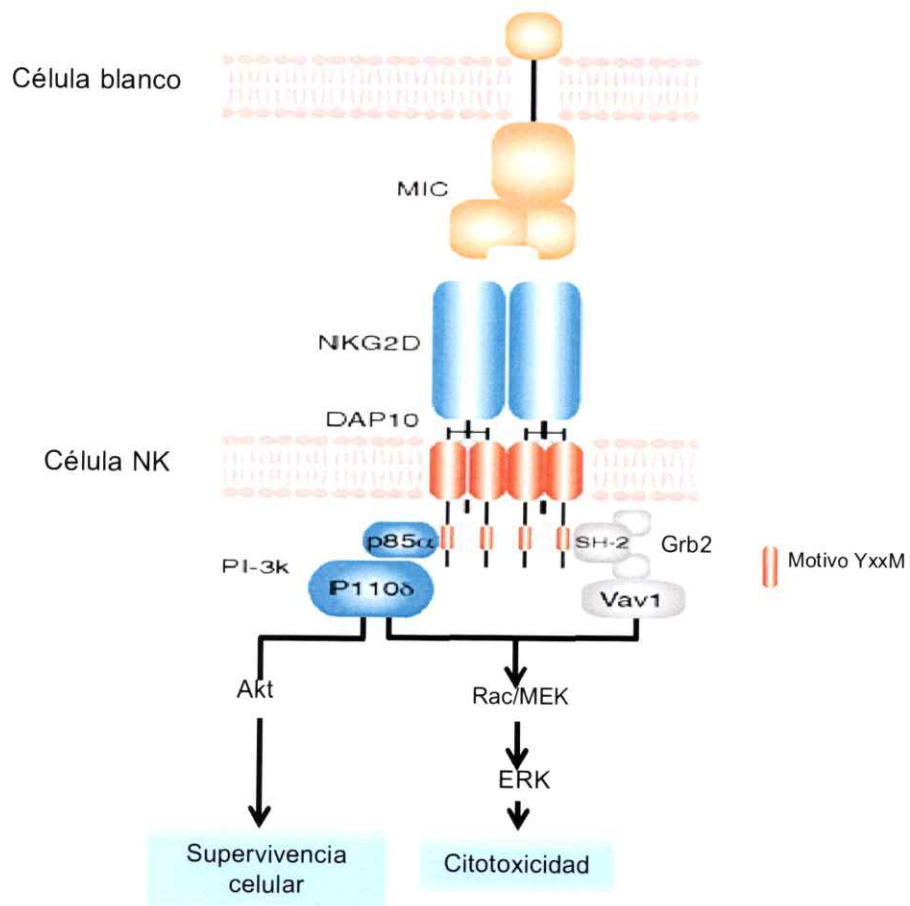
Dentro de los receptores activadores de las células NK, el receptor NKG2D es uno de los que ha sido mejor caracterizado. Este receptor es una proteína de transmembrana de tipo II que pertenece a la familia de lectinas de tipo C (Houchins y col, 1991), y se expresa en células NK, células NKT, linfocitos T  $\gamma\delta$  y algunos linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos. El receptor NKG2D consiste en dos proteínas de transmembrana de tipo II unidas por un puente de disulfuro. El dominio de transmembrana posee aminoácidos cargados positivamente; el dominio intracelular es muy corto y no tiene propiedad de señalización, por lo que, para la transducción de señales, NKG2D se asocia, como muchos otros receptores activadores, con proteínas adaptadoras por medio de los residuos ITAMs cargados en su dominio de transmembrana. En humanos, el receptor NKG2D forma un complejo con la molécula adaptadora DAP10 (proteína activadora DNAX de 10 kDa), la cual se asocia con el receptor NKG2D como homodímeros (Wu y col, 1999). El complejo de señalización NKG2D forma una estructura hexamérica debido a que cada homodímero de NKG2D se une dos

homodímeros de moléculas adaptadoras (Garrity y col, 2005). DAP10 tiene en su cola citoplasmática un motivo Tyr-Ile-Asn-Met (YINM), que, al ser fosforilado, recluta la subunidad p85 de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y a la proteína adaptadora Grb2 (proteína 2 de unión al receptor de factor de crecimiento), la cual interacciona con Vav1 (ver Figura 1) (Upshaw y col, 2006). Esta señal estimula la proliferación y citotoxicidad de las células NK, y provee de co-estimulación a los linfocitos T activados (Chang y col, 1999; Wu y col, 2000; Wu y col, 1999).

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

### **1.5. Ligandos del receptor NKG2D**

Una de las características más notables del sistema NKG2D es la diversidad de ligandos que se pueden unir a este receptor invariante. Los ligandos de NKG2D (NKG2DL) son homólogos estructurales de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I (MHC-I), pero están lejanamente relacionados.



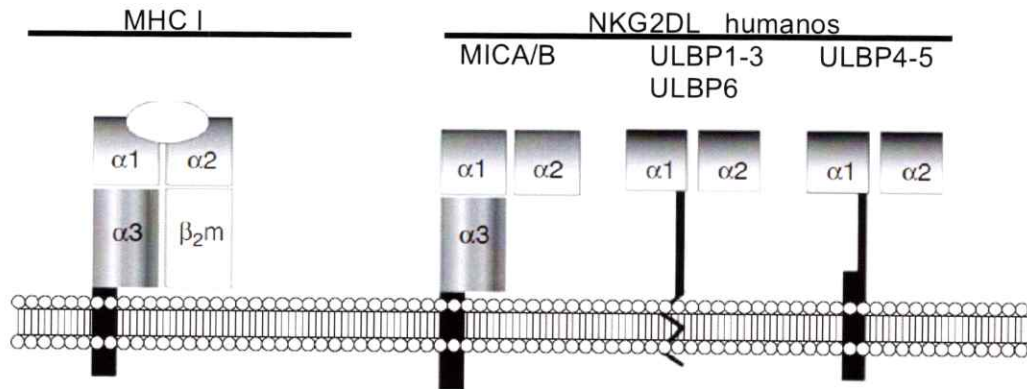
**Figura 1. Esquema representativo de señalización del receptor NKG2D.** Estimulación de las células NK vía receptor NKG2D: La unión del receptor NKG2D a su ligando en la célula blanco resulta en la fosforilación de DAP10 y reclutamiento de PI3K y Grb2-Vav1. Posteriormente, la señal río abajo es desencadenada,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

En humanos, se han descrito dos familias de NKG2DL: la familia de proteínas relacionadas con la cadena de MHC-I (MIC), MICA y MICB, cuyos genes se codifican dentro del complejo principal de histocompatibilidad clase I (Bauer y col, 1999) y la familia de proteínas de unión a la molécula UL16 del citomegalovirus, la cual contiene 6 miembros descritos (ULBP1-6) (Champsaur & Lanier, 2010). Del mismo modo que las moléculas de MHC-I, las proteínas MIC poseen 3 dominios extracelulares ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , y  $\alpha 3$ ), una región transmembrana y un dominio citoplasmático corto. Los miembros de la familia ULBP son estructuralmente similares a MIC, pero carecen del dominio  $\alpha 3$ . Sin embargo, a diferencia de las moléculas de MHC-I, los NKG2DL no se asocian a la molécula  $\beta 2$ -microglobulina y tampoco unen péptidos (Figura 2) (Li y col, 2001).

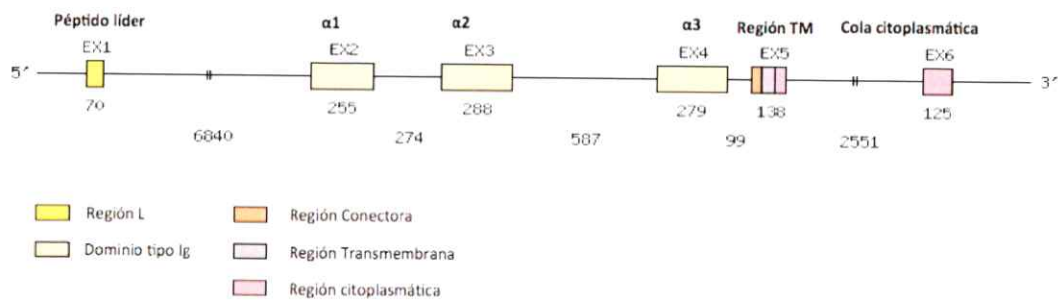
#### **1.6. MICA**

El gen de MICA es transcrito en un RNAm de 1.382 pb, originando un polipéptido de 383 aminoácidos con un peso molecular de 43 kDa (Bahram y col, 1994). La proteína MICA es altamente glicosilada, ya que tiene 8 sitios potenciales de N-glicosilación ubicados a lo largo de los 3 dominios extracelulares, por lo que la proteína madura tiene un peso molecular 65 kDa (Groh y col, 1996) (Figura 3).

Además, MICA es una proteína altamente polimórfica: 91 alelos han sido identificados hasta ahora (base de datos IMGT).



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



**Figura 3. Organización exón/intrón del gen MICA.** El gen MICA contiene 6 exones que codifican para un péptido líder (Región L, exón 1), 3 dominios extracelulares ( $\alpha 1$ -3) (exones 2,3 y 4, respetivamente), un dominio de transmembrana (exón 5), y un dominio citoplasmático (exón 6). El largo de los exones e intrones están representados en pares de bases. Adaptada de (Frigoul & Lefranc, 2005).



### 1.7. Expresión de NKG2DLs

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

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

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

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que las células NK pueden eliminar células tumorales (Stagg & Smyth, 2007). Además, la expresión de NKG2DL en tumores los hace susceptibles a su eliminación por las células NK *in vitro* (Bauer y col, 1999), y la formación de tumores puede ser prevenida a través de la señalización vía

receptor NKG2D (Smyth y col, 2005). Estudios *in vivo* han demostrado que la expresión de NKG2DLs en las células tumorales luego de ser transplantadas en ratón, resulta en la eliminación del tumor mediada por NKG2D (Cerwenka y col, 2001; Dieffenbach y col, 2001). Además, se ha demostrado que la regulación negativa o el *knockout* del receptor NKG2D en ratones resulta en una respuesta inmune comprometida contra células tumorales, un mayor nivel de expresión de los ligandos de NKG2D y una elevada incidencia de ciertos tumores (Guerra y col, 2008; Wiemann y col, 2005).

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

### **1.8. Evasión del sistema inmune**

Aunque los tumores expresen NKG2DL, estos son capaces de crecer progresivamente debido a múltiples mecanismos de evasión de la respuesta inmune (Oppenheim y col, 2005). Las células tumorales utilizan diversas estrategias para prevenir su eliminación mediada por el receptor NKG2D. Una de estas corresponde a la regulación negativa de los NKG2DL. Se ha demostrado que muchos tumores inhiben activamente la expresión de NKG2DL (Sers y col, 2009). Un mecanismo importante para la regulación negativa de los NKG2DL sería la producción de citoquinas inmunomoduladoras, como el TGF- $\beta$ , el cual puede ser secretado directamente por las propias células tumorales o por células inmunoregulatorias que se expanden durante la progresión del tumor (Eisele y col, 2006; Ghiringhelli y col, 2005). En nuestro

laboratorio, se demostró que IL-10, una citoquina inmunosupresora, también reduce la expresión de NKG2DL en la superficie de células de melanoma, afectando la citotoxicidad mediada por las células NK (Serrano y col, 2010).

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

Debido al hecho de que altos niveles de sMICA en el suero de pacientes con algunos tipos de cáncer se correlacionan significativamente con el estadio del cáncer, diferenciación y metástasis, este ligando soluble podría ser usado como marcador para la progresión del tumor (Salih y col, 2008).

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

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

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

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

Por lo tanto, es de gran interés estudiar la expresión de NKG2DL tanto en superficie de células derivadas del tumor gástrico como en forma soluble, y así poder entender mejor los mecanismos mediante los cuales el cáncer gástrico evade la respuesta inmune antitumoral, ya que estos podrían contribuir al desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y fármacos para el tratamiento de esta enfermedad.

### **1.9. Hipótesis**

En adenocarcinoma gástrico humano, una alta expresión de NKG2DL en células derivadas del tumor o en forma soluble en el suero se asocia con la progresión de la enfermedad y/o la sobrevida del paciente.

### **1.10. Objetivos**

#### **1.11. Objetivo general**

Evaluar la expresión de ligandos de NKG2D en células derivadas del tumor, así como cuantificar MICA soluble en el suero en pacientes con adenocarcinoma gástrico y correlacionar estos parámetros con las características clínico-patológicas de los pacientes.

#### **1.12. Objetivos específicos**

- I. Evaluar patrones de expresión de MICA y otros ligandos de NKG2D, tanto a nivel de mRNA como de expresión protéica, en células derivadas de tumor de pacientes con cáncer gástrico.
- II. Medir la expresión de MICA soluble en el suero de pacientes con cáncer gástrico.
- III. Correlacionar los niveles de expresión de los ligandos de NKG2D (en superficie celular y, en el caso de MICA, su variante soluble) con parámetros clínico-patológicos de la enfermedad.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Pacientes

Para realizar este estudio, se reclutaron 16 pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a gastrectomía en el Hospital Salvador en colaboración con el Dr. Marco Bustamante, Director del Departamento de Cirugía de este Hospital. Previamente a la recolección de muestras, se obtuvo una autorización firmada por el paciente a través de un Consentimiento Informado (Anexo 1). Para el estudio, se incluyeron pacientes con tumores localizados; tanto las muestras tumorales como tejido de la mucosa gástrica adyacente al tumor, se recolectaron durante la cirugía. Además, se obtuvieron muestras de suero para cada paciente con CG y de 16 voluntarios sanos (grupo control), los que también firmaron un Consentimiento Informado (Anexo 2). El criterio de exclusión de los pacientes fue haber tenido un tratamiento de quimioterapia y/o radioterapia previo a la cirugía. El protocolo de estudio se aprobó por el Comité de Ética Científico del Servicio de Salud Metropolitano Oriente del Gobierno de Chile (Anexo 3) y por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Anexo 4). La Tabla 1 indica los datos demográficos y clínico-patológicos de los pacientes, reclutados en el presente estudio.

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

	n (pacientes)	%
<b>Género</b>		
Masculino	11	68,8
Femenino	5	31,3
<b>Tamaño tumor</b>		
≤ 4 cm	6	37,5
> 4 cm	10	62,5
<b>Diferenciación tumoral</b>		
alta/mediana	6	42,9
baja/ninguna	8	57,1
<b>Profundidad de invasión<sup>a</sup></b>		
T1, T2	5	31,3
T3, T4	11	68,8
<b>Metástasis nodos linfáticos</b>		
Ausente	6	37,5
Presente	10	62,5
<b>Estadio TNM<sup>b</sup></b>		
I, II	8	50,0
III, IV	8	50,0

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



## **2.2. Análisis de expresión de NKG2DLs en la superficie de células tumorales y de mucosa gástrica**

### **2.2.1. Preparación de suspensiones celulares desde el tejido tumoral y de mucosa gástrica adyacente al tumor**

Las muestras de tejido tumoral y mucosa adyacente se transportaron en forma separada en medio HBSS (Gibco, EE.UU.) suplementando con penicilina/estreptomicina al 1% (Hyclone, EE.UU.). Los tejidos se cortaron en pequeñas piezas usando hojas de bisturí estériles y se disgregaron mecánicamente mediante el uso de agujas y émbolos de una jeringa en medio RPMI suplementando con 1% penicilina/estreptomicina y 3% de suero fetal bovino (SFB) (Hyclone, EE.UU.). El tejido disociado se filtró por un "cell strainer" de 70  $\mu\text{m}$  (BD Falcon, EE.UU.). Las células se centrifugaron a 805 $\times$  g por 10 min a 4°C y el pellet se incubó con buffer de lisis de eritrocitos por 10 min a temperatura ambiente. Luego, las células se lavaron con medio RPMI suplementado SFB al 3% y se evaluó la viabilidad celular mediante la tinción con azul de Tripán.

### **2.2.2. Citometría de flujo**

Las suspensiones celulares obtenidas de los tejidos de tumor primario y de la mucosa adyacente se resuspendieron en 1% de paraformaldehído (PFA) en PBS con SFB al 1% (PBS-SFB 1%) e incubaron en hielo por 30 min. Las células se transfirieron a una placa de 96 pocillos con fondo en "V" (Nunc Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) y se centrifugaron a 805  $\times$  g por 3 min a 4°C. Al menos 2  $\times$  10<sup>5</sup> células se tiñeron individualmente con anticuerpos monoclonales (AcMo) purificados de ratón anti-MICA, MICB, MICB, ULBP-1, ULBP-2, y ULBP-3 humanos (todos de R&D Systems, EE.UU.)



a una dilución de 1:25 en PBS-SFB 1%, como también con el mAb anti-CD44 humano (BD Pharmingen, EE.UU.) a una dilución de 1:100 en PBS-SFB 1%. El anticuerpo purificado de ratón IgG2b (Santa Cruz Biotech, EE.UU.) se utilizó como control de isotipo. Las células se incubaron a 4°C toda la noche. Luego de tres lavados con PBS-SFB 1%, se agregó el anticuerpo secundario de cabra anti ratón conjugado a isocianato de fluoresceína (FITC) (KPL, EE.UU.) en un dilución 1:50 en PBS-SFB 1%, y las células se incubaron por 30 min a 4°C. Otro paso de lavado se llevó a cabo, y las células se fijaron finalmente en 1% de PFA previo al análisis mediante citometría de flujo. Esta se realizó usando el citómetro FACScalibur, los datos se adquirieron con el programa CellQuest (ambos de Becton-Dickinson, EE.UU.) y se analizaron usando el software FlowJo v7.6 (Tree Star). Las células muertas se excluyeron de acuerdo a sus características de tamaño (side scatter (SSC)) y granularidad (forward scatter (FSC)). Se recolectaron y analizaron un promedio de 20.000 eventos por muestra.

### **2.3. Análisis de los niveles de mRNA de NKG2DLs por RT-PCR semicuantitativo**

#### **2.3.1. Extracción de RNA total**

Se obtuvieron muestras frescas de los tejidos tumorales y de mucosa adyacente de aproximadamente 3 mm<sup>3</sup>, las cuales se obtuvieron igualmente durante la gastrectomía, se transportaron de forma separada en 1 ml de RNAlater<sup>®</sup> RNA Stabilization Reagent (Qiagen, Alemania) en hielo, y mantuvieron a -20°C hasta su uso. El RNA total de las muestras se extrajo usando el kit RNeasy (Qiagen, Alemania), según las instrucciones del fabricante, y la concentración de RNA se determinó en un espectrofotómetro (Biotek, EE.UU.).

### 2.3.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa-formaldehído

La integridad del RNA se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% en tampón MOPS (MOPS 20 mM, acetato de sodio 5 mM, EDTA 1 mM), formaldehído (2,2 M) y bromuro de etidio (0,1 µg/ml). Para cada muestra, 1 µg de RNA se mezcló con el tampón de carga de RNA 5X, el que fue preparado según lo descrito en el protocolo del kit RNeasy Mini. Luego, se incubó por 5 min a 65°C e inmediatamente se enfrió en hielo; el gel se corrió a 50 V durante 45 min.

### 2.3.3. Reacción semicuantitativa en cadena de la polimerasa retrotranscrita (sqRT-PCR)

El RNA se trató con DNAasa I (Fermentas, EE.UU.) para remover el DNA contaminante. Se llevó a cabo la reacción usando 5 µg RNA, 1X de tampón de reacción con MgCl<sub>2</sub>, 5U de DNAasa I en un volumen final de 50 µl. Se incubó durante 30 min a 37°C y después se agregó EDTA a una concentración final de 1mM; luego, se llevó la mezcla a 60°C por 10 min. Posteriormente, 1 µg de este RNA se sometió a la reacción de transcripción reversa usando la enzima del virus de leucemia murina Moloney (M-MLV RT) y oligo(dT) (ambos de Promega, EE.UU.), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El cDNA resultante se amplificó en el termociclador Mastercycler<sup>®</sup> gradient PCR (Eppendorf, EE.UU.) usando partidores indicados en la Tabla 2. Los partidores diseñados para los NKG2DLs fueron sintetizados en *Integrated DNA Technologies* (IDT, EE.UU.). Se preparó la reacción de PCR que incluía 2 µl de cDNA, 1,25 U de DNA Polimerasa Paq5000<sup>™</sup> (Stratagene, EE.UU.), 0,8 mM de dNTPs, 1X Tampón de reacción Paq5000<sup>™</sup> (Stratagene, EE.UU.) y 0,2 µM de cada uno de los partidores específicos para cada gen en un volumen final de 25 µl. En general, las condiciones para el PCR fueron las siguientes: un paso inicial de

denaturación de 3 min a 95°C, seguido por 25-3 ciclos de 20 s a 95°C, 20 s a 55-58°C (dependiendo del par de partidores, ver Tabla 2), y 15 s a 72°C, con un paso final de elongación de 5 min a 72°C. Para cada gen, el número de ciclos de PCR indicado en la Tabla 2 corresponde al 50% de la curva de saturación de los productos de PCR.

**Tabla 2. Partidores y condiciones de amplificación usados para el análisis de RT-PCR semicuantitativo.**

Gen	Secuencia 5'-3'		Tamaño del producto (pb)	Temperatura de Annealing (°C)	Numero de ciclos PCR
	Partidor Directo	Partidor Reverso			
$\beta$ -actina (ACTB)	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	234	55	25
MICA	TGTAAGAAGAAAACATCAGCT	ATAGGTCAGGAAACTGAGGCAC	248	55	32
MICB	TCACGGGTTTCATTCAAGTTGGC	ACAGCACCATGAGGTTGTAACG	166	58	36
ULBP1	ACGGAGCTCCAGGTCTACAATG	GTGGTTCAGGTCTGGACTTAGG	161	58	36
ULBP2	CTCTCCTCCATCAAGTCTC	TGGTCCAGGTCTGAACTTAG	186	56	36
ULBP3	AGAAGTGGGAGAAGGATAGCG	TGGCTATGGCTTGGGTTGAG	165	56	36

pb: pares de bases

#### 2.3.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 80 mM, EDTA 2 mM) con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Alícuotas (10 µl) de cada reacción de PCR se mezclaron con el tampón de carga 6X (glicerol 60%, Tris-HCl (pH 7,6) 10 mM, azul de bromofenol 0,03%, xileno cianol 0,03%). Los geles se visualizaron en un transiluminador ultravioleta, fotografiados con una cámara digital SONY®, modelo Cyber-shot DSC-W220, y la intensidad de fluorescencia de las bandas se analizó usando el software ImageJ 1.43u (National Institutes of Health, EE.UU.). Los niveles de expresión de mRNA para cada

muestra se determinaron como la razón entre la intensidad de banda de cada NKG2DL y de  $\beta$ -actina.

## **2.4. Determinación de la expresión de MICA soluble en el suero de pacientes con cáncer gástrico**

### **2.4.1. Cepa de *Escherichia coli* y plasmidio**

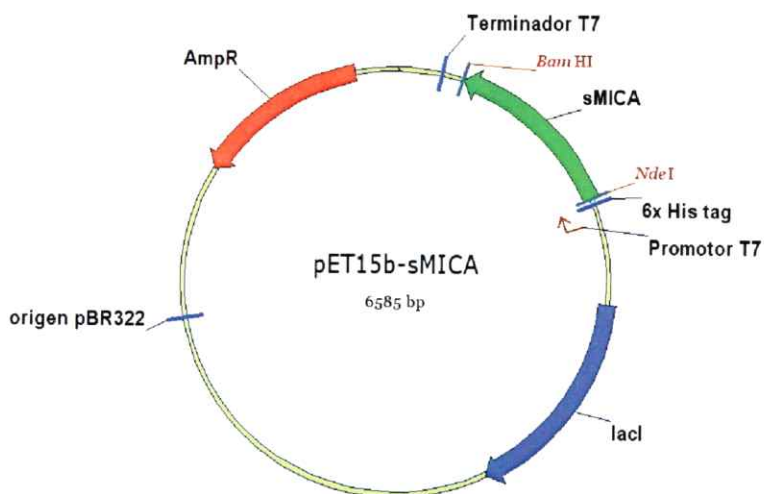
La cepa bacteriana usada en este trabajo fue *Escherichia coli* BL21(DE3). Esta cepa posee una copia cromosomal del gen de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 que está bajo el control de un promotor inducible por IPTG, por lo que son capaces de expresar los genes regidos por el promotor T7.

Anteriormente, en el laboratorio, se construyó el vector de expresión pET15b-sMICA (Figura 4) y se transformó *E. coli* BL21(DE3) con este plasmidio. Este vector deriva del vector pET15b, en el cual se clonó el cDNA que codifica para el dominio extracelular de MICA, el que queda bajo el control del promotor de *T7lac*. El vector pET15b permite agregar una secuencia de residuos de histidina en el extremo amino terminal de la proteína expresada, lo que va permitir su posterior purificación. Además, como marcador de selección, posee un gen de resistencia a ampicilina (Amp<sup>R</sup>).

### **2.4.2. Expresión de rMICA en *E. coli* BL21(DE3) [pET15b-sMICA]**

Para obtención de MICA recombinante (rMICA), se inoculó 2 ml de medio LB (peptona 10 g/l, extracto de levadura peptona 5 g/l, NaCl 5 g/l) suplementado con antibiótico (100  $\mu$ g/ml de ampicilina) con *E. coli* transformada con el vector pET15b-MICA o pET15b y se dejaron crecer a 37°C en agitación (150 rpm) durante toda la noche. Con este cultivo, se inoculó medio LB suplementado con ampicilina y se dejó

incubando a 37°C en agitación hasta que alcanzó una densidad óptica de 0,6, aproximadamente. Cada cultivo se dividió en dos: a un cultivo se agregó 1 mM isopropil-sopr1-tiogalactopiranosido (IPTG) (US Biological, EE.UU) mientras que al otro no y se incubaron durante 3 h a 37°C con agitación de 150 rpm. Luego, se centrifugaron los cultivos a  $805 \times g$  por 30 min, y el pellet se resuspendió con el tampón de lisis (Tris 50 mM, Triton 1%, DOC 0,2 %, Glicerol 5%, pH 8.0). Una vez lisado, se centrifugó la mezcla para separar las fracciones solubles e insolubles, y se tomaron alícuotas del lisado y de la fracciones solubles e insolubles, las que se analizaron por SDS-PAGE.



**Figura 4. Representación esquemática del vector de expresión pET15b-sMICA.** Vector diseñado para la expresión del dominio extracelular de MICA. En el esquema del plasmidio, se indican los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI*, los cuales corresponden a los utilizados para clonar el cDNA de sMICA. Este, está bajo el control del promotor T7lac. Además, el plasmidio contiene un gen de resistencia a ampicilina (AmpR), el gen *lacI*, y el origen de replicación de pBR322.

### 2.4.3. Purificación de rMICA

Se inoculó 5 ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina con *E. coli* transformada con el vector pET15b-MICA y se dejó crecer a 37°C con agitación de 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente, con este medio, se inocularon 200 ml de medio de autoinducción (peptona 1%, extracto de levadura 0,5%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM, NH<sub>4</sub>Cl 50 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, citrato trisódico 1mM, traza de metales 1X, glicerol 0,5%, glucosa 0,05%, lactosa 0,2%) y se dejó incubando a 25°C por aproximadamente 24 h (Studier, 2005). Se centrifugó el cultivo a 3220 × *g* y 4°C y luego el pellet celular se resuspendió en tampón de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM, pH 8.0, NaCl 250 mM, imidazol 20 mM, Triton 0,1%), al cual se agregó una pastilla de inhibidores de proteasas (Roche, Suiza). La suspensión se sometió a 6 ciclos de 20 s de sonicación en hielo, seguido de 1 min de reposo entre cada ciclo. Luego, el lisado se centrifugó a 3220 × *g* por 30 min a 4°C y el sobrenadante se dejó incubando con 1 ml de resina de agarosa Ni-NTA (Invitrogen, EE.UU.) en agitación a 4°C toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 201 × *g* por 5 min, se removió el sobrenadante y la resina se lavó con el tampón de lavado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM pH 8.0, NaCl 250 mM, imidazole 30 mM) 4 veces. Finalmente, se agregó la resina con tampón de lavado en una columna. Una vez eluido el tampón de lavado, se agregaron 5 ml de tampón de elución (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM, pH 8.0, NaCl 250 mM, imidazole 30 mM), y se recolectaron fracciones de 500 µl. Posteriormente, las fracciones eluidas se separaron por SDS-PAGE y analizadas mediante Western blot usando un anticuerpo anti-MICA y anti-poli-histidina.

#### 2.4.4. SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó según el procedimiento descrito por Laemmli (Laemmli y col, 1970) en un sistema minigel vertical Mini-PROTEAN® Tetra cell (Bio-Rad, EE.UU.). Se prepararon geles de poliacrilamida discontinuos, con un gel de separación de poliacrilamida al 12% o 15% y un gel de apilamiento de poliacrilamida al 5%. Las muestras a analizar se mezclaron con el tampón de carga de proteína 5X (Tris 150 mM pH 6.8, glicerol 50%, SDS 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,02%) y se llevó a 95°C durante 5 min. Se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular en el gel, seguido de la corrida electroforética, la cual se llevó a cabo en buffer de corrida (Tris 25 mM, Glicina 190 mM, SDS 0,1%, pH 8.3) durante 15 min a 50 V y luego a 90 min a 100 V. Se utilizó el marcador de peso molecular de proteínas preteñido (10 a 170 kDa) (Thermo Scientific, EE.UU.).

#### 2.4.5. Western Blot

Ya corrido el gel de poliacrilamida, las proteínas se detectaron mediante la tinción con azul de Coomassie o se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, Suecia) en tampón de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 190 mM y metanol 20%) a 100 V durante 1 h a 4°C para análisis por Western blot. Luego, se bloqueó la membrana usando una solución de leche descremada al 3% en TBS-Tween 0,1 % (NaCl 150 mM, Tris-Cl 20 mM, pH 7,5 y Tween-20 0,1%) durante 1 h a temperatura ambiente. Para detectar rMICA o la cola de histidina de la proteína recombinante, se incubó la membrana durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal (AcPo) de conejo anti-MICA (ab63709, Abcam, Inglaterra) o un anticuerpo monoclonal (AcMo) de ratón anti-poli-histidina (clon HIS-1, Sigma, EE.UU.) diluido

1:3000 y 1:1000, respectivamente, en TBST-Leche 3%. Las membranas fueron lavadas con TBST, y luego se agregó un anticuerpo (IgG) de cabra anti conejo o ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) (ambos de Sigma, EE.UU.) diluido 1:6000 en TBST-Leche 3%. Finalmente, se procedió a la detección usando el reactivo ECL (Thermo Scientific, EE.UU.), según las indicaciones del fabricante.

#### **2.4.6. Tinción con azul de Coomassie**

Terminada la electroforesis, los geles de poliacrilamida se dejaron 1 h incubando en la solución de tinción (metanol 50%, ácido acético 10%, azul de Coomassie brillante R-250 0,25%) en agitación. Luego, la destinción del gel se realizó por medio de varios lavados con solución de destinción (metanol 15% y ácido acético 10%), hasta que el contraste de las bandas correspondientes a las proteínas y el fondo fuera adecuado.

#### **2.4.7. Cuantificación de proteínas**

La concentración de proteína total se determinó utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, EE.UU.) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.



## **2.5. Estandarización de ensayo de ELISA para la detección de MICA soluble en suero de pacientes con cáncer gástrico**

### **2.5.1. Estandarización de anticuerpos de captura y detección del ensayo de ELISA**

Con el fin de desarrollar el ensayo de ELISA de captura para la detección de MICA en el suero de pacientes, previamente en el laboratorio se generaron AcPo que fuesen capaces de detectar la fracción soluble de MICA. Los AcPo generados se purificaron a partir del suero de un conejo inmunizado con rMICA mediante absorción por proteína A. Se sensibilizó una placa de poliestireno de 96 pocillos MaxiSorp (Nunc, EE.UU.) con un AcMo comercial de captura de ratón anti-MICA (clon 159233, R&D Systems, EE.UU.) o con AcPo anti-MICA (generados anteriormente en el laboratorio) en una concentración de 4 µg/ml y 10 µg/ml, respectivamente, en tampón carbonato-bicarbonato 0.05 M pH 9.6. Se incubó durante 18 h a 4°C. Al día siguiente, se bloqueó con una solución de tampón fosfato y albumina al 1 % (PBS-BSA 1%) durante 2 h a 37°C; luego, se lavó 4 veces con PBS-Tween 20 0.05% (PBST). Se prepararon diluciones seriadas del estándar de rMICA para la curva de calibración en la solución de bloqueo, al igual que los controles, y se incubaron durante 2 h a 37°C. Posteriormente, se lavaron las placas 4 veces con PBST y se añadió el anticuerpo de detección: un AcPo biotinilado de cabra anti-MICA humano (BAF1300, R&D Systems, EE.UU.) 0,2 µg/ml en PBS-BSA 1% y se dejó durante 1 h a 37°C. Después de 4 lavados con PBST, se incubó con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) (Sigma, EE.UU.) diluida en PBS-BSA 1% a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, se realizaron 7 lavados, se agregó el sustrato TMB (3,3',5,5' Tetrametil-bencidina, Thermo Scientific, EE.UU.) y se dejó incubando por 30 min. La



reacción se detuvo agregando ácido sulfúrico 2N y finalmente se leyó la densidad óptica a 450 nm en un lector de ELISA (TECAN, Suiza).

### **2.5.2. Estandarización de solución de bloqueo para ELISA**

Se sensibilizó una placa de poliestireno de 96 pocillos (Nunc, EE.UU.) con el AcPo anti-MICA en una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$ ; como blanco, se agregó solamente tampón carbonato. Se utilizaron distintas soluciones para bloquear: PBS-BSA 1%, PBS-SFB 10% y PBS-caseína 1%. Se incubó con 1000  $\mu\text{g/ml}$  de rMICA diluido en la respectiva solución de bloqueo. Luego, se incubó con 0,2  $\mu\text{g/ml}$  del AcPo biotinilado de cabra anti-MICA humano y después con la estreptavidina-HRP diluido en la solución de bloqueo correspondiente. Las condiciones de incubación y lavado fueron las mismas previamente descritas para el ELISA *sandwich* anteriormente (Sección 4.4.1).

### **2.5.3. Optimización del anticuerpo de captura**

Se sensibilizó la placa con 5, 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$  de AcPo anti-MICA humano. Se bloqueó con PBS-caseína 1% y se incubó con 10  $\text{ng/ml}$ , 100  $\text{ng/ml}$  ó 1000  $\text{ng/ml}$  de rMICA. El anticuerpo de detección AcPo biotinilado de cabra anti-MICA humano se agregó a una concentración de 0,3  $\mu\text{g/ml}$ , seguido de incubación con estreptavidina-HRP diluida 1:2000. Lo anterior se realizó utilizando las mismas condiciones de incubación y lavado antes mencionadas para el ELISA *sandwich* (Sección 4.4.1).

### **2.5.4. Estandarización de anticuerpo de detección y estreptavidina-HRP**

El ELISA se llevó a cabo según las condiciones ya mencionadas. La placa se sensibilizó con 20  $\mu\text{g/ml}$  de AcPo anti-MICA humano. Ya bloqueada, se incubó con 1000  $\text{ng/ml}$  de rMICA. En este caso, se utilizaron distintas concentraciones para el

anticuerpo de detección: 0,6 µg/ml, 0,3 µg/ml, 0,15 µg/ml y 0,075 µg/ml. Además, se incubó con estreptavidina-HRP en una dilución 1:2000 y 1:4000.

#### **2.5.5. ELISA estandarizado para detección de MICA soluble**

Se sensibilizaron placas de 96 pocillos (Nunc, EE.UU.) con el anticuerpo de captura AcPo anti-MICA humano a 20 µg/ml en buffer carbonato pH 9,6 toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se bloqueó con 2,5% caseína-PBS por 2 h a 37°C y se lavó 4 veces con PBST. Las muestras de suero de pacientes, controles y estándares se incubaron en las placas hasta el día siguiente a 4°C. Se lavó la placa 4 veces con PBST y se agregó el anticuerpo de detección (AcMo anti-MICA humano biotinilado) a 0,3 µg/ml en PBS-caseína 1% y se incubó durante 2 h a 37°C. Se volvió a realizar otro lavado, se agregó estreptavidina-HRP en PBS-caseína 1% diluido 1:2000 y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 6 lavados, se agregó el sustrato TMB; después de 30 min, se detuvo la reacción agregando ácido sulfúrico 2N y finalmente se leyeron los resultados a 450 nm en un lector de ELISA.

#### **2.5.6. Kit de ELISA para detectar MICA humano (BAMOMAB)**

Finalmente, para la detección de MICA soluble en el suero de pacientes con cáncer gástrico y controles sanos, se ocupó el kit de ELISA para sMICA humano (BAMOMAB, Alemania) y se siguieron las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones indicadas a continuación. En resumen, las placas se sensibilizaron con el AcMo de captura anti-MICA AMO1 a 5 µg/ml en PBS durante la noche. Luego, se bloquearon con PBS-BSA 15% y se incubó durante 1 h a 37°C, se lavaron e incubaron con la proteína estándar (sMICA\*004 recombinante producida en *E. coli*) o suero de paciente (o controles), los cuales se dejaron incubando durante la noche. Los sueros

se diluyeron 1:3 en PBS-BSA 7,5%. Después, las placas se lavaron, se incubaron con el AcMo de detección BAMO3 a 1 µg/ml durante 2 hr a 37°C, se lavaron de nuevo, se añadió el anticuerpo anti-ratón IgG2a conjugado a HRP (dilución 1:3000) (Southern Biotechnologies, EE.UU.) y se incubó durante 1 h a 37°C. Finalmente, las placas se lavaron y revelaron usando TMB y la absorbancia se midió a 450 nm en un lector de ELISA.

## **2.6. Correlación entre los niveles de expresión de los ligandos del receptor NKG2D con parámetros clínico-patológicos de la enfermedad**

Se analizaron las fichas clínicas de cada paciente con adenocarcinoma gástrico incluidos en este estudio, y se clasificaron de acuerdo al resultado obtenido en las respectivas biopsias para el tamaño del tumor, estadio de invasión tumoral, metástasis hacia linfonodos y estado TNM (los cuales se refieren a la extensión del tumor primario, la propagación del tumor cercana a los linfonodos y a la presencia de metástasis a otros órganos) (Tabla 1). Sistema de clasificación propuesto por la AJCC 7<sup>a</sup> edición (Washington, 2010). Se determinó la asociación entre los niveles de expresión y células positivas para los NKG2DLs estudiados o CD44 en superficie celular por citometría de flujo, la presencia de MICA soluble en el suero de pacientes y los distintos parámetros clínico patológicos de la enfermedad.

## 2.7. Análisis estadístico

Primero se llevó a cabo el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov en cada grupo para determinar si los datos muestran una distribución normal. La evaluación estadística de la diferencia de la expresión y frecuencia de NKG2DLs entre el tumor y la mucosa se llevó a cabo usando el test de Wilcoxon o test t pareado. Las diferencias entre la expresión y frecuencia de NKG2DLs del tumor entre los grupos correspondientes al tamaño del tumor y otros parámetros clínico patológicos se evaluaron utilizando el test de Mann-Whitney o test t no pareado.

Las curvas de sobrevida fueron generadas según el método de Kaplan-Meier y la diferencia entre las curvas de sobrevida se analizaron por el test log-rank. Todos los pacientes cuyas muertes fueron asociadas con el CG, incluyendo aquellos que murieron de complicaciones post operativas, se incluyeron en el análisis de sobrevida.

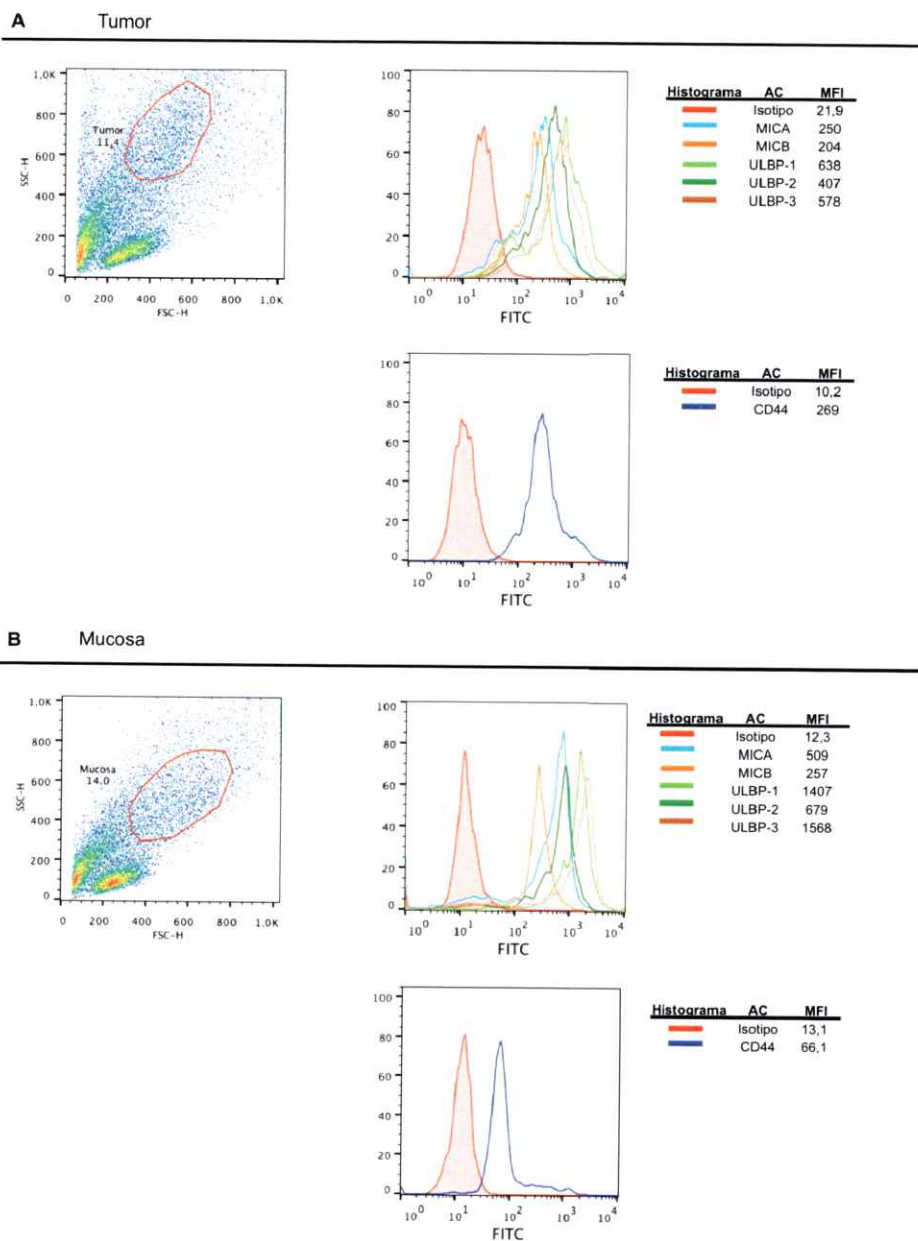
Todos los datos se analizaron con el software GraphPad Prism, versión 5 (EE.UU.), y los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Expresión de ligandos de NKG2D, a nivel de proteico y de mRNA, en células derivadas del tumor primario de pacientes con cáncer gástrico

Durante este estudio, se analizaron 16 pacientes con adenocarcinoma gástrico sometidos a gastrectomía total, 5 mujeres y 11 hombres, con un promedio de edad de 61,1 años. La Tabla 1 resume los diversos datos demográficos, clínicos, patológicos y operatorios correspondientes a los 16 pacientes.

La expresión en superficie celular de los NKG2DLs se analizó mediante citometría de flujo en células derivadas de muestras frescas del tejido tumoral y de la mucosa gástrica adyacente al tumor de los pacientes con adenocarcinoma gástrico sometidos a gastrectomía (Tabla 1), como se describe en Materiales y Métodos. En la Figura 5 se muestran *density plots* representativos de las células derivadas del tumor y mucosa gástrica, además de la población seleccionada a evaluar (círculo rojo). En la Figura 6, se muestra la intensidad mediana de fluorescencia (MFI) y el porcentaje de células positivas para MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3 en células derivadas del tumor primario y de la mucosa adyacente al tumor. La MFI específica para los ligandos estudiados se determinó restando el control de isotipo correspondiente, la cual se muestra en los histogramas correspondientes (Figura 5). Como control positivo para las células tumorales, se analizó la expresión en superficie de CD44, una molécula de adhesión la cual se ha descrito que se sobreexpresa en varios tipos de tumores, incluyendo el CG (Ghaffarzadehgan y col, 2008; Ko y col, 2011).



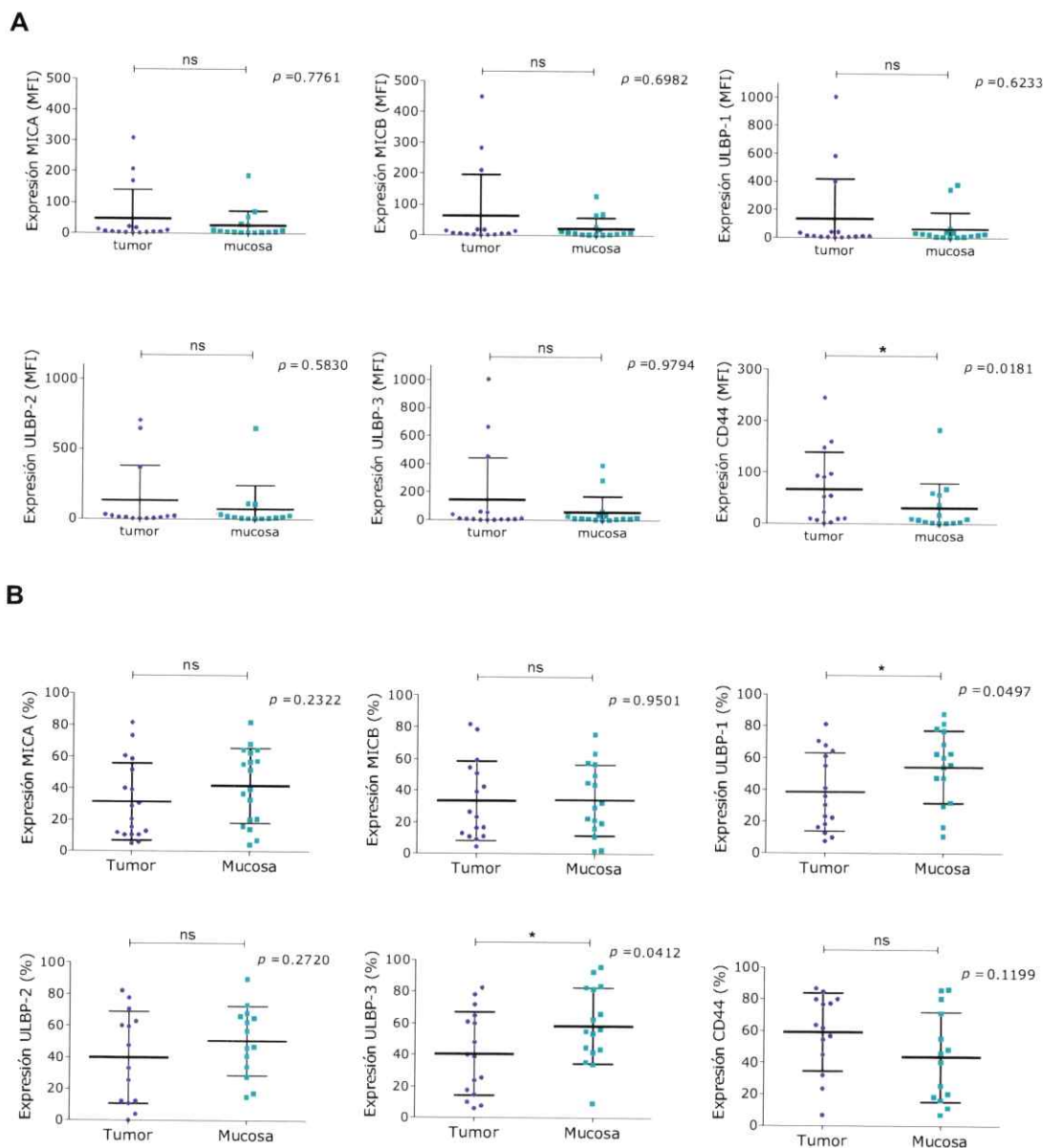
**Figura 5. NKG2DLs son expresados en células tumorales y de mucosa de estómago de pacientes con CG.** Gráficos de densidad, obtenidos por citometría de flujo, representativos del tumor primario (A) y del tejido de mucosa adyacente al tumor (B) de un paciente con CG. La expresión de CD44, MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3 se analizó en la población seleccionada (círculo rojo), se midió como MFI y están representados en los histogramas (líneas de color). Histograma rojo: control de isotipo. Los valores de MFI están indicados en la leyenda coloreada (para NKG2DLs y CD44).

Como se muestra en la Figura 6, tanto las células derivadas de la mucosa adyacente al tumor como las del tejido tumoral expresan, en la superficie celular, los NKG2DL analizados, a distintos niveles. Se observó que el porcentaje de células positivas para ULBP-1 y ULBP-3 en el tumor fue significativamente menor en comparación a la mucosa adyacente (Figura 6B), pero esta diferencia no se observó cuando se comparó el MFI entre ambos tejidos para estos ligandos (Figura 6A). Para los demás NKG2DL, no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa al comparar tanto la intensidad de expresión de estos ligandos, como el porcentaje de células positivas para estas moléculas entre células derivadas de ambos tejidos (Figura 6). Esto podría ser debido a que, entre los pacientes, hay una expresión muy heterogénea de los distintos ligandos.

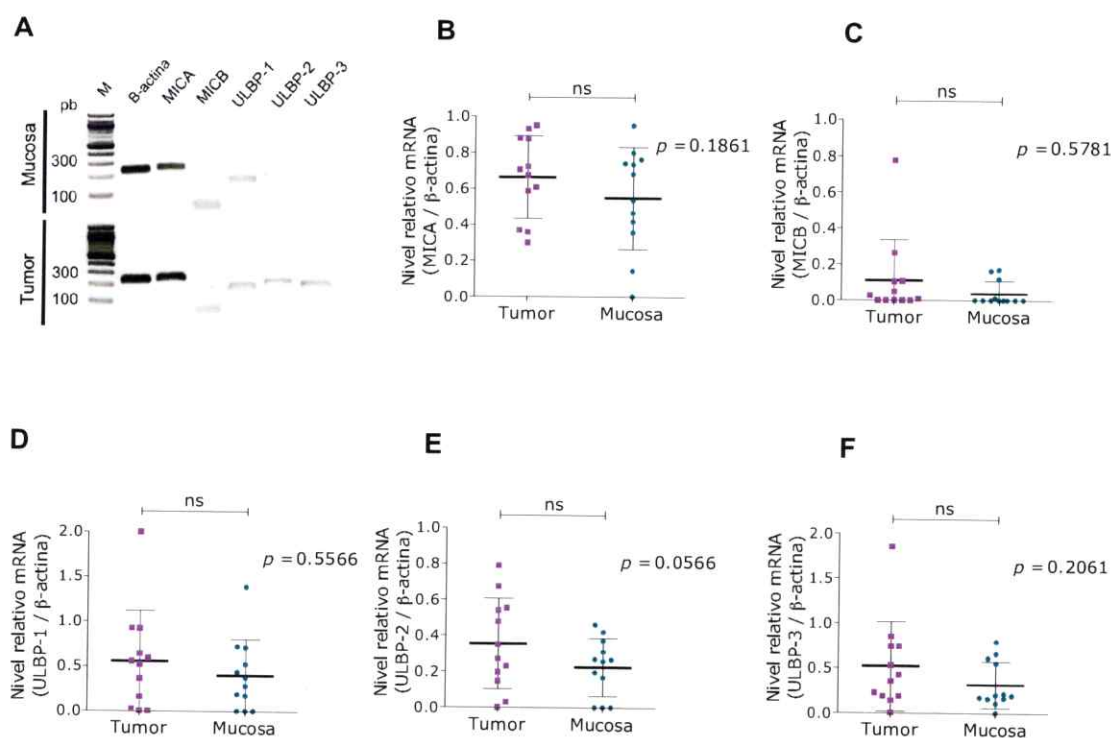
Como se esperaba, la expresión de CD44 fue significativamente mayor en las células derivadas del tejido tumoral que en las células obtenidas de la mucosa adyacente ( $p= 0.0181$ , Figura 6A). Sin embargo, para el porcentaje de células positivas para CD44, no se observó diferencia significativa ( $p= 0,1199$ , Figura 6B).

Para confirmar los resultados obtenidos por citometría de flujo, también se evaluaron los niveles de mRNA de NKG2DLs mediante análisis por RT-PCR semicuantitativo. Los resultados mostrados en la Figura 7 demuestran que los niveles de mRNA de los ligandos de NKG2D en las células tumorales tienden a ser mayores en comparación a las células de la mucosa gástrica. Sin embargo, no se detectó una diferencia estadísticamente significativa con relación a esta expresión entre las células de ambos tejidos (Figura 7).





**Figura 6. Expresión de NKG2DLs en células derivadas del tumor primario y de la mucosa adyacente al tumor de pacientes con CG.** Los gráficos muestran los valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) (A) y porcentaje de células positivas (B) obtenidos, por citometría de flujo, para la expresión en superficie celular de CD44, MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3 en las células tumorales y de mucosa gástrica. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) obtenida para 16 pacientes con CG. \*\*\*,  $p < 0.001$ , \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ .



**Figura 7. Expresión de mRNA de NKG2DLs en células tumorales y de mucosa gástrica en pacientes con CG.** (A) Figura representativa de los productos amplificados de un paciente con CG. Los productos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa y visualizados mediante la tinción con bromuro de etidio. (B,C,D,E y F). La expresión del mRNA de MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3 se evaluó mediante RT-PCR semicuantitativo usando partidores específicos para cada ligando (Tabla 2). Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gels de agarosa al 1%. Los datos se presentan como la expresión relativa de cada gen normalizado por un control interno ( $\beta$ -actina) y representan valores de 12 pacientes  $\pm$  SD.

### **3.2. Medición de la expresión de MICA soluble en el suero de pacientes con cáncer gástrico**

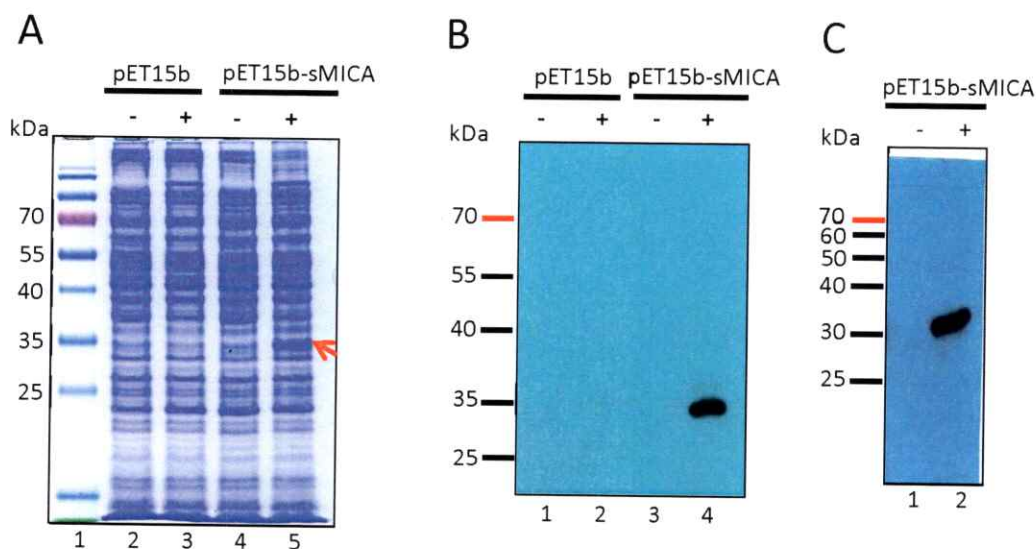
Debido a que se detectó sMICA en el suero de pacientes con diferentes tipos de enfermedades malignas y varios estudios han indicado a sMICA como un marcador de pronóstico (Holdenrieder y col, 2006a; Li y col, 2009; Tamaki y col, 2008). Es de gran importancia probar si los niveles de sMICA séricos pueden ser usados como un marcador de pronóstico en pacientes con CG. Por lo que, se decidió evaluar los niveles de sMICA en el suero de estos pacientes. Para esto, se desarrolló un ELISA de captura para medir la concentración de sMICA en el suero de pacientes con CG y compararla con la de individuos sanos.

#### **3.2.1. Expresión y purificación de sMICA**

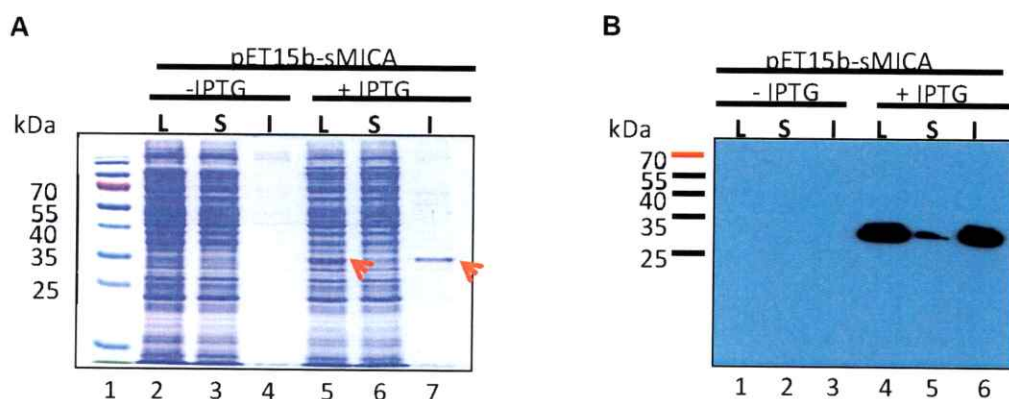
El primer objetivo correspondió a expresar la proteína recombinante rMICA, la cual es necesaria para realizar una curva estándar para el ELISA. Para esto, se utilizó un clon de *E. coli* BL21(DE3) transformado con el plasmidio pET15b-sMICA (Figura 4). Las bacterias transformadas se crecieron y se indujo la expresión de rMICA. Para verificar la expresión y solubilidad de la proteína recombinante, se analizó tanto el lisado celular como la fracción soluble e insoluble del lisado, mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% seguido de la tinción con azul de Coomassie. Se observó una banda de sobreexpresión cercana a 35 kDa sólo en el lisado de *E. coli* BL21 (DE3) [pET15b-sMICA] inducido con IPTG (línea 5, Figura 8A), correspondiente al peso molecular esperado de sMICA (34 kDa), la cual no está presente en los controles negativos (líneas 2,3 y 4, Figura 8A). Para comprobar que esta banda correspondía a sMICA, se realizó un análisis por Western blot del SDS-PAGE mostrado en la Figura 8 ocupando un anticuerpo comercial específico para MICA

(Abcam, EE.UU.), mediante el cual se pudo detectar esta banda sólo en el lisado bacteriano (BL21 (DE3) [pET15b-sMICA]) inducido (línea 4, Figura 8B). Además, esta banda fue reconocida por un anticuerpo anti-poli-histidina (Sigma) en el lisado bacteriano inducido (línea 2, Figura 8C).

Al analizar las fracciones del lisado bacteriano, podemos ver tanto en fracción total como insoluble, inducidas con IPTG, una banda correspondiente a la proteína inducida (líneas 5 y 7, respectivamente, Figura 9A). Al realizar un análisis de Western blot utilizando un anticuerpo anti-MICA humano, se detectó una banda correspondiente a sMICA en las fracciones total e insoluble (líneas 4 y 6, respectivamente, Figura 9B) e, incluso, en la fracción insoluble (línea 5, Figura 9B), pero de menor intensidad.



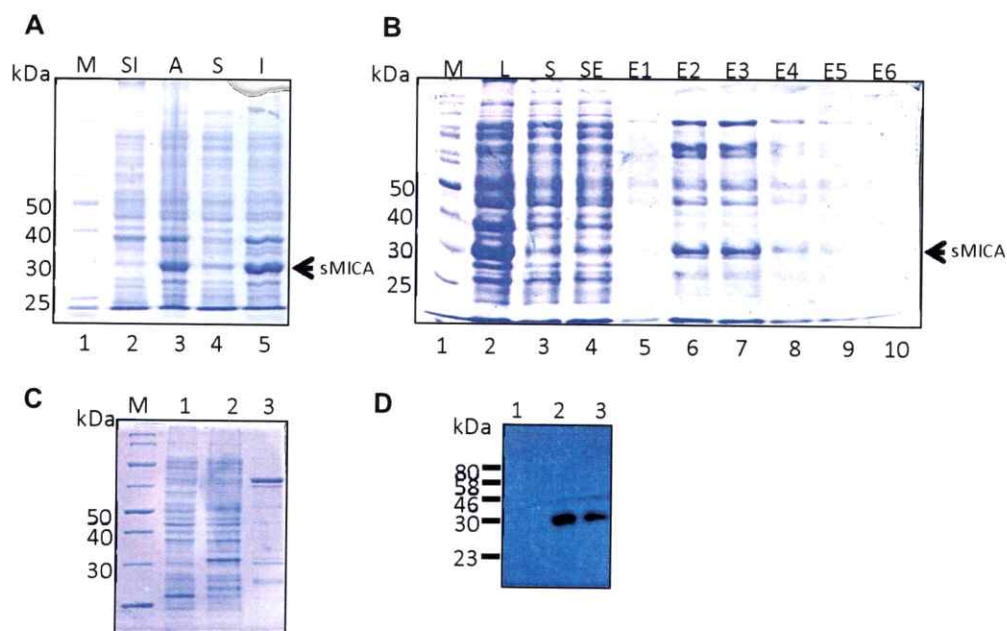
**Figura 8. Expresión de sMICA en *E. coli* BL21(DE3) [pET15b-sMICA].** (A) Análisis por SDS-PAGE de lisado bacteriano de *E. coli* transformada con el plasmidio pET15b y pET15b-sMICA, sin IPTG (-) (línea 2 y 4) y con IPTG (+) (línea 3 y 5). Línea 1: Marcador de peso molecular. La banda correspondiente a sMICA se señala con una flecha. (B) Análisis por Western blot del SDS-PAGE mostrado en A, utilizando un anticuerpo policlonal anti-MICA en dilución 1:1000. (C) Análisis por Western blot del SDS-PAGE de lisado de *E. coli* BL21(DE3) [pET15b-sMICA] sin inducir (línea 1) e inducido con IPTG (línea 2), utilizando anticuerpo anti-poli-histidina.



**Figura 9. Distribución de sMICA en *E. coli* BL21(DE3) [pET15b-sMICA].** (A) Análisis por SDS-PAGE del lisado celular (L), con la fracción soluble (S) e insoluble (I) de *E. coli* BL21(DE3) [pET15b-sMICA] sin y con IPTG. (B) Análisis por Western Blot del gel en A, utilizando un anticuerpo anti-MICA humano.

### 3.2.2. Purificación de sMICA recombinante

Lo siguiente consistió en purificar la proteína recombinante, mediante el uso de una resina de agarosa Ni-NTA, a partir de la fracción soluble del lisado. Las fracciones eluidas se analizaron mediante SDS-PAGE y se determinó que la elución 2 y 3 eran las que poseían mayor cantidad de proteína recombinante (líneas 6 y 7, Figura 10B). Por esto, ambas fracciones se dializaron contra PBS durante 24 h a 4°C y luego se determinó que la concentración de proteínas totales fue de 206 µg/ml. Se puede observar que, junto con proteína recombinante, co-eluyeron otras proteínas, las cuales podrían corresponder a proteínas nativas de *E. coli* (línea 3, Figura 10C) (Bolanos-García & Davies, 2006). A partir de este resultado, se midió la intensidad de las bandas mediante densitometría (Image J), y se obtuvo la proporción de sMICA de las proteínas contaminantes, la cual correspondió a un 30% aproximadamente. Finalmente, se determinó que la concentración de sMICA correspondía a aproximadamente a 63 ng/µl.



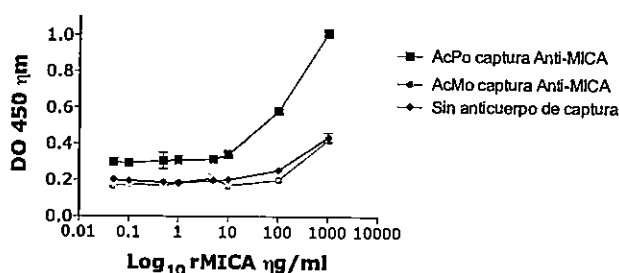
**Figura 10. Expresión y purificación de sMICA por autoinducción por SDS-PAGE al 12%.** (A) Expresión por autoinducción de *E. coli* BL21(DE3) [pET15b-sMICA]. M: marcador de peso molecular (Fermentas); línea 1: lisado no inducido; línea 2: lisado autoinducido; línea 3: fracción soluble del lisado autoinducido; línea 4: fracción insoluble del lisado autoinducido. (B) Purificación de sMICA en columna de Ni-NTA. M: marcador de peso molecular, línea 1: lisado autoinducido; línea 2: fracción soluble del lisado autoinducción; línea 3: líneas 4-9 fracciones de elusión. (C) línea 1: lisado no inducido; línea 2: lisado autoinducido; línea 3: purificación de sMICA después de la diálisis. (D) Análisis por Western blot de gel en C utilizando anticuerpo anti-poli-histidina (Sigma).

### 3.2.3. Estandarización de ELISA de captura para detectar sMICA en suero de pacientes con cáncer gástrico

Ya obtenida sMICA recombinante, se procedió a realizar un ELISA de tipo *sandwich*, en el cual se utilizó un AcMo de captura anti-MICA de origen murino (Clone 159233, R&D Systems) y un AcPo de detección anti-MICA de cabra biotinilado (R&D Systems). En la Figura 11 se muestra una curva estándar de sMICA, en la cual se observa que, con la combinación de anticuerpos anteriormente mencionada, es similar

a la curva del blanco (sin anticuerpo de captura), por lo que esta combinación de anticuerpos no detecta sMICA.

Por esta razón, se probó una nueva combinación de anticuerpos: como anticuerpo de captura, se utilizó una combinación de anticuerpos policlonales (generados previamente en nuestro laboratorio) y, como anticuerpo de detección, se utilizó el mismo AcPo de cabra anti-MICA biotinilado previamente mencionado (R&D Systems). Al comparar ambas combinaciones de anticuerpos utilizadas en el ELISA *sandwich*, se obtuvo una mejor sensibilidad cuando se utiliza el AcPo de conejo para capturar (Figura 11). Según la literatura, la concentración promedio de sMICA en el suero de los individuos sanos está en el orden de los picogramos (Holdenrieder y col, 2006a). Por esta razón, para poder detectar sMICA en el suero de pacientes con CG, se debe tener un sistema de ELISA con una sensibilidad dentro de este orden de magnitud.



**Figura 11. Combinaciones de ELISA de tipo *sandwich* utilizando distintos anticuerpos de captura.** Se utilizaron dos anticuerpos de captura: 4  $\mu\text{g/ml}$  de AcMo anti-MICA (Clon 159233, R&D Systems) y 10  $\mu\text{g/ml}$  de AcPo anti-MICA generado en el laboratorio; como control, no se sensibilizó la placa con los anticuerpos de captura. El ensayo se hizo por triplicado y se grafica el promedio de cada determinación  $\pm$  SD.

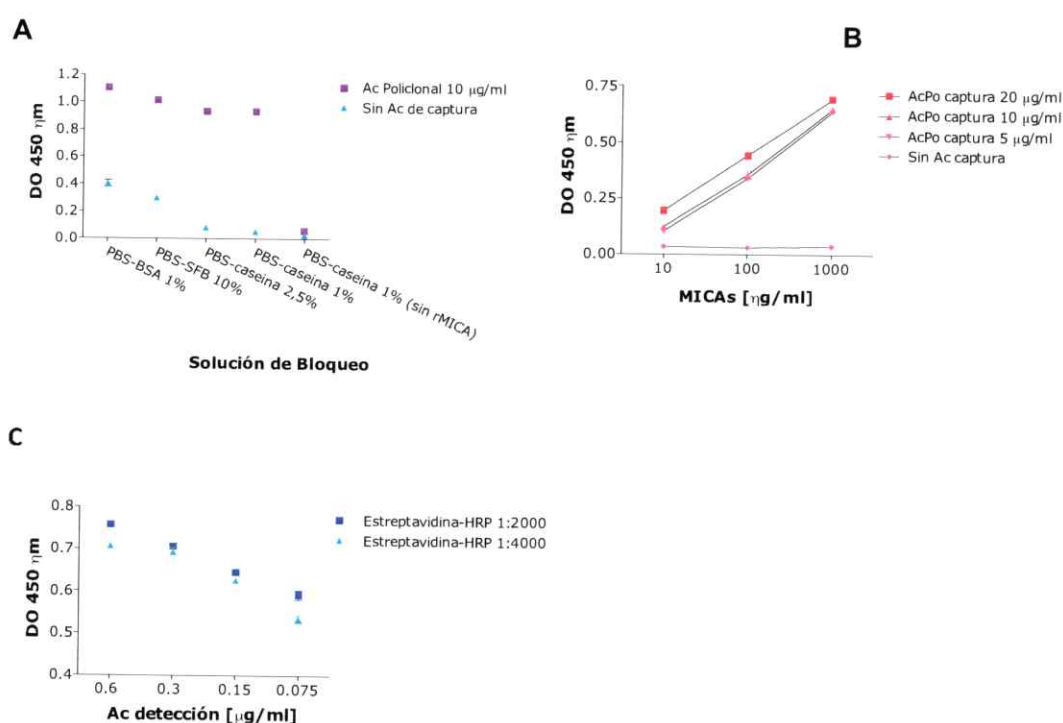
A pesar de que se logró una mejor sensibilidad cuando se utiliza el AcPo de conejo anti-MICA humano para capturar la proteína, esta no es suficiente y, además, se observó un alto *background* (señal de fondo alta), por lo que se probaron distintas soluciones de bloqueo, entre ellas caseína 1%, SFB 10% y BSA 1%, todos en PBS (Figura 12). Utilizando la solución de bloqueo caseína 1%, se obtuvo un menor *background* en comparación a las otras soluciones (Figura 12A). Además, para aumentar la sensibilidad del ELISA para detectar sMICA, se evaluaron distintas concentraciones del Ac de captura, Ac de detección y de estreptoavidina peroxidasa-HRP. Se determinó que la concentración óptima del anticuerpo de captura fué de 20 µg/ml, ya que es con la que se obtuvo un mayor valor en la lectura espectrofotométrica (Figura 12B). Con respecto al anticuerpo de detección, como se observa en la Figura 12C, la concentración mayor de este Ac (0,6 µg/ml) es la que permite una mayor señal. Sin embargo, se decidió utilizar la concentración de 0,3 µg/ml de este Ac, con la cual es suficiente para obtener una buena señal. Además, la dilución óptima de la estreptoavidina-HRP es de 1:2000, según lo que se observa en la Figura 12C.

Ya estandarizado el ELISA de captura, se realizó una curva estándar ocupando rMICA comercial (Abcam, EEUU) para determinar la sensibilidad del sistema (Figura 13A). Si bien este ensayo detecta hasta 1 ng/ml de rMICA, este no fue lo suficientemente sensible para detectar sMICA de las muestras de pacientes. Este ensayo se trató de mejorar mediante la utilización de un método de detección más sensible que el colorimétrico, como la quimioluminiscencia. Sin embargo, con el sustrato quimioluminiscente, la sensibilidad fue similar que con el sustrato colorimétrico (Figura 13B).

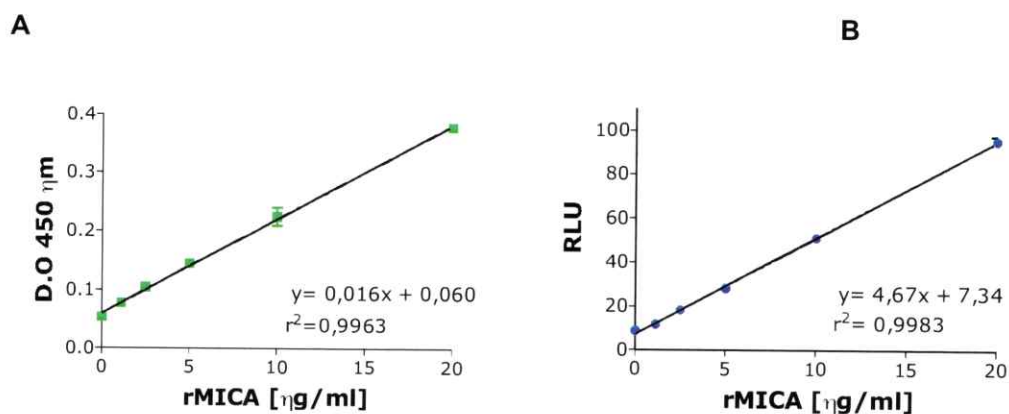
Finalmente, se utilizó una combinación de anticuerpos comerciales (BAMOMAB): como anticuerpo de captura, se utilizó un AcMo anti-MICA (clon AMO1)



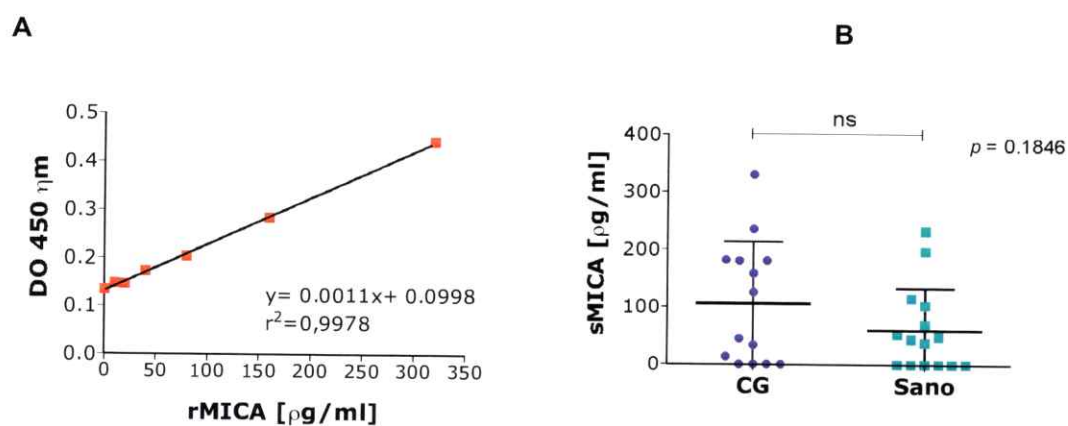
IgG1, y como anticuerpo de detección, un AcMo anti-MICA/B (clon BAMO3) IgG2a, luego de un anticuerpo de cabra anti-Ig2a conjugado a HRP. Con esta nueva combinación, se pudo obtener una sensibilidad de 20 pg/ml (Figura 14A). Por lo tanto, ahora fue posible medir sMICA en el suero de pacientes con CG.



**Figura 12. Estandarización de ELISA de tipo *sandwich*.** (A) Comparación de soluciones de bloqueo. Se sensibilizó con el  $\blacksquare$  AcPo de captura anti-MICA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) o  $\blacktriangle$  sin anticuerpo de captura (solo buffer carbonato); luego, se incubó con distintas soluciones de bloqueo. Se agregó sMICA recombinante 1000  $\eta\text{g/ml}$  y luego se detectó con el AcMo anti-MICA biotinilado y estreptoavidina-HRP. (B) Estandarización AcPo de captura. Se sensibilizó con  $\blacksquare$  20,  $\blacktriangle$  100,  $\blacktriangledown$  5  $\mu\text{g/ml}$  de AcPo anti-MICA o  $\blacklozenge$  solo con buffer carbonato. (C) Estandarización de anticuerpo de detección y estreptoavidina-HRP. Se utilizaron distintas concentraciones del anticuerpo de detección (0.6, 0.3, 0.15 y 0.075  $\mu\text{g/ml}$ ) y diluciones 1:2000 y 1:4000 de estreptoavidina-HRP. Los resultados de DO se muestran como promedios  $\pm$  SD de los triplicados.



**Figura 13. Curva estándar de rMICA.** Se utilizó rMICA comercial (Abcam) y como sustrato (A) TMB (Thermo Scientific) o (B) quimioluminiscente para ELISA (Thermo Scientific). Los resultados de DO se muestran como promedios  $\pm$  SD de los triplicados.



**Figura 14. Detección de sMICA en el suero de pacientes con CG.** (A) Curva estándar de rMICA con combinación Ac AMO1 de captura y BAMO3 de detección (B) Niveles de sMICA en suero de pacientes con CG y en controles sanos. Se analizaron 14 sueros de pacientes con CG y 14 controles sanos. En A se grafica el valor promedio de tres determinaciones  $\pm$  SD.  $\bullet$ ,  $\blacksquare$ , valores individuales para sMICA en el suero.

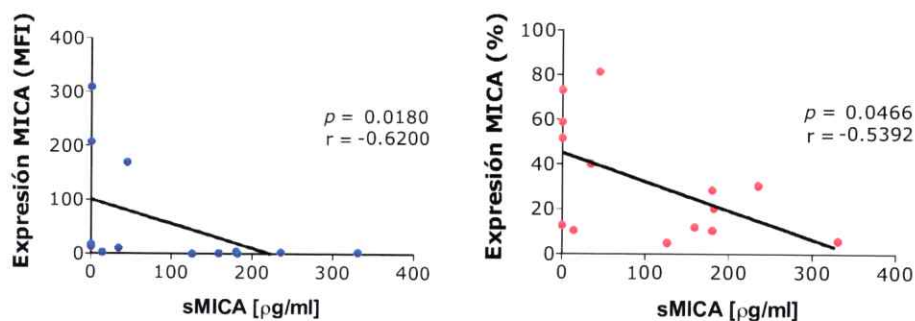
### **3.2.4. Detección de sMICA en el suero de pacientes con CG**

Se analizó el suero de 14 pacientes con CG como también de 14 controles sanos de una edad similar. La presencia de sMICA solo fue detectable en 10 pacientes (> 20 pg/ml) y en 8 controles sanos. El promedio de sMICA fue de 106,2 pg/ml y 60,0 pg/ml en pacientes con CG y controles sanos, respectivamente. Sin embargo, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de sMICA en el suero de pacientes y controles sanos (Figura 14B).

### **3.2.5. Correlación de la expresión de sMICA y la expresión MICA en la superficie de células derivadas del tejido tumoral.**

Un aumento en los niveles de MICA soluble podría deberse a que esta molécula es clivada de las células tumorales, lo que disminuiría MICA en la superficie de las células tumorales al mismo tiempo en que aumentan los niveles séricos de su forma soluble. Por esta razón, evaluamos si los niveles de sMICA se correlacionaban con la expresión celular de MICA (tanto por MFI como por porcentaje de células positivas para MICA).

Se pudo observar una correlación negativa entre los niveles de MICA soluble y los niveles de expresión (MFI) y porcentaje de células positivas para MICA en las células derivadas del tumor primario de pacientes con CG (Figura 15).



**Figura 15. Correlación entre la expresión de MICA en la superficie celular de células derivadas del tumor y los niveles de sMICA en el suero de pacientes con CG.** (A) Correlación entre el MFI para MICA y los niveles de sMICA, analizada por el test de correlación Spearman. (B) Correlación entre el porcentaje de células positivas para MICA y los niveles de sMICA, analizada por el test de correlación Pearson. Curva regresión lineal n=14.

### 3.3. Correlación de la expresión de NKG2DL y sMICA con los parámetros clínico patológicos de la enfermedad

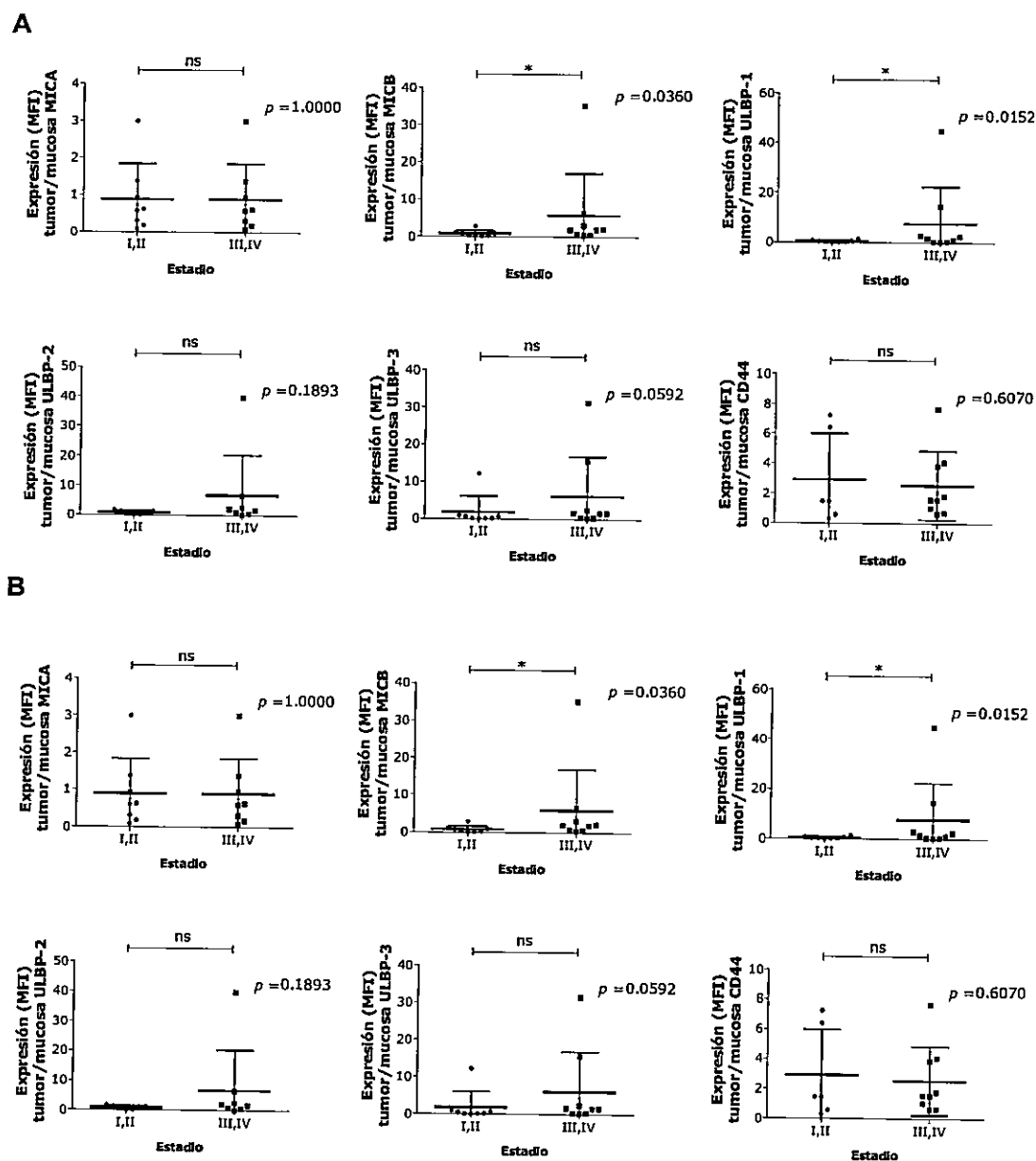
Debido a que los NKG2DL se expresan en células derivadas del tumor primario de los pacientes con CG analizados (Figura 6), se evaluó si la expresión de NKG2DL podría ser utilizada como un posible marcador en el diagnóstico diferencial y estadio del cáncer. Para esto, se asociaron los niveles de expresión o el porcentaje de células positivas para los ligandos estudiados con los distintos parámetros clínico-patológicos de la enfermedad.

Se ha descrito, por ejemplo, que el tamaño del tumor está relacionado con el pronóstico del adenocarcinoma gástrico (Adachi y col, 1997; Jun y col, 2009), por lo que se decidió correlacionar la expresión de los NKG2DL con el tamaño del tumor. Los pacientes se dividieron en dos grupos basados en el tamaño del tumor: en un grupo cuyo tumor era menor o igual a 4 cm y otro grupo con tumores mayores a 4 cm. Distintos estudios sugieren que el tamaño tumoral en CG sirve como un indicador de

pronóstico independiente, algunos trabajos han determinado que el punto de corte óptimo para el tamaño tumoral es de 4 cm, que corresponde al tamaño tumoral más frecuente entre pacientes con CG (Guo y col, 2013). En base a esto, se comparó la expresión y el porcentaje de células positivas para NKG2DL entre tumores de tamaño menor o igual 4 cm y mayor a 4 cm. Sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos de tamaño de tumor (no mostrados).

Dada la alta variabilidad interindividual de la expresión de NKG2DL observada en este estudio (Figura 15), se decidió correlacionar la razón de la intensidad de expresión y el porcentaje de células positivas para NKG2DL entre el tumor primario y la mucosa adyacente al tumor con el estadio de la enfermedad. Se observó que la proporción de la expresión (MFI) entre el tumor y la mucosa para MICB y ULBP-1 era significativamente mayor en estadios tardíos del cáncer gástrico que en estadios tempranos. Sin embargo, esta diferencia no fue significativa cuando se comparó la razón entre el porcentaje de células positivas para MICB y ULBP-1 entre los estadios temprano y avanzado (Figura 16A). Para los ligandos MICA, ULBP-2, ULBP-3 y CD44 (Figura 16A y B), no se detectó una diferencia significativa cuando se analizó la razón de la expresión y el porcentaje entre células tumorales y de la mucosa comparándolos entre las etapas temprana y avanzada del tumor.

Además, se determinó que la expresión (MFI o porcentaje de células positivas para NKG2DL) y razón de expresión de NKG2DL y CD44 entre las células derivadas del tumor *versus* las células de la mucosa no se asocia con otros parámetros clínico-patológicos de la enfermedad, como el tamaño del tumor, extensión tumoral, o metástasis hacia los linfonodos. Tampoco se encontró asociación entre los niveles de sMICA y los parámetros clínico-patológicos de pacientes con CG (datos no mostrados).



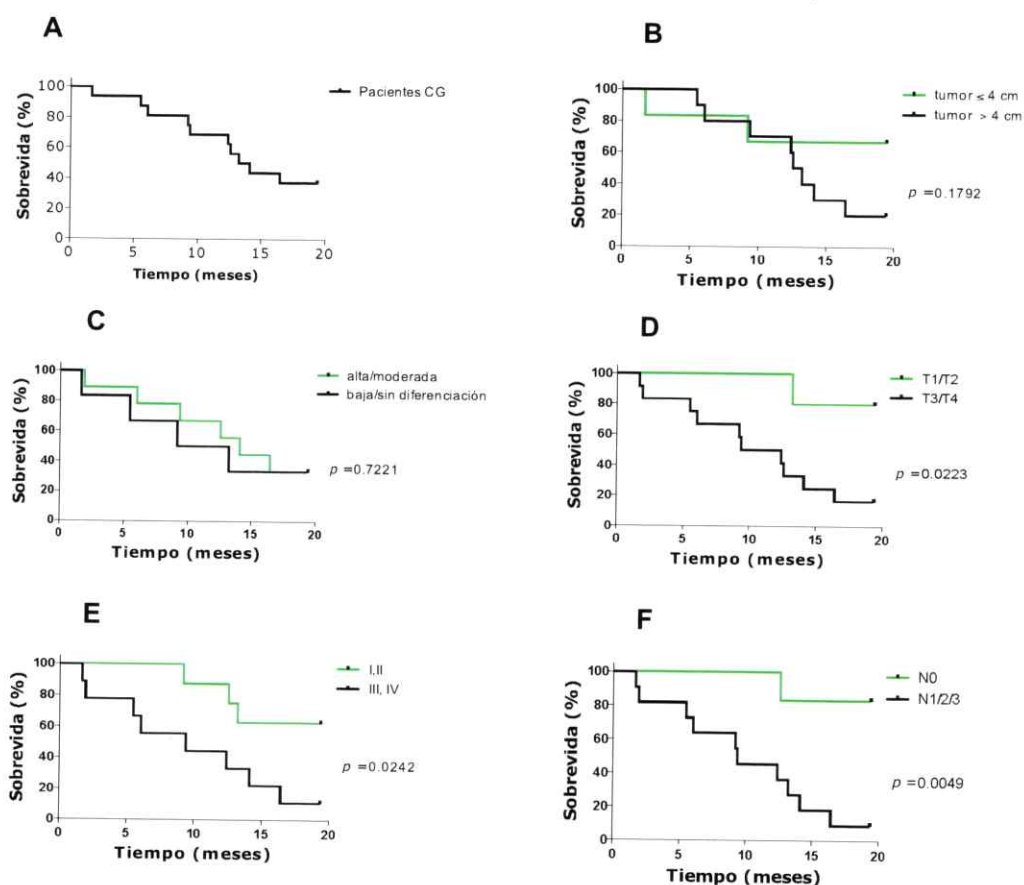
**Figura 16.** Razón de la expresión y frecuencia de NKG2DLs entre tejido tumoral y la mucosa de pacientes con CG asociados con el estadio tumoral. Expresión (MFI) (A) y porcentaje de células positivas (B) de MICA/B, ULBP-1-3 y CD44 entre el tejido tumoral y de mucosa se agruparon de acuerdo al estadio tumoral, definido como I,II (temprano) o III,IV (tardío). Los datos representan valores obtenidos de 16 pacientes con CG  $\pm$  SD. \*,  $p < 0.05$ .

### 3.4. Correlación de la expresión de NKG2DL y sMICA con la sobrevida de los pacientes con CG

Finalmente, se estudió la **sobrevida** de los pacientes con CG durante un periodo de 19,4 meses después de haberse realizado la operación. De los 16 pacientes que se realizó la gastrectomía total, 10 de ellos (65,5 %) fallecieron durante el período analizado (Figura 17A). Se comparó la sobrevida entre el grupo de pacientes con CG con tamaño de tumor menor o igual a 4 cm y mayor a 4 cm, así como entre pacientes cuyos tumores que presentaban una diferenciación alta/moderada y baja/indiferenciado, una extensión tumoral T1/T2 y T3/T4, un estadio I,II y III, IV, y metástasis hacia los linfonodos N0 y N1/2/3. Para esto, se realizó un análisis de sobrevida según el método de Kaplan-Meier, y las curvas de sobrevida se compararon utilizando la prueba de Log-rank. En los análisis realizados, se observó una mayor sobrevida en los pacientes con menor extensión tumoral (T1/T2) ( $p= 0.023$ , Figura 17D), estadios tempranos de la enfermedad (I,II) ( $p= 0.0242$ , Figura 17E), y en ausencia de metástasis de linfonodos (N0) ( $p= 0.0049$ , Figura 17F). Sin embargo, no se encontró una diferencia significativa al comparar la sobrevida post-operatoria con relación al tamaño del tumor, tampoco respecto a la diferenciación tumoral (Figura 17B y C).

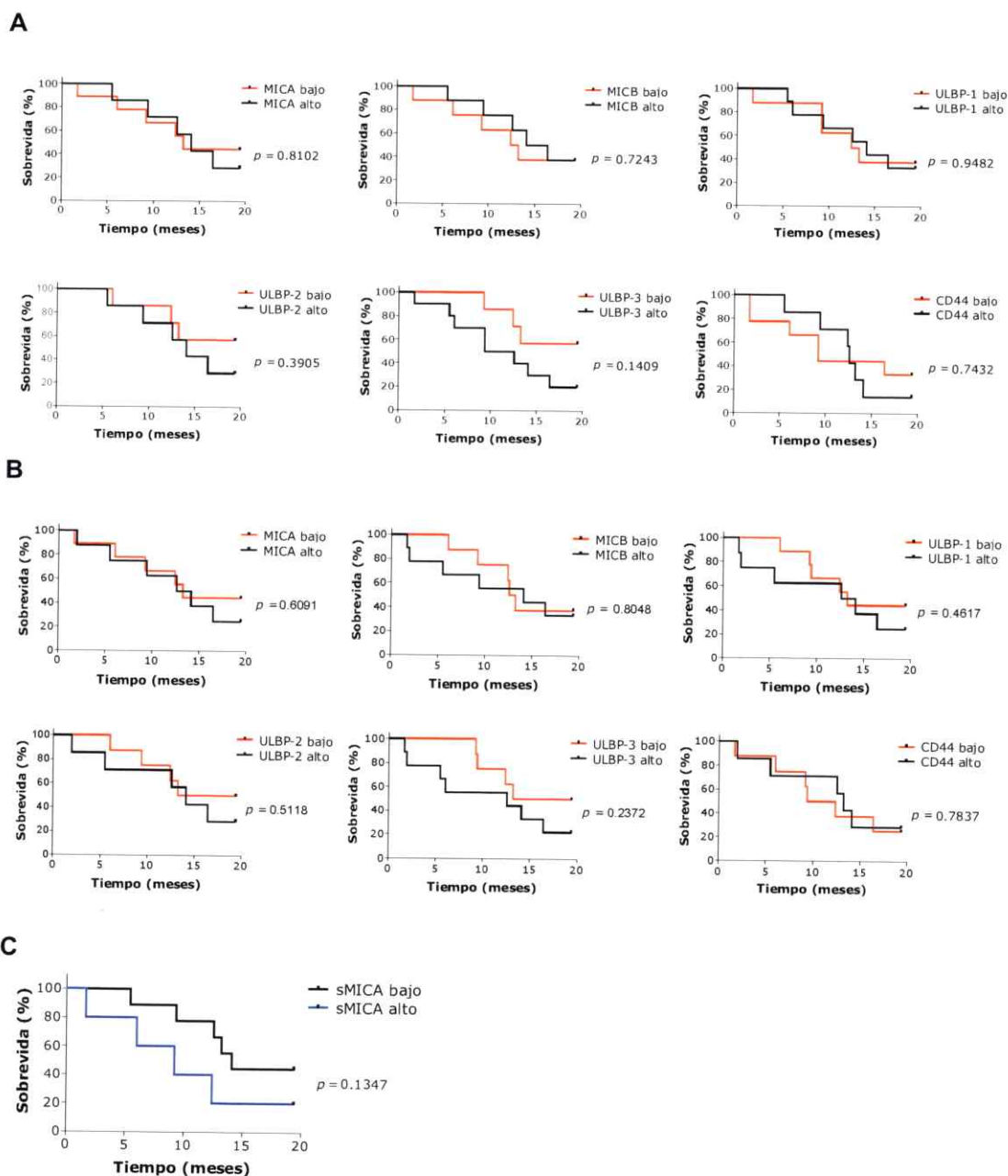
Para evaluar si la expresión de los ligandos de NKG2D tenía correlación con la sobrevida de los pacientes, estos se dividieron en dos grupos según los niveles de expresión de cada NKG2DL. Para determinar los niveles de expresión como altos y bajos, el punto de corte se estableció como la mediana de los valores obtenidos para la intensidad de expresión (MFI) o porcentaje de células positivas para cada ligando. El análisis de sobrevivencia de Kaplan-Meier para cada NKG2DL reveló que no hay una

diferencia significativa en la sobrevida entre los pacientes que expresan altos y bajos niveles de NKG2DL (Figura 18A y B). También se analizó si la expresión de sMICA se correlacionaba con la sobrevida de los pacientes con CG. Los pacientes se agruparon de acuerdo a los valores de expresión de sMICA alto y bajo. El punto de corte se determinó como la mediana, que corresponde a 180 pg/ml. Tampoco se observó una diferencia en la sobrevida entre los pacientes con niveles elevados y bajos en el suero de sMICA ( $p= 0.1347$ , Figura 18B).



**Figura 17. Curvas de sobrevida en pacientes con CG después de la gastrectomía total.** (A) Curva de sobrevida general (Kaplan-Meier) de 16 pacientes con cáncer gástrico después de la gastrectomía total. (B) Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para los pacientes con CG mostrando la progresión de acuerdo al tamaño del tumor ( $\leq 4$  o  $> 4$  cm de diámetro). Sobrevida de pacientes con CG según (B) la diferenciación (bien/moderadamente o poco/indiferenciado), (D) la extensión tumoral (T1/T2 ó T3/T4), (E) el estadio del CG (I,II ó III,IV), (F) metástasis en nodos linfáticos (N0 ó N1/2/3).





**Figura 18. Sobrevida de pacientes con CG.** (A) Gráfico de Kaplan-Meier para los pacientes con CG representando sobrevida general de acuerdo a los niveles de expresión NKG2DL MFI (A) o porcentaje de células positivas (B), alto o bajo. Los pacientes se agruparon de acuerdo a los valores de expresión de NKG2DL o sMICA. Las diferencias estadísticas se calcularon por el test de log-rank. (C) Gráfico de Kaplan-Meier para los pacientes con CG representando sobrevida general de acuerdo a los niveles de expresión de MICA soluble, alto o bajo.  $n=16$ .

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Expresión de NKG2DL en CG

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

En este estudio, se demostró que MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3, ligandos del receptor activador NKG2D, son expresados y frecuentemente coexpresados en células derivadas del adenocarcinoma gástrico y de la mucosa gástrica adyacente al tumor. Sin embargo, hemos observado la presencia significativamente mayor de células que expresan los ligandos ULBP-1 y ULBP-3 en la

mucosa gástrica no tumoral en comparación al tejido tumoral (Figura 6 B). La gran mayoría de los pacientes estudiados expresa bajos niveles de todos los ligandos analizados, y los pocos pacientes que expresan niveles altos de estas moléculas en el tejido tumoral también expresan altos niveles en la mucosa gástrica. Esta expresión elevada de ligandos en la mucosa adyacente podría deberse a que el tejido obtenido de la mucosa correspondiente a estos tumores esté infiltrado con células tumorales o también al hecho que muchos pacientes presentan gastritis crónica, y puede que este proceso inflamatorio produzca un aumento en la expresión de NKG2DL. Además, los pacientes que presentan una alta expresión de NKG2DLs en la mucosa también poseen una alta expresión de CD44, una molécula de adhesión altamente expresada en adenocarcinoma gástrico (Ghaffarzadehgan y col, 2008).

Para poder evaluar si hay una mayor expresión de NKG2DL durante las diversas etapas de desarrollo del cáncer gástrico, habría que analizar la expresión de NKG2DL en la mucosa gástrica de individuos sanos como un control basal de los niveles de expresión de estas moléculas. Sin embargo, conseguir una muestra de mucosa gástrica de individuos sanos es un proceso complejo, ya que se debe realizar mediante endoscopia, procedimiento que, en general, se realiza cuando existe algún problema de salud. Como se explicó anteriormente, MICA se expresa constitutivamente en el tracto gastrointestinal y se sobreexpresa en respuesta al estrés y transformación celular. Por ello, es posible que la mucosa gástrica adyacente al tumor también esté alterada en estos pacientes, por lo que no sería un buen control de expresión de estos ligandos.

También es importante destacar que la molécula CD44, también evaluada en este estudio, no es un buen marcador para definir la población tumoral, debido a que los linfocitos también la expresan. Por lo tanto, para poder definir la población de las

células tumorales, se debería ocupar otro marcador tumoral, como EpCAM, el cual usualmente no se expresa en la mucosa gástrica sana pero sí es expresado frecuentemente en cáncer gástrico (Balzar y col, 1999). Además, se debería utilizar un marcador que permita excluir del estudio los leucocitos, como el CD45 (antígeno común leucocitario).

En este estudio, también se pudo demostrar, mediante PCR semicuantitativo, que los ligandos del receptor NKG2D se expresan a nivel de mRNA, lo que confirma adicionalmente que los NKG2DL se expresan en las células derivadas del tejido tumoral y mucosa gástrica de pacientes con adenocarcinoma gástrico. Sin embargo, no se observó una diferencia entre los niveles de RNA de los NKG2DL entre el tumor y la mucosa adyacente (Figura 7), similar a lo que hemos observado a nivel proteico, por citometría de flujo.

#### **4.2. Evasión de la respuesta inmune en CG**

El hecho que las células derivadas del tejido tumoral expresen simultáneamente los diferentes ligandos de NKG2D, y habiéndose demostrado que el receptor NKG2D participa en la inmunovigilancia y eliminación de células tumorales (Bauer y col, 1999), se esperaría que estas células fueran más susceptibles a la citotoxicidad mediada por linfocitos NK, NKT, T CD8<sup>+</sup> o Tγδ, resultando en el control del crecimiento tumoral y un pronóstico más favorable para la enfermedad. Sin embargo, estos tumores han podido progresar, lo cual implicaría que las interacciones entre el receptor NKG2D y sus ligandos podrían estar alteradas en el microambiente tumoral. Esto podría explicarse, ya que, si bien los ligandos de NKG2D están presentes en las células derivadas del tumor, sus niveles de expresión en la superficie celular no serían óptimos para

estimular adecuadamente la respuesta antitumoral mediada por los linfocitos citotóxicos. Se ha descrito que la capacidad de una línea celular que expresa NKG2DL para estimular la respuesta antitumoral depende críticamente de los niveles de superficie NKG2DL expresados en las células tumorales (Diefenbach y col, 2001). Debido a que esta actividad está guiada por el balance de señales activadoras e inhibitoras, y así como una expresión de NKG2DL elevada es capaz de gatillar que las células NK superen las señales inhibitorias y se activen, una modesta disminución de NKG2DL puede influenciar críticamente en la reactividad de las células NK (Bauer y col, 1999; Cosman y col, 2001).

Lo mencionado anteriormente podría deberse también a que células tumorales emplean distintos mecanismos para evadir la inmunovigilancia mediada por el receptor NKG2D. Uno de estos mecanismos es el corte proteolítico de los NKG2DL de la superficie celular, resultando en liberación de ligandos solubles, los cuales se han detectado en el suero de pacientes con cáncer (Eisele y col, 2006; Groh y col, 2002; Holdenrieder y col, 2006a; Salih y col, 2002). Distintos estudios demuestran que la presencia de sMICA en el suero de pacientes con cáncer interfiere con la inmunidad antitumoral por medio de la regulación negativa del receptor NKG2D en los linfocitos citotóxicos, llevando a una función citotóxica defectuosa (Groh y col, 2002; Jinushi y col, 2005). Formas solubles de ULBP-1 y ULBP-3 se han descrito en sobrenadantes de líneas celulares tumorales (Fernandez-Messina y col, 2010; Song y col, 2006b). Sin embargo, esto no se ha podido demostrar en pacientes con cáncer. Debido a lo anteriormente mencionado, se evaluaron los niveles de MICA soluble en los sueros de los pacientes con CG y se correlacionaron con los niveles de expresión de MICA en células derivadas del tumor primario en los mismos pacientes.

Se diseñó un sistema de ELISA de captura para detectar sMICA; en esta metodología, se utilizó AcPo anti-MICA de captura (desarrollado en nuestro laboratorio) y un AcPo anti-MICA de detección (comercial). Para poder realizar la curva estándar que permita determinar la concentración de sMICA, se utilizó MICA recombinante humano, que fue producido y purificado en el laboratorio. Uno de los mayores problemas enfrentados durante la purificación de MICA fue que la proteína recombinante co-eluía con otras proteínas contaminantes (Figura 10), las cuales podrían corresponder a proteínas de *E. coli* que se unían a la resina. Esto último se postula en base a que se ha descrito que proteínas nativas de *E. coli* poseen alta afinidad por el níquel, por lo que pueden ser co-purificadas en cromatografía de afinidad en columnas con níquel (Bolanos-Garcia & Davies, 2006). Luego, debido a que MICA recombinante obtenida en este estudio no estaba totalmente pura, sólo se pudo determinar una concentración aproximada de esta. Por lo mismo, esta proteína se utilizó sólo para estandarizar las concentraciones óptimas de anticuerpos de captura, de detección y de estreptavidina-peroxidasa, ya que es necesario tener la concentración exacta de la proteína en estudio para realizar la curva estándar. Por lo tanto, para hacer la curva estándar del experimento, se utilizó MICA recombinante comercial; sin embargo, con la primera combinación de anticuerpos, no se obtuvo una sensibilidad suficiente para detectar sMICA en el suero – ni con el sustrato TMB ni con el quimioluminiscente, con el cual se debería obtener una mayor sensibilidad (Figura 13). Como resultado, se utilizó otra combinación de anticuerpos comerciales anti-MICA: AMO1 y BAMO3, con los cuales se pudo obtener una sensibilidad del orden de los picogramos (Figura 14A), ya que sMICA se ha detectado en el suero en otros pacientes con cáncer dentro de este rango de concentración (Holdenrieder y col, 2006a).

Nuestros resultados indican que en 11 de 14 pacientes con CG (se disponía de 14 sueros de un total de 16 pacientes estudiados) se detectó sMICA en el suero. Sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la concentración de sMICA entre los pacientes con cáncer gástrico y los controles sanos (Figura 14B). A diferencia del promedio de sMICA descrito en la literatura para controles sanos (30 pg/ml) (Holdenrieder y col, 2006a), en este estudio se detectó niveles más altos de sMICA en varios individuos sanos. Esto podría explicarse debido a que numerosas enfermedades benignas han sido asociadas con elevados niveles de sMICA (Holdenrieder y col, 2006a), lo que estaría limitando la capacidad diagnóstica de sMICA para el cáncer. Además, se han detectado altos niveles de sMICA en individuos con enfermedades infecciosas, hepáticas y renales (Holdenrieder y col, 2007). También se han encontrado altos niveles de sMICA en el suero de pacientes celíacos, mientras que sueros controles de pacientes con enteropatías no celíacas fueron negativos para MICA. Interesantemente, pacientes bajo una dieta que contiene gluten poseen niveles significativamente más altos de sMICA comparados con pacientes con una dieta libre de gluten (Hue y col, 2004). Otro estudio reportó elevados niveles de sMICA/B en el suero de mujeres embarazadas (Mincheva-Nilsson y col, 2006). Por lo tanto, la liberación de NKG2DL soluble no es un fenómeno exclusivo de neoplasias, sino que también ocurre bajo varias condiciones fisiológicas y situaciones patofisiológicas no malignas, por lo que es necesario tener un criterio más estricto en la selección de los controles sanos. También es posible que no se haya detectado sMICA en algunos pacientes debido a problemas técnicos, ya que MICA posee más de 91 alelos descritos (base de datos IMGT), y es posible que la combinación de anticuerpos utilizada no haya detectado algunos de estos alelos.

No obstante, se pudo observar una correlación negativa entre los niveles de MICA soluble y los niveles de expresión o porcentaje de células positivas para MICA en las células derivadas del tumor (Figura 15). Los pacientes que poseen mayores niveles de MICA soluble poseen bajos niveles de expresión de MICA en la superficie, y esta disminución de los ligandos en superficie podría estar determinando que la respuesta antitumoral sea menos eficaz. Además, la liberación de MICA hacia el medio extracelular podría afectar también la función del receptor NKG2D en las células citotóxicas efectoras, por lo que hubiera sido interesante haber evaluado la expresión del receptor NKG2D en células NK y linfocitos T CD8<sup>+</sup> circulantes e infiltrantes de tumor y ver si una disminución de este receptor se asociaba con la presencia de sMICA en el suero.

Asimismo, aunque no se encontró una correlación entre sMICA y los parámetros clínico-patológicos de la enfermedad, es posible que la presencia de sMICA se deba a la inflamación de la mucosa gástrica que presentan los pacientes, ya que se ha demostrado que, en condiciones de inflamación crónica, hay un aumento moderado de sMICA en el suero (Groh y col, 2003; Holdenrieder y col, 2007).

Estudios recientes del laboratorio han detectado MICA y MICB soluble en sobrenadantes de cultivo, en donde se había dejado incubando un trozo de tumor de un paciente con CG durante 24 h, por lo que es posible que más de un ligando se pueda estar liberando en forma soluble de manera de evitar al respuesta anti-tumoral. En este estudio, el porcentaje de células positivas para ULBP-1 y ULBP-3 es significativamente mayor en la mucosa en comparación al tumor, lo cual nos estaría indicando que hay una disminución de la expresión de NKG2DL en el tumor, lo que podría deberse a la proteólisis de los ligandos de la superficie de las células tumorales. Por esta razón, también sería interesante evaluar la expresión de los otros ligandos en el suero de los



pacientes con cáncer gástrico, ya que, además, o alternativamente a MICA soluble, otros ligandos, como el más cercano relativo MICB, o los ULBPs, podrían estar siendo liberados desde la superficie de las células tumorales, disminuyendo la expresión en superficie de los ligandos.

#### **4.3. Expresión NKG2DL y su correlación con parámetros clínico-patológicos en CG**

Al comparar la sobrevida entre grupos de pacientes con CG con los parámetros clínico-patológicos, se encontró que una mayor extensión del tumor, estadios avanzados del CG y metástasis presente en los linfonodos se asocian con una menor sobrevida. Esta respuesta era esperable, ya que estos son indicadores del pronóstico de la enfermedad (Siewert y col, 1998). Distintos estudios han relacionado a los tumores gástricos de mayor tamaño con un peor pronóstico (Guo y col, 2013; Zu y col, 2013). Además, se ha determinado en algunos trabajos que los pacientes con adenocarcinoma bien y moderadamente diferenciados tienen un mejor pronóstico que los adenocarcinomas poco diferenciados (Adachi y col, 2000; Wang y col, 2010). Sin embargo, en este estudio, no se encontró una asociación significativa entre la sobrevida y el tamaño del tumor o entre la diferenciación tumoral.

En este estudio, también se analizó si existe una asociación entre los niveles de expresión (MFI) o el porcentaje de células positivas para los NKG2DL estudiados y los distintos parámetros clínico-patológicos de la enfermedad. No se observó ninguna correlación entre la expresión de ligandos de NKG2D tanto en superficie celular como MICA soluble con los factores clínico-patológicos (datos no mostrados).

Sin embargo, al evaluar la razón de los niveles de expresión (MFI) para MICB y ULBP-1 entre el tumor y la mucosa con relación al estadio del cáncer gástrico, observamos que los tumores cuya expresión de estos NKG2DL era mayor que en la mucosa adyacente correspondían a tumores en estadios avanzados, mientras que aquellos tumores que poseían una expresión de NKG2DL similar o menor al de la mucosa se caracterizaban como tumores diagnosticados en fase avanzada de la enfermedad (Figura 16B).

La eliminación tumoral mediada por NKG2D se considera efectiva en estados temprano del crecimiento tumoral (Diefenbach y col, 2001; Guerra y col, 2008; Siewert y col, 1998). De este modo, los niveles de expresión de ligandos de NKG2D en la superficie de células tumorales puede determinar la eficacia de la respuesta antitumoral, por lo que una disminución de la expresión de estos ligando en etapas tempranas del tumor podría evitar la inmunovigilancia mediada por NKG2D durante el desarrollo tumoral. Además, si esta disminución es debida a la expresión de los ligandos solubles, estos pueden actuar también sobre el receptor NKG2D, evitando la eliminación del tumor. De este modo, podrían seleccionarse y crecer células tumorales que expresen ligandos de NKG2D, aumentando la disponibilidad de la expresión de ligandos en los estados tardíos, lo que también puede afectar la función del receptor NKG2D, ya que se ha descrito que la expresión sostenida de los NKG2DL en los tumores puede también promover la disminución de la expresión del receptor NKG2D de las células efectoras, comprometiendo así su citotoxicidad (Oppenheim y col, 2005).

Además, no se encontró una relación entre la expresión de los ligandos y la sobrevida de los pacientes, tampoco para la expresión de MICA soluble (Figura 18). Por esta razón, postulamos que la expresión de NKG2DL en superficie celular o MICA soluble en el suero no se correlacionan con un mal pronóstico en CG.

Estudios han demostrado que en algunos tipos de cáncer, como el de ovario, carcinoma de cuello y cabeza, mieloma múltiple y leucemia, los niveles elevados de sMICA en el suero estarían asociados con un peor pronóstico para los pacientes (Jinushi y col, 2008; Li y col, 2009; Salih y col, 2003; Tamaki y col, 2008). También se ha demostrado que los niveles de sMICA aumenta con la progresión tumoral para el cáncer de próstata y hepatocarcinoma, entre otros (Holdenrieder y col, 2006a; Jinushi y col, 2005; Jinushi y col, 2008; Wu y col, 2004). En algunos tumores, como el cáncer de pulmón, altos niveles de sMICA son detectables ya en etapas tempranas de la enfermedad sin un aumento durante la progresión (Holdenrieder y col, 2006a), por lo que es posible que este también pueda ser el caso del cáncer gástrico, cuyos niveles de sMICA no se correlacionan con la progresión de la enfermedad.

En general, el efecto de la expresión en superficie celular de NKG2DL y la presencia de ligandos solubles en el suero en CG requiere una evaluación más a fondo, debido a que se observan distintos grupos de pacientes: unos que expresan altos niveles de NKG2DL en superficie y otros que expresan niveles muy bajos de los ligandos. Es necesario el análisis de un mayor número de pacientes para corroborar estos resultados y quizás para poder obtener alguna correlación significativa con el desarrollo y progresión de la enfermedad.

También es necesario investigar si la expresión de NKG2DL en la superficie de las células tumorales y/o la expresión de NKG2DL soluble tienen alguna influencia en el microambiente inmunológico en el cáncer gástrico, ya que altos niveles de ligandos de NKG2D solubles podría llevar a una regulación negativa del receptor NKG2D en células citolíticas y, de este modo, una insensibilidad o anergia de las células del sistema inmune, lo que podría resultar en la evasión del ataque inmune por tumores que expresen los ligandos solubles del receptor NKG2D.

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio nos permiten corroborar parte de la hipótesis propuesta. Se observó una correlación entre la expresión de MICB y ULBP1 en las células derivadas del tumor con la progresión tumoral (determinada por el estadio de la enfermedad (Csendes y col, 1992)). Sin embargo, la expresión de NKG2DL en células derivadas del tumor o MICA en forma soluble en el suero no se correlaciona con una menor sobrevida en los pacientes con CG.

Finalmente, los mecanismos por los cuales los NKG2DL median la función o disfunción inmune pueden ser diversos en diferentes tumores o diferir de acuerdo al microambiente tumoral. Los resultados obtenidos en la presente Tesis nos permiten postular que el aumento de los niveles de superficie de ligandos de NKG2D en la superficie de células tumorales en estadios avanzados de la enfermedad podría ser uno de los mecanismos por el cual el adenocarcinoma gástrico escapa de la vigilancia inmune.

## 5. CONCLUSIONES

Los resultados de nuestro estudio demuestran que los ligandos de NKG2D se expresan tanto en células derivadas de adenocarcinoma gástrico como en la mucosa gástrica adyacente al tumor. Se observó la mayor presencia de células positivas para los ligandos ULBP-1 y ULBP-3 en la mucosa en comparación al tejido tumoral; sin embargo, para los demás ligandos estudiados, no hay una diferencia estadísticamente significativa en la expresión entre el tumor y la mucosa gástrica.

El 71 % de los pacientes evaluados expresa MICA soluble en el suero. No obstante, no se encontró diferencia estadísticamente significativa respecto a la concentración de sMICA sérico entre los pacientes con cáncer gástrico y controles sanos.

Los niveles de MICA soluble se correlacionaron inversamente con la expresión en superficie celular de MICA y con el porcentaje de células positivas para este ligando presentes en el tumor.

Los tumores en estadios tardíos (III y IV) expresaron significativamente mayores niveles de MICB y ULBP-1 (con respecto a la mucosa) en comparación a los estadios temprano (I y II), por lo que este aumento de la expresión de estas moléculas podría estar asociado a la progresión del tumor.

La expresión de MICA, ULBP-2 y ULBP-3, así como sMICA sérico no se correlaciona con los parámetros clínico-patológicos analizados, tampoco con la supervivencia de los pacientes, por lo que su expresión no se relaciona ni con el pronóstico ni con la progresión del cáncer gástrico.

## 6. ANEXOS

### Anexo 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

## Anexo 2

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. Carolina Hager Ribeiro

INSTITUCIÓN: Universidad de Chile

TELÉFONO: (2) 978-6088

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Investigador responsable: Dra. Carolina Hager Ribeiro

Teléfono: (2) 978-6088



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

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

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

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

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

## Anexo 3



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

**PROTOCOLO DE APROBACIÓN DE PROYECTOS CLÍNICOS**

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

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

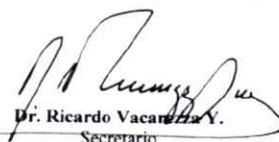
y que conducirá como Investigador Principal la **Dra. Carolina Hager Ribeiro** en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y la colaboración del Dr. Marco Bustamante Jefe del Equipo de Cirugía Digestivo Alto del Servicio de Cirugía del Hospital del Salvador.

Se analizó y aprobó los siguientes documentos del estudio:

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

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

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

  
**Dr. Ricardo Vacarezza Y.**  
 Secretario

Santiago, 03 de Noviembre de 2009



## Anexo 4



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



**ACTA DE APROBACIÓN  
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS**

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

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

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

*El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:*

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

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

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



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



09 JUL. 2009

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

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

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

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

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



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

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

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

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi Y., Oshiro T., Mori M., Maehara Y., y Sugimachi K. 1997. Tumor size as a simple prognostic indicator for gastric carcinoma. *Annals of Surgical Oncology* **4**: 137-40.
- Adachi Y., Yasuda K., Inomata M., Sato K., Shiraishi N., y Kitano S. 2000. Pathology and prognosis of gastric carcinoma: well versus poorly differentiated type. *Cancer* **89**: 1418-24.
- Arkenau H.T. 2009. Gastric cancer in the era of molecularly targeted agents: current drug development strategies. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **135**: 855-66.
- Bahram S., Bresnahan M., Geraghty D.E., y Spies T. 1994. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 6259-63.
- Balzar M., Winter M.J., de Boer C.J., y Litvinov S.V. 1999. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *Journal of Molecular Medicine* **77**: 699-712.
- Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J.H., Lanier L.L., y Spies T. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* **285**: 727-9.
- Bolanos-Garcia V.M., y Davies O.R. 2006. Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta* **1760**: 1304-13.
- Burgess S.J., Marusina A.I., Pathmanathan I., Borrego F., y Coligan J.E. 2006. IL-21 down-regulates NKG2D/DAP10 expression on human NK and CD8+ T cells. *Journal of Immunology* **176**: 1490-7.
- Caligiuri M.A. 2008. Human natural killer cells. *Blood* **112**: 461-9.
- Cerwenka A., Baron J.L., y Lanier L.L. 2001. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 11521-6.
- Cerwenka A., y Lanier L.L. 2001. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nature Reviews Immunology* **1**: 41-9.
- Champsaur M., y Lanier L.L. 2010. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunological Reviews* **235**: 267-85.
- Chan C.J., Andrews D.M., y Smyth M.J. 2008. Can NK cells be a therapeutic target in human cancer? *European Journal of Immunology* **38**: 2964-8.
- Chang C., Dietrich J., Harpur A.G., Lindquist J.A., Haude A., Loke Y.W., King A., Colonna M., Trowsdale J., y Wilson M.J. 1999. Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties. *Journal of Immunology* **163**: 4651-4.
- Compare D., Rocco A., y Nardone G. 2010. Risk factors in gastric cancer. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* **14**: 302-8.
- Cosman D., Mullberg J., Sutherland C.L., Chin W., Armitage R., Fanslow W., Kubin M., y Chalupny N.J. 2001. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* **14**: 123-33.
- Csendes A., Smok G., Medina E., Salgado I., Rivera R., y Quiral M. 1992. [Clinical course characteristics of gastric cancer 1958-1990]. *Revista Médica de Chile* **120**: 36-42.

- Dennert G., Anderson C.G., y Prochazka G. 1987. High activity of N-alpha-benzyloxycarbonyl-L-lysine thiobenzyl ester serine esterase and cytolytic perforin in cloned cell lines is not demonstrable in in-vivo-induced cytotoxic effector cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 5004-8.
- Dicken B.J., Bigam D.L., Cass C., Mackey J.R., Joy A.A., y Hamilton S.M. 2005. Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. *Annals of surgery* **241**: 27-39.
- Diefenbach A., Jensen E.R., Jamieson A.M., y Raulet D.H. 2001. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* **413**: 165-71.
- Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J., y Schreiber R.D. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* **3**: 991-8.
- Dunn G.P., Old L.J., y Schreiber R.D. 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology* **22**: 329-60.
- Eisele G., Wischhusen J., Mittelbronn M., Meyermann R., Waldhauer I., Steinle A., Weller M., y Friese M.A. 2006. TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain : a Journal of Neurology* **129**: 2416-25.
- El-Gazzar A., Groh V., y Spies T. 2013. Immunobiology and conflicting roles of the human NKG2D lymphocyte receptor and its ligands in cancer. *Journal of Immunology* **191**: 1509-15.
- Farag S.S., y Caligiuri M.A. 2006. Human natural killer cell development and biology. *Blood Reviews* **20**: 123-37.
- Ferlazzo G., Thomas D., Lin S.L., Goodman K., Morandi B., Muller W.A., Moretta A., y Munz C. 2004. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *Journal of Immunology* **172**: 1455-62.
- Fernandez-Messina L., Ashiru O., Boutet P., Aguera-Gonzalez S., Skepper J.N., Reyburn H.T., y Vales-Gomez M. 2010. Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. *The Journal of Biological Chemistry* **285**: 8543-51.
- Frigoul A., y Lefranc M.-P. 2005. MICA: Standardized IMGT allele nomenclature, polymorphisms and diseases. *Recent Research Developments in Human Genetics* **3**: 95-145.
- Fuertes M.B., Girart M.V., Molinero L.L., Domaica C.I., Rossi L.E., Barrio M.M., Mordoh J., Rabinovich G.A., y Zwirner N.W. 2008. Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunology* **180**: 4606-14.
- Garrity D., Call M.E., Feng J., y Wucherpfennig K.W. 2005. The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 7641-6.
- Gasser S., Orsulic S., Brown E.J., y Raulet D.H. 2005. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* **436**: 1186-90.
- Ghaffarzadehgan K., Jafarzadeh M., Raziie H.R., Sima H.R., Esmaili-Shandiz E., Hosseinezhad H., Taghizadeh-Kermani A., Moaven O., y Bahrani M. 2008. Expression of cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinoma and its prognostic importance. *World Journal of Gastroenterology* **14**: 6376-81.
- Ghiringhelli F., Menard C., Terme M., Flament C., Taieb J., Chaput N., Puig P.E., Novault S., Escudier B., Vivier E., Lecesne A., Robert C., Blay J.Y., Bernard J., Caillat-Zucman S., Freitas A., Tursz T., Wagner-Ballon O., Capron C., Vainchencker W., Martin F., y Zitvogel L. 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *The Journal of Experimental Medicine* **202**: 1075-85.

- Globocam. 2008. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide 2008. World Health Organization International Agency for Research on Cancer.
- Groh V., Bahram S., Bauer S., Herman A., Beauchamp M., y Spies T. 1996. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 12445-50.
- Groh V., Bruhl A., El-Gabalawy H., Nelson J.L., y Spies T. 2003. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 9452-7.
- Groh V., Rhinehart R., Randolph-Habecker J., Topp M.S., Riddell S.R., y Spies T. 2001. Costimulation of CD8 $\alpha$  T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nature Immunology* **2**: 255-60.
- Groh V., Rhinehart R., Secrist H., Bauer S., Grabstein K.H., y Spies T. 1999. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *PNAS* **96**: 6879-84.
- Groh V., Wu J., Yee C., y Spies T. 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* **419**: 734-8.
- Guerra N., Tan Y.X., Joncker N.T., Choy A., Gallardo F., Xiong N., Knoblaugh S., Cado D., Greenberg N.M., y Raulet D.H. 2008. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* **28**: 571-80.
- Guo P., Li Y., Zhu Z., Sun Z., Lu C., Wang Z., y Xu H. 2013. Prognostic value of tumor size in gastric cancer: an analysis of 2,379 patients. *Tumor Biology* **34**: 1027-35.
- Hayakawa Y., Kelly J.M., Westwood J.A., Darcy P.K., Diefenbach A., Raulet D., y Smyth M.J. 2002. Cutting edge: tumor rejection mediated by NKG2D receptor-ligand interaction is dependent upon perforin. *Journal of Immunology* **169**: 5377-81.
- Holdenrieder S., Eichhorn P., Beuers U., Samtleben W., Stieber P., Nagel D., Peterfi A., Steinle A., y Salih H.R. 2007. Soluble NKG2D ligands in hepatic autoimmune diseases and in benign diseases involved in marker metabolism. *Anticancer Research* **27**: 2041-5.
- Holdenrieder S., Stieber P., Peterfi A., Nagel D., Steinle A., y Salih H.R. 2006a. Soluble MICA in malignant diseases. *International Journal of Cancer* **118**: 684-7.
- Holdenrieder S., Stieber P., Peterfi A., Nagel D., Steinle A., y Salih H.R. 2006b. Soluble MICB in malignant diseases: analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **55**: 1584-9.
- Hornig T., Bezbradica J.S., y Medzhitov R. 2007. NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway. *Nature Immunology* **8**: 1345-52.
- Houchins J.P., Yabe T., McSherry C., y Bach F.H. 1991. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine* **173**: 1017-20.
- Hue S., Mention J.J., Monteiro R.C., Zhang S., Cellier C., Schmitz J., Verkarre V., Fodil N., Bahram S., Cerf-Bensussan N., y Caillat-Zucman S. 2004. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* **21**: 367-77.
- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., y Forman D. 2011. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **61**: 69-90.
- Jinushi M., Takehara T., Tatsumi T., Hiramatsu N., Sakamori R., Yamaguchi S., y Hayashi N. 2005. Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-

- related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. *Journal of Hepatology* **43**: 1013-20.
- Jinushi M., Takehara T., Tatsumi T., Kanto T., Groh V., Spies T., Kimura R., Miyagi T., Mochizuki K., Sasaki Y., y Hayashi N. 2003. Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. *International Journal of Cancer* **104**: 354-61.
- Jinushi M., Vanneman M., Munshi N.C., Tai Y.T., Prabhala R.H., Ritz J., Neuberger D., Anderson K.C., Carrasco D.R., y Dranoff G. 2008. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 1285-90.
- Jun K.H., Jung H., Baek J.M., Chin H.M., y Park W.B. 2009. Does tumor size have an impact on gastric cancer? A single institute experience. *Langenbeck's Archives of Surgery* **394**: 631-5.
- Kandulski A., Malfertheiner P., y Wex T. 2010. Role of regulatory T-cells in *H. pylori*-induced gastritis and gastric cancer. *Anticancer Research* **30**: 1093-103.
- Ko Y.H., Won H.S., Jeon E.K., Hong S.H., Roh S.Y., Hong Y.S., Byun J.H., Jung C.K., y Kang J.H. 2011. Prognostic significance of CD44s expression in resected non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* **11**: 340.
- Kuroda H., Saito H., y Ikeguchi M. 2012. Decreased number and reduced NKG2D expression of Vdelta1 gammadelta T cells are involved in the impaired function of Vdelta1 gammadelta T cells in the tissue of gastric cancer. *Gastric cancer* **15**: 433-439.
- Laemmli U.K., Molbert E., Showe M., y Kellenberger E. 1970. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *Journal of Molecular Biology* **49**: 99-113.
- Lee K., Cáceres D., Varela N., Csendes D.A., y Ríos R.H., Quiñones, S. L. 2006. Cytochrome P4501A1 (CYP1A1), glutathione S transferase M1 (GSTM1) polymorphisms and their association with smoking and alcohol consumption as gastric cancer susceptibility biomarkers. *Revista Médica de Chile* **134**: 1107-1115.
- Li K., Mandai M., Hamanishi J., Matsumura N., Suzuki A., Yagi H., Yamaguchi K., Baba T., Fujii S., y Konishi I. 2009. Clinical significance of the NKG2D ligands, MICA/B and ULBP2 in ovarian cancer: high expression of ULBP2 is an indicator of poor prognosis. *Cancer Immunology Immunotherapy* **58**: 641-52.
- Li P., Morris D.L., Willcox B.E., Steinle A., Spies T., y Strong R.K. 2001. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nature Immunology* **2**: 443-51.
- Lopez-Larrea C., Suarez-Alvarez B., Lopez-Soto A., Lopez-Vazquez A., y Gonzalez S. 2008. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends in Molecular Medicine* **14**: 179-89.
- McGilvray R.W., Eagle R.A., Rolland P., Jafferji I., Trowsdale J., y Durrant L.G. 2010. ULBP2 and RAET1E NKG2D ligands are independent predictors of poor prognosis in ovarian cancer patients. *International Journal of Cancer* **127**: 1412-20.
- Medina E., y Kaempffer A. 2001. Mortalidad por cáncer en Chile: consideraciones epidemiológicas. *Revista Médica de Chile* **129**: 1195-1202.
- Mincheva-Nilsson L., Nagaeva O., Chen T., Stendahl U., Antsiferova J., Mogren I., Hernestal J., y Baranov V. 2006. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. *Journal of Immunology* **176**: 3585-92.
- Minsal. 2010. Guía Clínica Cáncer Gástrico.



- Mistry A.R., y O'Callaghan C.A. 2007. Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. *Immunology* **121**: 439-47.
- Nausch N., y Cerwenka A. 2008. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* **27**: 5944-58.
- Oppenheim D.E., Roberts S.J., Clarke S.L., Filler R., Lewis J.M., Tigelaar R.E., Girardi M., y Hayday A.C. 2005. Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nature Immunology* **6**: 928-37.
- Osaki T., Saito H., Yoshikawa T., Matsumoto S., Tatebe S., Tsujitani S., y Ikeguchi M. 2007. Decreased NKG2D expression on CD8+ T cell is involved in immune evasion in patients with gastric cancer. *Clinical Cancer Research* **13**: 382-7.
- Podack E.R., y Dennert G. 1983. Assembly of two types of tubules with putative cytolytic function by cloned natural killer cells. *Nature* **302**: 442-5.
- Raffaghello L., Prigione I., Airoidi I., Camoriano M., Levreri I., Gambini C., Pende D., Steinle A., Ferrone S., y Pistoia V. 2004. Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia* **6**: 558-68.
- Robertson M.J. 2002. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Journal of Leukocyte Biology* **71**: 173-83.
- Saito H., Osaki T., y Ikeguchi M. 2012. Decreased NKG2D expression on NK cells correlates with impaired NK cell function in patients with gastric cancer. *Gastric cancer* **15**: 27-33.
- Salih H.R., Antropius H., Gieseke F., Lutz S.Z., Kanz L., Rammensee H.G., y Steinle A. 2003. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* **102**: 1389-96.
- Salih H.R., Holdenrieder S., y Steinle A. 2008. Soluble NKG2D ligands: prevalence, release, and functional impact. *Frontiers in Bioscience* **13**: 3448-56.
- Salih H.R., Rammensee H.G., y Steinle A. 2002. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *Journal of Immunology* **169**: 4098-102.
- Schrambach S., Ardizzone M., Leymarie V., Sibilia J., y Bahram S. 2007. In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. *PLoS ONE* **2**: e518.
- Serrano A.E., Menares-Castillo E., Garrido-Tapia M., Ribeiro C.H., Hernandez C.J., Mendoza-Naranjo A., Gatica-Andrades M., Valenzuela-Diaz R., Zuniga R., Lopez M.N., Salazar-Onfray F., Aguillon J.C., y Molina M.C. 2010. Interleukin 10 decreases MICA expression on melanoma cell surface. *Immunology & Cell Biology*.
- Sers C., Kuner R., Falk C.S., Lund P., Sueltmann H., Braun M., Buness A., Ruschhaupt M., Conrad J., Mang-Fatehi S., Stelnic I., Krapfenbauer U., Poustka A., y Schafer R. 2009. Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells. *International Journal of Cancer* **125**: 1626-39.
- Siewert J.R., Bottcher K., Stein H.J., y Roder J.D. 1998. Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Annals of Surgery* **228**: 449-61.
- Smyth M.J., Hayakawa Y., Takeda K., y Yagita H. 2002. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* **2**: 850-61.
- Smyth M.J., Swann J., Cretney E., Zerafa N., Yokoyama W.M., y Hayakawa Y. 2005. NKG2D function protects the host from tumor initiation. *The Journal of Experimental Medicine* **202**: 583-8.
- Song H., Hur D.Y., Kim K.E., Park H., Kim T., Kim C.W., Bang S., y Cho D.H. 2006a. IL-2/IL-18 prevent the down-modulation of NKG2D by TGF-beta in NK cells via the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *Cell Immunology* **242**: 39-45.

- Song H., Kim J., Cosman D., y Choi I. 2006b. Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression. *Cellular Immunology* **239**: 22-30.
- Stagg J., y Smyth M.J. 2007. NK cell-based cancer immunotherapy. *Drug News & Perspectives* **20**: 155-63.
- Studier F.W. 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification* **41**: 207-34.
- Sutherland C.L., Rabinovich B., Chalupny N.J., Brawand P., Miller R., y Cosman D. 2006. ULBPs, human ligands of the NKG2D receptor, stimulate tumor immunity with enhancement by IL-15. *Blood* **108**: 1313-9.
- Tamaki S., Kawakami M., Yamanaka Y., Shimomura H., Imai Y., Ishida J., Yamamoto K., Ishitani A., Hatake K., y Kirita T. 2009. Relationship between soluble MICA and the MICA A5.1 homozygous genotype in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clinical Immunology* **130**: 331-7.
- Tamaki S., Sanefuzi N., Kawakami M., Aoki K., Imai Y., Yamanaka Y., Yamamoto K., Ishitani A., Hatake K., y Kirita T. 2008. Association between soluble MICA levels and disease stage IV oral squamous cell carcinoma in Japanese patients. *Human Immunology* **69**: 88-93.
- Trinchieri G. 1989. Biology of natural killer cells. *Advances in Immunology* **47**: 187-376.
- Upshaw J.L., Arneson L.N., Schoon R.A., Dick C.J., Billadeau D.D., y Leibson P.J. 2006. NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nature immunology* **7**: 524-32.
- Wang W., Li Y.F., Sun X.W., Chen Y.B., Li W., Xu D.Z., Guan X.X., Huang C.Y., Zhan Y.Q., y Zhou Z.W. 2010. Prognosis of 980 patients with gastric cancer after surgical resection. *Chinese Journal of Cancer* **29**: 923-30.
- Washington K. 2010. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. *Ann Surg Oncol* **17**: 3077-9.
- Watson N.F., Spendlove I., Madjd Z., McGilvray R., Green A.R., Ellis I.O., Scholefield J.H., y Durrant L.G. 2006. Expression of the stress-related MHC class I chain-related protein MICA is an indicator of good prognosis in colorectal cancer patients. *International Journal of Cancer* **118**: 1445-52.
- Wiemann K., Mittrucker H.W., Feger U., Welte S.A., Yokoyama W.M., Spies T., Rammensee H.G., y Steinle A. 2005. Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *Journal of Immunology* **175**: 720-9.
- Wu J., Cherwinski H., Spies T., Phillips J.H., y Lanier L.L. 2000. DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine* **192**: 1059-68.
- Wu J., Song Y., Bakker A.B., Bauer S., Spies T., Lanier L.L., y Phillips J.H. 1999. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* **285**: 730-2.
- Wu J.D., Higgins L.M., Steinle A., Cosman D., Haugk K., y Plymate S.R. 2004. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. *The Journal of Clinical Investigation* **114**: 560-8.
- Xiao P., Xue L., Che L.H., Peng J.J., Wu H.X., Li Y., y Qiao H. 2008. Expression and roles of MICA in human osteosarcoma. *Histopathology* **52**: 640-2.
- Zamai L., Ahmad M., Bennett I.M., Azzoni L., Alnemri E.S., y Perussia B. 1998. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *The Journal of Experimental Medicine* **188**: 2375-80.

Zhang C., Zhang J., Niu J., Zhou Z., y Tian Z. 2008. Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Human Immunology* **69**: 490-500.

Zu H., Wang F., Ma Y., y Xue Y. 2013. Stage-stratified analysis of prognostic significance of tumor size in patients with gastric cancer. *PLoS ONE* **8**: e54502.