

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**ESTUDIO DE LA FRECUENCIA Y FUNCIONES EFECTORAS DE LINFOCITOS NKT  
DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA GÁSTRICO**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera, como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

**GUILLERMO ANDRÉS PÉREZ MATELUNA**

**PROFESOR GUIA: CAROLINA HAGER RIBEIRO**

**TEMUCO – CHILE**  
**2012**

"ESTUDIO DE LA FRECUENCIA Y FUNCIONES EFECTORAS DE LINFOCITOS NKT DE  
PACIENTES CON ADENOCARCINOMA GÁSTRICO "

PROFESOR GUIA

---

Carolina Hager Ribeiro, Ph.D.  
Programa Disciplinario de Inmunología  
Instituto de Ciencias Biomédicas  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile

PROFESORES CONSEJEROS

: 

---

  
Mg. Favián Treulén Seguel  
Facultad de Cs. Agropecuarias y Forestales  
Universidad de La Frontera

CALIFICACION PROMEDIO TESIS: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera manifestar mis agradecimientos a mi familia, por su apoyo incondicional, y a todos mis amigos, por su afecto y compañía.

Quisiera agradecer de forma especial a mi tutora de tesis, Dra. Carolina Hager Ribeiro, por haber contribuido en forma significativa en mi formación profesional y científica, por creer en mí, por darme ánimo en momentos difíciles. Gracias por todo.

A la Dra. María Carmen Molina, por abrirme las puertas de su laboratorio. A mi profesor y co-tutor Favián Treulen, por sus consejos y colaboración. A la profesora Emma Bensch, por haber participado en la defensa de este trabajo y su interés sobre el mismo.

Agradezco a todos los integrantes del Programa Disciplinario de Inmunología de la Universidad de Chile, en el cual conocí personas geniales, que me integraron de inmediato a este gran grupo.

A todos mis compañeros del laboratorio de Inmunovigilancia y Evasión Inmune, a Macarena Garrido, Carolina Hernández, Bastián Jerez, por su colaboración y ayuda. Quiero agradecer en especial a mi amiga, ex-vecina, y ex compañera de laboratorio Karina Kramm, por todas esas conversaciones en el trayecto a casa, por el celular y en el P.C., también quiero agradecer en particular a mi amiga Francisca Cristi, ojalá en este mundo existieran más personas como tú. Gracias por todo Fran, de todo corazón. Sé que te irá bien en todo, posees una luz natural, lo cual te hace que seas una persona única.

Finalmente vuelvo a agradecer a mi familia, a quienes quiero mucho. A mi madre, Sonia, y a mi padre, Eduardo, los cuales han sido mis pilares durante mi formación, muchas gracias, los amo mucho. A mi hermana Catalina, que la amo con todo mi corazón, ella es quien da alegría a nuestro hogar. A mis amigas Leyla Parra, Carla Cisternas y Mauren Flores, las amo, y se nos viene un futuro exitoso donde estaremos siempre juntos.

## ÍNDICE

<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	2
2.1 Cáncer	2
2.2 Adenocarcinoma gástrico.	2
2.3 El Sistema Inmune	3
2.4 La respuesta inmune contra el cáncer	3
2.5 Células <i>Natural Killer</i> (NK)	5
2.6 Células <i>Natural Killer</i> T (NKT)	5
2.7 La molécula CD1d	7
2.8 $\alpha$ -Galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer)	8
2.9 Respuesta inmune mediada por células NKT	8
2.10 Células NKT y cáncer	11
<b>3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO</b>	15
3.1 Hipótesis	15
3.2 Objetivo general	16
3.3 Objetivos específicos	16
<b>4 METODOLOGÍA</b>	17
4.1 Pacientes y obtención de muestras	17
4.2 Transporte y procesamiento de las muestras de tumor y mucosa	18
4.3 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	20
4.4.1 Determinación de la frecuencia de células NKT	20
4.4.2 Determinación del patrón de citoquinas expresadas por las células NKT	22
4.5 Cultivo de Líneas Celulares	22

4.6 Determinación de la expresión de CD1d en células derivadas de la mucosa y tumor de pacientes con adenocarcinoma gástrico.	23
4.7 Análisis Estadístico	23
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>24</b>
5.1 Características clínico-patológicas de los pacientes con cáncer gástrico	24
5.2 Frecuencia de células NKT en sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico	25
5.3 Frecuencia de células NKT infiltrantes de tumor y mucosa	27
5.4 Análisis de la expresión de citoquinas intracelulares por células NKT de sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico	29
5.5 Perfil de expresión de citoquinas intracelulares por células NKT infiltrantes de tumor y mucosa gástrica	35
5.6. Análisis correlacional de los niveles de citoquinas de células NKT con las características clínico-patológicas del tumor	40
5.7. Análisis de expresión de marcadores de superficie celular en líneas celulares de origen tumoral	42
5.8. Análisis de expresión de marcadores de superficie celular en células derivadas del tejido tumoral y de mucosa	44
<b>6 DISCUSIÓN</b>	<b>46</b>
6.1 Frecuencia y perfil de citoquinas intracelulares de células NKT de sangre periférica	46
6.2 Frecuencia y perfil de citoquinas de células NKT infiltrantes de tumor y mucosa gástrica	48
<b>7 CONCLUSIONES</b>	<b>49</b>
<b>8 LITERATURA CITADA</b>	<b>51</b>
<b>9 ANEXOS</b>	<b>59</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Polaridad de la respuesta inmune mediada por células NKT en el cáncer.	14
<b>2</b>	Adenocarcinoma gástrico	18
<b>3</b>	Fragmentación y macerado de la muestra de adenocarcinoma gástrico	19
<b>4</b>	Citómetro de Flujo	21
<b>5</b>	Porcentaje de células NKT en sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico	26
<b>6</b>	Frecuencia de células NKT en muestras de tejido tumoral y de mucosa gástrica	28
<b>7</b>	Datos representativos de citometría de flujo de sangre periférica de un individuo sano	31
<b>8</b>	Datos representativos de citometría de flujo correspondiente a un paciente con adenocarcinoma gástrico	32
<b>9</b>	Expresión de citoquinas intracelulares por células NKT de sangre periférica provenientes de pacientes con adenocarcinoma gástrico e individuos sanos	33

<b>10</b>	Porcentaje de células NKT de sangre periférica productoras de citoquinas en pacientes con adenocarcinoma gástrico e individuos sanos	34
<b>11</b>	Datos representativos de una citometría de flujo correspondiente al tejido tumoral de un paciente con adenocarcinoma gástrico	36
<b>12</b>	Datos distintivos de una citometría de flujo correspondiente a la mucosa gástrica de un paciente con adenocarcinoma gástrico	37
<b>13</b>	Expresión de citoquinas intracelulares por células NKT infiltrantes de tejido tumoral y de mucosa adyacente al tumor de pacientes con adenocarcinoma gástrico	38
<b>14</b>	Expresión de citoquinas intracelulares por células NKT infiltrantes de tejido tumoral y de mucosa adyacente al tumor de pacientes con adenocarcinoma gástrico	39
<b>15</b>	Correlación entre IL-10 intracelular de células NKT infiltrantes de tumor y tamaño tumoral de pacientes con adenocarcinoma gástrico	40
<b>16</b>	Correlación entre IFN- $\gamma$ y TGF- $\beta$ intracelular de células NKT de sangre periférica y tamaño tumoral de pacientes con adenocarcinoma gástrico	41
<b>17</b>	Expresión de CD1d en líneas celulares de origen tumoral	43
<b>18</b>	Expresión de CD1d en células derivadas de tumor y mucosa de pacientes	44
<b>19</b>	Expresión de CD1d en células derivadas de tumor y mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico	45

## RESUMEN

El cáncer gástrico (CG) es la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo. En Chile, representa la principal causa de mortalidad derivada de cáncer. Entre los constituyentes celulares que median la respuesta inmune contra tumores y proporcionan protección contra el cáncer son las células NKT, una subpoblación de linfocitos T que expresan un receptor de células T (TCR)  $\alpha/\beta$  con un repertorio restringido, así como marcadores de células asesinas naturales (o células *natural killer*, NK). El TCR de las células NKT reconoce glicolípidos presentados por CD1d, una molécula presentadora de antígenos no-clásica que se asocia con  $\beta 2$  microglobulina y se expresa en una amplia gama de células, incluyendo células presentadoras de antígeno profesionales y algunos tipos de células tumorales. Las células NKT activadas liberan grandes cantidades de citoquinas del perfil T *helper* 1 (Th1) (como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) y citoquinas de tipo Th2 (como IL-4 e IL-13), entre otras citoquinas inmunoregulatoras (por ejemplo, IL-10 y TGF- $\beta$ ), las cuales regulan la función de las células dendríticas, macrófagos, células NK, linfocitos B y linfocitos T convencionales y reguladores.

Varias vías relacionadas con la respuesta inmune están desreguladas durante la tumorigénesis. Por ejemplo, diversos estudios apoyan un papel para la deficiencia en el número de células NKT o disminución en la producción de citoquinas (principalmente IFN- $\gamma$ ) durante el desarrollo del cáncer, lo que indicaría que estas células participan en la respuesta inmune anti-tumoral, y que la evasión de la respuesta inmune mediada por las células NKT puede contribuir a la progresión del tumor. En este estudio, se evaluó la frecuencia y la producción de citoquinas por células NKT en pacientes con cáncer gástrico, parámetros que, hasta la fecha, no han sido descritos en la literatura. En la etapa experimental, se obtuvieron células derivadas del tumor primario y mucosa gástrica adyacente al tumor de pacientes con cáncer gástrico. Además, se extrajeron células mononucleares de sangre periférica de los mismos pacientes y de donantes sanos. Posteriormente, las células fueron analizadas, por citometría de flujo para identificar la población de linfocitos NKT y, de esta manera, identificar su frecuencia y producción de distintas citoquinas.

En este estudio, se reporta que pacientes con adenocarcinoma gástrico poseen una mayor frecuencia de células NKT en sangre periférica comparado a los controles sanos. Además, estos pacientes presentan un mayor número de células NKT secretoras de IL-10 y un menor porcentaje de células NKT secretoras de IFN- $\gamma$  en la periferia. En el microambiente tumoral y en la mucosa gástrica adyacente al tumor, se pudo observar la presencia de células NKT; sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la frecuencia de estas células y la producción de citoquinas entre ambos tejidos gástricos. Asimismo, se observó una correlación entre el tamaño del tumor y la producción de IL-10 por parte de las células NKT en el microambiente tumoral. Por otro lado, las citoquinas producidas por células NKT de sangre periférica también fueron asociadas al tamaño tumoral, y los resultados mostraron correlaciones negativas y positivas para IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ , respectivamente. En este estudio, también se ha observado que líneas celulares de cáncer gástrico no expresan la molécula CD1d; sin embargo, tanto el tumor como la mucosa gástrica de pacientes con CG presentan células que expresan esta molécula en su membrana celular. Estos resultados sugieren que las células NKT, en CG, podrían contribuir a la progresión tumoral al comprometer, a través de una alta expresión de IL-10 y baja producción de IFN- $\gamma$ , el desarrollo de una respuesta inmune efectiva contra el cáncer.

## SUMMARY

Gastric cancer (GC) is the second most common cause of cancer death in the world. In Chile, it represents the leading cause of cancer mortality. Among the components that mediate the cellular immune response against tumors and provide protection against cancer are the NKT cells, a subpopulation of T lymphocytes expressing T cell receptor (TCR)  $\alpha/\beta$  with a restricted repertoire, as well as Natural Killer (NK) cell markers. The TCR of NKT cells recognizes glycolipids presented by CD1d, a non-classical antigen-presenting molecule that associates with  $\beta 2$  microglobulin and is expressed in a wide range of cells, including professional antigen presenting cells and some tumor cell types. Activated NKT cells release large amounts of cytokines of the T helper 1 (Th1) profile (as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) and Th2-type cytokines (such as IL-4 and IL-13), among other immunoregulatory cytokines (such as IL-10 and TGF- $\beta$ ), which regulate the function of dendritic cells, macrophages, NK cells, B lymphocytes and conventional and regulatory T lymphocytes.

Several pathways related to the immune response are deregulated during tumorigenesis. For instance, numerous studies support a role for the deficiency in the number of NKT cells or decreased production of cytokines (mainly IFN- $\gamma$ ) in the development of cancer, indicating that NKT cells are involved in the anti-tumor immune response, and evasion of the immune response mediated by NKT cells may contribute to tumor progression.

In this study, we evaluated the frequency and cytokine production by NKT cells from patients with gastric adenocarcinoma, as these parameters have not been described in the literature to date. During the experimental stage of this Thesis, cells were obtained from the primary tumor and from the adjacent gastric mucosa of patients with gastric cancer. Furthermore, mononuclear cells were extracted from the peripheral blood of the same patients, as well as from healthy donors. These cells were analyzed, by flow cytometry, to identify NKT lymphocytes in order to evaluate their frequency and cytokine production. In this study, it is reported that gastric adenocarcinoma patients have an increased frequency of NKT cells in the peripheral blood as

compared to healthy donors. In addition, these patients have an increased number of NKT cells secreting IL-10 and a lower percentage of NKT cells that secrete IFN- $\gamma$ . The presence of NKT cells was observed both, in the tumor microenvironment and in the gastric mucosa; however, no statistically significant differences regarding the frequency of these cells and cytokine production between these gastric tissues have been detected. We observed a correlation between tumor size and IL-10 production by NKT cells in the tumor microenvironment. Furthermore, cytokines produced by peripheral NKT cells were also associated with tumor size, and the results showed positive and negative correlations to IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  production, respectively. In this study, we also demonstrate that CD1d expression is not detected in gastric cancer cell lines; however, cells derived from the primary tumor and gastric mucosa of patients with GC express this molecule on their cell membrane. These results suggest that, in GC, NKT cells may contribute to tumor progression, since the higher frequency of IL-10 and lower percentage of IFN- $\gamma$ -producing NKT cells would compromise the development of an effective immune response against cancer.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. En nuestro país, corresponde a la segunda causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares. El cáncer gástrico presenta una de las mayores incidencias. A nivel mundial, alcanza el cuarto lugar, con 930.000 casos al año 2002. Además, el cáncer gástrico se asocia a una alta tasa de mortalidad, siendo la segunda causa de muerte después del cáncer de pulmón. En Chile, el cáncer gástrico ocupa el primer lugar dentro de las muertes causadas por esta enfermedad, por eso el adenocarcinoma gástrico tiene una gran importancia en salud pública, tanto por su alta incidencia como por la dificultad de lograr un diagnóstico oportuno. El diagnóstico rara vez se asocia a la sintomatología, pues la aparición de los síntomas se asocia a estados avanzados; por este motivo, solo un 10% de los casos son diagnosticados en un estado inicial y la mayor parte de los pacientes no logra sobrevivir 5 años.

El Sistema Inmune juega un rol importante durante el desarrollo del cáncer, por lo que el estudio de los mecanismos moleculares del reconocimiento de las células tumorales por parte de los componentes de la respuesta inmune es esencial al momento de diseñar nuevas herramientas terapéuticas para su tratamiento. Dentro de la búsqueda de nuevas alternativas, el estudio de las células NKT auspicia grandes oportunidades en entender cómo funciona el microambiente tumoral en el adenocarcinoma gástrico.

Las células NKT constituyen una subpoblación de linfocitos que se caracterizan por la expresión de moléculas relacionadas al fenotipo de las células NK, y además de un receptor de células T (TCR) invariante. Su frecuencia es relativamente baja, pero cumplen un rol importante a la hora de mediar una respuesta inmune tumoral.

En este contexto, surge la pregunta ¿Los pacientes con adenocarcinoma gástrico poseen niveles normales de células NKT en su sangre y en el microambiente del tumor? ¿Estas células NKT contribuyen a la eliminación tumoral o favorecen su expansión?

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cáncer

El cáncer pertenece a un grupo de enfermedades producidas por la proliferación descontrolada de células anormales, las cuales adquieren la capacidad de evadir la apoptosis, ser insensibles a las señales que inhiben el crecimiento celular, ser autosuficientes en las señales que promueven el crecimiento celular, generar angiogénesis, poseer un potencial proliferativo ilimitado y el potencial de invadir tejidos y generar metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000).

En Chile, el cáncer constituye la segunda causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares. Se estima que el año 2008 fallecieron 22 mil personas como consecuencia de cáncer, siendo el cáncer gástrico el causante de la mayor tasa de mortalidad (Ministerio de Salud, 2006).

### 2.2 Adenocarcinoma gástrico

El adenocarcinoma gástrico corresponde a un tumor maligno en el epitelio glandular de la mucosa gástrica. Aproximadamente el 90% de los cánceres gástricos son caracterizados como adenocarcinoma. Según su epidemiología e histología, el adenocarcinoma gástrico fue clasificado por Lauren, en 1965, en dos tipos: intestinal y difuso (Lauren, 1965). El adenocarcinoma de tipo intestinal, igualmente llamado bien diferenciado, es predominante en poblaciones con altas tasas de cáncer gástrico, y su causa está relacionada con factores ambientales tales como gastritis crónica, dieta e infección por *Helicobacter pylori* (Correa, 1992). Por el contrario, el adenocarcinoma de tipo difuso o infiltrante es más recurrente en poblaciones con baja incidencia de cáncer gástrico, y su causa estaría relacionada con factores genéticos (Videbaek y Mosbech, 1954).

El desarrollo de cáncer gástrico es un proceso multifactorial, complejo y de larga evolución. La infección por *Helicobacter pylori*, junto a factores dietéticos, ambientales y genéticos, favorecidos por un bajo nivel socioeconómico-sanitario, iniciarían la transformación de una mucosa normal a una mucosa afectada por gastritis crónica. En sucesivas etapas, se evolucionaría a gastritis atrófica y, en un porcentaje progresivamente decreciente de pacientes, a metaplasia intestinal, displasia y finalmente al adenocarcinoma gástrico (Jiménez y Estévez 1998). En Chile, más de la mitad de los pacientes se encuentran en un estado avanzado de la enfermedad al momento del diagnóstico. Por lo tanto, el tratamiento es solo paliativo (MINISTERIO DE SALUD, 2006).

### **2.3 El Sistema Inmune**

El Sistema Inmune (SI) está formado por órganos, células y moléculas que interactúan para proteger al organismo del daño provocado por patógenos externos y células transformadas. También posee la capacidad de discriminar las células propias del organismo de las no propias (de Visser, 2006). El SI desempeña un papel trascendental durante la oncogénesis, ya que está provisto de mecanismos fundamentales para la vigilancia de células estresadas o transformadas (Chan *et al.*, 2008).

### **2.4 La respuesta inmune contra el cáncer**

El SI innato proporciona la primera línea de defensa contra el cáncer, jugando así un rol efector fundamental en las primeras etapas del desarrollo de la enfermedad, lo cual es denominado como Inmunovigilancia (Blair *et al.*, 2008). La mayoría de los componentes del SI innato están presentes antes de la manifestación de una infección o una carcinogénesis, y constituyen a una gama de mecanismos no específicos, que incluyen componentes celulares y moleculares que participan del reconocimiento de patrones moleculares presentes en el microorganismo agresor o en las células transformadas. Tanto células efectoras (macrófagos,

neutrófilos y células NK), como barreras como la piel y una variedad de componentes antimicrobianos sintetizados por el hospedero juegan un rol importante en la inmunidad innata (Goldsby y Kuby, 2005).

El desarrollo de la respuesta inmune está regulado por complejos mecanismos de control que pueden favorecer tanto su acción efectora como su inhibición. Por esta razón, el conocer estos mecanismos abre nuevas alternativas para la manipulación de la respuesta inmune contra el cáncer. Adicionalmente, se ha descrito que algunos microorganismos patógenos y neoplasias utilizan estos sistemas de control de la respuesta inmunológica en su propio beneficio, generando así estrategias para evitar ser eliminados por el sistema de defensa, fenómeno conocido como **evasión inmune**. Sin embargo, tanto el sistema inmune innato como adaptativo, mediante mecanismos de inmunovigilancia, pueden proteger al huésped contra el desarrollo de tumores (Dunn *et al.*, 2004). La activación del sistema inmune innato desata la activación de la respuesta inmune adaptativa, de carácter antígeno-específico, mediada por los linfocitos T y B.

La activación de la respuesta inmune anti-tumoral depende de las señales de peligro liberadas o expresadas por las células dañadas o estresadas. En el caso de una transformación celular, las señales de peligro que activan la inmunidad antitumoral aún no se encuentran totalmente bien definidas. Estas pueden venir del microambiente tumoral como resultado del remodelamiento del tejido, o pueden provenir directamente de las células transformadas en respuesta a la señalización oncogénica (Seruga *et al.*, 2008).

Dentro de los elementos participantes en la respuesta inmune innata antitumoral se destaca el rol de las células NK. Estas células son linfocitos derivados de la médula ósea, que son capaces de inducir directamente la muerte de las células infectadas por virus y células tumorales sin una sensibilización previa con antígeno (Gasser y Raulet, 2008).

## 2.5 Células *Natural Killer* (NK)

Las células NK son linfocitos granulares que juegan un rol importante en la defensa temprana contra patógenos. Las células NK comprenden entre un 5-20% de los linfocitos de sangre periférica (Ritz et al., 1988). En humanos, las células NK maduras se definen fenotípicamente por la expresión en su superficie de la molécula CD56 y la ausencia de expresión de la molécula CD3 (Lanier *et al.*, 1986).

El reconocimiento de la células NK hacia las células normales y tumorales se rige por las señales entregadas a través de receptores integrados en su membrana, de activación e inhibición, lo que determinará, durante una interacción de las células NK y las células blanco, si la célula NK se activa, que tipo de citoquinas son producidas y / o si se produce la lisis de la célula blanco (Caligiuri, 2008). Existen variados receptores de activación en las células NK; dentro de los más importantes, se encuentra el receptor de activación NKG2D, el cual posee la capacidad para detectar moléculas inducidas por estrés celular y carcinogénesis (Trinchieri, 1989). Sus ligandos de activación son proteínas inducidas por estrés celular que se expresan en la superficie en casos de infección viral o transformación tumoral (Cooper et al., 2001). Además de su expresión en las células NK, el receptor NKG2D también se expresa en otras células citotóxicas, como linfocitos T CD8<sup>+</sup> y células NKT (Berzins *et al.*, 2011).

## 2.6 Células *Natural Killer T* (NKT)

Las células NKT, descritas por primera vez en 1987, constituyen una subpoblación de linfocitos T caracterizada por la expresión de moléculas asociadas con el fenotipo de las células NK, lo que llevó a denominarlas «células T asesinas naturales» o «células NKT» (Fowlkes *et al.*, 1987). En humanos, la frecuencia de las células NKT es baja, usualmente alrededor del 0,2% de los linfocitos T de sangre periférica, 0,01% de los linfocitos del timo, 0,2% en la medula ósea y bazo, 1% en el hígado y un 10% en el omento (Berzins *et al.*, 2011).

Las células NKT se caracterizan por la expresión de receptor de células T (TCR) conformado por una cadena  $\alpha$  invariante que presenta el mismo rearrreglo génico en la región variable ( $V\alpha J\alpha$ ) y también asociado a una cadena variante  $\beta$  ( $V\beta$ ). Con base a esta estructura constante del TCR, a estas células se les ha denominado “células T invariantes” (iNKT) (Godfrey et al., 2004).

Las células iNKT se desarrollan en el timo y se originan del mismo *pool* común precursor de células T linfoides (Gasser y Raulet, 2006). Después del compromiso  $\alpha\beta$  en linaje de las células T y la generación de timocitos doble positivos, las vías de selección de la célula iNKT divergen a las vías convencionales de células T. Los precursores de células iNKT se seleccionan después del reordenamiento de la cadena  $\alpha$  del gen TCR y expresan un TCR semi-invariante ( $V\alpha 14-J\alpha 18$  en ratones;  $V\alpha 24-J\alpha 18$  en los seres humanos) (Egawa *et al.*, 2005). En contraste con las células T convencionales, que son seleccionados por antagonistas o ligandos parciales, las células iNKT son seleccionadas por ligandos agonistas (Batuwangala *et al.*, 2004).

Las células iNKT responden rápidamente a una variedad de antígenos glicolípidos presentados por la molécula CD1d, tales como iGb3, GD3 y GM3 (Mattner, 2005); además, son capaces de activarse frente a la presentación del antígeno  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer), el cual estimula la liberación inmediata de altos niveles de citoquinas por las células NKT (Kawano, 1997). De manera similar a las células NK, las células iNKT tienen un papel en la inmunovigilancia contra tumores (Park *et al.*, 2003).

Las células NKT se clasifican en dos subtipos. En ratones y seres humanos, las células NKT de tipo I poseen un reordenamiento homólogo de los segmentos del TCR (variable (V)  $\alpha$  y la Junctional (J)  $\alpha$ ). Mientras que en ratones estas células NKT expresan un reordenamiento invariante en la cadena  $\alpha$  del TCR ( $V\alpha 14-J\alpha 18$ ), la que se asocia a una cadena  $V\beta 8.2$ ,  $V\beta 2$  o  $V\beta 7$ , en humanos las células NKT de tipo I expresan un reordenamiento de la cadena  $\alpha$  del TCR  $V\alpha 24-J\alpha 18$ , la que se asocia a una cadena  $V\beta 11$  (Balato *et al.*, 2009). Por esta razón, estas células son designadas células NKT invariantes (iNKT). Dentro de la población de iNKT de tipo I, se incluyen dos subpoblaciones bien definidas: una  $CD4^+$  y otra  $CD8^- CD4^-$  (doble negativas) (Seino y Taniguchi, 2005).

Las células NKT de tipo II, también llamadas células NKT no clásicas, tienen un repertorio de TCR más diverso (Berzins *et al.*, 2011). Estas células fueron identificadas basándose en el hecho de que la función de células NKT era todavía detectable en ratones carentes de células NKT de tipo I, pero no en ratones que no expresaban la molécula presentadora de antígeno CD1d. A pesar de que las células NKT de tipo II también están restringidas por la molécula CD1d, estas no reconocen  $\alpha$ GalCer (Seino y Taniguchi, 2005), por lo que las células NKT de los tipos I y II tienen distintas capacidades funcionales.

## 2.7 La molécula CD1d

Las moléculas CD1 pertenecen a una familia no polimórfica del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC), que unen y presentan antígenos lipídicos anfifílicos a las células NKT para su reconocimiento (Trinchieri, 1989). La familia CD1 en seres humanos, y la mayoría de otras especies, se dividen en el grupo de transmembrana 1 (CD1a, b, c) y el grupo 2 (CD1d) (Martin *et al.*, 1987; Calabi *et al.*, 1989).

Las moléculas CD1 del Grupo 1 se expresan en los timocitos, células dendríticas, monocitos y linfocitos B activados. CD1b presenta lípidos bacterianos, mientras que CD1a y CD1c presentan fosfolípidos bacterianos. Por otro lado, CD1d también se expresa en estas células mencionadas; además, se expresan en células no hematopoyéticas, incluyendo miocitos cardíacos y células endoteliales, y también en diversos órganos como el intestino, hígado, riñón, páncreas y útero (Exley y Koziel, 2004). Adicionalmente, se ha reportado la expresión de CD1d en tumores sólidos, como gliomas malignos y meduloblastomas (Giaccone *et al.*, 2002; Yang y Jove *et al.*, 2010).

Estructuralmente, CD1d posee una cadena polipeptídica codificada por el gen CD1 asociada a  $\beta$ 2 microglobulina. Aunque CD1d estructuralmente es similar a las moléculas de MHC de clase I, la presentación antigénica se asemeja a las moléculas MHC de clase II, ya que la presentación del

antígeno se produce en la vía endosómica y es independiente del transportador asociado al procesamiento de antígeno (TAP) (Balk *et al.*, 1994).

El dominio extracelular de CD1d contiene un surco de unión al antígeno compuesto de hasta cuatro bolsillos hidrófobos, en los cuales se insertan las colas de lípidos antigénicos (Boes *et al.*, 2009; Brutkiewicz *et al.*, 2006; Batuwangala *et al.*, 2004). CD1d presenta esfingolípidos bacterianos de *Sphingomonas* (Mattner *et al.*, 2005). El esfingolípido  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer) es el ligando clásico de CD1d para la activación de las células NKT *in vitro* (Kawano *et al.*, 1997).

## 2.8 $\alpha$ -Galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer)

Todas las células iNKT de ratones y humanos reaccionan con el glicoesfingolípido sintético  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer), el cual fue originalmente aislado de la esponja marina *Agelas mauritanus* (Kawano y Koesuka *et al.*, 1997).  $\alpha$ GalCer es un agonista muy potente para las células iNKT. Su interacción con CD1d y el TCR invariante de las células iNKT, sus actividades inmunomoduladoras, y sus propiedades terapéuticas han sido ampliamente estudiadas. Este compuesto se une eficazmente a CD1d, y el complejo de glicolípido más CD1d se une al TCR de célula iNKT, lo que resulta en su activación.  $\alpha$ GalCer se utiliza ampliamente como un antígeno altamente específico tanto en células iNKTs humanas como murinas (Balato *et al.*, 2009; Silk *et al.*, 2008).

## 2.9 Respuesta inmune mediada por células NKT

La respuesta de células NKT ante la activación con sus antígenos resulta en una rápida liberación de grandes cantidades de citoquinas de tipo T *helper* 1 (*Th*1), tales como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , o citoquinas de tipo *Th*2, incluyendo IL-4 e IL-13 (Berzins *et al.*, 2011). Estas células también

producen IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, y TGF- $\beta$  (Balato *et al.*, 2009). El factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y la interleuquina-10 (IL-10) son citoquinas con efecto inmunosupresor. Experimentos realizados en animales indican que el TGF- $\beta$  *in vivo* promueve la invasión tumoral y la metástasis (Arteaga *et al.*, 1993). *In vitro*, el TGF- $\beta$  inhibe la expansión de las células T citotóxicas y de los linfocitos B, además de inhibir la expresión de receptores de IL-2 de alta afinidad, inactivando a las células T y NK (Samuel *et al.*, 1993). En seres humanos, el TGF- $\beta$  ha sido involucrado en el aumento del potencial metastásico de melanomas y otros carcinomas (Friedman *et al.*, 1995).

Otro factor importante en la inhibición de la respuesta inmune es la IL-10, una citoquina que inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias en monocitos y macrófagos y reduce la expresión de MHC de clase I y II en las células presentadoras de antígenos (Balato *et al.*, 2009). Este efecto redundante directamente en la inhibición del crecimiento y activación de linfocitos T y células NK y, por lo tanto, favorece el escape de los tumores (Matsuda *et al.*, 1994).

La rápida liberación de citoquinas por parte de las células NKT se debe al hecho que estas células, incluso en estado de reposo, almacenan RNA pre-formado de citoquinas, liberándolas en cuestión de horas después de la activación celular (Stetson *et al.*, 2003). Por lo tanto, las células NKT pueden servir como una fuente importante de citoquinas que proporcionan señales tempranas a otras células del sistema inmune y así favorecer una respuesta innata o adaptativa y proteger al huésped del crecimiento tumoral (Matsuda *et al.*, 2003).

La población de células NKT CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> está ampliamente asociada a un tipo Th0 de la respuesta inmune (es decir, estas células son capaces de producir citoquinas del tipo Th1 y Th2 al mismo tiempo), mientras que la población CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> de células NKT poseen un fenotipo de tipo Th1, ya que producen IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ; además, se caracteriza por presentar receptores del linaje de células NK, como el receptor de activación NKG2D (Berzins *et al.*, 2011; Balato *et al.*, 2009). Se ha comprobado que la subpoblación de células NKT humanas CD4<sup>-</sup> puede mediar la lisis directa de las células blanco a través de la activación del receptor NKG2D independiente de presentación antigénica vía CD1d y que, además, NKG2D también funciona como un receptor

co-estimulador en estas células (Kuylenstierna y Björkström *et al.*, 2011).

Los mecanismos que determinan la polaridad en la respuesta de citoquinas en las células NKT y su influencia en el sistema inmune no se entienden completamente; hay una marcada heterogeneidad en la expresión de importantes receptores de funcionalidad en la superficie celular y citoquinas por las células NKT CD4<sup>+</sup> y CD4<sup>-</sup> (Balato *et al.*, 2009). También hay evidencia de que las alteraciones en la estructura de ligandos glicolípidos pueden afectar a las respuestas de citoquinas en las células NKT a través de la estimulación selectiva de una particular subpoblación de células NKT (Berzins *et al.*, 2011), mientras que las señales co-estimuladoras y de peligro recibidas por las células NKT, y el entorno de citoquinas y sitios anatómicos donde las subpoblaciones de células NKT son maduradas, pueden influir en la respuesta inmune mediada por estas células (van den Heuvel *et al.*, 2011).

Las citoquinas producidas por las células NKT pueden activar una variedad de tipos celulares, incluyendo células dendríticas (DCs), macrófagos, células NK, células B y células T convencionales (Bendelac *et al.*, 2007). Esto se evidencia por la expresión de marcadores de activación, como CD69, por las células NK, células B y células T, y la inducción de moléculas co-estimuladoras en DCs, macrófagos y células B luego de la secreción de citoquinas derivadas de células de NKT (Nieda *et al.*, 2004; Dhodapkar, 2009).

Las células NKT invariantes también pueden alterar la fuerza y carácter de las respuestas inmunes mediadas por células supresoras. Por ejemplo, al cambiar la respuesta de citoquinas desde/hacia una respuesta Th1, Th2, Th17 o un perfil de células de tipo regulador, las células NKT regulan la inmunidad adaptativa, lo que afirma así su papel en la **unión de la respuesta inmune innata y adaptativa** (Berzins *et al.*, 2011). Las células NKT invariantes pueden también exhibir actividad citotóxica similar a las células NK y células T CD8 (Konishi *et al.*, 2004; Kawano y Koezuka *et al.*, 1998). Los subconjuntos de células iNKT expresan constitutivamente FasL y tienen el potencial para actividad citotóxica a través de Fas (Ho *et al.*, 2004). Además, estas células también producen altos niveles de granzima B, perforina y TNF (Takahashi *et al.*, 2003)

## 2.10 Células NKT y cáncer

Varios estudios apuntan hacia un papel en la deficiencia del número de células NKT o una alterada producción de citoquinas en el desarrollo del cáncer, tanto en ratones como en humanos (Berzins *et al.*, 2011). Por ejemplo, existe suficiente evidencia de que las células NKT participan en la inmunovigilancia a tumores; esta proviene de los datos que muestran que ratones deficientes de células NKT están predispuestos a desarrollar cáncer (Wu y Van Kaer, 2009; Swann *et al.*, 2007), mientras que la transferencia adoptiva o la estimulación de células NKT en modelos de ratón puede proporcionar protección contra esta enfermedad (Lehuen *et al.*, 1998; Molling *et al.*, 2005).

Se ha reportado una deficiente frecuencia de células NKT en la sangre periférica de pacientes con cáncer, en los tejidos que rodean los tumores y en los propios tumores (Konishi *et al.*, 2004). En efecto, el número de células NKT se reduce marcadamente en la sangre periférica de pacientes con cáncer avanzado de pulmón y de colon, y los bajos niveles circulantes de células NKT predicen un mal pronóstico clínico en estos pacientes (Konishi *et al.*, 2004) (Molling *et al.*, 2005; Song y Ara *et al.*, 2007; Molling *et al.*, 2007).

Sin embargo, algunos grupos han demostrado que el número de células NKT no está aumentado ni disminuido en pacientes con algunos tipos de cáncer (Berzins *et al.*, 2011), mientras que otros informan de que células NKT de pacientes con cáncer de próstata presentan comprometida su actividad funcional. En aquellos pacientes, sus células NKT produjeron menos IFN- $\gamma$  que individuos sanos, lo que se correlaciona con el estadio clínico del tumor (Tahir y Cheng *et al.*, 2001; Yanagisawa y Seino *et al.*, 2002).

La mayor parte de la evidencia que señala una función antitumoral de las células NKT se deriva de los estudios en ratones que demuestran la capacidad de  $\alpha$ -GalCer para inhibir la metástasis del tumor (Kawano *et al.*, 1998) o suprimir el desarrollo de tumores en varios modelos, incluyendo sarcomas (Hayakawa *et al.*, 2003) y carcinomas (Motoki *et al.*, 1998). Aunque las células NKT pueden reconocer directamente y matar las células malignas que expresan CD1d (Metelitsa *et al.*, 2003), la mayoría de los tumores sólidos regulan negativamente o no expresan CD1d y, por lo

tanto, permanecen inmunológicamente invisibles a la inmunidad mediada por células NKT. La principal contribución de las células NKT a la inmunovigilancia contra tumores se produce indirectamente a través de la activación de las células NKT por la presentación de  $\alpha$ -GalCer por las DCs. Las células NKT activadas inician una serie de cascadas de citoquinas que ayudan a impulsar la fase de maduración de la respuesta inmune antitumoral (Terabe y Berzofsky, 2008).

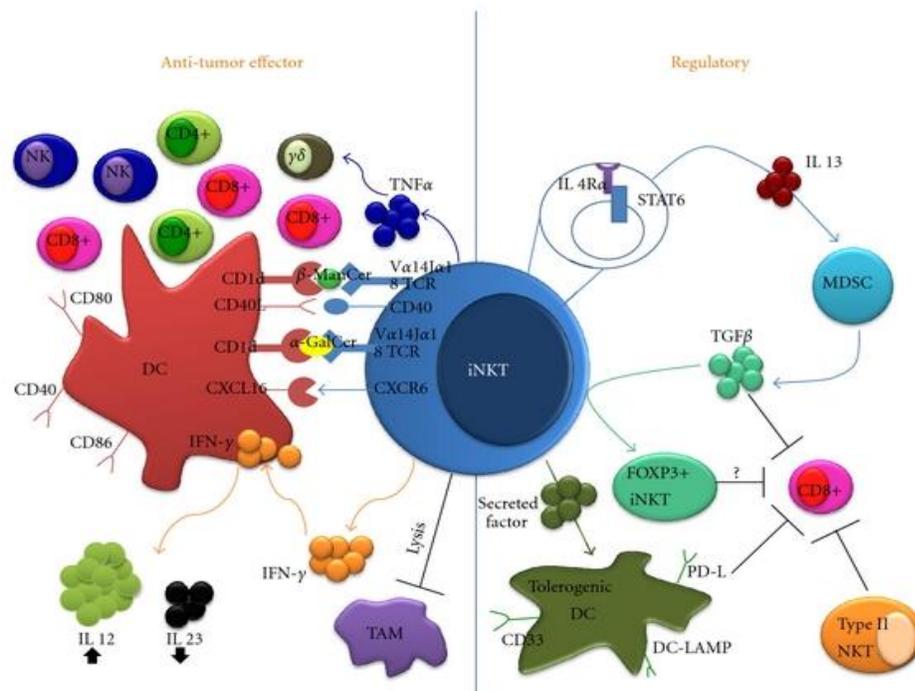
Se cree que el IFN- $\gamma$  producido por las células NKT activadas por medio de  $\alpha$ -GalCer proporciona la señal de inicio que distorsiona el equilibrio IL-12p70/IL-23 (Uemura, 2009). La activación de las células NKT también induce la regulación al alza de moléculas co-estimuladoras en las DCs, tales como CD40, CD80 y CD86 (Fujii *et al.*, 2003). Las DCs activadas recíprocamente intensifican la expresión de CD40L en las células NKT, proporcionando una señal de retroalimentación positiva que amplifica la respuesta del IFN- $\gamma$  (Kitamura *et al.*, 1999). La unión del receptor de quimioquinas CXCR6 en la superficie de las células NKT con su ligando CXCL16 expresado en las células presentadoras de antígenos también puede proporcionar una fuerte señal co-estimuladora resultante por la activación de células NKT inducida por  $\alpha$ -GalCer (Shimaoka, *et al.*, 2007; Germanov *et al.*, 2008). Estos eventos conducen finalmente a la activación de los efectores críticos de la inmunidad antitumoral, incluyendo las células NK, las células citotóxicas CD8<sup>+</sup> y linfocitos T *helper* CD4<sup>+</sup> (**Figura 1**) (Fujii *et al.*, 2003; Metelitsa *et al.*, 2003).

El papel fundamental que desempeña el IFN- $\gamma$  en la respuesta antitumoral mediada por células NKT se demostró en estudios que muestran la supresión de la respuesta antitumoral inducida por  $\alpha$ -GalCer en ratones IFN- $\gamma$  -/- (Taniguchi *et al.*, 2003; Smyth y Godfrey, 2000). Curiosamente, la actividad antitumoral inducida por un agonista de las células NKT recientemente descubierto,  $\beta$ -manosil-ceramida ( $\beta$ -ManCer), en ratones portadores del carcinoma de colon (CT26) o de melanomas (B16F10), fue mediada principalmente por especies de óxido nítrico (NOS) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) (O'Konek *et al.*, 2011). Las NOS fueron inhibidas por N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) y la inactivación de los TNF- $\alpha$  por inyecciones repetidas de etanercept (TNF- $\alpha$ R-Fc), lo cual anuló completamente el efecto antitumoral de  $\beta$ -ManCer, pero no el efecto en ratones tratados con  $\alpha$ -GalCer portadores de tumor. De manera similar, Van der

Vliet y colaboradores demostraron que células NKT activas producen niveles significativos de TNF- $\alpha$  que potencian la activación de un subconjunto de células T  $\gamma\delta$  (V $\gamma$ 9V $\delta$ 2) con actividades efectoras contra los tumores sólidos (Schneiders *et al.*, 2012).

En concordancia con la capacidad de las células NKT para modular células efectoras, Park y colaboradores demostraron que las células NKT juegan un papel esencial no sólo en la generación de efectores durante las primeras fases, sino también en la mantención y el aumento de las respuestas inmunes antitumorales secundarias (Hong *et al.*, 2009). Se obtuvieron células efectoras T CD8<sup>+</sup> de ratones inmunizados con extractos tumorales cargados con  $\alpha$ -GalCer y adoptivamente se transfirieron a destinatarios ratones CD1d<sup>+/-</sup>. La proliferación de las células transferidas adoptivamente se correlacionó con la capacidad para eliminar el extracto tumoral. No se ha visto en ninguna protección en los destinatarios CD1d<sup>-/-</sup> - que carecían de todas las células NKT o en destinatarios J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> - que carecen sólo de las células iNKT, lo cual implica a las células NKT en la mediación de respuestas protectoras antitumorales (Hong *et al.*, 2009). De manera similar, se ha demostrado que las células NKT participan como un apoyo a las respuestas antitumorales secundarias de las células T CD4<sup>+</sup> transferidas adoptivamente (Shin *et al.*, 2010).

Curiosamente, las células NKT también coordinan específicamente a la matanza de macrófagos asociados al tumor (TAM) y que expresan CD1d, un subconjunto muy plástico de células inflamatorias derivadas de monocitos circulantes que realizan funciones inmunosupresoras (Sica y Bronte, 2007). TAMs son conocidos por ser los principales productores de IL-6, la cual promueve la proliferación de muchos tumores sólidos, incluyendo neuroblastoma, mama y carcinomas de próstata (Song *et al.*, 2009 ;Hong *et al.* 2007). Una actividad citotóxica directa dependiente de CD1d de las células NKT contra TAMs sugiere la importancia de una vía alternativa indirecta por la cual las células NKT puedan mediar la inmunidad antitumoral, especialmente contra tumores sólidos que no expresan CD1d.



**Figura 1. Polaridad de la respuesta inmune mediada por células NKT en el cáncer.**

En el cáncer, las células NKT juegan un doble papel que puede promover (izquierda) o suprimir (derecha) la respuesta inmune antitumoral. En presencia de un fuerte agonista ( $\alpha$ -GalCer), las células NKT favorecen la capacidad de las DCs de activar las células efectoras a través de IL-12 y una regulación positiva de moléculas co-estimuladoras. La unión de CD40L en la superficie de las DCs proporciona una retroalimentación positiva, mejorando la activación de las células NKT. Estos eventos, en última instancia, conducirán a la activación "río abajo" de efectores antitumorales, tales como las células NK, células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>. Otros agonistas de células NKT ( $\beta$ -ManCer) estimulan la producción de TNF- $\alpha$ , dirigiendo la activación de células antitumorales T- $\gamma\delta$ . Las células NKT también pueden promover la inmunidad antitumoral directamente matando macrófagos pro-tumorígenicos (TAMs). Por otro lado, la producción de IL-13 por células NKT puede desencadenar la producción de TGF- $\beta$  por células supresoras derivadas de la línea mieloide (MDSCs). TGF- $\beta$  inhibe directamente la actividad efectora CD8<sup>+</sup> y puede inducir la expresión de Foxp3 en células NKT. Las células NKT también pueden inducir a las DCs para adquirir un fenotipo tolerogénico, incluyendo la expresión de DC-LAMP, PD-L, y CD33. Imagen tomada de Karsten et al. (2012).

En conjunto, estos datos indican que las células NKT exhiben una importante respuesta inmune anti-tumoral y, por lo tanto, la evasión de la vigilancia mediada por células NKT puede contribuir a la progresión del tumor.

### **3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

Hasta ahora, no existen evidencias que hablen de la frecuencia de células NKT en sangre periférica y tejido tumoral y de mucosa en pacientes con cáncer gástrico. Además, su perfil de citoquinas son temas que tampoco se han abordado. Por lo tanto, una correlación de las características de las células NKT con las características clínico-patológicas del paciente, la etapa y el tipo del tumor podrían ayudar a definir el papel de las células NKT en el desarrollo y pronóstico del cáncer gástrico.

#### **3.1 HIPÓTESIS**

Las células NKT de pacientes con adenocarcinoma gástrico, aparte de su disminuida frecuencia en la sangre periférica, presentan una disminuida habilidad para producir citoquinas inmunoestimuladoras (como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) y mayor potencial para producir citoquinas inmunosupresoras (IL-10 y TGF- $\beta$ ).

### **3.2 OBJETIVO GENERAL**

Analizar la frecuencia y el patrón de secreción de citoquinas por las células NKT de sangre periférica e infiltrantes del tumor en pacientes con adenocarcinoma gástrico.

### **3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar la frecuencia de células NKT en sangre periférica, tejido tumoral y mucosa gástrica de pacientes con adenocarcinoma gástrico.
2. Analizar la producción de citoquinas inmunoestimuladoras e inmunosupresoras por células NKT de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma gástrico.
3. Evaluar la producción de citoquinas por células NKT infiltrantes del tumor y en mucosa adyacente al tumor en pacientes con adenocarcinoma gástrico.
4. Correlacionar los niveles de citoquinas con las características clínico-patológicas del tumor.
5. Evaluar la expresión de la molécula CD1d en líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y en células derivadas del tejido tumoral y de mucosa.

## 4. METODOLOGÍA

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Inmunovigilancia y Evasión Inmune del Programa Disciplinario de Inmunología perteneciente al Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. En la etapa experimental, se obtuvieron células derivadas del tumor primario y mucosa gástrica adyacente al tumor de pacientes con cáncer gástrico. Además, se extrajeron células mononucleares de sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico y donantes sanos. Posteriormente, las células (tanto de tejidos como derivadas de la sangre) fueron marcadas con anticuerpos monoclonales acoplados a moléculas fluorescentes para identificar la población de linfocitos NKT y, de esta manera, analizar su frecuencia y producción de distintas citoquinas, ambos parámetros evaluados mediante citometría de flujo.

### 4.1 Pacientes y obtención de muestras

Los pacientes con adenocarcinoma gástrico fueron reclutados en el Hospital del Salvador, Santiago, Chile, en colaboración con el Dr. Marco Bustamante, Director del Departamento de Cirugía de este Hospital. Previo a la recolección de las muestras, se obtuvo una autorización firmada por el paciente por intermedio de un Consentimiento Informado (Anexo 1). Para este estudio, se reclutaron 5 pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, los cuales se sometieron a cirugía para remoción del estómago. Ninguno de los pacientes reclutados había recibido quimioterapia, radioterapia u otra intervención médica para el tratamiento del cáncer gástrico previo a la cirugía. Las características clínico-patológicas de los pacientes se muestran en la **Tabla 1**, las que fueron determinadas de acuerdo a la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (Gobbi *et al.* 2011). Durante el procedimiento quirúrgico, se recolectaron muestras del tumor primario (tumor en el estómago, **Figura 2**), mucosa gástrica adyacente al tumor y sangre periférica. Además, se tomaron muestras de sangre periférica a 5 voluntarios sanos mayores de 40 años, previa autorización a través de un Consentimiento Informado (Anexo 2). El protocolo de

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



**Figura 2. Adenocarcinoma gástrico.** *Diseción realizada al estómago para obtener muestras desde el tumor primario.*

#### **4.2 Transporte y procesamiento de las muestras de tumor y mucosa**

Las muestras de tumor y mucosa, cuyo volumen era de 2 a 3 cm<sup>3</sup>, aproximadamente, fueron transportadas, desde el Hospital hacia el laboratorio, en 15 mL de medio HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) (Invitrogen, EE.UU.) suplementado con Penicilina (100 U/mL) y Estreptomicina (100 µg/mL) (HyClone, Canada). Luego, en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar) y en medio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium 1640*) (HyClone, EE.UU.) suplementado con penicilina / estreptomicina y 3% de suero fetal de bovino (SFB), los tejidos tumoral y de mucosa fueron fragmentados, separadamente, con la ayuda de bisturís y pinzas, seguido de un maceramiento utilizándose el émbolo de una jeringa (**Figura 3**). Células tumorales y de mucosa gástrica en suspensión fueron finalmente obtenidas luego de

separarlas de los restos de tejidos no disgregados mediante filtros (*cell strainers*) de 70  $\mu\text{m}$  (BD Biosciences, EE.UU.).

Las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min a 4°C, y el sedimento se incubó con tampón de lisis de eritrocitos (Tampón ACK) por 10 min a temperatura ambiente. Luego de un lavado con medio RPMI 1640 suplementado, se contaron las células, cuya viabilidad se evaluó mediante exclusión con el método de tinción con azul de Trypan (Merck, Alemania). Las células se centrifugaron una vez más, y el sedimento se suspendió en medio para congelar células (SFB más 10% DMSO). Las células se mantuvieron almacenadas en nitrógeno líquido hasta su uso.



**Figura 3. Fragmentación y macerado de la muestra de adenocarcinoma gástrico.** Procedimiento realizado dentro de una campana de flujo laminar, para mantener un ambiente estéril en la recolección de células infiltrantes de tumor y mucosa.

### **4.3 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)**

Las muestras de sangre de los pacientes fueron transportadas en tubos heparinizados (BD Vacutainer). En condiciones de esterilidad, se transfirió la sangre no coagulada a tubos falcon estériles de 50 mL, seguido de dilución en solución salina (PBS) estéril. Luego, se le agregó a la sangre diluida 10 mL de Ficoll-Hypaque (polisacarido de alto peso molecular (400 kDa) el cual permite la separación de componentes de la sangre a través de un medio de alta densidad por centrifugación a baja velocidad) y se centrifugó durante 20 min a 1200 rpm sin freno a 18°C utilizando una centrifuga refrigerada IEC modelo MP4R (Maryland, EEUU). A continuación, se transfirió la fase conteniendo células mononucleares (PBMC) a tubos cónicos y se lavó con un volumen de 45 mL de PBS durante 5 minutos a 1400 rpm; se removió el sobrenadante para luego agregar 10 mL de Tampón ACK, seguido de incubación durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregó a la suspensión celular medio RPMI 1640 suplementado con 5% SFB y 100 U/mL penicilina y 100 mg/mL de estreptomina. Luego, la suspensión celular se centrifugó durante 5 min a 1400 rpm; al sedimento se le agregó 5 mL de PBS para posterior cuantificación de las células y determinación de su viabilidad por exclusión con azul de Tripan.

#### **4.4.1 Determinación de la frecuencia de células NKT**

Para medir el porcentaje de linfocitos NKT de pacientes con adenocarcinoma gástrico, PBMC (tanto de pacientes como de controles sanos), células obtenidas del tejido tumoral y de mucosa fueron lavadas con PBS 2% SFB y llevadas a una placa de poliestireno de 96 pocillos con fondo "V". Luego, las células fueron incubadas durante 30 min a 4°C con distintos anticuerpos monoclonales (AcMo) dirigidos contra moléculas presentes en la superficie celular: anti-CD3 (clon: OKT3), anti-CD56 (Clon: HCD56) y anti-TCR V $\alpha$ 24 J $\alpha$ 18 (clon: 6B11) conjugados a distintos fluoróforos: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) o alofococianina (APC) (todos de BioLegend, EE.UU.). A modo de control de especificidad de estos anticuerpos, se emplearon los controles de isotipo correspondientes. Las células fueron

lavadas tres veces con PBS-2% SFB y fijadas con paraformaldehído (PFA) al 2%. La lectura de los datos se realizó en el citómetro de flujo FACSCalibur (**Figura 4**) (Becton-Dickinson®, EE.UU.) por medio del software CellQuest (BD Biosciences, Alemania) y analizados utilizando el software FlowJo (versión v10) (Tree Star, EE.UU). La frecuencia de las células NKT se determinó de acuerdo al porcentaje de células positivas para la molécula TCR V $\alpha$ 24 J $\alpha$ 18 con relación al total de linfocitos T CD3<sup>+</sup>.



**Figura 4. Citómetro de Flujo** (*Fluorescence activated cell sorter (FACSCalibur)*) (Becton-Dickinson®)

#### 4.4.2 Determinación del patrón de citoquinas expresadas por las células NKT

Para evaluar el perfil de citoquinas inmunoestimuladoras e inmunosupresoras producidas por las células NKT, PBMC, células de tumor y de mucosa fueron estimuladas con forbol-12-miristato acetato (PMA) (agente estimulante que activa la proteína quinasa C) e Ionomicina (agente que se intercala en la bicapa lipídica de la membrana celular y aumenta la permeabilidad del  $\text{Ca}^{2+}$ ) durante 12 horas. Además, las células se incubaron en presencia de Monensina y Brefelfina A (BD Biosciences, EEUU), ambos inhibidores del transporte de proteínas intracelulares. Luego de la incubación, las células fueron lavadas con PBS 2% SFB y trasladadas a una placa de poliestireno para proceder a la tinción para citometría de flujo. Esta se realizó, primeramente, utilizándose anticuerpos específicos para marcadores de células NKT (Sección 4.4.1). Luego de lavados con PBS 2% SFB, se incubaron las células, durante 30 min a 4°C y protegidas de la luz, con solución Cytfix/Cytoperm (BD Biosciences, EEUU), la cual promueve fijación y permeabilización celular, al mismo tiempo en que permite la conservación de las características morfológicas de las células. Luego, se lavó tres veces con una solución de lavado (Perm/Wash Buffer) (BD Biosciences, EEUU), e, inmediatamente, se agregaron, por separado, distintos anticuerpos dirigidos a citoquinas intracelulares: anti-IL-10 (Clon: JES3-9D7), anti-IFN- $\gamma$  (Clon: B27), anti-TGF- $\beta$  (Clon: TW4-2F8), anti-TNF- $\alpha$  (Clon: MAb11) o sus correspondientes controles de isotipo (IL-10: Rat IgG1 $\kappa$  ; IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ : Mouse IgG1 $\kappa$ ) (todos los anticuerpos estaban conjugados a PEcy7 (BioLegend-EE.UU)). Se incubaron las células con los anticuerpos durante 30 min a 4°C protegidos de la luz. Después de la tinción, las células se lavaron tres veces con la solución de lavado y fijadas con PFA 2% y analizadas por citometría de flujo.

#### 4.5 Cultivo de líneas celulares de adenocarcinoma gástrico

Para evaluar la expresión de CD1d en células adenocarcinoma gástrico, se utilizaron las siguientes líneas celulares comerciales: AGS (ATCC, EEUU) (de origen epitelial derivada de

fragmentos de un tumor gástrico resecado de un paciente que no había recibido ningún tratamiento previo) y MNK-45 (DSMZ, Alemania) (establecido desde un adenocarcinoma gástrico poco diferenciado (tipo medular) de una mujer de 62 años de edad). Como control negativo para la expresión de CD1d, fue utilizada la línea celular K562 (ATCC, EEUU) (proveniente de la efusión pleural de una mujer de 53 años de edad con leucemia mieloide crónica). Estas células fueron cultivadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en medio RPMI 1640 suplementado con 5% de SFB y 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Luego de lavadas, las células fueron incubadas con anticuerpo anti-CD1d conjugado a PE (Clon: CD1d42) (BD Biosciences, EEUU), y anti-MHC-I conjugado a FITC. La tinción se comparó a la reactividad de las células con el control de isotipo para CD1d (Mouse IgG1, κ) y analizados mediante citometría de flujo.

#### **4.6 Determinación de la expresión de CD1d en células derivadas de la mucosa y tumor de pacientes con adenocarcinoma gástrico.**

Las células provenientes del tejido tumoral y de mucosa ya procesadas, fueron lavadas con PBS 2% SFB. Luego, las células se incubaron durante 30 min a 4°C con un anticuerpo anti-CD1d conjugado a PE. A modo de control de especificidad, se emplearon los controles de isotipo correspondientes.

#### **4.7 Análisis Estadístico**

Las diferencias entre grupos se calcularon con la prueba *t* de Student; para la relación entre grupos, se determinó su correlación. Todos los datos se analizaron con el programa GraphPadPrism versión 4 (EE.UU.). Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Características clínico-patológicas de pacientes con cáncer gástrico

Las características clínico-patológicas del adenocarcinoma gástrico fueron evaluadas en cada paciente enrolado en este estudio (Tabla 1). Los pacientes recibieron la nomenclatura “CG” seguida del número de la muestra para proteger su privacidad y mantener la confidencialidad de los datos obtenidos. Mediante los análisis de las biopsias de tejido tumoral, los que se realizaron en la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Salvador (Santiago, Chile), los parámetros clínico-patológicos fueron caracterizados según: tamaño del tumor (determinado como el diámetro máximo del tumor medido inmediatamente después de la resección del estómago), grado de diferenciación del tumor, fase de invasión tisular, estadio del tumor (según criterio TNM de la *American Joint Commission on Cancer (AJCC)*) (Gobbi *et al.* 2011), y la presencia de metástasis a los linfonodos cercanos al órgano. De acuerdo a la **Tabla 1**, los pacientes, en su totalidad, superaban los 40 años de edad, y la mayoría correspondía al sexo masculino. En todos los pacientes, la enfermedad se encontraba en una etapa avanzada y con presencia de metástasis hacia los linfonodos. Además, en todos los pacientes, el tamaño del tumor fue superior a 5 cm, lo que se ha asociado a un peor pronóstico de la enfermedad (Adachi *et al.*, 1997).

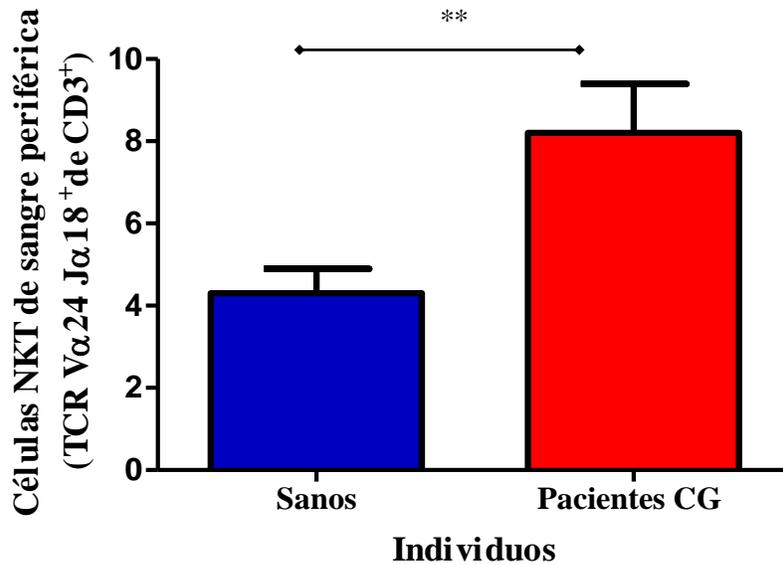
**Tabla 1.** Características clínico-patológicas de pacientes con cáncer gástrico.

Paciente	edad	sexo	tamaño del tumor (cm)	diferenciación tumoral	etapa del tumor	metástasis a linfonodo
CG 31	65	M	9	nd**	avanzado	Sí
CG 36	81	M	17	Poco	avanzado	Sí
CG 37	63	F	6	Bien	avanzado	Sí
CG 38	41	M	8	Poco	avanzado	Sí
CG 39	72	M	9	poco/moderado	avanzado	Sí

Estadio de acuerdo a la clasificación TNM para el cáncer gástrico (AJCC). \*\* nd, no determinado.

## 5.2 Frecuencia de células NKT en sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico

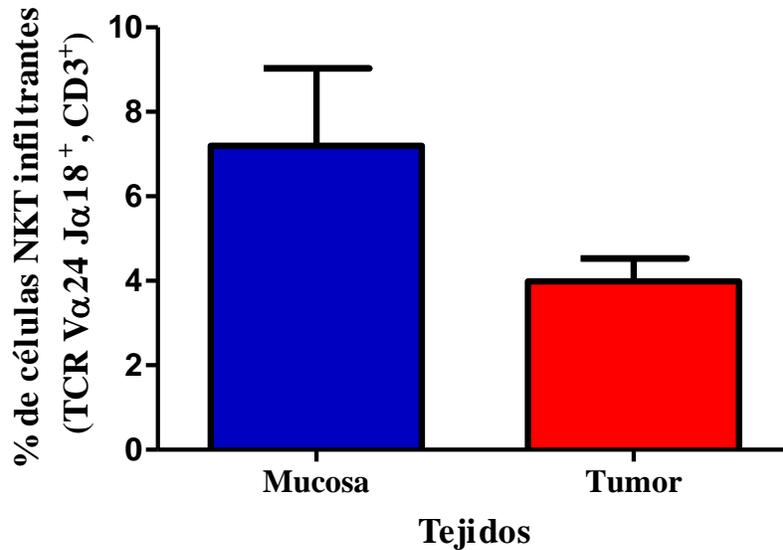
Con el objetivo de evaluar el porcentaje de células NKT en la sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma gástrico (Objetivo Específico 1), se realizaron ensayos de citometría de flujo utilizándose PBMCs tanto de pacientes como de donantes sanos. A través de la tinción celular con AcMo conjugados a marcadores fluorescentes, se midió la expresión, en superficie celular, de la molécula CD3 (presente exclusivamente en linfocitos T y células NKT) y de la cadena  $\alpha$  del receptor de linfocitos T (TCR) específico de las células NKT (TCR V $\alpha$ 24 J $\alpha$ 18). La frecuencia de las células NKT se determinó de acuerdo al porcentaje de células positivas para la molécula TCR V $\alpha$ 24 J $\alpha$ 18 con relación al total de linfocitos T CD3<sup>+</sup>. Los resultados obtenidos demuestran que, en pacientes con adenocarcinoma gástrico, la frecuencia de células NKT en sangre periférica es significativamente mayor que en individuos sanos (**Figura 5**).



**Figura 5. Porcentaje de células NKT en sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico.** PBMCs de 5 pacientes y de 5 controles sanos fueron marcados con anticuerpos conjugados a fluoróforos para identificar moléculas de superficie celular que determinan el fenotipo de las células NKT (anticuerpos anti-CD3 conjugado a APC y anti-TCR Vα24 Jα18 conjugado FITC). El porcentaje de células NKT fue determinado mediante citometría de flujo y analizado a través del software FlowJo v10. Un promedio de 10.000 eventos fueron colectados por muestra. El gráfico muestra el promedio de los porcentajes de células doble positivas para CD3 y TCR Vα24 Jα18 obtenidas de los 5 individuos de cada grupo ± desviación estándar. Se observa que la frecuencia de células NKT es significativamente mayor en pacientes con cáncer gástrico que en el grupo control. (\*\*  $p = 0,0057$ ).

### 5.3 Frecuencia de células NKT infiltrantes de tumor y mucosa gástrica

Mediante citometría de flujo, se evaluó la frecuencia de células NKT presentes tanto en el tumor gástrico primario como en la mucosa adyacente al tumor (Objetivo Específico 1). Suspensiones celulares derivadas de ambos tejidos gástricos fueron obtenidas de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos (Sección 4.4.1). Las células fueron posteriormente marcadas con anticuerpos específicos para los marcadores de superficie celular CD3-APC y TCR V $\alpha$ 24 J $\alpha$ 18-FITC, y se procedió a la identificación de las células NKT, cuyo porcentaje se estableció de acuerdo al mismo criterio utilizado para la sangre periférica (Sección 4.4.1). Los resultados obtenidos indican una clara tendencia a la prevalencia de células NKT en mucosa gástrica comparándose al tejido tumoral, aunque la diferencia entre ambos grupos no sea estadísticamente significativa (**Figura 6**).



**Figura 6. Frecuencia de células NKT en muestras de tejido tumoral y de mucosa gástrica.** Células provenientes del tumor y de la mucosa gástrica adyacente al tumor de 5 pacientes con adenocarcinoma gástrico fueron marcadas con anticuerpos monoclonales anti-CD3-APC y anti-TCR Vα24 Jα18-FITC. El porcentaje de células NKT fue determinado mediante citometría de flujo y analizado a través del software FlowJo v10. Un promedio de 10.000 eventos fueron colectados por muestra. El gráfico muestra el promedio de los porcentajes de células NKT presentes en ambos grupos de tejidos ± desviación estándar. No se observan diferencias significativas en la frecuencia de estas células entre los tejidos evaluados ( $p=0,0511$ ).

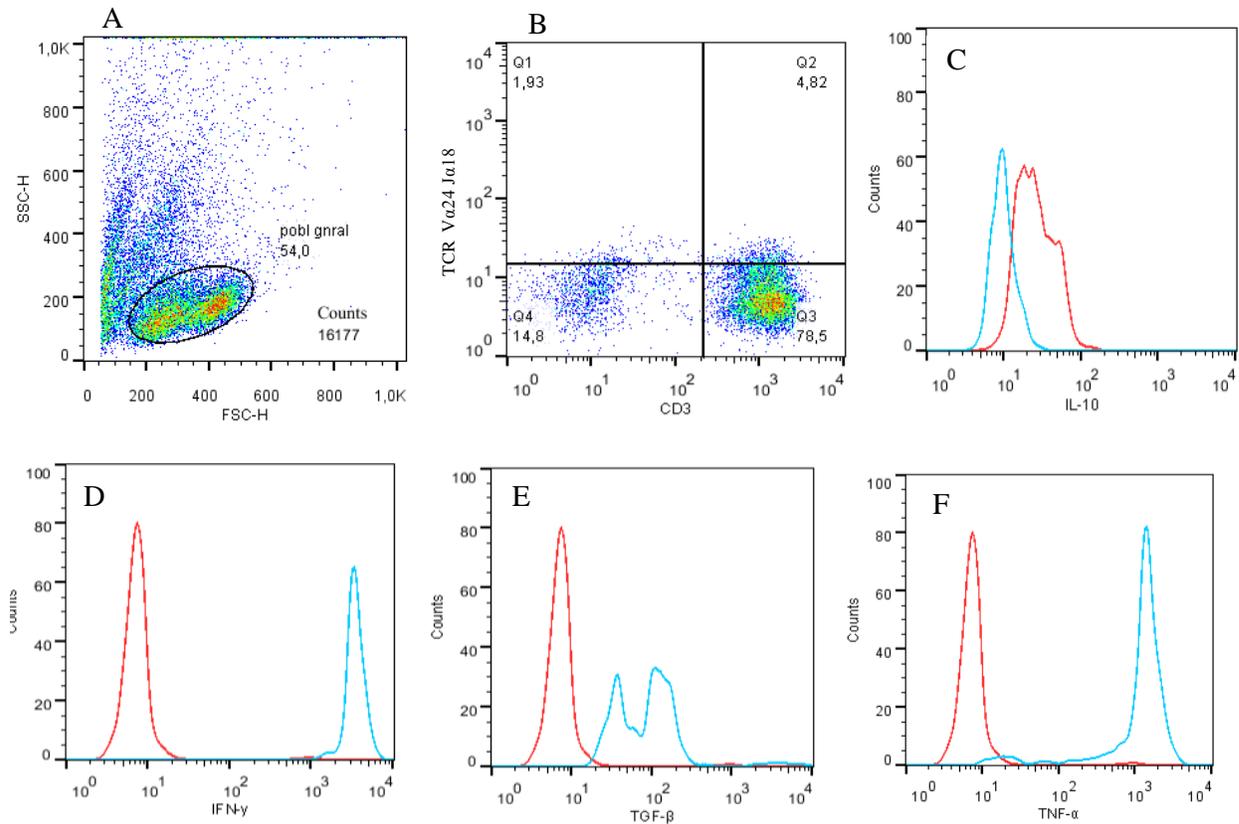
#### 5.4 Análisis de la expresión de citoquinas intracelulares por células NKT de sangre periférica de pacientes con cáncer gástrico

Para analizar la expresión de citoquinas intracelulares por las células NKT de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma gástrico (Objetivo Específico 2), PBMCs de 5 pacientes y de 5 individuos sanos fueron estimulados con PMA/Ionomicina en presencia de Brefeldina A/Monensina, por toda la noche, para inducir la producción de citoquinas por estas células e impedir su secreción hacia el medio extracelular, respectivamente (Watarai *et al.*, 2008). Luego, las células fueron lavadas e incubadas con anticuerpos específicos para identificar los linfocitos NKT, como previamente descrito (Sección 4.4.1). Posteriormente, para la detección de citoquinas intracelulares, las células fueron fijadas y permeabilizadas, seguido de incubación con anticuerpos anti-IL-10, -IFN- $\gamma$ , -TGF- $\beta$  y -TNF- $\alpha$ . Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo. Las **Figuras 7A y 8A** son representativas de las propiedades de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) de las células sanguíneas de un individuo sano y de un paciente con cáncer gástrico, respectivamente. Los linfocitos NKT se seleccionaron de acuerdo a sus características de tamaño y complejidad (**Figs. 7A y 7B**), así como por la expresión de CD3 y TCR V $\alpha$ 24 J $\alpha$ 18 (**Figs. 7B y 8B**). La expresión de IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$  se determinó en las células CD3<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 24J $\alpha$ 18<sup>+</sup> (cuadrante superior derecho de las **Figs. 7B y 8B**), comparándose a sus respectivos controles de isotipo (histogramas en azul y rojo, respectivamente, **Figs. 7 y 8**).

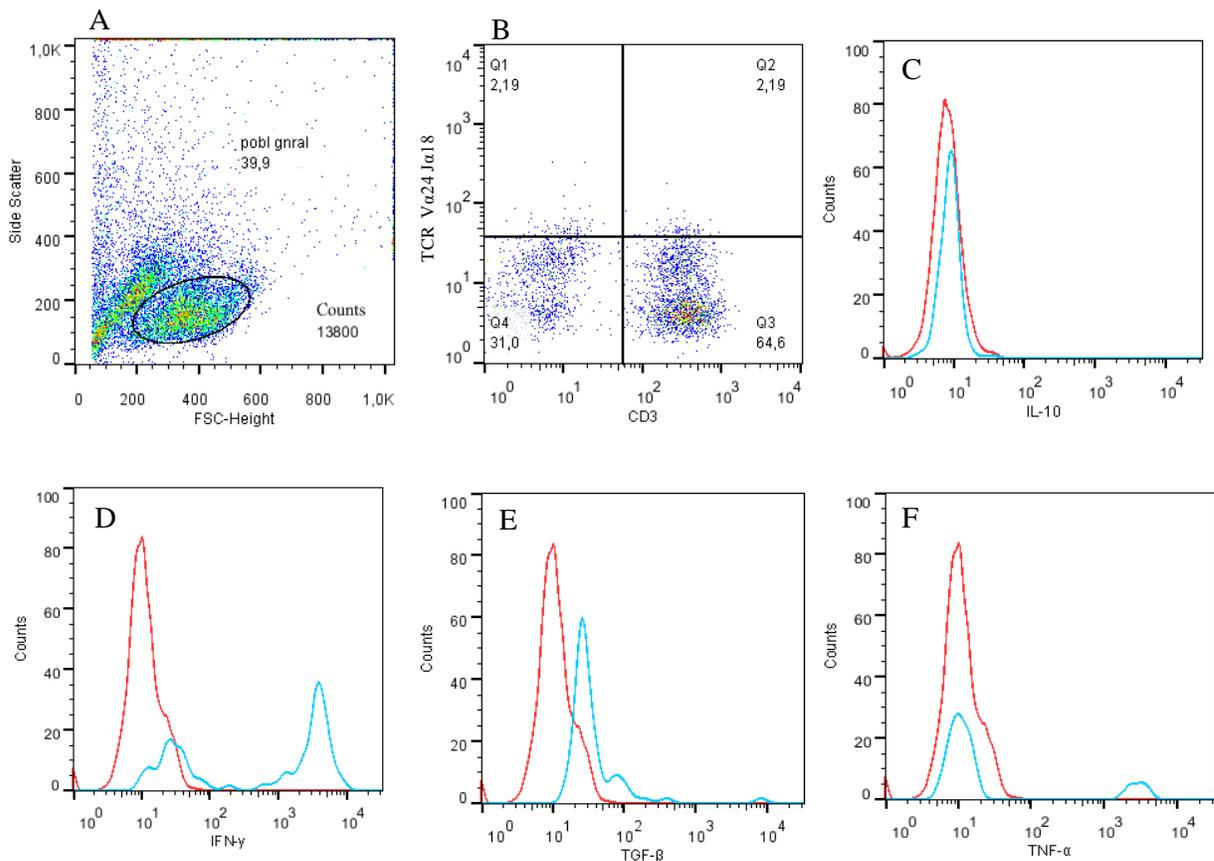
Los resultados indican que, entre individuos sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico, no se presentan diferencias estadísticamente significativas al comparar las intensidades medias de fluorescencia correspondientes a la producción de citoquinas intracelulares por las células NKT de sangre periférica (**Figura 9**). Sin embargo, se puede observar una leve tendencia que señala que células NKT de pacientes con adenocarcinoma gástrico poseen una menor producción de IFN- $\gamma$ , lo que podría asociarse a una menor capacidad inmuno-estimuladora por parte de estas células en la sangre periférica, además con el estadio del tumor, como observado en otros tipos de tumores (Yanagisawa y Seino *et al.*, 2002).

Por otro lado, al evaluar el porcentaje de células NKT periféricas que producen las citoquinas analizadas, se observó que los pacientes con cáncer gástrico presentan una mayor frecuencia de

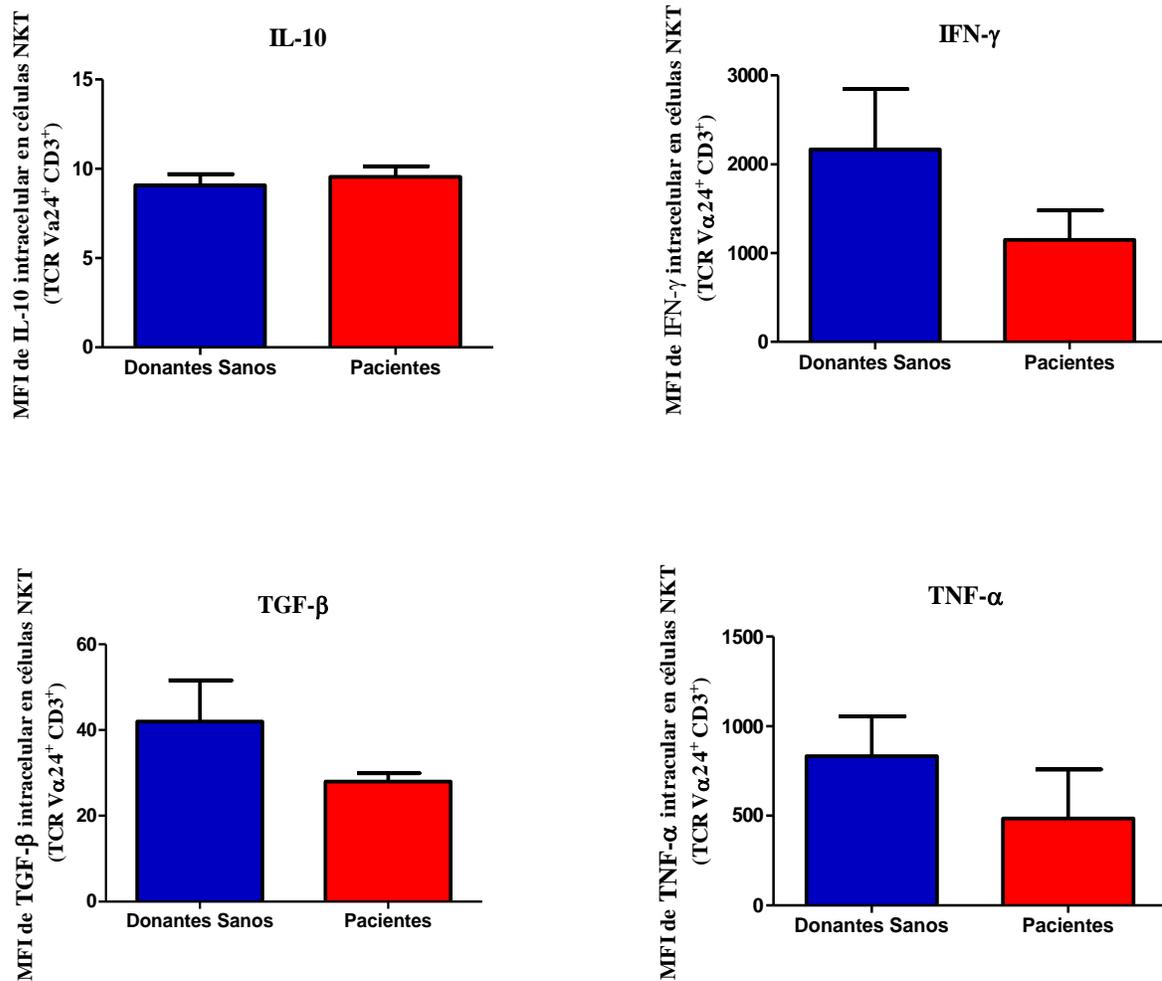
células NKT productoras de la citoquina inmunosupresora IL-10 en comparación a los controles sanos (**Figura 10**). Además, la frecuencia de células NKT productoras de IFN- $\gamma$ , en los pacientes, se vio disminuida comparada a los individuos sanos (**Figura 10**). Estos resultados nos indican que las células NKT de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma gástrico podrían estar promoviendo un ambiente inmunosupresor al secretar más IL-10 y menos IFN- $\gamma$  al medio extracelular, favoreciendo así la progresión del tumor.



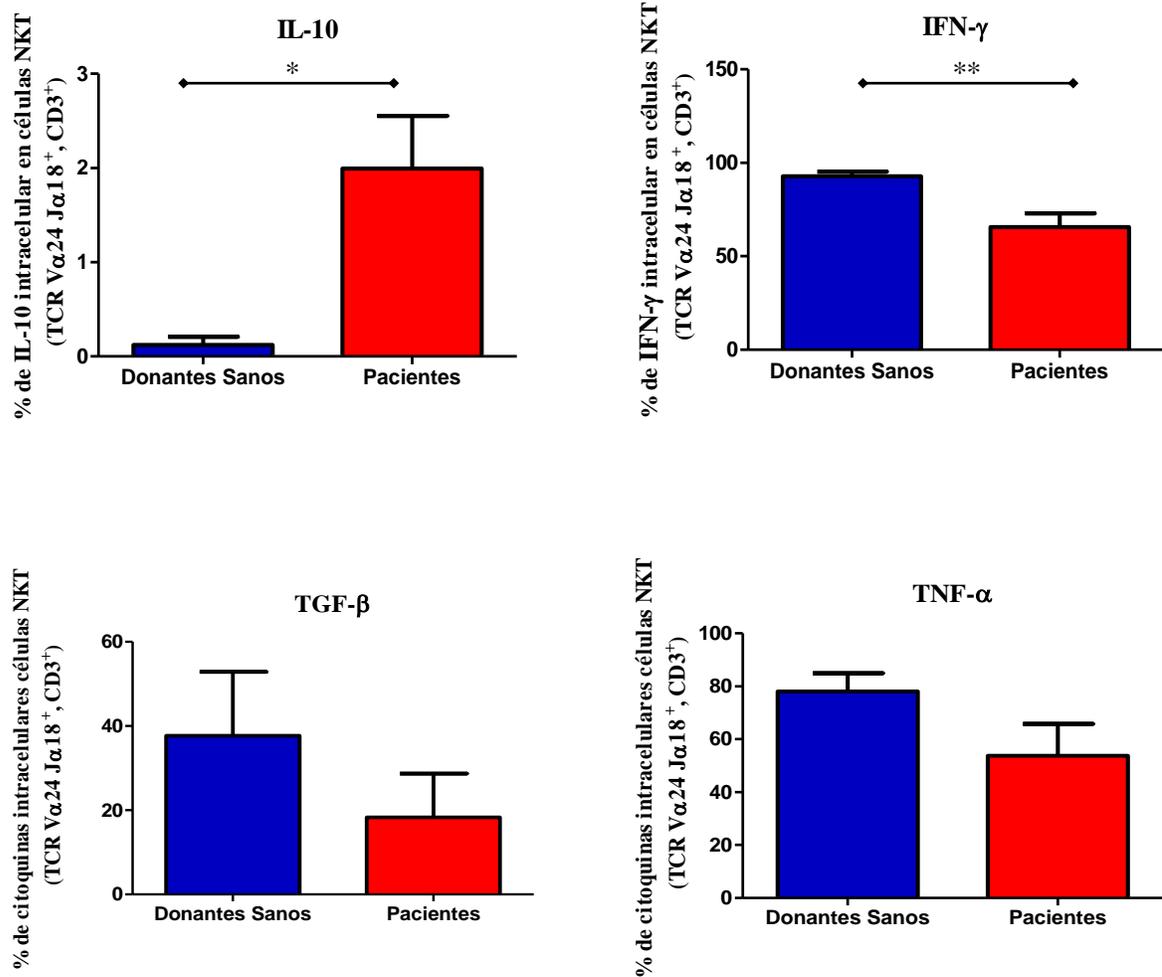
**Figura 7.** Datos representativos de citometría de flujo de sangre periférica de un individuo sano (A.) Propiedades de PBMCs relacionadas a su tamaño (forward scatter, FSC-H) y complejidad (o granularidad) (side scatter, SSC-H). (B) Dot-Plot de PBMCs marcados con anticuerpos anti-TCR Va24 Ja18-FITC y anti-CD3-APC, donde la población doble positiva corresponde a las células NKT (cuadrante superior derecho). En estas células, se evaluó la expresión de citoquinas utilizándose anticuerpos específicos conjugados a PECy7. Los histogramas en celeste representan la expresión, por células NKT, de IL-10 (C), IFN- $\gamma$  (D), TGF- $\beta$  (E) y TNF- $\alpha$  (F). Los histogramas en rojo indican los controles de isotipo correspondientes a cada anticuerpo.



**Figura 8. Datos representativos de citometría de flujo correspondiente a un paciente con adenocarcinoma gástrico (A).** *Propiedades de PBMCs bajo sus condiciones de tamaño (forward scatter, FSC-H) y granularidad (side scatter, SSC-H). (B) Dot-Plot de PBMC marcados con anticuerpos anti TCR Va24 Ja18-FITC y CD3-APC, donde la población doble positiva corresponde a las células NKT (cuadrante superior derecho). En esta población, se evaluó la expresión de citoquinas intracelulares utilizando anticuerpos específicos conjugados a PECy7. Los histogramas en celeste representan la expresión, por células NKT, de IL-10 (C), IFN- $\gamma$  (D), TGF- $\beta$  (E) y TNF- $\alpha$  (F). Los histogramas en rojo indican los controles de isotipo correspondientes.*



**Figura 9.** Expresión de citoquinas intracelulares por células NKT de sangre periférica provenientes de pacientes con adenocarcinoma gástrico e individuos sanos. Muestras de PBMC derivadas de 5 pacientes y 5 controles fueron marcadas con anticuerpos específicos para determinar el fenotipo de las células NKT (anti-CD3-APC y anti-TCR Va24Ja18-FITC), seguido de tinción intracelular para detectar expresión de IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$ . La intensidad media de fluorescencia (MFI) fue determinada mediante citometría de flujo y analizada a través del software FlowJo v10. Un promedio de 10.000 eventos fueron colectados por muestra. Los gráficos muestran el promedio de los valores de MFI correspondientes a las citoquinas  $\pm$  desviación estándar.

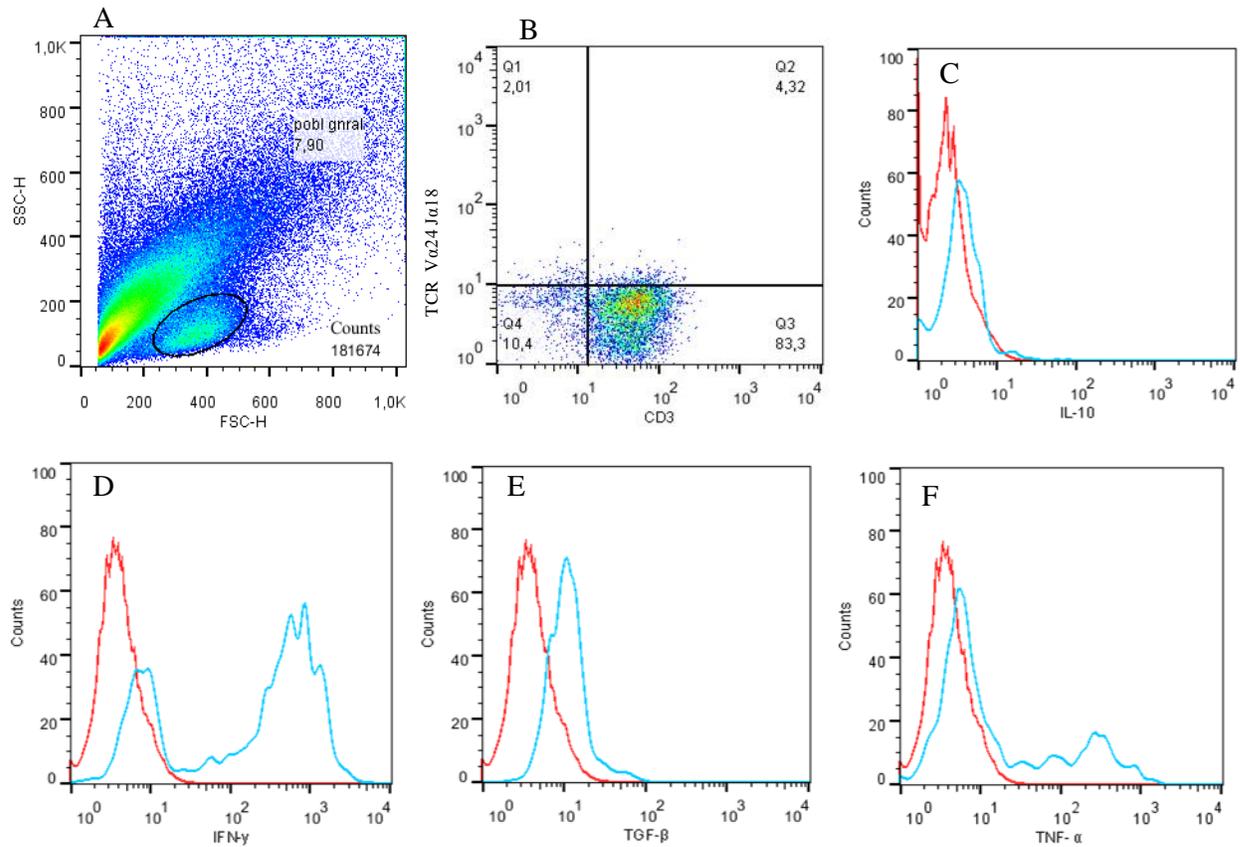


**Figura 10. Porcentaje de células NKT de sangre periférica productoras de citoquinas en pacientes con adenocarcinoma gástrico e individuos sanos.** Muestras de PBMC derivadas de 5 pacientes y 5 controles fueron marcadas con anticuerpos específicos para determinar el fenotipo de las células NKT (anti-CD3-APC y anti-TCR V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18-FITC). El porcentaje de células NKT fue determinado mediante citometría de flujo y analizado a través del software FlowJo v10. Un promedio de 10.000 eventos fueron colectados por muestra. Las gráficas enseñan los promedios de los porcentajes de citoquinas intracelulares de células NKT de sangre periférica en pacientes con adenocarcinoma gástrico e individuos sanos  $\pm$  desviación estándar. Se observan diferencias estadísticamente significativas para células productoras de IL-10 (\*  $p = 0,0107$ ) e IFN- $\gamma$  (\*  $p = 0,0087$ ) entre pacientes con cáncer gástrico y controles sanos.

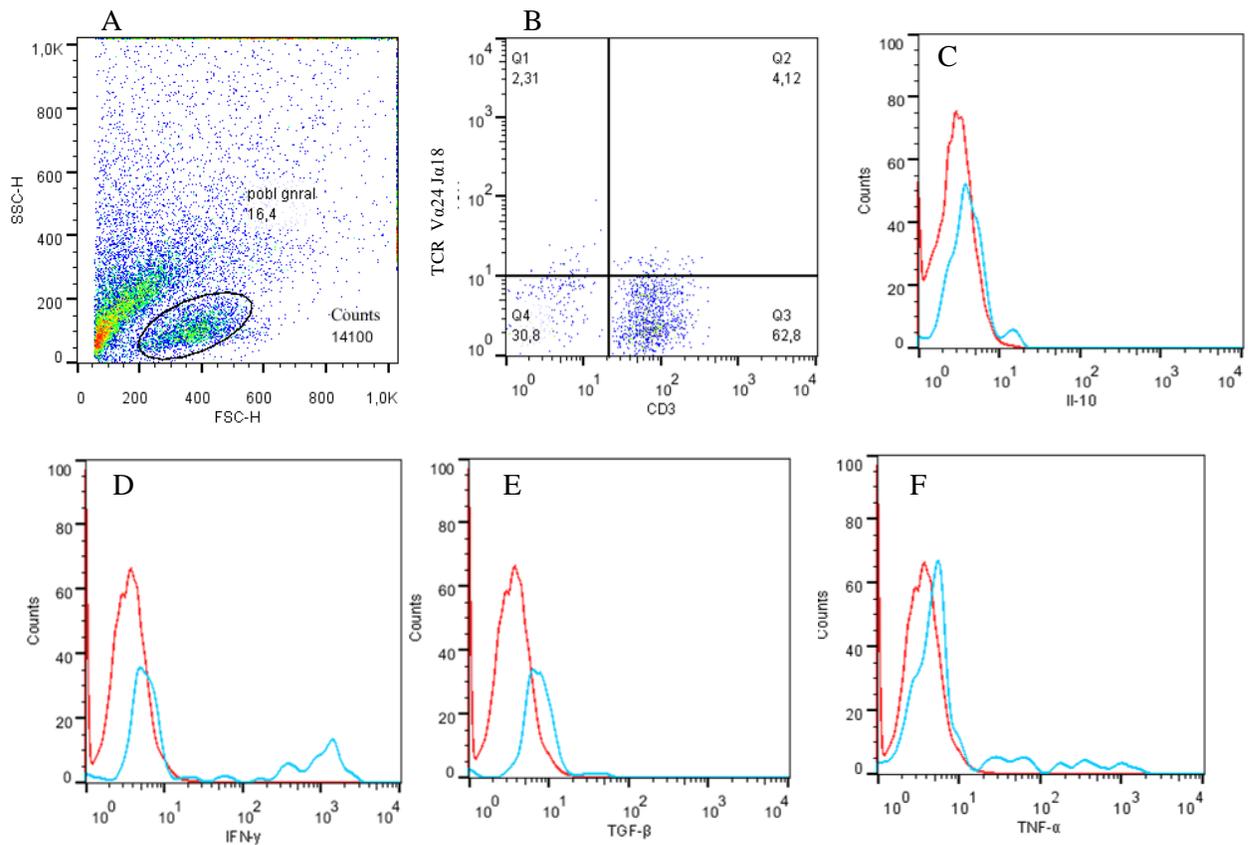
### 5.5 Perfil de expresión de citoquinas intracelulares por células NKT infiltrantes de tumor y mucosa gástrica

Para evaluar la producción de citoquinas por células NKT presentes en tumor y mucosa gástrica de pacientes con adenocarcinoma gástrico, por citometría de flujo (Objetivo Específico 3), suspensiones celulares derivadas del tejido tumoral y mucosa de 5 pacientes fueron estimuladas y marcadas con anticuerpos monoclonales para así identificar los linfocitos NKT infiltrantes de estos tejidos, como fue descrito (Sección 4.4.1). Luego, las células fueron permeabilizadas y fijadas, seguido de marcaje con anticuerpos específicos contra las citoquinas intracelulares analizadas (Sección 4.4.2). Las **Figuras 11A y 12A** indican las características de las citometrías y muestran las propiedades de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) de las células infiltrantes del tejido tumoral y el tejido adyacente al tumor (mucosa), respectivamente. Los linfocitos NKT se seleccionaron como fue mencionado previamente (Sección 5.4) (**Figuras 11B y 12B**). La expresión de IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$  se determinó en las células CD3<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 24J $\alpha$ 18<sup>+</sup> (cuadrante superior derecho de las **Figs. 11B y 12B**), comparándose a sus respectivos controles de isotipo (histogramas en azul y rojo, respectivamente, **Figs. 11 y 12**).

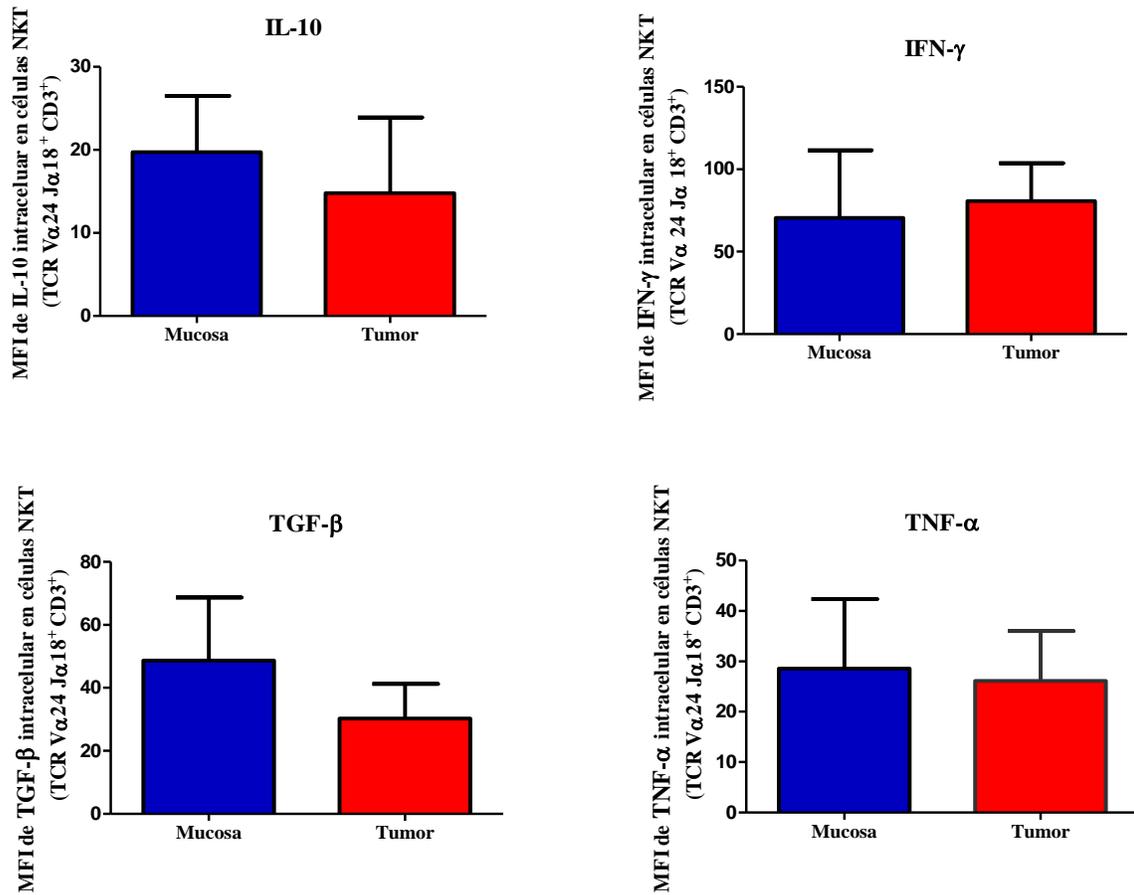
Los resultados revelan que, a pesar de que existen leves diferencias en los patrones de algunas citoquinas intracelulares (IL-10 y TGF- $\beta$ ) entre individuos sanos y pacientes con adenocarcinoma gástrico, estos no demuestran diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores de MFI de las citoquinas analizadas en células NKT del tejido tumoral y del tejido adyacente al tumor (**Figura 13**). Por otra parte, al comparar los porcentajes de células NKT productoras de citoquinas en los tejidos tumorales y de la mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico, se observa que, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la producción de citoquinas intracelulares por parte de estas células, se observa una tendencia a que la expresión de IL-10 y TGF- $\beta$  esté aumentada en la mucosa gástrica de los pacientes con adenocarcinoma gástrico (**Figura 14**). El aumento de estas dos citoquinas podría generar un ambiente inmunosupresor, favoreciendo la progresión del tumor.



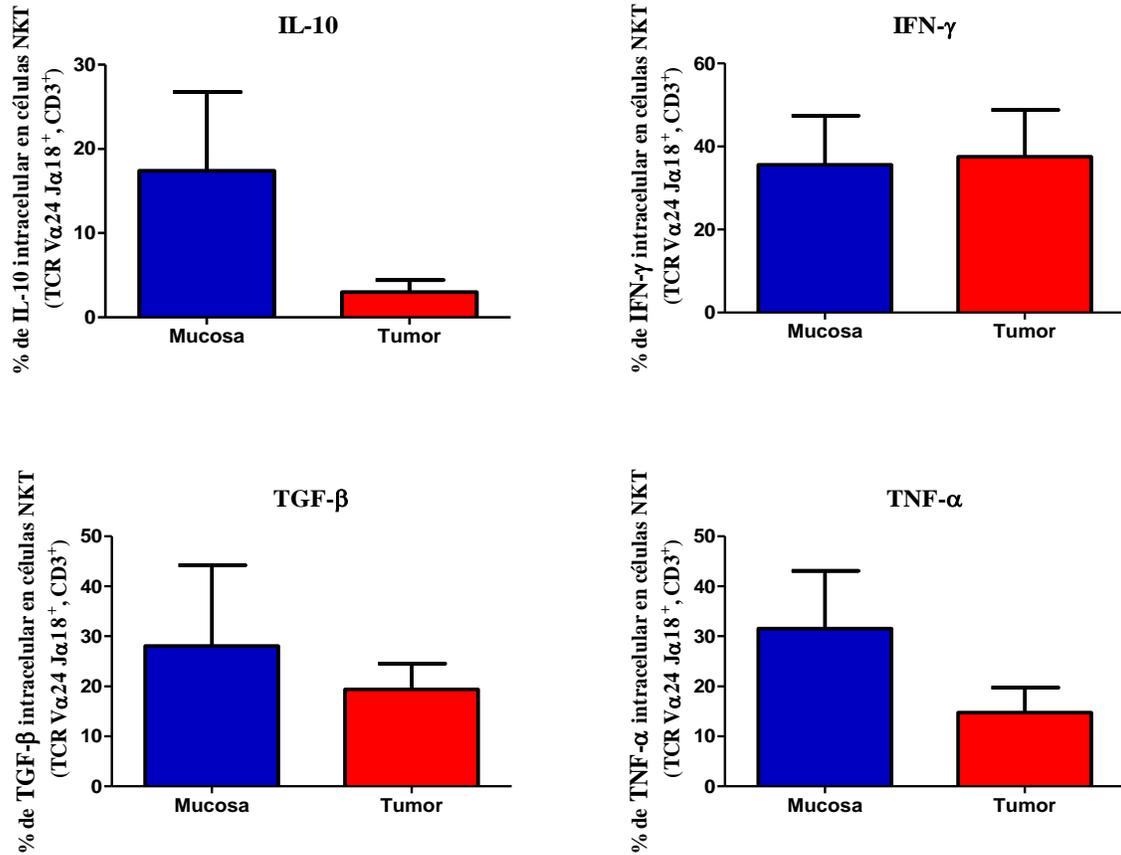
**Figura 11. Datos representativos de una citometría de flujo correspondiente al tejido tumoral de un paciente con adenocarcinoma gástrico (A.)** Los linfocitos infiltrantes de tumor son seleccionados bajo sus condiciones de tamaño (forward scatter, FSC-H) y complejidad (side scatter, SSC-H). (B) Dot-Plot de las células infiltrantes del tejido tumoral marcadas con anticuerpos monoclonales anti TCR Va24 Ja18-FITC y CD3-APC, donde la población doble positiva corresponde a las células NKT (cuadrante superior derecho). En esta población, se evaluó la expresión de citoquinas intracelulares utilizando anticuerpos específicos conjugados a PECy7. Los histogramas en celeste representan la expresión, por células NKT, de IL-10 (C), IFN- $\gamma$  (D), TGF- $\beta$  (E) y TNF- $\alpha$  (F). Los histogramas en rojo indican los controles de isotipo correspondientes.



**Figura 12.** Datos distintivos de una citometría de flujo correspondiente a la mucosa gástrica de un paciente con adenocarcinoma gástrico (A.) Los linfocitos de la mucosa gástrica son seleccionados bajo sus condiciones de tamaño (forward scatter, FSC-H) y complejidad (side scatter, SSC-H). (B) Dot-Plot de las células infiltrantes de la mucosa marcadas con anticuerpos monoclonales anti TCR Va24 Ja18-FITC y CD3-APC, donde la población doble positiva corresponde a las células NKT (cuadrante superior derecho). En esta población, se evaluó la expresión de citoquinas intracelulares utilizando anticuerpos específicos conjugados a PECy7. Los histogramas en celeste representan la expresión, por células NKT, de IL-10 (C), IFN- $\gamma$  (D), TGF- $\beta$  (E) y TNF- $\alpha$  (F). Los histogramas en rojo indican los controles de isotipo correspondientes.



**Figura 13.** Expresión de citoquinas intracelulares por células NKT infiltrantes de tejido tumoral y de mucosa adyacente al tumor de pacientes con adenocarcinoma gástrico. Las muestras fueron obtenidas de 5 pacientes, procesadas y luego marcadas con anticuerpos específicos para determinar el fenotipo de las células NKT (anti TCR V $\alpha$ 24 J $\alpha$ 18-FITC y CD3-APC), para luego ser permeabilizadas y seguido de una tinción intracelular para detectar expresión de IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$ . El porcentaje de células NKT fue determinado mediante citometría de flujo y analizado a través del software FlowJo v10. Un promedio de 10.000 eventos fueron colectados por muestra. Las gráficas muestran los valores de MFI de expresión de citoquinas intracelulares por células NKT de mucosa y tumor en pacientes con adenocarcinoma gástrico  $\pm$  desviación estándar.

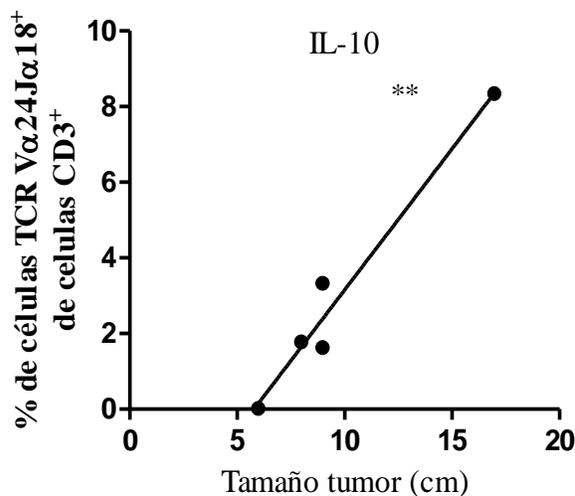


**Figura 14. Expresión de citoquinas intracelulares por células NKT infiltrantes de tejido tumoral y de mucosa adyacente al tumor de pacientes con adenocarcinoma gástrico.** Las muestras fueron obtenidas de 5 pacientes procesadas y marcadas con anticuerpos específicos para determinar el fenotipo de las células NKT (anti TCR V $\alpha$ 24 J $\alpha$ 18-FITC y CD3-APC) para luego ser permeabilizadas y marcadas con anticuerpos anti IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ . El porcentaje de células NKT fue determinado mediante citometría de flujo y analizado a través del software FlowJo v10. Un promedio de 10.000 eventos fueron colectados por muestra. Las gráficas muestran el promedio de los porcentajes de células positivas para las distintas citoquinas analizadas desde 5 individuos de cada grupo  $\pm$  desviación estándar.

## 5.6. Análisis correlacional de los niveles de citoquinas de células NKT con las características clínico-patológicas del tumor

En base a los resultados obtenidos, se estudió la interacción directa entre la producción de citoquinas por las células NKT de pacientes con adenocarcinoma gástrico y el tamaño del tumor, la cual corresponde a la única característica clínico-patológica que presenta variación entre los pacientes enrollados en el presente estudio, ya que cabe recordar de que todos los pacientes estaban en etapas avanzadas del cáncer y además presentan metástasis hacia los linfonodos (**Tabla 1**).

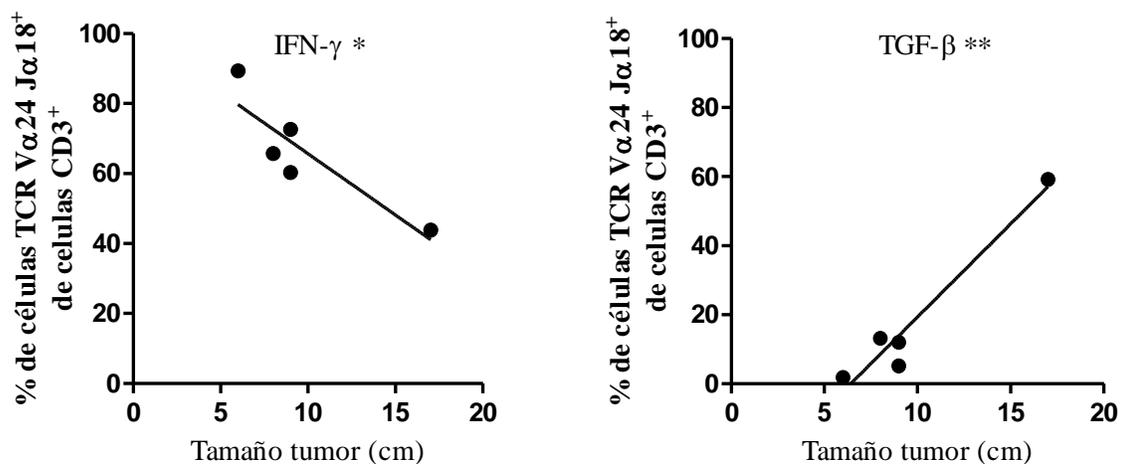
Se observa una correlación positiva entre la producción de IL-10 intracelular por las células NKT infiltrantes del tumor y el tamaño tumoral (**Figura 15**), lo cual sugeriría que, a medida que el tumor aumenta de tamaño, la producción de IL-10 por las células NKT también se ve aumentada. Este aumento en la producción de IL-10 sería determinante, ya que fomentaría un microambiente tumoral inmunosupresor, favoreciendo la progresión tumoral.



**Figura 15. Correlación entre IL-10 intracelular de células NKT infiltrantes de tumor y tamaño tumoral de pacientes con adenocarcinoma gástrico.** Gráfico de porcentaje de células NKT derivadas de tejido tumoral versus tamaño del tumor gástrico. Se observa una correlación positiva entre las variables ( $*r = 0.9816$ ) ( $**p = 0,003$ ).

A continuación, se determinó la posible correlación existente entre la producción intracelular de citoquinas en las células NKT de la periferia y el tamaño tumoral. Se observaron dos tipos de correlaciones: una negativa, en el caso de IFN- $\gamma$ , y otra positiva para TGF- $\beta$  (**Figura 16**).

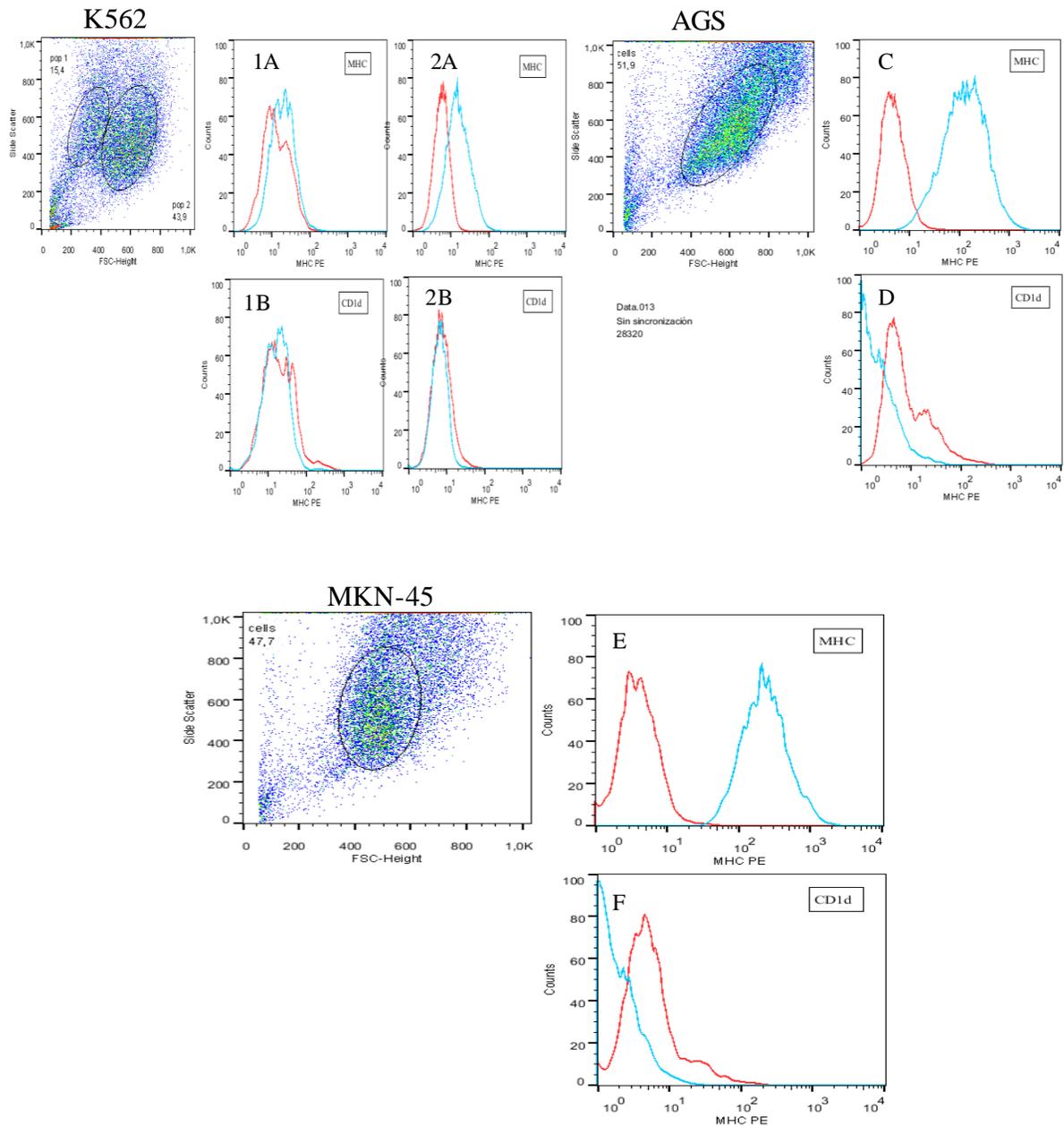
Estos resultados nos indican que existe una asociación entre el crecimiento tumoral y una mayor expresión de TGF- $\beta$  por las células NKT de la periferia, así como menor producción de IFN- $\gamma$ , lo cual determinaría una actividad efectora comprometida en la periferia. Los niveles de TGF- $\beta$  se encuentran aumentados en el suero de pacientes con CG; esto tiene un efecto directo en las células NK de la periferia, ya que el TGF- $\beta$  desregula el receptor NKG2D y también a sus ligandos, comprometiendo así su actividad efectora.



**Figura 16.** Correlación entre IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  intracelular de células NKT de sangre periférica y tamaño tumoral de pacientes con adenocarcinoma gástrico. Gráficos de porcentaje de células NKT productoras de ambas citoquinas versus tamaño tumoral de pacientes. Se puede observar dos correlaciones: una negativa (IFN- $\gamma$ ) ( $*r = -0,8847$ ) ( $*p = 0,0462$ ) y otra positiva (TGF- $\beta$ ) ( $**r = 0,9714$ ) ( $**p = 0,0058$ ).

### 5.7. Análisis de expresión de marcadores de superficie celular en líneas celulares de origen tumoral

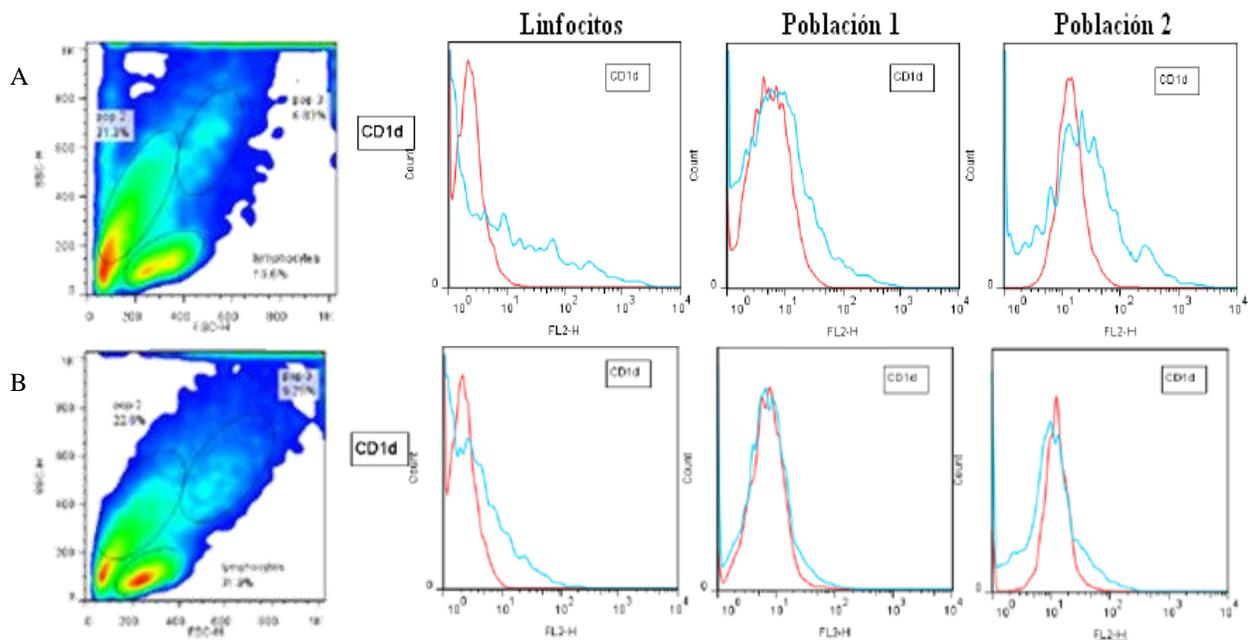
Con el objetivo de identificar la expresión de CD1d, molécula expresada en la membrana de células presentadoras de antígenos y en algunos tipos de células tumorales (Giaccone *et al.*, 2002) que presentan antígenos glicolípidicos a linfocitos NKT (Kawano *et al.*, 1997) (Objetivo específico 4), se utilizaron líneas celulares de adenocarcinoma gástrico (MKN-45 y AGS) y una línea celular de eritroblastoma (K562), la que, a diferencia de las líneas de adenocarcinoma gástrico, carece de la expresión de MHC de clase I (Vitale *et al.*, 1992). Las células K562 fueron utilizadas como un control negativo para CD1d, ya que no expresan esta molécula en su superficie (Kuylenstierna y Björkström *et al.*, 2011). Para su análisis, por citometría de flujo, las células fueron teñidas con anticuerpos específicos anti-CD1d y anti-MHC-I conjugados a fluoróforos. La tinción se comparó a la reactividad de las células con el control de isotipo para CD1d. La **Figura 17** muestra un análisis representativo de citometría de flujo, en el cual se observa la expresión de MHC-I por ambas células gástricas, como esperado (**Figura 17 C y E**). Aunque las células K562 no expresaron CD1d, como era esperado, sorpresivamente, se observaron dos poblaciones distintas, las que presentaron expresiones diferenciales de MHC-I (**Figura 17 1A y 1B**). Esto se podría atribuir a una diferenciación *in vitro* de estas células (Leif *et al.*, 1979). De acuerdo a los resultados obtenidos, las células AGS y MKN-45 no expresan CD1d, como se observa en la **Figura 17 D y F**, lo que indicaría que, en el ambiente tumoral, las células NKT pueden ser activadas a través de la presentación antigénica por parte de otras células presentadoras de antígenos, y no por las células tumorales.



**Figura 17. Expresión de CD1d en líneas celulares de origen tumoral.** Líneas celulares tumorales K562, AGS y MKN-45 fueron marcadas con anticuerpos anti-CD1d-PE y anti-MHC-I-FITC, para evaluar la expresión de estas moléculas en la membrana celular. Ninguna de las 3 líneas celulares evaluadas expresó CD1d (histogramas en celeste) al ser comparadas con su control de isotipo (histogramas en rojo) (1B, 2B, D, F).

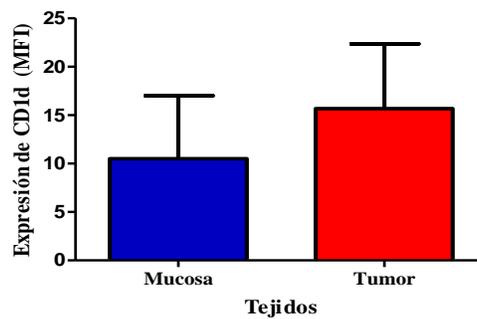
## 5.8. Análisis de expresión de marcadores de superficie celular en células derivadas del tejido tumoral y de mucosa

Las células provenientes del tumor y mucosa de pacientes con adenocarcinoma fueron marcadas con el objetivo de medir la expresión de la molécula CD1d en las células de estos tejidos. Para su análisis, mediante citometría de flujo, las células fueron teñidas con anticuerpos específicos anti-CD1d conjugado. La tinción se comparó con su respectivo control de isotipo para CD1d. La **Figura 18** muestra un resultado representativo de las citometría de flujo, en el cual se observa la expresión de CD1d por las células derivadas de los tejidos gástricos (en las tres poblaciones identificadas: linfocitos, población 1 y población 2). Los gráficos de las intensidades de fluorescencia obtenidos a partir de 3 pacientes con cáncer gástrico fueron representados (**Figura 19**), los cuales indican que las células expresan CD1d en ambos tejidos. Esta es la primera evidencia para la expresión CD1d en el cáncer gástrico.

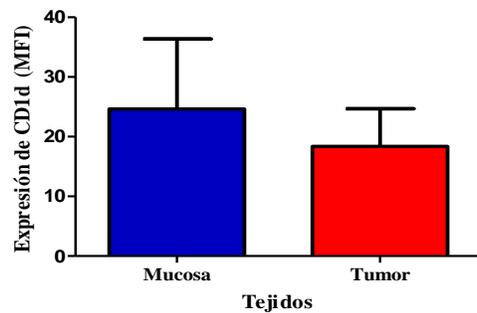


**Figura 18. Expresión de CD1d en células derivadas de tumor y mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico.** Las muestras de 3 pacientes, procesadas y luego marcadas con anticuerpos específicos anti-CD1d-PE, fueron utilizadas para evaluar la expresión de esta molécula en la membrana celular

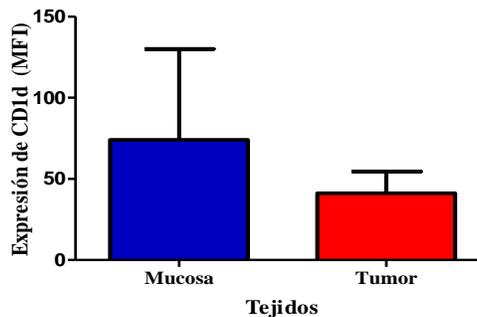
Expresión de CD1d por linfocitos totales derivados de tejidos



Expresión de CD1d por las células derivadas de tejido (pop 2)



Expresión de CD1d por las células derivadas de tejido (pop 3)



**Figura 19. Expresión de CD1d en células derivadas de tumor y mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico.** Las muestras fueron obtenidas de 3 pacientes, procesadas y luego marcadas con anticuerpos específicos anti-CD1d-PE, para evaluar la expresión de esta molécula en la membrana celular. El porcentaje de células NKT fue determinado mediante citometría de flujo y analizado a través del software FlowJo v10. Un promedio de 10.000 eventos fueron colectados por muestra. Las gráficas muestran los valores de MFI de expresión de CD1d por células de la mucosa y tumor en pacientes con adenocarcinoma gástrico  $\pm$  desviación estándar.

## 6. DISCUSIÓN

En este estudio, se reporta que pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico poseen una mayor frecuencia de células NKT en sangre periférica. Además, estos pacientes presentan un mayor número de células NKT secretoras de IL-10 y un menor porcentaje de células NKT secretoras de IFN- $\gamma$ . En el microambiente tumoral y en la mucosa gástrica adyacente al tumor, se pudo observar la presencia de células NKT; sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la frecuencia de estas células o la producción de citoquinas entre ambos tejidos gástricos. También se ha observado que existe una correlación positiva entre el tamaño del tumor y la producción de IL-10 intracelular por las células NKT derivadas del tumor. También se observó una asociación positiva entre el tamaño del tumor y la cantidad de TGF- $\beta$  intracelular en células NKT de la periferia. Por otro lado, se observó una correlación negativa entre el tamaño del tumor y la producción de IFN- $\gamma$  intracelular en células NKT de la periferia. También se reporta que líneas celulares de cáncer gástrico no expresan la molécula CD1d; sin embargo, en células derivadas de los tejidos gástricos se observa expresión de esta molécula.

### 6.1 Frecuencia y perfil de citoquinas intracelulares de células NKT de sangre periférica

Actualmente, no existen estudios que identifiquen y describan la frecuencia de las células NKT en sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma gástrico, a pesar de que sí se ha reportado en otros tipos de cáncer, como el de pulmón (Konishi et al., 2004) y colon (Molling et al., 2005), en los cuales existen bajos niveles de células NKT en la periferia, lo cual estaría asociado a un mal pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, algunos investigadores han demostrado que el número de células NKT periféricas en pacientes con algunos tipos de cáncer es equivalente a individuos sanos (Berzins et al., 2011), mientras que otros han informado de que células NKT de pacientes con cáncer de próstata presentan actividad funcional comprometida (Tahir y Cheng *et al.*, 2001).

En pacientes con adenocarcinoma gástrico, la frecuencia de células NKT de sangre periférica es significativamente mayor que la de controles sanos (Figura 5). Interesantemente, el porcentaje de células NKT productoras de IL-10, una citoquina inmunosupresora, es significativamente mayor en los pacientes que en los individuos sanos (Figura 10), mientras que el número de células secretoras de IFN- $\gamma$ , una citoquina inmunoestimuladora, es menor en los pacientes comparado a los controles (Figura 10). Estos datos novedosos indican que las células NKT podrían contribuir con los altos niveles séricos de IL-10 descritos en cáncer gástrico (Morisaki *et al.*, 1996). Además, como se ha descrito en otros tipos de cánceres (Berzins *et al.*, 2011), los pacientes con cáncer gástrico presentan menor frecuencia de células NKT que expresan IFN- $\gamma$  (Figura 10), lo que podría favorecer la progresión de la enfermedad (Tahir y Cheng *et al.*, 2001).

Sería muy interesante evaluar la frecuencia y producción de citoquinas por células NKT periféricas en pacientes en estado temprano del adenocarcinoma gástrico y compararlas con los pacientes en estado avanzado de la enfermedad con el objetivo de caracterizar mejor el papel de estas células en el desarrollo del cáncer gástrico. No obstante, los datos presentados en este trabajo nos permiten atribuir a estas células un rol inmunosupresor durante la respuesta inmune contra el cáncer gástrico avanzado.

IL-10 es una citoquina inmunosupresora producida por diversos tipos celulares, capaz de impedir la producción de un amplio rango de citoquinas producidas por varios tipos celulares involucrados en la respuesta inmune, como por ejemplo IL-2, IL-3, IFN- $\gamma$  y GM-CSF en células Th1; IL-4 e IL-5 en células Th2; TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en las células NK. Además, IL-10 participa en la generación de linfocitos T reguladores productores de IL-10 (linfocitos Tr1) (Sakaguchi *et al.*, 2010). Se ha descrito que los pacientes con cáncer gástrico tienen mayor porcentaje de linfocitos T reguladores periféricos que individuos sanos (Rad *et al.*, 2006). Más específicamente, se ha observado, en nuestro laboratorio, que pacientes con cáncer gástrico presentan mayor frecuencia de linfocitos Tr1 en sangre periférica (Ribeiro *et al.*, datos no publicados). El presente trabajo propone que las células NKT podrían actuar como una importante fuente de producción de esta citoquina, lo que contribuiría para la respuesta inmunosupresora observada en cáncer gástrico.

En este trabajo, también se demuestra que pacientes con cáncer gástrico presentan menor cantidad de células NKT periféricas productoras de IFN- $\gamma$  (Figura 10). Este resultado sugiere que estas células presentan funciones efectoras comprometidas, ya que el IFN- $\gamma$  es una citoquina inmunoestimuladora producida por las células NKT activadas (Berzins *et al.*, 2011). Esta citoquina, producida por las células NKT, es imprescindible para la activación de células NK y de linfocitos T CD8+ (Matsuda *et al.*, 2003). Por lo tanto, la menor cantidad de células NKT productoras de IFN- $\gamma$  en los pacientes con cáncer gástrico podría explicar la respuesta inmune deficiente observada en estos individuos, lo que podría contribuir a la inmunoevasión por parte del tumor y a la progresión de la enfermedad.

## **6.2 Frecuencia y perfil de citoquinas de células NKT infiltrantes de tumor y mucosa gástrica**

En cuanto a la frecuencia de células NKT tanto en el tumor primario como en la mucosa gástrica adyacente al tumor, los resultados mostraron una tendencia a un mayor porcentaje de estas células en la mucosa comparado al tumor (Figura 6). Además, tampoco se pudo observar diferencias significativas en cuanto a la producción de citoquinas por las células NKT presentes en ambos tejidos gástricos (Figuras 13 y 14), aunque se haya encontrado una tendencia a la presencia de mayores niveles de IL-10 y TGF- $\beta$  en la mucosa que en el tumor (Figuras 13 y 14). Dado que los pacientes con cáncer gástrico avanzado presentan gastritis crónica en la mucosa gástrica (Ishihara, 2004), es posible que, al momento de obtener las muestras de este tejido, un mayor número de células NKT en el microambiente de la mucosa estuviera participando de una respuesta inmunosupresora con el objetivo de mantener la homeostasis tisular. Además, es posible que el análisis tanto de la frecuencia como de la producción de citoquinas por células NKT derivadas de tejidos gástricos de más pacientes con cáncer gástrico promueva datos más concretos relacionados a los parámetros aquí evaluados.

## 7. CONCLUSIONES

1. Los pacientes con adenocarcinoma gástrico presentan una mayor cantidad de células NKT en la sangre periférica que individuos sanos.
2. Los pacientes con adenocarcinoma gástrico poseen mayor frecuencia de células NKT productoras de IL-10, lo cual favorecería una respuesta inmunosuprimida en estos pacientes, lo que contribuiría a la progresión del tumor.
3. Los pacientes con adenocarcinoma gástrico presentan un menor porcentaje de células NKT periféricas productoras de IFN- $\gamma$ , lo que podría estar comprometiendo el desarrollo de una respuesta inmune efectiva contra el cáncer gástrico.
4. En el tejido adyacente al tumor existe una tendencia a un mayor número de células NKT que en el tumor primario, generando un microambiente inmunosupresor, lo que repercutiría en una mayor expansión tumoral.
5. El tamaño del tumor posee una correlación con la producción de IL-10 por parte de las células NKT en el microambiente tumoral en pacientes con cáncer gástrico, lo cual quiere decir que a pesar de que existen escasas células infiltrando este tejido, la producción de IL-10 por estas células es mayor en tumores más grandes.
6. Las células NKT de la periferia mostraron una asociación negativa para IFN- $\gamma$  y positiva para TGF- $\beta$  con respecto al tamaño tumoral, lo que determinaría una respuesta efectora comprometida en la periferia.

7. Líneas celulares de adenocarcinoma gástrico no expresan CD1d, por lo que las células NKT presentes en el microambiente tumoral podrían activarse a través de otras células presentadoras de antígenos que sí expresarían esta molécula.

8. Células derivadas del tumor y la mucosa gástrica de pacientes expresan CD1d en su membrana celular. La identificación de las células presentes en ambos tejidos gástricos que expresan esta molécula es actualmente objetivo de nuestra investigación.

## 8. LITERATURA CITADA

**Adachi, Y., Oshiro, T., Mori, M., Maehara, Y., Sugimachi, K.** 1997. Tumor size as a simple prognostic indicator for gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol* 4, 137-140.

**Arteaga, C., Hurd, S., Winnier, A., Johnson, M, Fendly, B, Forbes, J.** 1993. Anti transforming growth factor (TGF)-beta antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. Implications for a possible role of tumor cell/host TGF-beta interactions in human breast cancer progression. *J Clin Invest* 92, 2569-76.

**Balato, A., Unutmaz D., Gaspari, A.** 2009. Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *The Journal of investigative dermatology* 129, 1628-42.

**Balk, S. P., Burke, J. E., Polischuk, M. E., Frantz, L., Yang, S., Porcelli, S. P., Colgan, R. S. Blumberg.** 1994. Beta 2-microglobulin-independent MHC class Ib molecule expressed by human intestinal epithelium. *Science* 265, 259-262.

**Batuwangala, T., Shepherd, D., Gadola, SD., Gibson, KJ., Zaccai, NR., Fersht, AR., Besra, GS., Cerundolo, V., Jones, EY.** 2004. The crystal structure of human CD1b with a bound bacterial glycolipid. *J. Immunol* 172, 2382-2388.

**Bendelac, A., Savage, P., Teyton, L.** 2007. The biology of NKT cells, *Annual Review of Immunology* 25, 297-336.

**Berzins, S. P., M. J. Smyth, and A. G. Baxter.** 2011. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease, *Nature Reviews Immunology* 11, 131-142

**Blair, G.E., G.P. Cook.** 2008. Cancer and the immune system: an overview. *Oncogene* 27, 5868.

**Boes, M., Stoppelenburg, AJ., Sille, FC.** 2009. Endosomal processing for antigen presentation mediated by CD1 and Class I major histocompatibility complex: roads to display or destruction. *Immunology* 127, 163-170.

**Brutkiewicz, RR., Bemmink, JR., Yewdell, JW., Bendelac, A.** 1995. TAP-independent, beta 2-microglobulin-dependent surface expression of functional mouse CD1.1. *J Exp Med* 182, 1913-1919.

**Calabi, F., J. M. Jarvis, L. Martin, C. Milstein.** 1989. Two classes of CD1 genes. *Eur. J. Immunol* 19, 285.

**Caligiuri, MA.** 2008. Human natural killer cells. *Blood* 112, 461-469.

**Cheng, TY., Relloso, M., Van Rhijn, I., Young, DC., Besra, GS., Briken, V., Zajonc, DM., Wilson, IA., Porcelli, S., Moody, DB.** 2006. Role of lipid trimming and CD1 groove size in cellular antigen presentation. *EMBO J* 25, 2989-2999.

**Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Caligiuri, M. A.** 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in immunology* 22, 633–640.

**Correa, P.** 1992. Human Gastric Carcinogenesis : A Multistep and Multifactorial Process — First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention Human Gastric Carcinogenesis : A Multistep and Multifactorial Process First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology, *CANCER RESEARCH* 52, 6735–6740.

**de Visser, KE., Coussens, LM.** 2006, The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer. *Contributions to Microbiology* 13, 118-137.

**Dhodapkar, M. V.** 2009. Harnessing human CD1d restricted T cells for tumor immunity: progress and challenges. *Front Biosci* 14, 796-807.

**Douglas Hanahan, R. A. W.** 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57-70.

**Dunn, GP., Old, LJ., Schreiber, RD.** 2004. The three es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22, 329-360.

**Egawa, T., Eberl, G., Taniuchi, I., Benlagha, K., Geissmann, F., Hennighausen, L., Bendelac, A., Littman, DR.** 2005. Genetic evidence supporting selection of the Valpha14i NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors. *Immunity* 22, 705–716.

**Exley, M. A., Koziel, M. J.** 2004, To be or not to be NKT: natural killer T cells in the liver. *Hepatology* 40, 1033-1040.

**Fowlkes, B.J., A.M. Kruisbeek, H. Ton-That, M.A. Weston, J.E. Coligan, R.H. Schwartz, D.M. Pardoll.** 1987. A novel population of T-cell receptor alpha betabearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. *Nature* 329, 251-254.

**Fujii, S. I., Shimizu, K., Smith, C., Bonifaz, L., Steinman, R. M.** 2003. Activation of natural killer T cells by  $\alpha$ -galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a

coadministered protein. *Journal of Experimental Medicine* 198 (2), 267–279.

**Gasser, S., Raulet, D. H.** 2006, Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunological Reviews* 214, 130–142.

**Germanov, E., Veinotte, L., Cullen, R., Chamberlain, E., Butcher, E. C., Johnston, B.** 2008 Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in homeostasis and activation of CD1d-restricted NKT cells. *J. Immunol* 181, 81-91.

**Giaccone, G., Punt, C. J. a, Ando, Y., Ruijter, R., Nishi, N., Peters, M., Von Blomberg, B. M. E., Scheper Rik J., van der Vliet, Hans J. J., van den Eertwegh, Alfons J. M., Roelvink, Marja., Beijnen, Jos., Zwierzina, Heinz, Pinedo, Herbert M.** 2002. A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clinical cancer* 8, 3702.

**Gobbi, P. G., Villano, L., Pozzoli, D., Bergonzi, M., Vanoli, A., Tava, F., Dionigi, P., Corazza, G. R.** 2011. Improving the AJCC/TNM Classification for Use in Early Gastric Cancer. *J Gastrointest Surg* 15, 935-941.

**Godfrey, DI., MacDonald, H. R., Kronenberg, M., Smyth, M.J., Van Kaer, L.** 2004. NKT cells: What's in a name? *Nat Rev Immunol* 4, 231-237.

**Goldsby, R.A., Kuby, J.** 2005. *Inmunología* Mc Graw Hill. 172, 7350.

**Hayakawa, Y., Rovero, S., Forni, G., Smyth, M. J.** 2003.  $\alpha$ -galactosylceramide (KRN7000) suppression of chemical- and oncogene-dependent carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (16), 9464–9469.

**Hong, C., Lee, H., Park, Y.-K., Shin, J., Jung, S., Kim, H., Hong, S., Park, S.** 2009. Regulation of secondary antigen-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses by natural killer T cells, *Cancer Research* 69, 4301–4308.

**Hong, D. S., Angelo, L. S., & Kurzrock, R.** 2007. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. *Cancer* 110, 1911–28

**Ishihara, S., Rumi, M.A., Kadowaki, Y., Ortega-Cava, C.F., Yuki, T., Yoshino, N., Miyaoka, Y., Kazumori, H., Ishimura, N., Amano, Y., Kinoshita, Y.** 2004. Essential role of MD-2 in TLR4-dependent signaling during *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *J Immunol* 173 (2), 1406-16.

**Jiménez, D. F. P., Estévez, P. M. P.** 1998. Instituto de Gastroenterología CÁNCER GÁSTRICO : FACTORES DE RIESGO. *Rev Cubana de Onco* 14, 171–179.

**Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E.** 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science*, 278:1626-1629.

**Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Sato, H., Kondo, E., Harada, M., Koseki, H., Nakayama, T.** 1998. Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5690–5693.

**Kitamura, K. Iwakabe, T. Yahata.** 1999. The natural killer T (NKT) cell ligand  $\alpha$ -galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *Journal of Experimental Medicine*, 189 (7), 1121–1128.

**Konek, J. J. O., Illarionov, P., Khursigara, D. S., Ambrosino, E., Izhak, L., Ii, B. F. C., Raju, R.** 2011. Mouse and human iNKT cell agonist  $\beta$ -mannosylceramide reveals a distinct mechanism of tumor immunity. *Journal of Clinical Investigation* 12, 683–694.

**Konishi, J., Yamazaki, K., Yokouchi, H., Shinagawa, N., Iwabuchi, K., Nishimura, M.** 2004. The characteristics of human NKT cells in lung cancer—CD1d independent cytotoxicity against lung cancer cells by NKT cells and decreased human NKT cell response in lung cancer patients. *Hum Immunol* 65 (11), 1377-1388.

**Kuylensstierna, C., Björkström, N. K., Andersson, S. K., Sahlström, P., Bosnjak, L., Paquin-Proulx, D., Malmberg, K.-J., et al.** 2011. NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d. *European journal of immunology* 41(7), 1913–1923.

**Lanier, LL., Le, A.M., Civin, CI., Loken, M.R., Phillips, J.H.** 1986. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 136(12), 4480-6.

**Lauren, P.** 1965. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so called intestinal-type carcinoma: an attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 64, 31-49.

**Lehuen, A., Lantz, O., Beaudoin, L., Laloux, V., Carnaud, C., Bendelac, A., Bach, J.F.,**

- Monteiro, R.C.** 1998. Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J. Exp. Med* 188, 1831–1839.
- Martin, L. H., Calabi, F., Lefebvre, F. A., Bilslund, C. A., Milstein, C.** 1987. Structure and expression of the human thymocyte antigens CD1a, CD1b, and CD1c. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, 9189-9193.
- Matsuda, M., Salazar, F., Petersson, M., Masucci, G., Hansson, J., Pisa, P., Zhang, Q.J., Masucci, M.G., Kiessling, R.** 1994. Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Med* 180, 2371-2376.
- Matsuda, JL., Gapin, L., Baron, JL., Sidobre, S., Stetson, DB., Mohrs, M., Locksley, RM., Kronenberg, M.** 2003. Mouse V alpha 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 8395–400.
- Mattner, J, Debord, K.L., Ismail, N., Goff, R.D., Cantu, C., Zhou, D., Saint-Mezard, P., Wang, V., Gao, Y., Yin, N., et al.** 2005. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 434, 525-529.
- Metelitsa, L. S., Weinberg, K. I., Emanuel, P. D., Seeger, R. C.** 2003. Expression of CD1d by myelomonocytic leukemias provides a target for cytotoxic NKT cells, *Leukemia* 17, 1068–1077.
- MINISTERIO DE SALUD.** 2006. Guía Clínica Cáncer Gástrico. SERIE GUÍAS CLÍNICAS MINSAL N°35.Santiago:Minsal,  
[http://www.redsalud.gov.cl/archivos/guiasges/Guia\\_GES\\_sobre\\_cancer\\_gastrico20062.pdf](http://www.redsalud.gov.cl/archivos/guiasges/Guia_GES_sobre_cancer_gastrico20062.pdf)
- Molling, J.W., Langius, J.A., Langendijk, J.A., et al.** 2007. Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 25 (7), 862-8.
- Molling, J.W., Kolgen, W., van der Vliet, HJ., Boomsma, M.F., Kruizenga, H., Smorenburg, C.H. et al.** 2005. Peripheral blood IFN-g-secreting Va24+Vb11+ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load. *Int J Cancer* 116, 87–93.
- Morisaki, T., et al.** 1996. Immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta) genes expression in human gastric carcinoma tissues. *J Surg Oncol* 63 (4), 234-239.

- Motoki, K., Nakagawa, R., Nakamura, H., et al.** 1998. Antitumor activities of KRN7000 in liver metastases models. *Annals of Oncology* 9, supplement 2, 80–89.
- Nieda, M., Okai, M., Tazbirkova, A., Lin, H., Yamaura, A., Ide, K., et al.** 2004. Therapeutic activation of V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood* 103, 383-389.
- Park, S. H., Kyin, T., Bendelac, A., Carnaud, C.** 2003. The contribution of NKT cells, NK cells, and other  $\gamma$ -chain-dependent non-T non-B cells to IL-12-mediated rejection of tumors. *J. Immunol* 170, 1197–1201.
- Rad, R., Brenner, L., Krug, A., Volland, P., Mages, J., Lang, R., et al.** 2007. Toll-like receptor-dependent activation of antigen-presenting cells affects adaptive immunity to *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 133, 150–163.
- Renukaradhya, G. J., et al.** 2008. Type I NKT cells protect (and type II NKT cells suppress) the host's innate antitumor immune response to a B-cell lymphoma. *Blood* 111, 5637–5645.
- Ritz, J., et al.** 1988. Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol* 42, 181-211.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M., Hafler, D.A.** 2010. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10, 490-500
- Samuel, S., Hurta, R., Spearman, M., Wright, J., Turley, E. Greenberg, A.** 1993. TGF-beta stimulation of cell locomotion utilizes the hyaluronan receptor RHAMM and hyaluronan. *J. Cell Biol* 123, 749-758.
- Shin, Y., Hong, C., Lee, H., Shin, J. H., Hong, S., Park, S. H.** 2010. NKT cell-dependent regulation of secondary antigen-specific, conventional CD4+ T cell immune responses. *Journal of Immunology* 184 (10), 5589–5594.
- Schneiders, F.L., de Bruin, R.C.G., Santegoets, S.J.A.M., Bonneville, M., Scotet, E., Scheper, R.J., Verheul, H.M.W., de Gruijl, T.D., van der Vliet, H.J.** 2012. Activated iNKT cells promote V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T cell anti-tumor effector functions through the production of TNF- $\alpha$ . *Clinical Immunology* 142, 194-200.
- Seino, K.I., Taniguchi, M.** 2005. Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes. *The Journal of experimental medicine*, 202(12), 1623–1626.

**Seruga, B., Zhang, H., Bernstein, L.J., Tannock, I.F.** 2008. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 887-899.

**Shimaoka, T., Seino, K. I., Kume, N., et al.** 2007. Critical role for CXC chemokine ligand 16 (SR-PSOX) in Th1 response mediated by NKT cells, *Journal of Immunology* 179 (12), 8172–8179.

**Sica, A., Bronte, V.** 2007. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *Journal of Clinical Investigation* 117 (5), 1155–1166.

**Silk J. D., Salio, M., Reddy, B. G., et al.** 2008. Cutting edge: nonglycosidic CD1d lipid ligands activate human and murine invariant NKT cells. *J Immunol* 180 (10), 6452-6.

**Smyth, M. J., Godfrey, D. I.** 2000. NKT cells and tumor immunity— a double-edged sword. *Nature Immunology* 1 (6), 459–460.

**Song, L., Asgharzadeh, S., Salo, J., et al.** 2009. *V* $\alpha$ 24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages. *Journal of Clinical Investigation* 119 (6), 1524–1536.

**Song, L., Ara, T., Wu, H.W., Woo, C.W., Reynolds, C.P., Seeger, R.C., DeClerck, Y.A., Thiele, C.J., Sposto, R., Metelitsa, L.S.** 2007. Oncogene MYCN regulates localization of NKT cells to the site of disease in neuroblastoma. *J. Clin. Invest.* 117, 2702-2712.

**Stetson, D.B., Mohrs, M., Reinhardt, R.L., Baron, J.L., Wang, Z.E., Gapin, L., Kronenberg, M., Locksley, R.M.** 2003. Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J Exp Med* 198, 1069–1076.

**Swann, J.B., Coquet, J.M., Smyth, M.J., Godfrey, D.I.** 2007. CD1-restricted T cells and tumor immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 314, 293–323.

**Tahir, S.M., Cheng, O., Shaulov, A., et al.** 2001. Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer. *J Immunol* 167 (7), 4046-4050.

**Takahashi, T., Haraguchi, K., Chiba, S., Yasukawa, M., Shibata, Y., Hirai, H.** 2003. *V* $\alpha$ 24<sup>+</sup> natural killer T-cell responses against T-acute lymphoblastic leukaemia cells: implications for immunotherapy. *Br J Haematol* 122, 231-239.

- Taniguchi, M., Harada, M., Kojo, S., Nakayama, T., Wakao, H.** 2003. The regulatory role of V $\alpha$ 14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annual Review of Immunology* 21, 483–513.
- Terabe, M., Berzofsky, J. A.** 2008. Chapter 8 the role of NKT cells in tumor immunity. *Advances in Cancer Research* 101, 277–348.
- Tesniere, A., et al.** 2008. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ* 15 (1), 3-12.
- Trinchieri, G.** 1989. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47, 187-376.
- Uemura, Y., Liu, T. Y., Narita Y., et al.** 2009. Cytokine-dependent modification of IL-12p70 and IL-23 balance in dendritic cells by ligand activation of V $\alpha$ 24 invariant NKT cells. *Journal of Immunology* 183 (1), 201–208.
- van den Heuvel, M.J., Garg, N., van Kaer, L., Haeryfar, S.M.** 2011. NKT cell costimulation: experimental progress and therapeutic promise. *Trends Mol. Med* 17, 65–77.
- Videbaek, A., Mosbech, J.** 1954. The aetiology of gastric carcinoma elucidated by a study of 302 pedigrees. *Acta Med Scand* 149 (2), 137–159.
- Wu, L., Van Kaer, L.** 2009. Natural killer T cells and autoimmune disease. *Curr Mol Med* 9 (1), 4-14.
- Wu, D. Y., Segal, N. H., Sidobre, S., Kronenberg, M., Chapman, P. B.** 2003. Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *J. Exp. Med.* 198, 173–181.
- Yanagisawa, K., Seino, K., Ishikawa, Y., Nozue, M., Todoroki, T., Fukao, K.** 2002. Impaired Proliferative Response of V $\alpha$ 24 NKT Cells from Cancer Patients Against  $\alpha$ -Galactosylceramide. *J. Immunol* 168 , 6494-6499.
- Yang, F., Jove, V., Xin, H., Hedvat, M., Van Meter, T.E., Yu, H.** 2010. Sunitinib induces apoptosis and growth arrest of medulloblastoma tumour cells by inhibiting STAT3 and AKT signalling pathways. *Mol Cancer Res* 8, 35–45.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1. Consentimiento informado para pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico.

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

Investigador principal: Dra. Carolina Hager Ribeiro

Institución: Universidad de Chile

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

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

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

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

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

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

Además, se le pedirá una **muestra de sangre** equivalente a una cucharadita de té, lo que tampoco presenta riesgos para Ud., salvo en algunos casos un pequeño moretón, dolor y rara vez infección.

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

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

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

#### **Confidencialidad**

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

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

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

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

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

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

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

Investigador responsable: **Dra. Carolina Hager Ribeiro**

Teléfono: (2) 978-6088

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

Teléfono: (2) 269-9278

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

**Dr. Manuel Oyarzún**

Departamento de Bioética y Humanidades Médicas

Facultad de Medicina - Universidad de Chile

Teléfono: (2) 274-1560

**Dr. Andrés Stuardo**

Centro de Bioética del S.S.M. Oriente

Teléfono: (2) 575-3735

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

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

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

## Anexo 2. Consentimiento informado para voluntarios sanos mayores de 40 años.

### 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. Acta de aprobación del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile



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



1/2

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

Con fecha 07 de julio de 2011, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente  
Sra. Marianne Gaudlitz H., Enfermera, Mg. Humanidades, Vicepresidente  
Dr. Hugo Amigo C., Ph. D., Especialista en Salud Pública  
Dr. Leandro Biagini A., Médico Internista  
Dra. Lucía Cifuentes O., Médico Genetista  
Sra. Nina Horwitz C., Sociólogo, Mg. Bioética  
Dra. María Eugenia Pinto C., Médico Infectólogo  
Sra. Claudia Marshall F., Representante de la comunidad

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **"Uniendo la inmunidad innata y adaptativa: rol de las células NKT y linfocitos T reguladores en la inmunoregulación de la respuesta inmune contra el cáncer gástrico"** y cuyo investigador responsable es la **Dra. Carolina Hager**, quien desempeña funciones en el **Laboratorio de Inmunovigilancia y Evasión Inmune, Programa Disciplinario de Inmunología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.**

*El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:*

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

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

**Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: [ceiha@med.uchile.cl](mailto:ceiha@med.uchile.cl)**



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

2/2

08 JUL. 2011



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

- a) Carácter de la población estudiada: Población no cautiva, investigación no terapéutica.
- b) Utilidad del Proyecto: Estudio de los factores que permiten a la células de Cáncer Gástrico, eludir la vigilancia inmunológica.
- c) Riesgos y Beneficios: Riesgos mínimos, ya que , los investigadores trabajarán en muestras de Cáncer Gástrico obtenidas en la intervención quirúrgica realizada en razón de la patología, y con muestras de sangre periférica.
- d) Protección de los participantes: Existe un formulario de Consentimiento Informado bien redactado para pacientes y para donantes de muestra de sangre sin Cáncer Gástrico.
- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: no aplica.
- f) La investigadora responsable se ha comprometido a entregar los resultados del estudio a este Comité al finalizar el proyecto.

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

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión corregida del 05 de julio de 2011, que se adjunta firmado, fechado y timbrado por el CEISH.

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

Santiago, 07 de julio de 2011.

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

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

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

CONSENTIMIENTO INFORMADO

08 JUL. 2011



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

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. Carolina Hager Ribeiro

INSTITUCIÓN: Universidad de Chile

TELÉFONO: (2) 978-6088

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

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

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

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

Este estudio se hará con un número total de 30 pacientes del Hospital Salvador, Santiago, Chile. Si Ud. acepta participar en este estudio, se le pedirá que acepte donar una pequeña muestra del tumor, del tamaño de una tableta de paracetamol obtenida en la biopsia u operación. El procedimiento no tendrá más riesgos para Ud. que la cirugía misma.

Además, se le pedirá una muestra de sangre equivalente a una cucharadita de té, lo que tampoco presenta riesgos para Ud., salvo en algunos casos un pequeño moretón, dolor y rara vez infección.

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

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

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

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

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

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

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

08 JUL. 2011



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

**Investigador responsable:** Dra. Carolina Hager Ribeiro

**Teléfono:** (2) 978-6088

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

**Teléfono:** (2) 269-9278

Este documento resume lo que los médicos me explicaron anteriormente, resolviendo todas mis dudas, y teniendo yo conocimiento de todos los procedimientos que me serán realizados

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

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

## CONSENTIMIENTO INFORMADO



08 JUL. 2011

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

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. Carolina Hager Ribeiro

INSTITUCIÓN: Universidad de Chile

TELÉFONO: (2) 978-6088

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Investigador responsable:** Dra. Carolina Hager Ribeiro

**Teléfono:** (2) 978-6088

