



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**INMUNO-MONITOREO DEL COMPONENTE DE
CELULAS PRESENTADORAS DE ANTIGENO (APC) Y
CÉLULAS T EN DISTINTOS ESTADIOS DEL
DESARROLLO DE CÁNCER GÁSTRICO DE TIPO
INTESTINAL**

Anamaría Morales Álvarez

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, CIENCIAS FISIOLÓGICAS
MAESTRIA EN BIOQUIMICA
Bogotá D.C., Colombia
2016**

**INMUNO-MONITOREO DEL COMPONENTE DE
CELULAS PRESENTADORAS DE ANTIGENO (APC) Y
CÉLULAS T EN DISTINTOS ESTADIOS DEL
DESARROLLO DE CÁNCER GÁSTRICO DE TIPO
INTESTINAL**

**Presentado por:
Anamaría Morales Álvarez
Bióloga**

**Tesis para optar al título de
Magister en Bioquímica**

**Dirigido por:
Carlos A. Parra-López M.D., Ph.D.
Grupo de Investigación:
Inmunología y Medicina Traslacional**

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, CIENCIAS FISIOLÓGICAS
MAESTRIA EN BIOQUIMICA
Bogotá D.C., Colombia
2016**

“Progress is made by trial and failure; the failures are generally a hundred times more numerous than the successes; yet they are usually left unchronicled.”

William Ramsay

AGRADECIMIENTOS

Hay veces en la vida que eres exitoso porque has ido aprendiendo las cosas a tu modo, pero también hay otras veces en que simplemente hay personas que dejan un buen recuerdo de enseñanza en ella, gracias a todos aquellos que dejaron un pedacito de sus vidas en este sueño.

Primero, al par de Ángeles que tengo en el cielo. Mis abuelos contribuyeron en gran medida a que lograra ser como soy, me permitieron tener una niñez muy muy feliz y me exigieron lo suficiente como para entender que la responsabilidad es lo más importante. Gracias por tanto amor sobre todo cuando la vida se empeñaba en hacernos entender que luchando contra las adversidades es como se consiguen las cosas.

Gracias Mamá y Papá por todo el amor, por impulsarme siempre a ser mejor, por exigirme y corregirme... por creer en mí y tener siempre una palabra dulce de aliento cuando quería rendirme, gracias por enseñarme a valorar todas esas cosas que no se compran con dinero. Gracias Piti... mi hermano no solo de sangre sino de alma, por simplemente ser... por el abrazo y la patanería siempre que necesitaba desahogarme, por enseñarme a hacer las cosas con el corazón... la vida a veces es difícil, pero sé que al caminarla contigo los retos son más livianos. Ustedes tres son las personas más especiales en mi vida, los quiero muchísimo.

¡A mis Tíos, Primos y toda mi familia... GRACIAS!!... una palabra muy chiquita que decir para todo el agradecimiento que les tengo a todos ustedes. Gracias por creer en mí, por ayudarme y apoyarme una y otra y otra vez. El vacío que deja el abuelo es inmenso, pero me deja el regalo más grande del mundo y son ustedes... ahora es nuestra tarea conservar ese regalo y permanecer unidos, y construir unidos.

Felipe...Gracias por la confrontación, el debate, el apoyo y tanto tanto amor, ¡Eres un guerrero! fuiste y eres el impulso para no dejarme vencer y la sonrisa reconfortante que me hacía sentir que no estaba sola... IS WHAT YOU DON`T DO! Te quiero!

“Didn't make sense not to live for fun... Your brain gets Smart, but your head gets dumb”... A mis amigos y compañeros de laboratorio... David, gracias por el aguante y la paciencia, gracias por ser guía y confidente tantas veces, este trabajo sería muy diferente sin tu apoyo! Gracias a, Aleja, a la Dotora y a Dinais, por permitirme desahogarme con ustedes, por siempre tener el consejo y escuchar mil veces mis chincheras, gracias por cada una de las sonrisas y las voces de aliento en el laboratorio. A todos los compañeros y estudiantes que nos acompañaron un par de meses... gracias chicos por ayudar a alivianar las tareas del lab... y llegar llenos de ideas y entusiasmo para dar un aire fresco a nuestra cotidianidad. ¡Gracias David Julián, por la compañía y el apoyo... no solo para las IHQ... también en los días de aburrimiento y desasosiego... disfrute enormemente tomar Té y comer tacos con usted!

Gracias al apoyo del Hospital el Tunal, especialmente al doctor Martin Gomes, el doctor Rene Burgos, el doctor Néstor Suarez, por sacar tiempo de sus ocupaciones y permitirme obtener las muestras de los pacientes, gracias por creer en este proyecto y darme el apoyo y el consentimiento para trabajar con ustedes.

Muchas gracias al doctor Yobani Sánchez, y todo el laboratorio de patología, por permitirme trabajar en su laboratorio, por ayudarme y enseñarme a entender la enfermedad. Muchas gracias a Lucia Botero por dedicarme el tiempo para aprender a realizar la tinción de IHQ.

A los profesores de la Maestría, especialmente al Prof. Carlos Guerrero y el Prof. Luis Alberto Gómez, por hacerme sufrir en los seminarios, y enseñarme el método de la investigación, por inculcar el pensamiento crítico frente al planteamiento de proyectos y el acercamiento a la metodología científica.

Muchas gracias las entidades co-financiadoras de distintos proyectos que hicieron posible el desarrollo de mi trabajo de tesis, a Colciencias por apoyarme dentro de la convocatoria de Jóvenes Investigadores, a la Universidad Nacional y en especial a la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional por la co-financiación de los proyectos HERMES: Códigos: 33290; 33317; 32181; 22944; 21275; 19058; 18458; 14976; 11748, y a la Fundación Salud de los Andes por permitir incluir mi trabajo de tesis como parte de los proyectos desarrollados en el marco del proyecto TEBICA.

Finalmente, gracias al Doctor Carlos Parra, mi director de tesis, por creer en mí y darme la oportunidad de crecer como científica, mil gracias por la paciencia y el tiempo dedicado para mi formación. Sus conocimientos y orientaciones contribuyeron en gran parte a mi formación como investigadora. Gracias por inculcar la responsabilidad, la seriedad y el rigor académico, quedo profundamente agradecida con usted y su forma de trabajar tiene toda mi admiración.

ABREVIATURAS

aDCs	Células dendríticas alpha
APC	Célula presentadora de antígeno
CG	Cáncer Gástrico
CF	Citometría de flujo
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DCs	Células dendríticas
DMSO	Dimetil sulfóxido
EVDA	Endoscopia vías digestivas altas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Foxp3	Factor de transcripción Forkhead box P3
GM-CSF	Factor estimulante de colonia granulocito macrófago
GrB	Granzima B
Hp(2-20)	Cecropin-like H. pylori-derived peptide
IARC	Agencia Internacional para la investigación en cáncer
IFN- γ	Interferón gamma
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
LB	Linfocitos B
LT	Linfocitos T
MDSCs	Células mieloides supresoras
MFI	Índice de Fluorescencia Media
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PCA	Análisis de componentes principales
PE	Ficoeritrina
RORc	Receptor gamma huérfano relacionado con RAR
SFB	Suero fetal bovino
TAA	Antígeno asociado a tumor
TAE	Tasas Ajustadas por la Edad
TAM	Macrófagos infiltrantes de Tumor
TCM	Células T de memoria central
TCR	Receptor de células T
TEM	Células T efectoras de memoria
TEMRA	Células T efectoras de memoria terminales
TFh	Células T foliculares
TIL	Linfocitos infiltrantes de tumor
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocito T regulador

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	4
ABREVIATURAS.....	6
TABLA DE CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABLAS.....	12
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	14
PROBLEMA	16
MARCO TEORICO.....	17
Epidemiología del Cáncer Gástrico	17
Cáncer Gástrico en Colombia	18
Clasificación de los Tumores Gástricos	20
Infección <i>H.pylori</i> y Relación Cáncer	22
Inflamación gástrica	23
Modelo de carcinogénesis gástrica	25
Inmuno-monitoreo.....	27
OBJETIVOS.....	28
Objetivo General	28
Objetivos Específicos.....	28
DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS.....	29
Selección de Pacientes	29
Criterios de Inclusión.....	29
Criterios de Exclusión	29
Consecución de Pacientes y Toma de Muestras	30
Procesamiento de Muestras de Sangre	31
Análisis de Células en Sangre Periférica.....	31
1. Caracterización de Distintas Sub-poblaciones de Leucocitos <i>ex vivo</i>	34
2. Ensayo Activación de Linfocitos T <i>ex vivo</i>	36
3. Evaluación de la Maduración de Células Dendríticas <i>ex vivo</i>	37
Fluorescencia menos uno.....	37
Análisis de Inmunohistoquímica biopsias gástricas	38
Generación de la Plantilla de análisis—Software CellProfiler	40

Análisis Estadístico y Multivariado	42
INMUNO-MONITOREO POR CITOMETRIA DE FLUJO DE APCs y LINFOCITOS T PRESENTES EN PBMCs DE PACIENTES CON LESIONES BENIGNAS Y MALIGNAS DE LA MUCOSA GASTRICA (Análisis Manual)	43
Racional	43
INMUNO-MONITOREO DE APCs	44
Estado del arte	44
Monocitos CD14/CD16	44
Células Supresoras de origen Mieloide (MDSCs)	45
Células Dendríticas (DCs)	46
Resultados	48
Evaluación Monocitos CD14/CD16	48
Evaluación Células Mieloides Supresoras (MDSCs)	50
Evaluación Subpoblaciones DCs	51
Evaluación de la respuesta de DCs a estímulos de Maduración	52
Correlación entre infiltrado de CD33 en Mucosa Gástrica vs. niveles pnm-MDSCs en sangre	55
INMUNO-MONITOREO DE LINFOCITOS	57
Estado del arte	57
Resultados	58
Relación entre linfocitos CD4/CD8	58
Análisis subpoblaciones de linfocitos ayudadores CD4+	59
Activación Linfocitos T	63
Correlación entre infiltrado de Linfocitos en Mucosa Gástrica vs. niveles en sangre	65
ANALISIS MULTIDIMENSIONAL COMPUTACIONALMENTE EFICIENTE DE CITOMETRIA DE FLUJO COMPLEJA	68
Racional	68
Resultados	69
Generación de la estrategia de análisis multidimensional	69
Análisis de componentes principales (PCA)	70
Análisis por SPADE	73
Análisis por CITRUS	79
DISCUSIÓN	84
Monitoreo APC y Linfocitos	84
Correlación entre PBMCs e infiltrado en Mucosa Gástrica	88

Evaluación Multidimensional	88
CONCLUSIONES	91
CONSIDERACIONES ÉTICAS	92
Confidencialidad.....	93
CONDICIONES DE BIOSEGURIDAD Y DECLARACIÓN DE IMPACTO AMBIENTAL DEL PROYECTO	93
BIBLIOGRAFÍA.....	94
ANEXOS	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimación de la tasa de mortalidad y de incidencia de los principales tipos de cáncer.	17
Figura 2. Número de casos nuevos y muertes estimadas de cáncer gástrico a nivel mundial con las proporciones de las principales regiones del mundo para ambos sexos, en el 2012.....	18
Figura 3. Tendencias en la mortalidad por cáncer, principales localizaciones, Colombia 1985-2006.....	18
Figura 4. Distribución del Cáncer Gástrico según las tasas crudas por departamentos de residencia habitual en Colombia entre los años 2000-2009.....	20
Figura 5. Efectos ambiguos de la respuesta a infección en la prevención o desarrollo de cáncer (excluyendo la transformación directa).	24
Figura 6. Cascada de la carcinogénesis gástrica propuesta por Pelayo Correa en 1975..	25
Figura 7. Esquema general obtención de PBMCs y análisis por citometría de flujo.....	31
Figura 8. Esquema de procedimientos y tratamiento de muestras de PBMCs utilizados para monitorear APCs y linfocitos T por citometría de flujo.....	32
Figura 9. Procedimiento de marcación y caracterización de las distintas poblaciones ex vivo a partir de PBMCs de individuos pertenecientes a cada uno de los 5 grupos de individuos estudiados.....	34
Figura 10. Fluorescencia Menos Uno (FMO) para panel de 10 anticuerpos.....	38
Figura 11. Estructura del polímero de Peroxidasa utilizado para la marcación de Inmunohistoquímica..	39
Figura 12. Interfaz “CellProfiler” para la generación de la plantilla de análisis automatizado (Pipeline).	40
Figura 13. Módulos de análisis para la cuantificación positiva de la marcación por inmunohistoquímica de forma automatizada.....	41
Figura 14. Análisis de la población de monocitos (definidos por SSC-A y CD14+) en PBMCs de individuos con diferentes lesiones de la mucosa gástrica..	49
Figura 15. Análisis de las subpoblaciones de monocitos clásicos, intermedios y no clásicos en los diferentes grupos evaluados..	49
Figura 16. Análisis ex vivo de tres poblaciones de MDSCs en PBMCs de individuos de los 5 estadios de carcinogénesis gástrica estudiados.....	50
Figura 17. Esquema de la evaluación y cuantificación ex vivo de tres subpoblaciones de células dendríticas (DCs) en PBMCs de individuos sanos y con lesiones asociados al desarrollo del cáncer gástrico..	51
Figura 18. Evaluación de las sub-poblaciones de células dendríticas Inmaduras, Mieloides y Plasmacitoides en PBMCs de individuos en los cinco grupos estudiados.....	52
Figura 19. Evaluación del grado de maduración de DCs derivadas in situ a partir de monocitos y DCs primarias totales presentes en PBMCs de individuos en distintos estadios de la carcinogénesis gástrica..	54
Figura 20. Cuantificación de la secreción de citoquinas presentes en sobrenadante de cultivos de PBMCs de individuos (n=5) de los cinco estadios analizados tratados con GM-CSF e IL-4 +/- y el coctel de maduración α DC..	55

Figura 21. Cuantificación y correlación de infiltrado CD33+ en mucosa gástrica en individuos (n=3) de tres grupos de patología de la mucosa gástrica..	56
Figura 22. Evaluación de las poblaciones de linfocitos ayudadores CD4+ y CD8+ y relación CD4+/CD8+ en individuos sanos y con lesiones benignas y malignas de la mucosa gástrica.....	59
Figura 23. Esquema de la evaluación y cuantificación de los linfocitos T reguladores (Treg) en los diferentes estadios de la carcinogénesis gástrica.	60
Figura 24 Evaluación, cuantificación y análisis de los linfocitos Th17 en los individuos (n=5) en diferentes estadios de la carcinogénesis gástrica.....	61
Figura 25. Esquema de identificación y cuantificación de la subpoblación de células Tfh en los diferentes estadios de la carcinogénesis gástrica.....	62
Figura 26. Evaluación de la internalización del TCR en linfocitos T totales de individuos sanos y con diferentes tipos de lesión de la mucosa gástrica..	64
Figura 27. Caracterización fenotípica de la activación de los linfocitos T de individuos en diferentes estadios de la carcinogénesis gástrica en respuesta a un estímulo con perlas anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2.....	65
Figura 28. Porcentaje de infiltración de cinco poblaciones de linfocitos en la mucosa gástrica para tres grupos evaluados de la carcinogénesis.....	66
Figura 29. Correlación de las poblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ en sangre periférica y mucosa gástrica en individuos sanos y con lesiones benignas y malignas de la mucosa gástrica	66
Figura 30. Modelo esquemático del análisis multivariado a partir de los datos de citometría..	69
Figura 31. Evaluación extracción de factores iniciales.....	72
Figura 32. Gráfico de componentes y distribución de pacientes en el espacio rotado.	73
Figura 33. Plataforma de SPADE en el “software” MATLAB.	75
Figura 34. Mapa de calor y análisis por HCL a partir de los datos de obtenidos en SPADE.....	76
Figura 35. Identificación de las principales poblaciones de linfocitos a partir de la expresión de los marcadores específicos..	77
Figura 36. Proporción de cambio en la expresión de los marcadores IL-17, BTLA y CTLA-4 en cuatro grupos de la carcinogénesis gástrica en comparación con los donantes Sanos.....	78
Figura 37. Clústeres identificados por CITRUS que permiten diferenciar entre las tres patologías analizadas.....	80
Figura 38. Caracterización de los clústeres que permiten diferenciar los tres estadios evaluados..	81
Figura 39. Validación del modelo predictivo a través del análisis de la Tasa de error. En rojo, la tasa de error estimada del modelo y en azul la tasa de descubrimientos falsos..	82

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Relacion entre el tipo de cáncer y el agente infeccioso clasificado como cancerígeno en humanos.....	22
Tabla 2. Características de los pacientes con patología de la mucosa gástrica.	30
Tabla 3. Listado de cada uno de los paneles de citometría utilizados para el inmuno-monitoreo	33
Tabla 4. Revisión de estudios en los que se ha analizado el desempeño de las células MDSCs en la etiología del cáncer gástrico.....	45
Tabla 5. Comunalidades obtenidas para cada una de las variables, una vez realizada la extracción.....	72

RESUMEN

El cáncer gástrico es la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial, anualmente 989,600 casos nuevos son diagnosticados, pacientes que tienen una sobrevivida a cinco años menor al 5%. En Colombia, es la primera causa de muerte en hombres en etapa laboral con una letalidad es del 42,37% y una incidencia de 17 a 48 casos por cada 100.000 habitantes. Dentro de los principales factores de riesgo a padecer esta enfermedad está la infección con *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), bacteria que infecta a más del 90% de la población, e inicia una inflamación crónica asociada con un proceso de carcinogénesis gástrica de tipo intestinal.

El sistema inmune mediante el proceso de inmuno-vigilancia tiene la capacidad de reconocer y eliminar diferentes tipos de tumor en sus etapas iniciales, sin embargo, los tumores tienen la capacidad de evadir la inmuno-vigilancia por diferentes mecanismos de inmuno-supresión. Aunque en el cáncer gástrico distintos estudios han tratado de establecer la identidad de las células del sistema inmune responsables de: la vigilancia, la inflamación crónica y la supresión, aún se desconoce si cambios cuantitativos de células que modulan la respuesta inmune y/o si alteraciones de la inmuno-competencia de Linfocitos T y células APC pueden ser detectados en sangre en etapas tempranas del desarrollo de este tumor y si el monitoreo de estos componentes en fases previas a la aparición del tumor es útil para identificar biomarcadores que brinden nuevas oportunidades de manejo y tratamiento a los pacientes con cáncer gástrico.

En este proyecto, se realizó el inmuno-monitoreo de marcadores celulares y moleculares de respuesta inmune en PBMCs de un grupo de individuos con lesiones benignas y malignas de la mucosa gástrica, clásicamente asociadas a la epidemiología del desarrollo del cáncer gástrico. Los pacientes analizados en este estudio de acuerdo a su patología gástrica fueron clasificados en 4 grupos: (i) gastritis crónica, (ii) metaplasia intestinal, (iii) cáncer gástrico *in-situ* y (iv) cáncer avanzado, con el fin de determinar por citometría de flujo, la cantidad e inmuno-fenotipo de diferentes poblaciones supresoras y pro-inflamatorias de linfocitos T y APCs, así como la respuesta de ambos componentes frente a estímulos *in-vitro* que pudiesen estar asociados al estadio de la lesión gástrica. Finalmente, en un estudio piloto, los resultados registrados en sangre por citometría de flujo se correlacionaron con el fenotipo de células del infiltrado de las distintas lesiones *in situ* con el fin de tratar de validar algunos de los resultados observados.

Los resultados encontrados muestran un cambio en la respuesta inmune en los individuos con metaplasia los cuales señalan a este estadio como un punto de inflexión de la progresión de la enfermedad de estadios benignos reversibles a neoplasia y cáncer gástrico en el cual marcadores de inmuno-vigilancia y supresión de la respuesta inmune son simultáneamente detectados. Por su parte, el análisis multidimensional de los datos de citometría de flujo multicolor nos permitió identificar una población celular con un fenotipo no descrito hasta ahora de linfocitos T CD8+ productores de IL-17 (Tc17) que expresa los receptores inhibitorios PD1, CTLA-4 y BTLA, característica de individuos sanos que permite diferenciarlos de individuos con patología benigna (gastritis y metaplasia) o con cáncer gástrico.

INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico es el cuarto cáncer más frecuente a nivel mundial y aunque su incidencia ha disminuido gracias a la implementación de estrategias de prevención y diagnóstico temprano, en Colombia es responsable del 43.37% de defunciones relacionadas con cáncer, siendo la primera causa de muerte en hombres en etapa laboral; con una supervivencia a 5 años menor del 29%; razón por la cual es considerado un problema de salud pública con un alto impacto económico y social (1, 2).

Por lo general, en los estadios iniciales, el cáncer gástrico es un tumor que no presenta síntomas característicos lo cual impide su identificación temprana y hace que más del 85% de los casos se detecten tardíamente. El cáncer gástrico de tipo intestinal (90% del total de cánceres gástricos diagnosticados) se desarrolla a partir de una gastritis crónica (patología benigna) cuya progresión puede dar inicio a un proceso de carcinogénesis gástrica, descrito originalmente por Correa en 1975, quien por primera vez atribuyó el desarrollo del cáncer gástrico a estados histopatológicos progresivos de la mucosa gástrica que comprenden: gastritis crónica superficial, atrofia gástrica, metaplasia intestinal, displasia, cáncer temprano localizado en la mucosa y sub-mucosa y avanzado cuando sobrepasa la mucosa y exhibe compromiso ganglionar (3).

Una de las principales causas del desarrollo de esta carcinogénesis es la infección por *Helicobacter pylori*, que modula la respuesta inmunológica mediante mecanismos directos (proteínas VacA y CagA consideradas "oncoproteínas" de la bacteria) e indirectos (inflamación crónica exacerbada en respuesta a la infección (4)). Si bien el sistema inmune reconoce la infección por *H. pylori* (5-9) etiológicamente relacionada con la carcinogénesis de la mucosa gástrica, el rol de componentes celulares y moleculares del sistema inmune en la etiología o la protección al desarrollo del carcinoma gástrico no son bien conocidos.

Por su parte, existe numerosa evidencia en favor de la capacidad del sistema inmune para controlar los tumores en su fase temprana y a su vez hoy se sabe que el escape de los tumores a la inmuno-vigilancia – atribuible a la selección de variantes del tumor y a la inmunosupresión inducida por el microambiente tumoral- son causas determinantes del desarrollo tumoral (10, 11). Defectos en el procesamiento antigénico (12), anergia de linfocitos T, eliminación de células T citotóxicas específicas de tumor (13) y reclutamiento al microambiente tumoral de poblaciones de células reguladoras/inhibitorias (14, 15) están entre los mecanismos mejor conocidos de evasión de la respuesta inmune de una amplia gama de tumores distintos al carcinoma gástrico en el cual estos aspectos han sido incipientemente evaluados.

Si bien se han realizado diversos estudios en los que se evalúa el papel que pueden jugar distintas poblaciones celulares en el carcinoma gástrico (16-19), hoy desconocemos el grado de participación de distintas sub-poblaciones de células del sistema inmune innato y adaptativo en estadios benignos de la carcinogénesis gástrica y si la supresión vista en estadios avanzados se inicia en etapas tempranas. De igual forma desconocemos si el escape a la

inmuno-vigilancia opera en el cáncer gástrico y si este escape es ya evidente en etapas pre-malignas del proceso de carcinogénesis gástrica.

Con el fin de intentar dar respuesta a algunas de estas preguntas, en este proyecto, se implementó una metodología para el inmuno-monitoreo de componentes celulares y moleculares de respuesta inmune relacionados con la etiología de otros tumores con el fin de tratar de establecer su participación en la etiología de lesiones benignas y malignas de la mucosa gástrica clásicamente asociadas a la epidemiología del desarrollo del cáncer gástrico (3) en un grupo de pacientes con estas lesiones (3). Para ello se analizaron por citometría de flujo células de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés Peripheral Blood Mononuclear Cells) de pacientes con lesión de mucosa gástrica atendidos en el Hospital El Tunal en la ciudad de Bogotá, distribuidos para el estudio en 4 grupos: (i) gastritis crónica, (ii) metaplasia intestinal, (iii) cáncer gástrico in-situ (temprano) y (iv) cáncer avanzado, con el fin de examinar *ex vivo* algunos inmuno-fenotipos de sub-poblaciones celulares de los componentes APC y de linfocitos T (supresoras y pro-inflamatorios) y el desempeño funcional de estos componentes frente a un estímulo *in vitro*.

Los resultados obtenidos se presentan en dos secciones: en la primera se describen los hallazgos en distintas poblaciones celulares mediante análisis de citometría de flujo manual, además, al final de esta sección, se correlacionan algunos resultados obtenidos en sangre con resultados histopatológicos de inmuno-histoquímica realizados en especímenes clínicos (biopsias) en una muestra seleccionada de individuos, con el ánimo de relacionar los resultados en sangre con la celularidad propia del microambiente tumoral *in situ*. Finalmente, en la segunda parte se muestran los resultados de un análisis multidimensional "*in silico*", en el que el monitoreo automatizado de una población linfoide hizo posible encontrar asociaciones entre estadios de lesión de la mucosa gástrica y algunas de las mediciones inmunológicas hechas en sangre.

PROBLEMA

En el mundo hay anualmente 989.600 casos nuevos de cáncer gástrico, de los cuales el 80% se presentan en países en vía de desarrollo y de estos el 90% están relacionados con la infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Aunque a nivel mundial la incidencia ha disminuido gracias a la implementación de estrategias de prevención y diagnóstico temprano, en nuestro país más del 90% de los casos se detectan tardíamente lo que ocasiona alta mortalidad y bajas expectativas de vida en los pacientes (sobrevida a 5 años menor al 10%) (1, 2). Debido a que los pacientes son en su mayoría personas laboralmente activas, este tipo de cáncer tiene un importante impacto económico y social. Por lo anterior existe la necesidad de generar en nuestro país estrategias de diagnóstico temprano e identificar biomarcadores pronósticos que hagan más efectivo el manejo y el tratamiento oportuno de los pacientes con esta enfermedad.

Uno de los principales mecanismos responsables del desarrollo de cáncer gástrico, es la inflamación crónica caracterizada por la proliferación excesiva de células epiteliales y la producción de radicales libres que lesionan el ADN de las células del epitelio gástrico. Un modelo de carcinogénesis gástrica ampliamente reconocido descrito en 1975 por el Dr. Pelayo Correa, describe una jerarquía de estados histopatológicos progresivos producto de la inflamación de la mucosa gástrica que comprenden: gastritis crónica superficial, atrofia gástrica, metaplasia intestinal, displasia y cáncer (3).

Aunque existe suficiente información que indica que la atrofia gástrica como alteración histológica es un fuerte predictor de riesgo de desarrollar cáncer de tipo intestinal, que la progresión de la inflamación gástrica, y la metaplasia intestinal conllevan un riesgo 6 a 17 veces mayor de desarrollar cáncer gástrico, y que distintas poblaciones inmunes pueden modificar el carcinoma gástrico (20, 21); aún se desconoce hasta qué punto el proceso de carcinogénesis gástrica es atribuible a la respuesta de componentes específicos de células del sistema inmune innato y adaptativo. De igual forma se desconocen si la supresión inmune responsable de la evasión de la inmuno-vigilancia observada en estadios avanzados del cáncer gástrico es detectable en individuos con lesiones pre-malignas, ni si el grado de participación de componentes celulares y moleculares del sistema inmune en la progresión de los distintos tipos de lesión de la mucosa gástrica.

MARCO TEORICO

EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER GÁSTRICO

En el 2012 GLOBOCAN estimó 14.1 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados a nivel mundial y 8.2 millones de muertes estimadas a causa de esta enfermedad, excluyendo los cánceres de piel –tipo no melanoma. Estas estimaciones corresponden a una incidencia de 182 personas por cada 100.000 y una mortalidad de 102 habitantes por cada 100.000. Cerca de la mitad de los casos diagnosticados se encuentran en Asia, seguido por Europa con un cuarto de estos y finalmente América y África (1).

En América latina y el Caribe, al igual que en Europa y Norte América, el cáncer de próstata y seno son los más comunes. Sin embargo, contrario a la situación observada en los países más desarrollados, el cáncer de cérvix contribuye en gran parte a la incidencia de cáncer en las mujeres, siendo la segunda incidencia y mortalidad más altas en mujeres (Figura 1).

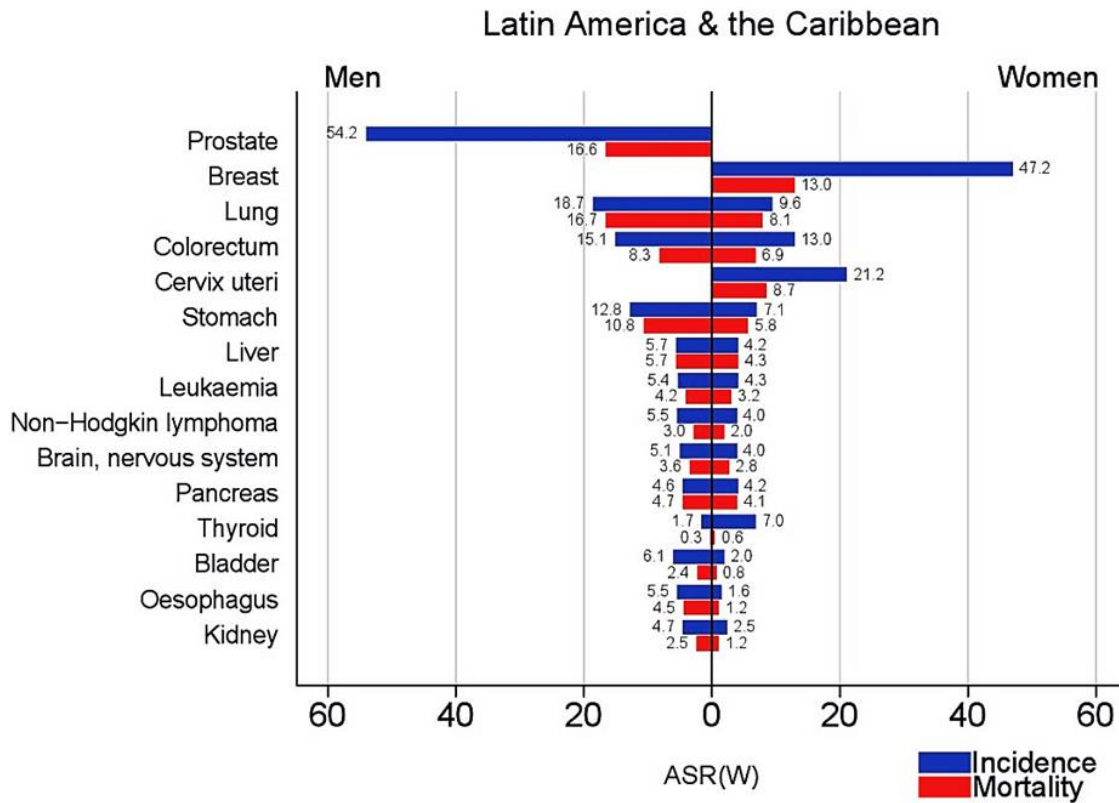


Figura 1. Estimación de la tasa de mortalidad y de incidencia de los principales tipos de cáncer. Edad estandarizada a nivel mundial por ASR (age-specific rate) por cada 100.000 habitantes en América Latina y el Caribe, en el 2012. Tomado de (22).

El cáncer gástrico aparece como el cuarto con mayor incidencia en hombres (cáncer de pulmón y colorectal como segundo y tercero respectivamente), y quinto en mujeres. Sin embargo, llama la atención la baja sobrevida en estos pacientes (Figura 1) y aunque la incidencia ha disminuido considerablemente a nivel mundial, éste continúa siendo la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo. Para el 2012 se diagnosticaron 952.000 nuevos casos y

723.000 muertes relacionadas con la enfermedad, 70% de los cuales ocurrieron en países en vía de desarrollo, con una mortalidad de 7.11% para América Latina y el Caribe (Figura 2) (1, 2).

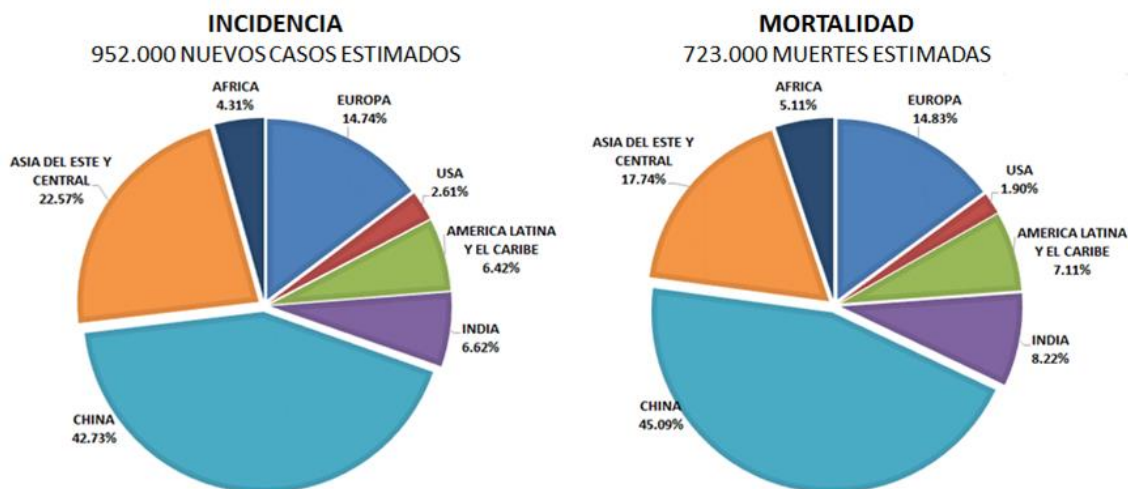


Figura 2. Número de casos nuevos y muertes estimadas de cáncer gástrico a nivel mundial con las proporciones de las principales regiones del mundo para ambos sexos, en el 2012 (Adaptado de (22)).

CÁNCER GÁSTRICO EN COLOMBIA

En Colombia, el cáncer representa un problema de salud pública creciente. De acuerdo a las estimaciones de incidencia, en el periodo 2000-2006 se presentaron cerca de 70887 nuevos casos anuales de cáncer: 32316 en hombre y 38571 en mujeres (23). Entre estos los tumores más frecuentes fueron en orden decreciente: próstata, estómago, pulmón, colon-recto, y linfomas No-Hodgkin para hombres, y de mama, cuello uterino, tiroides, estómago y colon-recto-ano para mujeres.

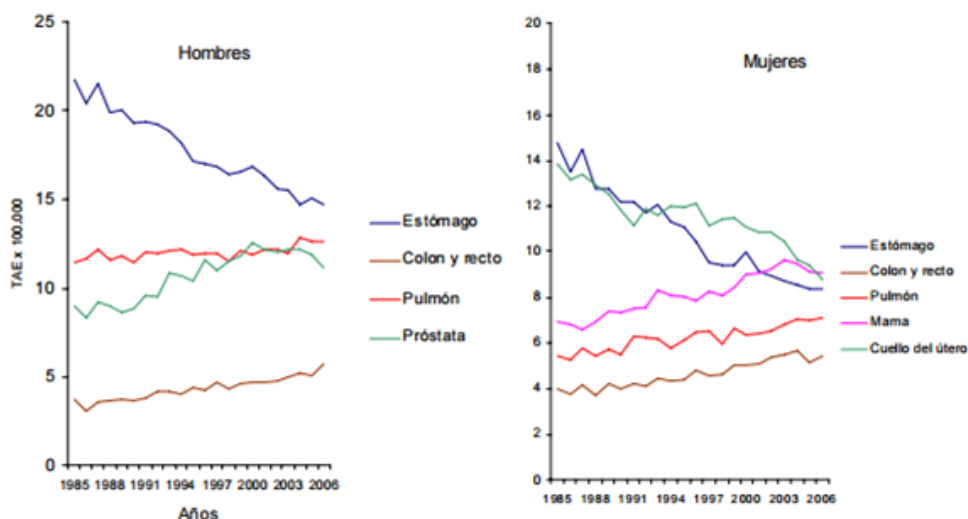


Figura 3. Tendencias en la mortalidad por cáncer, principales localizaciones, Colombia 1985-2006 (TAE – Tasas Ajustadas por la Edad) (tomado de (24)).

En cuanto a los índices de mortalidad, para el 2009, se tenían registradas 32815 defunciones por cáncer (17% del total de defunciones), con una tasa de 72,6 por cada 100000 hombres y 73,3 por cada 100000 mujeres. Este comportamiento ha ido en incremento para toda la población, a excepción del cáncer de estómago (24, 25), y de cuello uterino, que han tenido una reducción importante, sin embargo continúan con las cifras más altas de cáncer en el país (Figura 3).

De las 32815 defunciones registradas, según los registros de mortalidad del DANE, la principal causa de muerte fue cáncer gástrico, constituyéndose en el tumor maligno más letal, por encima de tumores como el de cérvix y pulmón que tienen una frecuencia mayor. Según datos del Instituto Nacional de Salud, la letalidad es del 42,37%; siendo la primera causa de muerte en hombres en etapa laboral, con una incidencia de 17 a 48 casos por cada 100000 habitantes (26). Estas tasas de mortalidad tienen un incremento después de los 50 años, pasando de tasas de 0,35 por cada 100000 habitantes en el grupo de edad de 20 a 24 años a tasas de 21,65, 32,77, y 156,21 por cada 100000 habitantes en los grupos de 55 a 59 años, 60 a 64 años y mayores de 80 respectivamente (24, 25). Estas cifras señalan hacia una relación entre la incidencia de cáncer gástrico (y otros tipos de cáncer) y la incidencia de enfermedades crónicas en individuos mayores de 65 años lo cual ha sido atribuido a la senescencia de la respuesta inmune en individuos de esta parte de la población (27).

En el cáncer gástrico, y en general en la mayoría de los cánceres, la edad juega un papel preponderante, lo cual puede ser explicado, entre otras cosas, por la historia natural de la enfermedad y por el hecho de que las personas de mayor edad usualmente son diagnosticadas en estadios avanzados de la enfermedad y con formas histológicas más agresivas, empeorando el pronóstico de la enfermedad y disminuyendo la expectativa de vida a 5 años (24).

Además de la edad, el Atlas de Mortalidad por Cáncer en Colombia señala una gran variación geográfica en el riesgo de cáncer gástrico, y sugiere una correlación directa entre la altura sobre el nivel del mar y la mortalidad (28). Las tasas de mortalidad más altas se observan en las zonas de alta cordillera, incluyendo la Sabana de Bogotá, y descienden progresivamente hasta llegar a las más bajas en las costas y los llanos orientales (Figura 4). Mientras la mayor incidencia y mortalidad se encuentra en el departamento del Quindío; en Boyacá ocurre la mayor prevalencia (28).

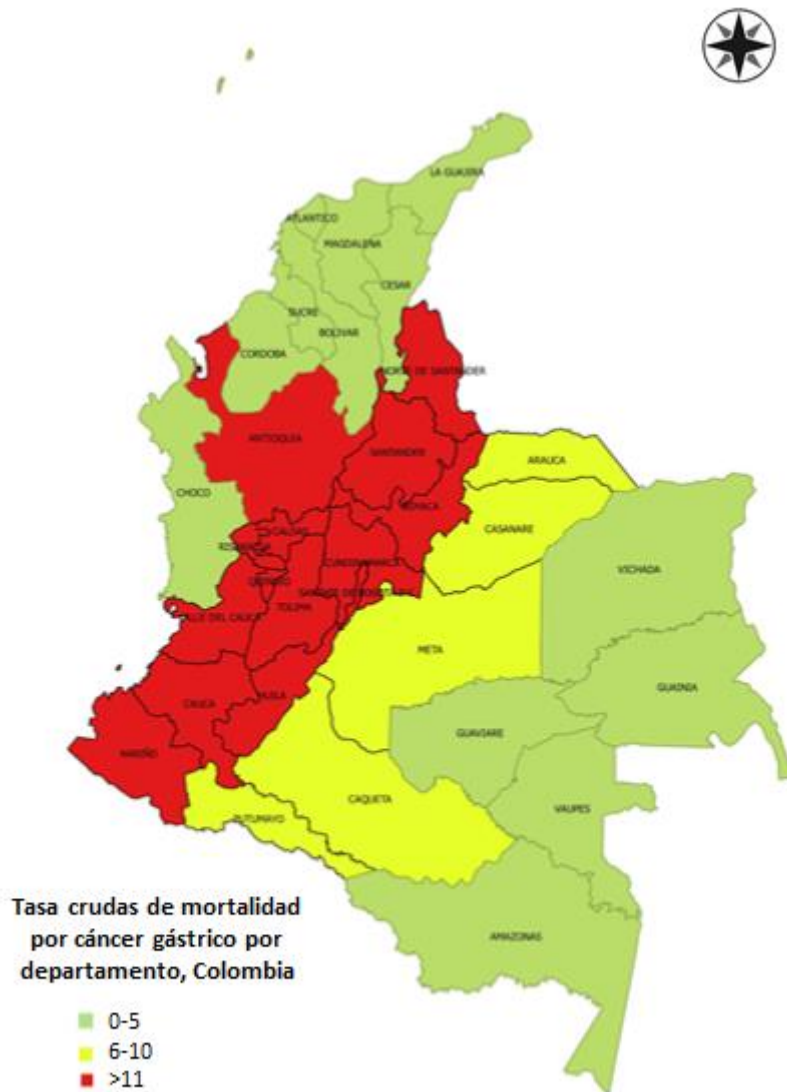


Figura 4. Distribución del Cáncer Gástrico según las tasas crudas por departamentos de residencia habitual en Colombia entre los años 2000-2009 *Rango de Tasas por 100.000 habitantes. Modificado de Guía del lector para mapas. DANE 2005. Guía del Lector para mapas. DANE.

CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES GÁSTRICOS

La mayoría de los cánceres de estómago se caracterizan por ser neoplasias epiteliales altamente malignas. Estos representan un grupo biológico y genéticamente heterogéneo de tumores con etiologías multifactoriales, tanto ambientales como genéticas. Los cánceres de estómago se caracterizan por una amplia heterogeneidad morfológica en cuanto a patrones de arquitectura y crecimiento, diferenciación celular, histogénesis y patogénesis molecular (22).

El 90% de los casos de cáncer gástrico son adenocarcinomas esporádicos, mientras que un porcentaje muy bajo (1-3%), representan el cáncer gástrico hereditario, agrupado

principalmente por dos síndromes hereditarios: cáncer gástrico difuso hereditario y adenocarcinoma gástrico y poliposis proximal del estómago (29).

En términos histopatológicos, la clasificación de Lauren subdivide los adenocarcinomas en: intestinales, cuando están bien diferenciados, se caracterizan por gastritis en el corpus con atrofia gástrica y metaplasia intestinal; o difusos, cuando no están diferenciados, y ocurre una gastritis sin atrofia(30). Los tumores de tipo intestinal son predominantes en poblaciones mayores de 60 años, mientras los tumores de tipo difuso son más frecuentes en personas jóvenes. Un pequeño grupo de tumores difusos son de tipo hereditario causados por mutaciones en el gen que codifica para la E-cadherina (31).

El pronóstico de los pacientes con cáncer gástrico está relacionado con la extensión tumoral e incluye tanto la afectación ganglionar como la extensión directa del tumor más allá de la pared gástrica. El cáncer gástrico temprano es aquel que compromete hasta la submucosa, tiene excelente pronóstico, con una tasa de supervivencia a los cinco años de más del 80% (32, 33). El cáncer gástrico avanzado cuyo compromiso va más allá de la submucosa, es de mal pronóstico, con una tasa de supervivencia a cinco años que va del 5 al 20%, lo que se relaciona con la inexistencia de programas de detección temprana debido a su baja incidencia lo cual genera una inadecuada relación costo-beneficio al momento de implementar programas de tamizaje general de la población con fines preventivos (34).

En el cáncer gástrico distal localizado, más del 50% de los pacientes pueden ser curados. Sin embargo, la enfermedad en etapa temprana representa sólo el 10% al 20% de todos los casos diagnosticados en los Estados Unidos. Los pacientes restantes presentan enfermedad metastásica en sitios regionales o distantes. La tasa de supervivencia global en estos pacientes a los 5 años varía desde casi ninguna supervivencia para los pacientes con enfermedad diseminada hasta casi el 50% de supervivencia para los pacientes con cáncer gástrico distal localizado confinado a enfermedad regional resecable (34, 35). Incluso con enfermedad localizada aparente, la tasa de supervivencia a los 5 años de los pacientes con cáncer gástrico proximal es sólo de 10% a 15%. Aunque el tratamiento de pacientes con cáncer gástrico diseminado puede resultar en paliación de los síntomas y cierta prolongación de la supervivencia, las remisiones son largas e infrecuentes (36)

Por otra parte, estudios en Colombia han demostrado que tanto en las mujeres como en los hombres la edad de presentación de esta patología se encuentra por encima de los 30 años y que muy probablemente todo paciente con dispepsia debería remitirse para la realización de Endoscopia de Vías Digestivas Altas (EVDA) independiente o no de la existencia de síntomas de alarma, ya que la ausencia de estos es frecuente en enfermedad temprana. El tiempo de duplicación tumoral de los cánceres gástricos tempranos es alrededor de dos a tres años, así que tras una EVDA negativa si se llegase a realizar nuevamente en este lapso de tiempo el procedimiento, se podría diagnosticar un estadio temprano susceptible a tratamiento curativo(24).

Los signos y síntomas del cáncer gástrico dependen de su estadio clínico y de su localización. Los estudios observacionales indican que la mayoría de los pacientes con cáncer gástrico temprano refieren síntomas de tipo dispéptico (dolor epigástrico leve, recurrente, pirosis, con distensión abdominal o sin ella, náuseas o vómitos), y no presentan síntomas de alarma

(anemia, disfagia, pérdida de peso), los cuales son indistinguibles de los de sujetos con afecciones benignas. Por su parte, en la mayoría de los casos de cáncer gástrico avanzado se presentan síntomas de alarma, como dolor abdominal recurrente, anemia, pérdida de peso, vómitos y anorexia, y según la situación del tumor, disfagia o síndrome pilórico (34, 35).

INFECCIÓN *H. PYLORI* Y RELACIÓN CÁNCER

Actualmente es aceptada la relación existente entre el una infección crónica por *H. pylori* y el desarrollo de cáncer. La IARC (Agencia Internacional para la investigación en cáncer) reconoce 11 agentes infecciosos como cancerígenos para el hombre (Tabla 1), los cuales se estima que aumentan más de 10 veces el riesgo relativo a desarrollar cáncer, por lo que se sugiere que un manejo temprano de la enfermedad y la eliminación de la exposición a una infección específica, podrían evitar o detectar de forma temprana el inicio de una patología tumoral (3-4).

TIPO DE CANCER	AGENTE CARCINOGENICO
ESTOMAGO	Helicobacter pylori
HIGADO	Virus Hepatitis B
	Virus Hepatitis C
	Opisthorchis viverrini
	Clonorchis sinensis
CERVIX	Virus del papiloma Humano con o sin VIH
ANOGENITAL	Virus del papiloma Humano con o sin VIH
NASOFARINGE	Virus Epstein-Barr
OROFARINGE	Virus del papiloma Humano, con o sin consumo de Tabaco o Alcohol
LINFOMA NO-HODGKIN	Helicobacter pylori
	Virus Epstein-Barr
	Virus Hepatitis C
	Virus linfotrópico de células T humanas tipo 1
SARCOMA KAPOSI	Herpesvirus del sarcoma de Kaposi, con o sin VIH
LINFOMA HODGKIN	Virus Epstein-Barr con o sin VIH
VEJIGA	Schistosoma haematobium

Tabla 1. Relación entre el tipo de cáncer y el agente infeccioso clasificado como cancerígeno en humanos. Adaptado de (22).

En el caso del cáncer gástrico, la IARC determinó que la infección por *H. pylori* era una causa primaria del cáncer gástrico (37). Tumor que se ha visto se desarrolla en la zona no cardial (es decir, cuerpo) del estómago, con una patología de tipo intestinal (37, 38).

Esta bacteria infecta aproximadamente al 50% de la población mundial (39-41), pero su prevalencia varía significativamente entre los diferentes países, niveles sociales, edades y razas (42-44). Generalmente es más baja en países desarrollados que en países en vías de desarrollo, en los cuales puede ser más del 80% (45). Sin embargo, no todos los individuos infectados con esta bacteria desarrollan cáncer; se han encontrado ciertas incongruencias, como es el caso de África, en donde la prevalencia de la infección es casi universal, pero el cáncer gástrico es muy

raro, fenómeno conocido como “el enigma africano”) (46). En Colombia, se ha visto ocurre un fenómeno similar, ya que la infección es muy frecuente en el país, sin embargo, en las zonas andinas el cáncer es muy frecuente, pero en las costas Atlántica y Pacífica este tipo de tumor es raro; este fenómeno es conocido como el “enigma colombiano” (11), el cual ha sido analizado en diferentes estudios, los cuales sugieren que ambos enigmas pueden estar influenciados a fenómenos migratorios (46, 47).

Si bien aún no se han determinado todos los factores que podrían estar asociados a estos enigmas, se sugieren componentes del contexto genético tanto humanos (polimorfismo de la IL-1 β (48, 49), como de la bacteria. En el caso de *H. pylori*, estos factores dependen de la cepa, la cual varía sus niveles de virulencia, principalmente debido a la secreción de toxinas (50). Las más estudiadas son la toxina citotóxica cagA (cytotoxin associated gene), y la toxina vacuolizadora vacA (vaculating cytotoxin) , que son secretados sobre la mucosa que recubre el epitelio gástrico, perforando y alterando las células del epitelio (51), disminuyendo la secreción de ácidos gástricos (52) y permitiendo la supervivencia de la bacteria (51, 53).

Aunque la bacteria ha desarrollado mecanismos para evadir la respuesta inmune del huésped, éste es capaz de reconocerla y activar respuesta innata a través de múltiples mecanismos, entre los que se encuentra el ensamblaje de inflamomas que secretan IL-1 β e IL-18 (5, 54); aumentar la secreción de IL-8 (55) y TNF- α en respuesta a cag-PaI (56) y la activación de NF- κ B (57), genera la infiltración de neutrófilos (6), monocitos, macrófagos, y células dendríticas (7), y aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) (8, 58), que conllevan a una respuesta inflamatoria crónica.

Además del mecanismo de respuesta innata, *H. pylori* activa una respuesta inmune adaptativa que juega un papel doble, actúa tanto en la eliminación, como en la patogénesis. La principal respuesta T en humanos es de tipo Th1 y Th2, asociada al ambiente pro-inflamatorio, que promueven el desarrollo de gastritis y riesgo a desarrollar cáncer (caso de la población asiática) cuando es del tipo 1, y una respuesta más controlada en el tipo 2 (caso de la población africana) (9, 59, 60). Así mismo, esta bacteria tiene la capacidad de secretar factores que disminuyen la activación de las células T in-vitro (61), y controlar la respuesta a través de la generación de Tregs, que secretan las citoquinas supresoras IL-10 y TGF- β (62, 63).

INFLAMACIÓN GÁSTRICA

Aunque gran número de factores influyen la predisposición y progresión de desarrollo de cáncer gástrico, es claro que la inflamación crónica es una característica común de este y otros tipos de cáncer (64, 65). El cáncer gástrico, es un buen ejemplo de este efecto, ya que como se explicó anteriormente, una infección crónica acarrea una respuesta pro-inflamatoria alterada.

La inflamación tiene efectos opuestos frente al cáncer; mientras la inflamación aguda lleva a una respuesta inmunológica antitumoral; una inflamación crónica promueve la proliferación celular y el desarrollo de cáncer, debido a daños en el ADN y el tejido, incluyendo cambios genéticos y epigenéticos. Además, esta inflamación genera un cambio en el contexto inmunológico a expensas del aumento de células Th2, Treg, macrófagos M2, y células

supresoras de origen mieloide (MDSCs: del inglés *Myeloid Derived Suppressor Cells*), cuyo efecto es de mal pronóstico en la mitad de los diagnósticos (Figura 5) (66, 67)

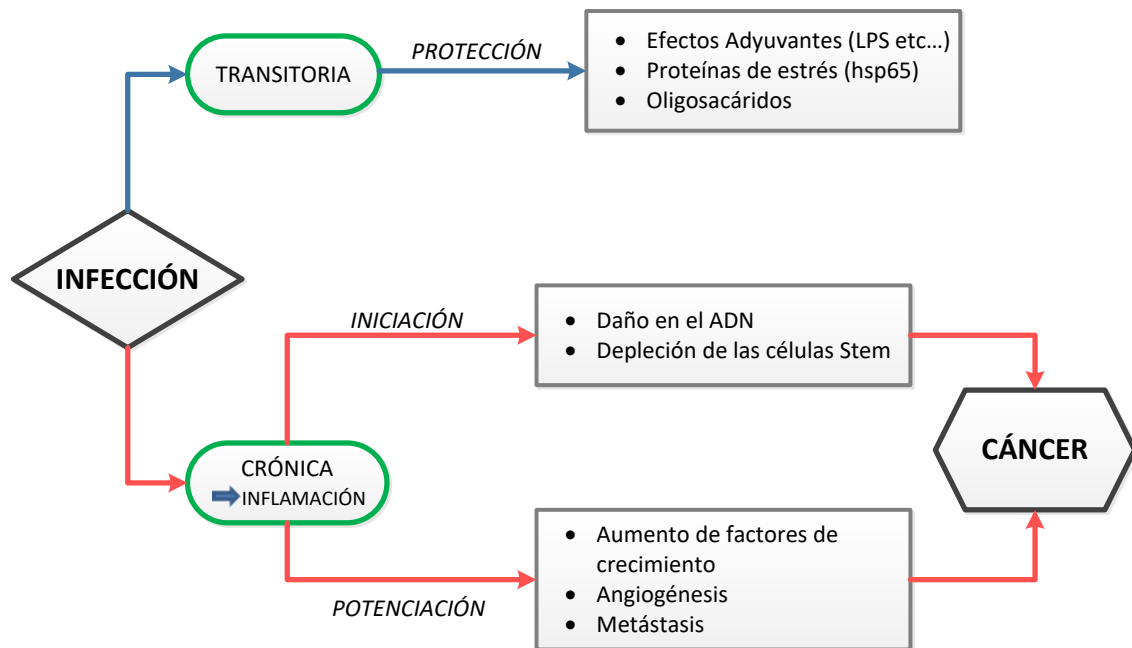


Figura 5. Efectos ambiguos de la respuesta a infección en la prevención o desarrollo de cáncer (excluyendo la transformación directa). Una infección transitoria puede proveer protección contra el cáncer. Sin embargo, una infección crónica conlleva a una inflamación crónica que puede iniciar un proceso de oncogénesis. (Adaptado de (68))

A medida que avanza la inflamación crónica, algunos actores clave de la respuesta inmune se suprimen, entre estos, las células asesinas naturales (NK) y los linfocitos T (LT) (69, 70). El proceso de supresión inducida durante la inflamación crónica se rige por la acumulación y activación de células supresoras inmunes, citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas, factores de crecimiento tumoral y angiogénicos, y por la activación de varias vías inflamatorias de señalización mediadas predominantemente por NFκB (71, 72) y factores de transcripción como STAT3 (70, 73).

Evidencia importante apoya la idea de que, el desarrollo de un entorno de supresión durante la inflamación crónica, limita el éxito de las terapias anti-tumorales convencionales y favorece el desarrollo de los tumores. Sin embargo, este estado de supresión es irreversible y se considera que intervenciones inmunes apropiadas podrían resolver la inmuno-supresión asociada favoreciendo respuestas exitosas a ciertos regímenes de inmuno-terapia (74-76).

MODELO DE CARCINOGENESIS GÁSTRICA

La vigilancia actual del desarrollo de cáncer gástrico se fundamenta en el estudio del proceso de carcinogénesis gástrica descrito originalmente por Pelayo Correa en 1975 y el cual continúa vigente (3). Correa señala que el cáncer gástrico de tipo intestinal es el resultado de una serie de cambios (mutaciones y transformaciones celulares progresivas de la mucosa gástrica) cuya etiología está ligada a un proceso inflamatorio. En términos generales, el proceso inicia con una mucosa normal que desarrolla una gastritis crónica (caracterizada por una inflamación crónica), seguida por gastritis atrófica multifocal (múltiples lesiones y pérdida de glándulas gástricas) y el desarrollo de metaplasia intestinal (sustitución de glándulas del tejido gástrico por epitelio de tipo intestinal), displasia (células irregulares con mitosis frecuente) y finalmente desarrollo de carcinoma (Figura 6), una secuencia de eventos que toma para desarrollarse varios años.

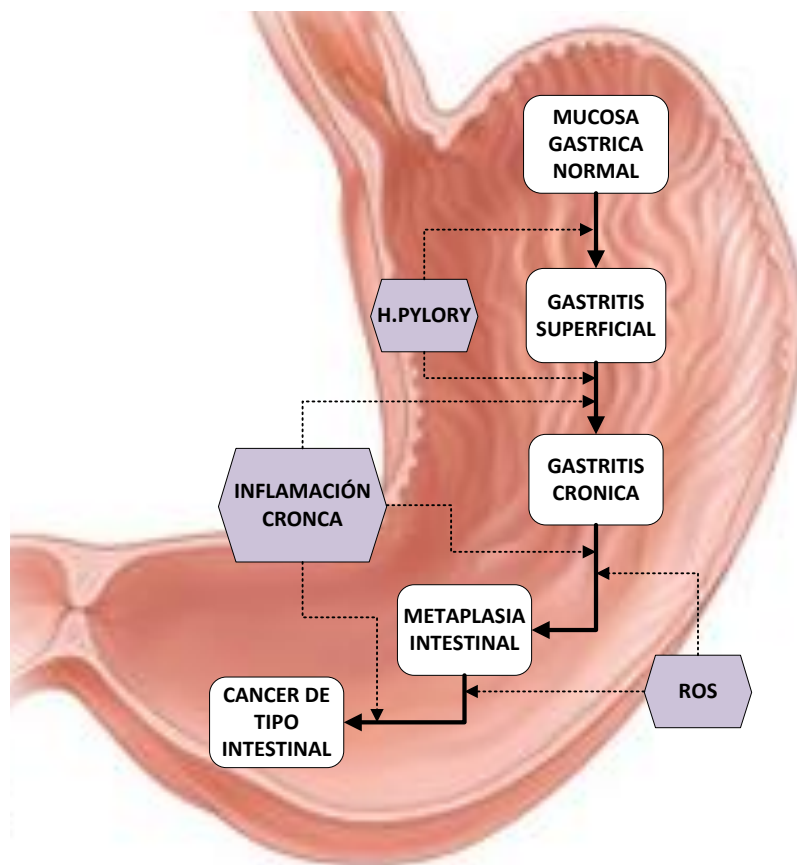


Figura 6. Cascada de la carcinogénesis gástrica propuesta por Pelayo Correa en 1975. Esquema de la transformación de la mucosa gástrica desde el estadio inicial y la infección por *Helicobacter pylori*, hasta el desarrollo de cáncer gástrico de tipo intestinal.

Una mucosa normal contiene una baja cantidad de células mononucleares infiltrantes, sin embargo, en la gastritis hay un aumento en la infiltración de la lámina propia con neutrófilos y polimorfos (inflamación aguda) y leucocitos mononucleares (inflamación crónica). Este infiltrado inflamatorio está frecuentemente asociado a la presencia de *H. pylori*, y la severidad de la inflamación está asociada a la cepa de la bacteria (77). En la gastritis, la morfología de las glándulas se conserva y si la lesión del epitelio progresa esta se torna en gastritis crónica no

atrófica. En este punto de la enfermedad la eliminación de la bacteria hace que la inflamación revierta (78).

En caso de una infección persistente la patología aumenta su severidad, la respuesta inflamatoria en respuesta a la infección y factores de virulencia de la bacteria (toxinas) generan daños a las glándulas de la mucosa gástrica las cuales desaparecen en las fases más avanzadas. Estos cambios morfológicos se evidencian en distintos focos dispersos en el tejido lo que se conoce como gastritis atrófica multifocal.

Esta atrofia se localiza en la mucosa del antro y el cuerpo del estómago y continúa con un proceso agresivo de fibrosis de la lámina propia. Un biomarcador utilizado para cuantificar el grado de atrofia es evaluar la relación de dos tipos de Pepsinógeno (PG); PGI/PGII. Mientras que los niveles en sangre de pepsinogeno I (PGI) disminuyen a medida que se pierde la mucosa oxíntica, el pepsinogeno II (PGII) aumenta su secreción en las foveolas en respuesta a la inflamación y a la proliferación celular (79, 80).

Una vez que la lesión presenta un cambio en el fenotipo del epitelio gástrico y se observan células con morfología intestinal, se considera un nuevo paso en el proceso de la carcinogénesis gástrica, en el que el reemplazo de las glándulas normales es consecuencia de la proliferación celular del neo-epitelio en respuesta a la pérdida de la mucosa glandular (atrofia severa). La patología de metaplasia intestinal se clasifica en dos tipos: metaplasia de intestino delgado o de tipo completo, y la metaplasia colónica o de tipo incompleto. La patología completa se caracteriza por la presencia de células de Goblet intercaladas por enterocitos y la presencia eventual de células de Paneth. Estos cambios son lentos y progresivos, y el grado de progresión de la metaplasia puede ser evaluado por las mucinas estomacales que empiezan a tener un pH ácido (81). Por otra parte, la metaplasia de tipo colónico, se caracteriza por la presencia de mucinas de sulfato ácido, y sus células no tienen bordes en cepillo. En algunos casos un mismo paciente puede expresar ambos tipos de metaplasia (mixta).

En este punto de la evolución de la lesión gástrica, el riesgo a desarrollar cáncer aumenta en los casos en el que aparece epitelio de tipo intestino delgado, asociado a la extensión de los cambios de atrofia y metaplasia (82).

Un siguiente paso en la cascada es el proceso de displasia o neoplasia intraepitelial, el cual se caracteriza por un epitelio con núcleos agrandados, hipercromáticos y aglomerados, con mitosis frecuentes. Además el tejido pierde la morfología de glándulas organizadas que se transforman en bifurcadas o ramificadas que pasan de estar bien diferenciadas, a pobremente diferenciadas (83). El grado de diferenciación es proporcional al riesgo de cáncer, sin embargo, este paso ocurre de forma relativamente rápida y es difícil de diagnosticar en la clínica, por lo que se diagnostica usualmente cuando ya existe un carcinoma caracterizado por las células neoplásicas que han penetrado el estroma circundante.

INMUNO-MONITOREO

El sistema inmune cuenta con mecanismos de inmuno-vigilancia de los tumores ejercida por células inmunes que previenen el desarrollo de tumores basado en el reconocimiento y eliminación de células cancerígenas o pre-cancerígenas (84). Usualmente este sistema es eficiente, sin embargo, en algunos casos a pesar de esta vigilancia los tumores se desarrollan en individuos inmunológicamente competentes. El análisis de trabajo experimental en modelos de cáncer en animales, ha aportado este tipo de observaciones sobre las cuales reposa el concepto de *inmuno-vigilancia* de los tumores (84), el cual ha sido validado por observaciones epidemiológicas que sugieren que el cáncer se desarrolla de forma más frecuente en huéspedes inmuno-deficientes (85), y en pacientes receptores de trasplantes sometidos a inmunosupresión farmacológica crónica (86). Otras evidencias en favor del papel del sistema inmune en la inmuno-vigilancia y control de los tumores son la regresión tumoral asociada a la recuperación de células T y B en individuos inmuno-comprometidos (87) y el control de tumores debido al aumento de linfocitos CD8+ infiltrantes específicos contra neo-antígenos en pacientes con cáncer colorectal con inestabilidad de los micro satélites (MSI por sus siglas en inglés), lo cual es considerado factor de buen pronóstico (88, 89).

El concepto de *inmuno-vigilancia* tumoral propone que muchas lesiones premalignas son *eliminadas* de forma eficiente por células del sistema inmune, que los tumores pequeños entran en *equilibrio* con un sistema menos eficiente, y que en etapas posteriores del cáncer los tumores *escapan* al control inmunológico, y se desarrollan como tumores clínicamente detectables, debido al entorno de inmunosupresión del micro-ambiente tumoral y a que pierden determinantes antigénicas que los hacen reconocibles por el sistema inmune. Dentro de los mecanismos de escape de los tumores, se han reportado defectos en el procesamiento antigénico (12), anergia de linfocitos T, eliminación de células T citotóxicas específicas de tumor (13) y generación de un micro-ambiente tumoral que favorece la supresión inmune gracias a varios factores incluido el reclutamiento de poblaciones de células reguladoras/inhibitorias de los linfocitos T anti-tumorales (14, 15, 90).

Debido a esta capacidad del sistema para controlar los tumores, se han desarrollado nuevas terapias contra el cáncer orientadas a restituir la inmuno-vigilancia en el tumor, con el fin de modular la interacción entre los componentes malignos y no malignos del microambiente tumoral (91). Una de estas estrategias es la transferencia adoptiva de las células inmunes (dendríticas y linfocitos) en numerosos ensayos clínicos (92).

Así las cosas, el concepto de *inmuno-monitoreo* del paciente con cáncer ha cobrado particular importancia en el desarrollo de la inmunoterapia no solo con el fin de analizar las características de la respuesta inmune generada en diferentes tipos de terapia, sino además para establecer correlación entre el contexto inmune y la respuesta clínica de los tumores a distintos tratamientos (93-96). Por lo anterior en este trabajo se ha implementado una estrategia de análisis de distintos componentes del sistema inmune (poblaciones de APC y linfocitos T) como instrumento para monitorear cambios de activación o supresión del sistema en individuos con lesiones pre-malignas y malignas de la mucosa gástrica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluación funcional de células APC y linfocitos T en pacientes con lesiones malignas y pre-malignas de la mucosa gástrica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluación de los niveles *ex vivo* de las poblaciones APC y linfocitos T en patologías asociadas a la carcinogénesis gástrica.
2. Identificación de diferencias funcionales de APC y Linfocitos T en patologías asociadas a la carcinogénesis gástrica.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

El presente, es un estudio descriptivo en donde se realiza un monitoreo general de distintos componentes del sistema inmune, con el fin de evaluar diferencias cuantitativas y funcionales de las principales poblaciones de células APC y linfocitos T presentes en sangre periférica (PBMCs) de pacientes con lesiones pre-malignas y malignas de la mucosa gástrica, definidas como tal de acuerdo al modelo de carcinogénesis gástrica descrito por Correa (3). En este estudio se analizaron muestras de cinco grupos de individuos (i) sanos; (ii) con gastritis; (iii) con metaplasia; (iv) cáncer temprano (*in situ*) y (v) cáncer avanzado. La cuantificación de las poblaciones de células APC y linfocitos T así como la medición del grado de maduración y activación de estas en respuesta a estímulos *in vitro*, se realizó mediante citometría de flujo multi-color. Mientras la selección de varias subpoblaciones de leucocitos en sangre se definió por la co-expresión simultánea de varios marcadores; el comportamiento de algunos grupos celulares con inmuno-fenotipos definidos fue comparado entre distintos grupos de individuos analizados.

Además, de los análisis a los componentes APC y de linfocitos T hechos por citometría de flujo en sangre periférica, el grado de infiltración de la mucosa gástrica por algunos de estos componentes celulares fue cuantificado en preparaciones de inmuno-histoquímica de biopsias en tres individuos mediante la utilización de “*software*” de análisis de imagen.

Finalmente, a través de algoritmos multi-paramétricos de identificación automatizada, se realizó el inmuno-monitoreo de algunas sub-poblaciones de linfocitos T que permitió evidenciar algunas diferencias en su expresión entre los grupos de individuos evaluados.

SELECCIÓN DE PACIENTES

Debido a la alta variabilidad que existe entre individuos se establecieron estrictos criterios de inclusión y exclusión con el fin de evitar variables de confusión en las poblaciones celulares evaluadas.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes mayores de 18 años de edad
- Diagnóstico histopatológico de gastritis aguda y crónica, metaplasia intestinal, cáncer gástrico *in-situ* o avanzado sin tratamiento previo y recién diagnosticado.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Pacientes con al menos una de las siguientes características:

- Mujeres en gestación o periodo de lactancia.
- Bajo peso y/o desnutrición.
- En quimio-radioterapia.
- Intervenidos quirúrgicamente en el último año.

- En tratamiento con corticoides o inmunosupresores.
- Con enfermedad autoinmune.
- Que hayan recibido transfusiones sanguíneas en los últimos 6 meses.
- Que hayan recibido tratamiento con antibióticos en los últimos 2 meses.
- Con procesos infecciosos recientes (menor a 2 meses).

CONSECUCCIÓN DE PACIENTES Y TOMA DE MUESTRAS

Se invitaron a participar pacientes del servicio de gastroenterología del Hospital el Tunal que consultaron por sintomatología gástrica y que requerían de la toma de biopsia para su diagnóstico inicial. Un total de 48 pacientes fueron involucrados al estudio entre junio de 2014 y marzo de 2016. Para los análisis, las muestras fueron clasificadas en 4 tipos de lesiones de la mucosa gástrica: (i) gastritis crónica atrófica (n=13), (ii) metaplasia intestinal (n=10), (iii) cáncer gástrico *in-situ* (temprano) (n=11) y (iv) cáncer avanzado (n=14) (Tabla 2).

Posterior a la firma del consentimiento informado (Anexo 1) y del registro de los datos clínicos básicos, se tomaron muestras de sangre de 20 mL en tubos heparinizados, así como las respectivas biopsias, que se emplearon para la generación de láminas cargadas y el posterior análisis por inmunohistoquímica.

Como grupo control se reclutaron 13 donantes jóvenes (18-25 años) (donantes sanos), que aunque no se les realizó una endoscopia de vías digestivas altas (EVDA), no refirieron tener sintomatología compatible con lesiones de la mucosa gástrica. A estos individuos se les tomó muestra de 20mL de sangre y sus muestras fueron procesadas y analizadas de la misma forma como se procesaron las muestras obtenidas de los pacientes.

PACIENTES	(n= 48/61)
SEXO M/F	19/ 21
EDAD	58 (18-87)
CANTIDAD DE BIOPSIAS	30
DONANTES SANOS	13
GASTRITIS CRONICA	13
METAPLASIA INTESTINAL	10
CA. TEMPRANO	11
CA. AVANZADO	14

Tabla 2. Características de los pacientes con patología de la mucosa gástrica. Media de la edad, sexo, número de biopsias colectadas, número de individuos sanos y con patología de la mucosa gástrica vinculados al estudio.

De estos pacientes el 48,6% eran hombres y el 51,4% mujeres. En cuanto a la edad de los pacientes el promedio fue de 58 años, la paciente más joven fue una mujer con gastritis crónica de 22 años y el participante de mayor edad fue un hombre de 87 años con cáncer temprano (Tabla 2).

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE SANGRE

En el laboratorio del grupo de Inmunología y Medicina Traslacional de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia se procesaron las muestras de sangre. A partir de la sangre total, se obtuvieron aproximadamente 5 mL de plasma por medio de centrifugación (700G durante 10 minutos sin freno), a partir del concentrado de células sangre, se aislaron las PBMCs mediante separación por gradiente utilizando Ficoll (Histopaque – 1077, Sigma Aldrich) (Figura 7).

Las PBMCs obtenidos (en promedio 20 millones de células) se preservaron en nitrógeno líquido en medio de congelación (RPMI 50%, Suero fetal bovino 40% y DMSO 10%); y el plasma se congeló a -20°C (Figura 7).

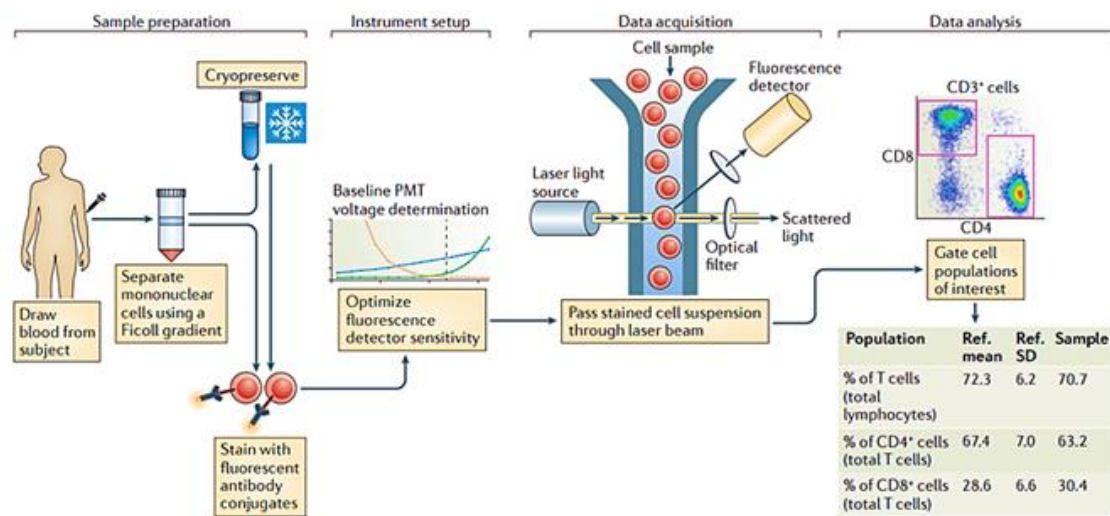


Figura 7. Esquema general obtención de PBMCs y análisis por citometría de flujo. Una vez seleccionados los pacientes que ingresaron al estudio, se tomó una muestra de sangre, a partir de la cual se obtuvieron células mononucleares utilizando gradiente de Ficoll (PBMCs por sus siglas en inglés Peripheral Blood Mononuclear Cells). Las muestras fueron criopreservadas en nitrógeno líquido hasta su tinción para análisis con anticuerpos conjugados a fluorocromos. Antes de leer las muestras fue necesario calibrar el equipo y ajustar la intensidad de los voltajes de cada uno de los tubos fotomultiplicadores (PMTs), con el fin de asegurar la sensibilidad y especificidad óptima de fluorocromos y detectores. Luego se adquirieron los datos de cada una de las muestras de células mediante su paso por un equipo FACSariaII y el respectivo registro de emisión de fluorescencia de los anticuerpos fluorocromados. Finalmente se realizó el análisis de los datos, seleccionando y evaluando las diferentes poblaciones de interés utilizando el programa FlowJo VX (Treestar), (Ref., referencia; SD, desviación estándar). Tomado de Nussenblatt, 2012 (97).

ANÁLISIS DE CÉLULAS EN SANGRE PERIFÉRICA

Las PBMCs de todos los pacientes incluidos en el ensayo y agrupados en 5 grupos (sanos, gastritis, metaplasia intestinal, cáncer temprano y cáncer avanzado) se analizaron mediante la técnica de citometría de flujo multi-paramétrica (CF) utilizando el equipo FACSaria II (BD Biosciences). Durante este procedimiento se evaluaron, cuantificaron y compararon las poblaciones de monocitos, células dendríticas y linfocitos y se investigó la capacidad funcional

de maduración de células dendríticas y de linfocitos T. Los datos obtenidos de FC se analizaron mediante análisis manual utilizando el “software” FlowJo VX (Treestar) y un análisis automatizado multidimensional (ver sección análisis multidimensional (Figura 7).

Inicialmente, las PBMCs se descongelaron en baño serológico a 37°C y se lavaron con medio AIM-V (GIBCO) a 700G por 7 minutos, con el fin de remover restos de DMSO presente en el medio de congelación. Una vez lavadas, las células se contaron y se determinó la viabilidad por azul de tripan mediante el uso de la cámara de Neu Bauer (solo se utilizaron las muestras con una viabilidad superior al 85%). Paso seguido, se realizaron dos tipos de ensayos: el primero un análisis *ex vivo* (con células recién descongeladas) (Figura 8- verde) y el segundo luego del estímulo de las células *in-vitro* (para lo cual las células fueron dispensadas en pozos en placas de 96 pozos fondo plano) con el fin de evaluar la capacidad de activación de linfocitos T (Figura 8– rojo) y la respuesta a un estímulo pro-inflamatorio tanto de células dendríticas primarias como de derivadas *in situ* a partir de monocitos (Figura 8- azul).

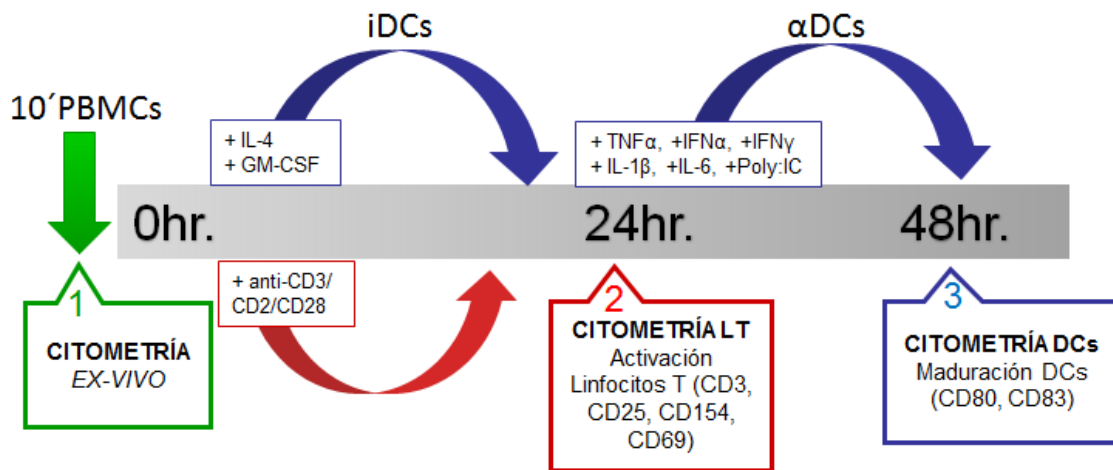


Figura 8. Esquema de procedimientos y tratamiento de muestras de PBMCs utilizados para monitorear APCs y linfocitos T por citometría de flujo. A partir de 10 millones de PBMCs obtenidas de la muestra de sangre, se realizaron 3 ensayos con el fin de evaluar diferentes componentes fenotípicos y funcionales de APCs y linfocitos T presentes en PBMCs de voluntarios participantes en el estudio. Una vez descongeladas las células, se reservaron 2 millones para los análisis *ex vivo* y se dispensaron células en 4 pozos para su evaluación funcional *in vitro*. La evaluación *in vitro* del grado de activación del componente de linfocitos T se realizó luego del estímulo de las PBMCs en cultivo con perlas anti CD3/CD2/CD28 por 24 horas. La maduración de las células dendríticas se realizó luego del tratamiento en cultivo de PBMCs con IL-4 y GM-CSF por 24 horas seguido por el tratamiento por 24 horas adicionales con un coctel de citoquinas pro-inflamatorias (llamado en este trabajo coctel αDCs) con el que se buscó analizar el grado de diferenciación a DCs maduras de monocitos y el grado de maduración en respuesta a la maduración de DCs primarias totales (células LIN-HLA-DR+) presentes en las PBMCs de cada muestra analizada.

Paso seguido, se realizó la marcación por citometría de flujo, en donde a cada uno de los tubos analizados se les agregó el coctel de anticuerpos (Biolegend) correspondiente (Tabla 3), siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, 4µL de cada uno de los anticuerpos extracelulares se agregaron a la suspensión con 5x10⁵ células. Las muestras luego, fueron incubadas por 20 minutos a 4°C en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo, se lavó con 1mL de Staining buffer (Biolegend) mediante centrifugación a 700G por 7 minutos. Finalmente, se retiró el sobrenadante y las células se re-suspendieron en 200µL de Staining buffer para ser leídas en el citómetro.

ex-vivo		in-vitro	
MDS Cs y Monocitos		Maduración Dendriticas	
CD14	FITC	HLA-DR	PE TEXAS
CD16	PE-CY5	LIN	FITC
CD33	PE	CD123	PE-CY7
HLA-DR	PE TEXAS	CD11c	PE
CD11b	APC-CY7	CD80	APC
Subpoblaciones DCs		CD83	PE-CY5
HLA-DR	PE TEXAS	Activación Linfocitos	
LIN	FITC	CD3	PE-CY7
CD11c	PE	CD25	FITC
CD123	PE CY7	CD69	PE
Poblaciones Linfocitos		CD154	APC
CCR7	FITC		
IL-17	PE		
CD8	PE TEXAS		
BTLA	Percp		
CTLA-4	PE-CY7		
PD1	APC		
CD25	ALEXA 700		
CD45RA	APC-CY7		
CD4	BV. 510		
Foxp3	Pacific Blue		

Tabla 3. Listado de cada uno de los paneles de citometría utilizados para el inmuno-monitoreo. En gris se encuentra la identificación del panel y a continuación los anticuerpos utilizados con su respectivo fluorocromo

En el panel de marcación de linfocitos, en donde era necesario realizar marcación intracelular de Foxp3 e IL-17, se utilizó el kit de fijación y permeabilización FOXP3 Fix/Perm Buffer Set (Biolegend). En resumen, una vez realizada la marcación extracelular, se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con 500µL de solución Fix/Perm. Paso seguido, se lavó e incubó 15 minutos con Perm Buffer; finalmente, las células se re-suspendieron nuevamente en 100 µl de Perm buffer y se realizó la marcación con los anticuerpos Foxp3 e IL-17 por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Luego de 30 min, se lavó y las células se re-suspendieron en 200µL de staining buffer (Biolegend) previo al paso de la muestra por el citómetro de flujo.

Para la lectura de citometría, al menos 200.000 células fueron adquiridas, y los resultados se grabaron en archivos FSC. Para su posterior análisis. El análisis por FlowJo se realizó seleccionando las poblaciones de células que expresaban la combinación de los marcadores evaluados, su porcentaje y nivel de marcación, expresado por el índice de fluorescencia media (MFI). Este último parámetro fue utilizado para evaluación de las poblaciones y su comparación entre los 5 diferentes grupos.

1. CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS SUB-POBLACIONES DE LEUCOCITOS EX VIVO

Inicialmente, de las PBMCs obtenidas de cada paciente, 5×10^5 células fueron dispensadas en tres tubos de citometría (5mL). En estos tubos se identificaron y cuantificaron las siguientes sub-poblaciones de celulares: (i) MDSCs y monocitos, (ii) tres subpoblaciones de dendríticas primarias CD11c+, CD123+ y CD11c-/CD123- y (iii) la expresión de los receptores inhibitorios: CTLA-4, BTLA y PD1 en poblaciones de linfocitos CD4/CD8 (vírgenes, efectores y de memoria); además se midió la presencia de células Th17 y Tregs (Figura 9.).

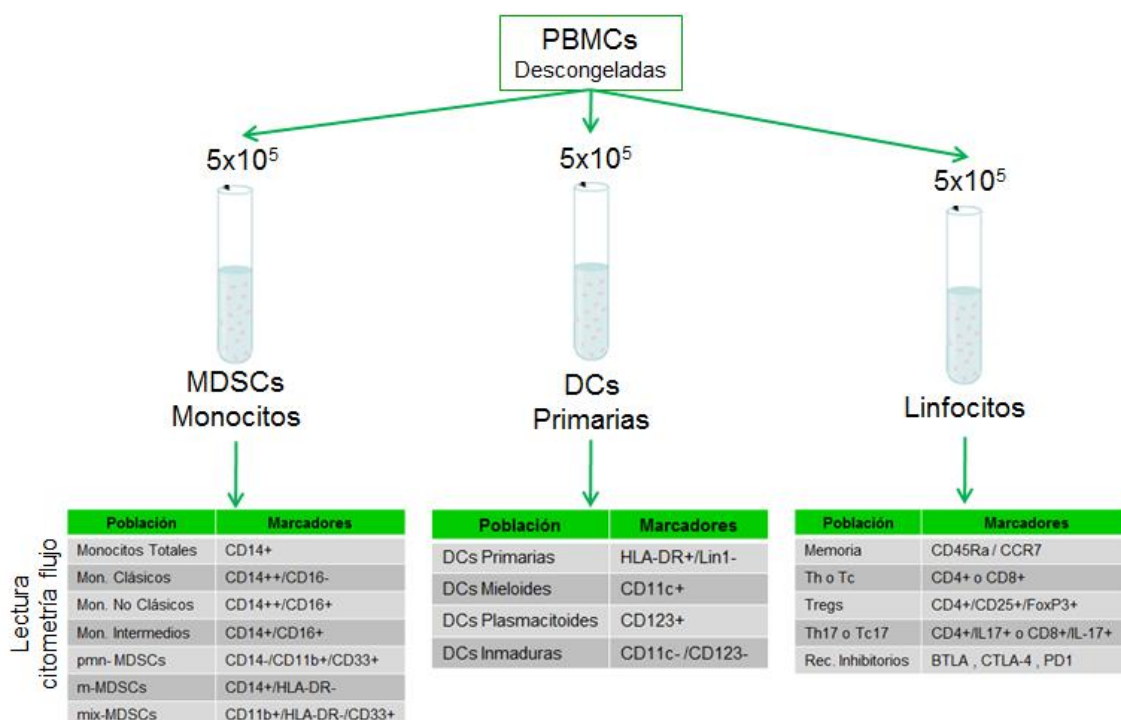


Figura 9. Procedimiento de marcación y caracterización de las distintas poblaciones ex vivo a partir de PBMCs de individuos pertenecientes a cada uno de los 5 grupos de individuos estudiados. Una vez descongeladas las PBMCs de los individuos participantes en el estudio, se dispensaron 5×10^5 células a tres tubos de citometría de 5 mL. Paso seguido, las PBMCs se marcaron *ex vivo* con uno de los paneles de anticuerpos detallados en la Tabla 3, y se realizó la lectura en citometría de flujo. A partir del tubo 1 se identificaron las poblaciones (i) monocitos y MDSCs (tabla izquierda), (ii) células dendríticas primarias (centro) y (iii) poblaciones de linfocitos (derecha).

MDSCs y Monocitos

Monocitos

La población de monocitos inicialmente fue seleccionada por los parámetros de tamaño y complejidad SSC-A y FSC-A, paso seguido se seleccionó la población positiva para el receptor CD14. Esta población se clasificó como monocitos totales CD14+ y se cuantificó y analizó entre los diferentes grupos.

A continuación, a partir de la población CD14+ se evaluaron los marcadores CD14 y CD16 con el objetivo de caracterizar tres subpoblaciones de monocitos, definidas como monocitos clásicos (alta expresión de CD14 y no expresaban CD16 (CD14++/CD16-)); monocitos

intermedios, con expresión alta de CD14 y positiva de CD16 (CD14⁺⁺/CD16⁺) y finalmente monocitos no clásicos aquellos con expresión doble positiva para los marcadores CD14⁺/CD16⁺ (Figura 9).

MDSCs

En este trabajo se realizó el análisis *ex vivo* de tres poblaciones de MDSCs dentro de los monocitos presentes en PBMCs. Inicialmente, para la identificación de estas células se seleccionó la fracción mononuclear identificada por su tamaño y complejidad (definida por los parámetros FSC-A y SSC-A).

Paso seguido, a partir de los monocitos totales se seleccionó la población CD14⁻/CD11b⁺, y dentro de esta población las células positivas para el marcador CD33. Estas células se definieron y cuantificaron como pmn-MDSCs (CD14⁻/CD11b⁺/CD33⁺). Por otra parte, de la misma población de monocitos totales, se identificaron y cuantificaron las m-MDSCs, las cuales expresan el marcador CD14 y son negativas para el marcador HLA-DR (CD14⁺/HLA-DR⁻). Finalmente, dentro de la población HLA-DR negativa y CD11b positiva, se seleccionaron las células CD33⁺ con lo cual se definió la población mix-MDSCs (CD11b⁺/HLA-DR⁻/CD33⁺) (Figura 9).

Subpoblaciones de células dendríticas (DCs)

Para monitorear este componente de las APCs, se realizó la evaluación de las subpoblaciones de células dendríticas (DCs) primarias, seleccionando inicialmente la población de monocitos mediante los parámetros de SSC-A y FSC-A. Pasó seguido, se identificaron las DCs totales caracterizadas por expresar HLA-DR y no expresar ninguno de los marcadores incluidos en el coctel de anticuerpos específicos de linaje (CD3, CD14, CD19, CD20, CD56 y CD34) en adelante denominado anticuerpo LIN-1. Por último, dentro de estas DCs totales, se cuantificaron las siguientes tres subpoblaciones de dendríticas: las DC mieloides (HLA-DR⁺ LIN⁻ CD11c⁺); las DC plasmacitoides (HLA-DR⁺ LIN⁻ CD123⁺); y las DC inmaduras, HLA-DR⁺ LIN⁻ negativas para la expresión de CD11c y CD123 (células HLA-DR⁺ LIN⁻CD11c⁻CD123⁻) (Figura 9).

Linfocitos

El panel de linfocitos estuvo compuesto por nueve marcadores, con los que se buscó monitorear *ex vivo* e *in vitro* diferentes poblaciones de linfocitos T por citometría de flujo (Tabla 3). Todas estas, provienen de un “*gate*” general de linfocitos determinada por su baja complejidad (SSC-A) y pequeño tamaño (FSC-A). Paso seguido se realizó la cuantificación de los linfocitos CD8 y CD4 en PBMCs en las diferentes etapas de la carcinogénesis, encontrando las cuatro posibles poblaciones: CD4⁻ CD8, CD4⁺ CD8⁻, CD4⁻ CD8⁺ y finalmente CD4⁺ CD8⁺, seleccionando y cuantificando únicamente las poblaciones positivas para un solo marcador.

Para la evaluación de la población de Treg, se inició la selección de la población CD4⁺ proveniente de los linfocitos totales (tal y como se explicó anteriormente). Paso seguido se seleccionó la población Foxp3 positiva proveniente de la fracción doble positiva para CD4 y CD25. Así mismo, la población de células Th17 se evaluó mediante la cuantificación de la IL-17 intracelular en las células CD4⁺ de forma similar a la obtención de las células Treg.

Finalmente se evaluó la población de linfocitos ayudadores foliculares o Tfh de acuerdo a lo sugerido por Herati et al., (98) en donde se definieron estas células seleccionando inicialmente la población CD4+. Paso seguido, mediante la marcación con CCR7 y CD45Ra, se escogió la población no virgen (excluyendo las células vírgenes CCR7+/CD45Ra+), y de esta población las células con marcación positiva para los marcadores CCR7, PD1 e ICOS (98).

Debido a que esta población de células es sangre periférica es de muy baja abundancia, la evaluación de esta población se realizó mediante su amplificación utilizando el estímulo del TCR mediante el uso de perlas anti CD3, CD28 y CD2.

Además, este panel se utilizó para monitorear de forma automatizada el componente linfoide, mediante el uso de los programas SPADE y CITRUS. Debido a los marcadores CD45Ra y CCR7 es posible evaluar las poblaciones de memoria. Así mismo, el panel permite valorar tres receptores inhibitorios que han sido reportados y estudiando en cáncer entre los que se encuentran PD1, CTLA-4 y BTLA.

2. ENSAYO ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T *EX VIVO*

La estimulación de linfocitos T, in vitro con perlas anti-CD3/CD28/CD2 (T Cell Activation/Expasion Kit – Miltenyi Biotec) se hizo con el fin de establecer el grado de reactividad de células T aun estímulo policlonal del TCR, función que suele estar comprometida en individuos con cáncer (99-101).

Para esto, se sembraron en un plato de 96 pozos fondo plano, dos pozos cada uno con 2×10^5 células. Mientras las células en uno de los pozos se estimularon con perlas anti CD3/CD28/CD2, las células del otro cultivo no se estimularon, con el fin de comparar el grado de internalización logrado en células estimuladas vs. no estimuladas. Después de 24 horas de iniciado el estímulo, las células se transfirieron a dos tubos en los cuales se evaluó además el grado de internalización del CD3, el grado de activación inducida por el estímulo de las células T midiendo la expresión de los marcadores CD25, CD69 y CD154 en células CD3+.

Para calcular el porcentaje de internalización del TCR se seleccionó la población de linfocitos por los parámetros FSC-A y SSC-A. Paso seguido, se evaluó en esta población el porcentaje de células CD3+, seguido de la cuantificación del porcentaje de expresión de este marcador en células sin estimular o estimuladas por 24 horas. El cálculo del porcentaje de internalización del TCR se hizo de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ INTERNALIZACION} = 100 - \left(\frac{\text{CÉLULAS ESTIMULADAS} \times 100}{\text{CÉLULAS NO ESTIMULADAS}} \right)$$

Los datos son graficados como porcentaje de internalización del TCR y corresponde a dicho porcentaje calculado a partir del cambio de MFI de la fluorescencia emitida por el fluorocromo acoplado al anticuerpo anti-CD3 entre las células estimuladas y las no estimuladas con las perlas anti-CD3/CD28/CD2.

Además de evaluar el porcentaje de internalización de TCR, luego del estímulo con las perlas, se evaluó la expresión de los marcadores de activación CD25, CD69 y CD154 en la población CD3+ en respuesta al estímulo como una forma adicional de evaluar el estado “refractario” o

de respuesta al estímulo de los linfocitos T. Para hacer esto se cuantificó el índice de fluorescencia media (MFI) para cada uno de los fluorocromos. Los datos son graficados como delta de expresión de cada marcador en respuesta al estímulo calculado con base en el cambio del MFI emitido por el fluorocromo acoplado a los anticuerpos anti-CD25, anti-CD69 y anti-CD154 en la superficie de células estimuladas y no estimuladas con perlas anti-CD3/CD28/CD2.

3. EVALUACIÓN DE LA MADURACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS *EX VIVO*

La disminución de la capacidad de maduración de células dendríticas en pacientes con cáncer reportada en otros estudios (102-104), nos indujo a evaluar el fenotipo de células dendríticas primarias en sangre y de DCs maduras derivadas *in situ* a partir de monocitos en sangre cultivados por 24 horas en GM-CSF e IL-4 seguido del cultivo por 24 horas adicionales en un coctel de citoquinas pro-inflamatorias como fue descrito previamente por Mailliard (105). Para esto, en dos pozos de una placa de 96 pozos fondo plano fueron sembrados 5×10^5 PBMCs en medio AIMV suplementado con 1000 UI/mL de GM-CSF (factor estimulante de colonias granulocito macrófago) y 750 UI/mL de IL-4 (ambos de Cellgenix), con el propósito de diferenciar monocitos a células dendríticas inmaduras (iDCs).

Posteriormente (24 horas), uno de los pozos se dejó sin ningún estímulo adicional (se marcó como cultivó control iDCs) y las células del pozo adicional fueron cultivadas durante 24 horas más con un coctel de citoquinas (IFN- α (Intron-A; Schering Plough Corp., Kenilworth, NJ), IFN- γ (R&D Systems), IL-6, IL-1 β , TNF- α , (Cellgenix) y Poly I:C (Sigma-Aldrich)) en adelante llamado coctel α DCs, para inducir la diferenciación a iDCs. Luego de cumplidas las 48 horas las células de los dos cultivos fueron cosechadas y marcadas con anticuerpos anti-HLA-DR, LIN, anti-CD11c, anti-CD123, anti-CD80 y anti-CD83 (ver fluorocromos acoplados a estos anticuerpos en Tabla 3). Todo esto, con el fin de cuantificar células dendríticas primarias y además evaluar el grado de maduración de estas y aquellas derivadas de monocitos *in situ* en respuesta al cultivo con las citoquinas GM-CSF e IL-4 y al coctel de maduración α DCs.

Para el análisis por el “software” FlowJo de las dos poblaciones de células dendríticas se seleccionó por tamaño y complejidad (FSC-A/SSC-A) la región de células monocíticas totales. Para su cuantificación las células dendríticas primarias de tipo plasmacitoide, mieloides e inmaduras fueron identificadas como células (HLA-DR+/LIN-/CD11c-/CD123+), (HLA-DR+/LIN-/CD11c+/CD123-) y (HLA-DR+/LIN-/CD11c-/CD123-) respectivamente. El grado de maduración de células dendríticas derivadas *in situ* a partir de monocitos y de células dendríticas primarias totales fue establecido comparando el aumento en la expresión de las moléculas CD80 y CD83 (MFI) en monocitos (seleccionados por FSC-A/SSC-A) y células monocíticas HLA-DR+/LIN respectivamente. En los dos casos los resultados se presentan como las veces de incremento (*fold increase*) de la expresión de CD80 y CD83 en las células tratadas DCs maduras con respecto a las no tratadas con el coctel de maduración α DCs (iDCs).

FLUORESCENCIA MENOS UNO

Dada la complejidad de la citometría empleada en los de paneles de anticuerpos utilizados (10 canales de fluorescencia) se requirió evaluar la especificidad de tinción de cada anticuerpo fluoro-marcado comprendido en cada panel. Para esto, se realizó un control conocido como Fluorescencia Menos Uno (FMO en inglés), que consiste en la evaluación del ruido de fondo en

cada canal generado por la adición de los fluorocromos de los canales restantes, pudiendo así determinar la diferencia entre la muestra totalmente sin marcar (blanco) y con el control de tinción para ese canal el punto de corte ideal para establecer la población positiva. En la Figura 10 se muestra cada uno de los canales, en donde se marca la muestra con todos los anticuerpos utilizados retirando uno de los anticuerpos y observando si la marcación de este faltante realmente se pierde (recuadros rojos). Este proceso se repite con cada uno de los 10 anticuerpos y se realiza una matriz la cual permite determinar el punto de corte positivo o negativo en las diferentes sub-poblaciones analizadas.

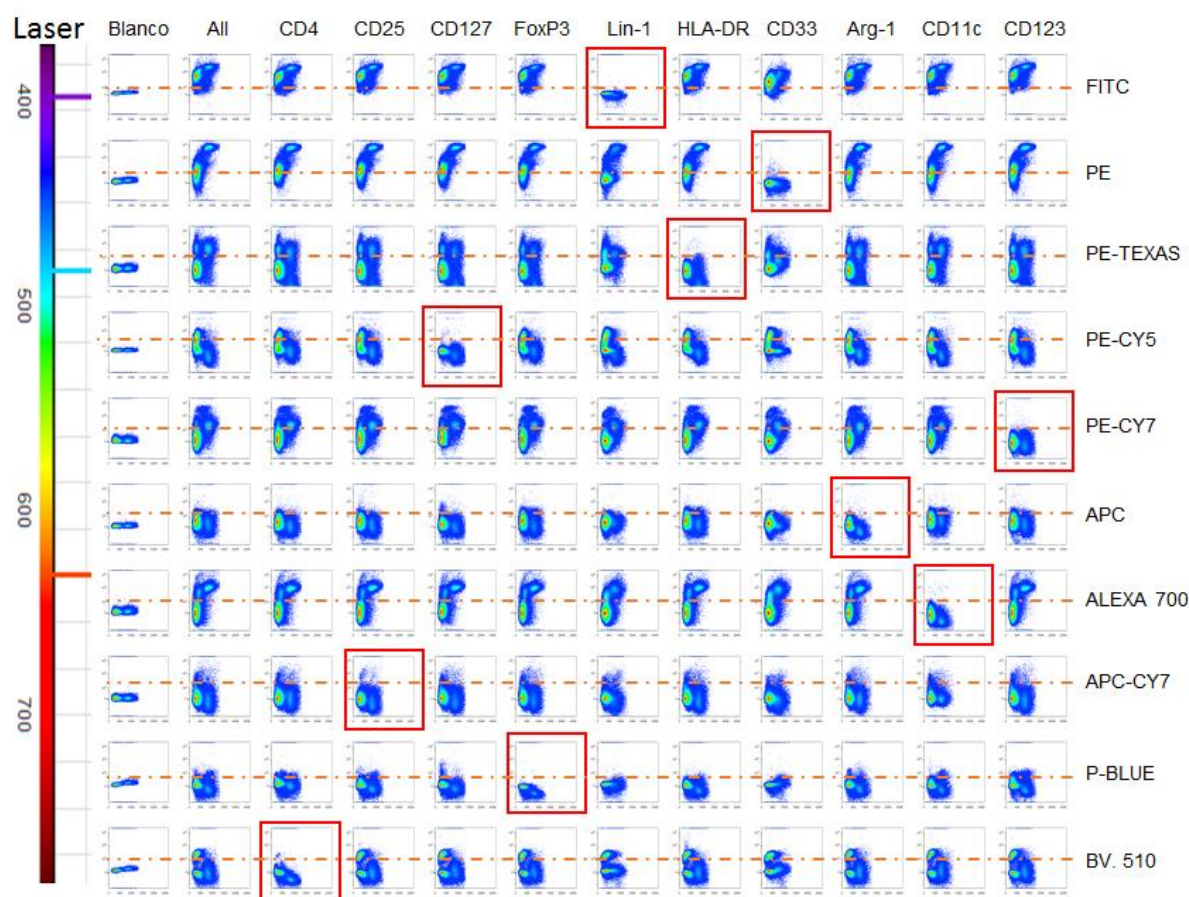


Figura 10. Fluorescencia Menos Uno (FMO) para panel de 10 anticuerpos. Esquema de control de fluorescencia a menos uno para el control de la marcación de la muestra con un set de 10 anticuerpos diferentes. Se observa como a pesar de tener una gama extensa de colores, cada una de los anticuerpos tiñe las células de manera altamente específica. La especificidad de la tinción se evidencia por la ausencia de señal en el respectivo canal de fluorescencia cuando el anticuerpo marcado con el Fluorocromo específico para el canal analizado ha sido omitido de la mezcla (no se evidencia señal), no obstante la muestra ha sido incubada con los otros nueve anticuerpos fluoro-marcados que componen la mezcla (recuadros rojos).

ANÁLISIS DE INMUNOHISTOQUÍMICA BIOPSIAS GÁSTRICAS

Las biopsias de la mucosa gástrica se obtuvieron de la región no ulcerada adyacente al sitio de la lesión en los pacientes con patología diferente a cáncer o fueron tomadas de la región tumoral en los pacientes con cáncer, procedimiento que fue realizado por el gastroenterólogo encargado, el Dr. Martin Gómez, en la Unidad de Gastroenterología del Hospital El Tunal ESE.

Paso seguido, las muestras de aproximadamente 3x5 mm se fijaron en buffer de formalina y se incluyeron en los bloques de parafina. A partir de estos bloques se realizó la generación de las láminas cargadas, una de ellas, fue teñida con hematoxilina-eosina y utilizada para la determinación del grado histológico del paciente, la cuantificación del grado de inflamación y la presencia/ausencia de *H. pylori*, proceso que se realizó en compañía del patólogo el Dr. Yobany Sánchez, siguiendo el sistema de clasificación de Sydney (77, 106).

La marcación por inmunohistoquímica se realizó en las láminas cargadas para cada uno de los pacientes siguiendo el protocolo utilizado en el laboratorio de patología clínica de la Universidad Nacional de Colombia, basado en la técnica de revelado con polímero de peroxidasa (Figura 11) y que se resume a continuación.

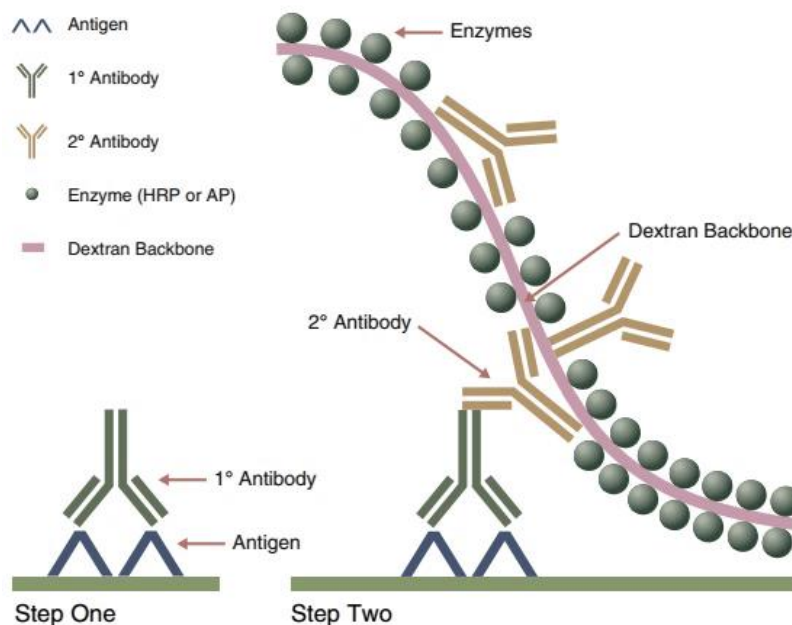


Figura 11. Estructura del polímero de Peroxidasa utilizado para la marcación de Inmunohistoquímica. Tomado de Dako Education Guide (107).

A las láminas seleccionadas para la tinción luego de ser desparafinadas y rehidratadas, se les realizó el procedimiento de recuperación antigénica utilizando un buffer pH 6 (Novocastra – Leica Biosystems) durante 40 minutos a 98°C (vaporera eléctrica). Paso seguido, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con solución de metanol y peróxido al 0.3%. Después de esto, se delimitó el tejido utilizando un marcador hidrofóbico (DAKOPEN) y se agregó el anticuerpo primario. Dos horas después de la incubación se agregó el polímero de peroxidasa EnVision+Dual Link System anti ratón/conejo (DAKO – K4061) durante 30 minutos. Finalmente, se reveló la actividad peroxidasa utilizando el sistema cromogénico basado en di-amino bencidina líquida (DAB) (Dako).

La lectura de las láminas se llevó a cabo en el laboratorio interfacultades de patología anatómica de la Universidad Nacional con un microscopio óptico (Eclipse E600, Nikon), el cual tiene acoplada una cámara digital de alta resolución (Eclipse DXM1200, Nikon) que se controla con un “software” para ajuste de variables ópticas (Automatic Camera Tamer, ACT-1, Nikon).

Al evaluar parámetros de identificación de marcación de revelado con peroxidasa de rábano, se encontró que se debe utilizar un foco de 0.71, con una exposición de 6MAX a un aumento de 40x, tomando fotografías campo de por medio para realizar un escaneo total del corte, dichas imágenes se analizaron finalmente por medio del “software” CELLPROFILER.

GENERACIÓN DE LA PLANTILLA DE ANÁLISIS—“SOFTWARE” CELLPROFILER

La cuantificación de la marcación por inmunohistoquímica y su análisis usualmente es realizado por patólogos expertos, sin embargo, esta metodología tiene ciertos inconvenientes, principalmente la subjetividad del investigador y lo dispendioso del trabajo, especialmente cuando se desea aplicar en procesos masivos, con gran cantidad de láminas y marcadores.

CellProfiler v2.1.1 (Board Institute) es un “software” libre especializado, que se utiliza para la cuantificación de imágenes biológicas obtenidas a través de microscopía óptica. Este “software” está diseñado a partir de módulos que permiten medir el tamaño celular, su forma y su intensidad de marcación (fluorescencia o DAB) (108).

Mediante una interfaz gráfica se genera una secuencia de comandos de acuerdo al tipo de análisis requerido por el investigador (*pipeline*), en donde se seleccionan e incluyen los módulos requeridos para que paso a paso se procese la imagen y se obtenga la cuantificación deseada (Figura 12). Una vez generado el “*pipeline*”, el “software” es capaz de cuantificar los fenotipos de miles de imágenes de forma automática, y exportar un archivo en Excel en donde se muestra el área positiva de marcación, para cada una de las imágenes.

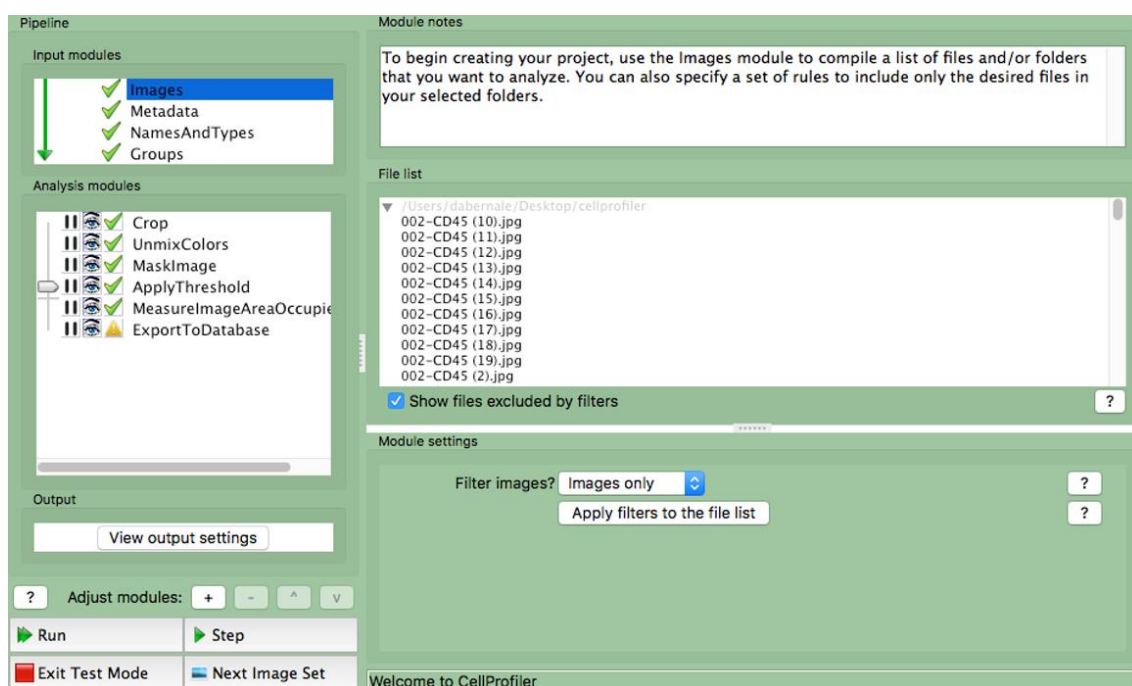


Figura 12. Interfaz “CellProfiler” para la generación de la plantilla de análisis automatizado (Pipeline).

Se digitalizaron fotografías representativas (70 – 80% del área total de la muestra) de cada una de las láminas marcadas por la técnica de IHQ y reveladas con peroxidasa, en un microscopio óptico (aumento de 40x) acoplado a una cámara de 20MPX con ajuste automático de exposición, balance de blancos y sensibilidad (ISO). Paso seguido las imágenes se cargaron al

“software” CellProfiler, y se inició el proceso de generación de la secuencia de análisis mediante la cual fue posible cuantificar la marcación positiva para cada uno de los marcadores utilizados, valor correspondiente al grado de infiltración inmune en el tejido gástrico.

El “pipeline” generado para la cuantificación de la marcación positiva se compuso de 6 módulos. En el primero – **CROP**– se estableció la ubicación de los archivos con las imágenes originales en formato *.jpg, y se realizó una selección de la muestra (recorte), descartando los bordes y espacios vacíos (configuración de punto central y un radio en píxeles en X y Y).

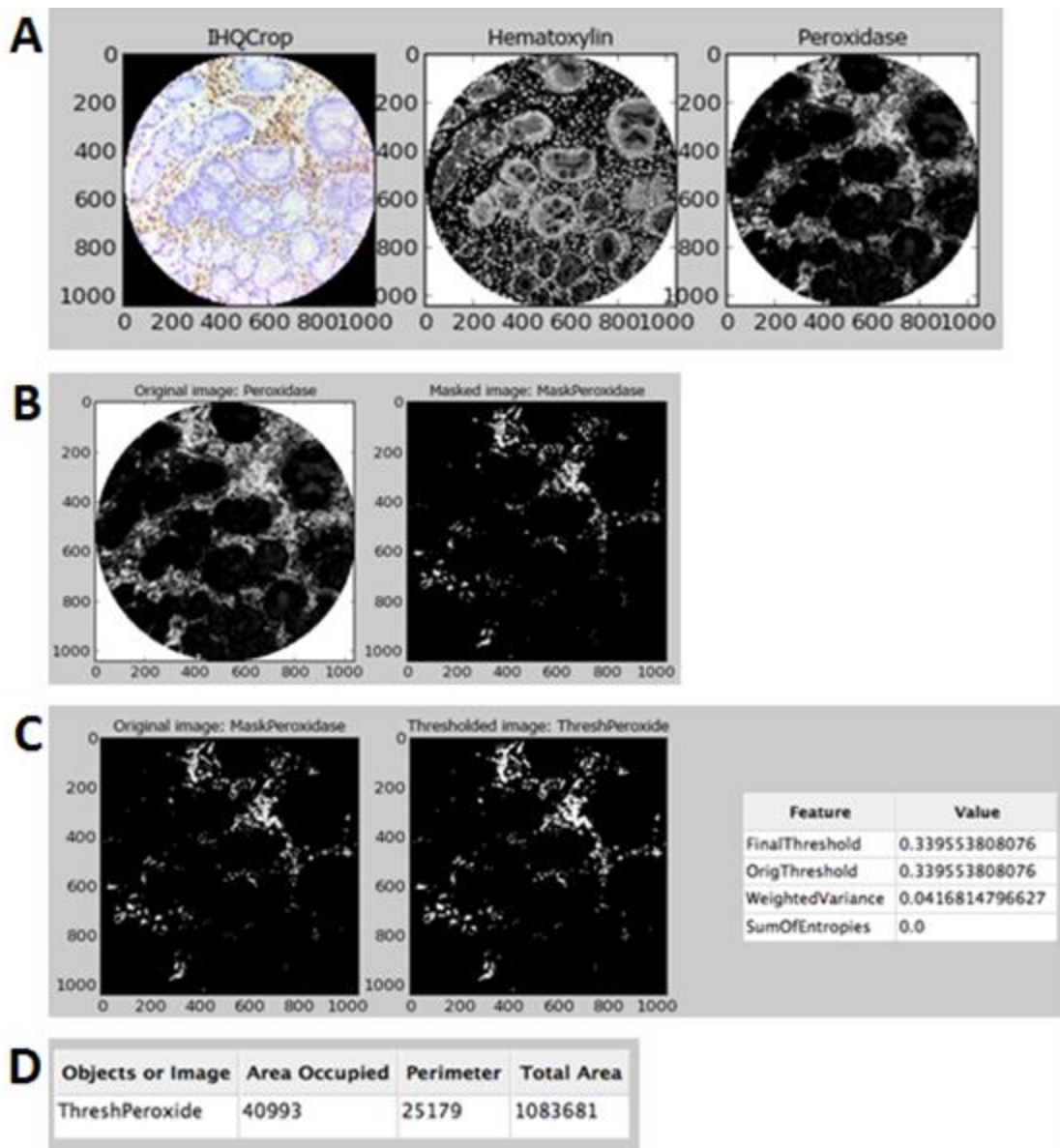


Figura 13. Módulos de análisis para la cuantificación positiva de la marcación por inmunohistoquímica de forma automatizada. Se describen cada uno de los pasos establecidos en el pipeline: (A) Unmixcolors, (B) Mask Image, (C) Apply Threshold, (D) Measure image area Occupied.

El segundo módulo, - **UNMIXCOLORS**– se configuró basándose en la capacidad de absorción de luz, combinación de los canales rojo, verde y azul. En este módulo, se separó la imagen original en canales y convirtió cada canal en una imagen en escala de grises, omitiendo el ruido de

fondo. Para fines de análisis, se seleccionó la imagen recortada (IHQ CROP), y separó la tinción con hematoxilina (azul-morado) de la tinción de peroxidasa (naranja-café) (Figura 13A).

El tercer módulo, - **MASK IMAGE**– oculta o ignora ciertas porciones de la imagen (basándose en los objetos previamente identificados). En el caso de este análisis, a partir de la imagen positiva para la tinción con peroxidasa en escala de grises, se produjo una máscara en donde sólo se tienen en cuenta los píxeles de interés, eliminando de la imagen los bordes blancos, y el ruido de fondo (Figura 13B)

El cuarto módulo -**APPLY THRESHOLD** – establece el punto de corte a partir de la intensidad de los píxeles en la imagen, llevando a cero aquellas intensidades arriba o abajo del umbral, produciendo así, una imagen binaria. En el caso del análisis, a partir de la imagen máscara generada, se calcula un umbral específico por fotografía, y se establecen en blanco las áreas realmente positivas (Figura 13C).

El penúltimo módulo -**MEASURE IMAGE AREA OCCUPIED** – analiza la imagen binaria final (ThreshPeroxide), y reporta la suma de las áreas y perímetros del objeto de interés (en blanco) midiendo el número de píxeles positivos que se encuentran por encima del umbral establecido en el paso anterior (Figura 13D).

Finalmente, en el módulo -**EXPORT TO DATABASE** - los resultados de todas las imágenes se exportan a un archivo de texto separado por tabuladores, a partir del cual se puede analizar en programas estadísticos o en Excel.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y MULTIVARIADO

En este estudio se estableció un tamaño de muestra de 20 pacientes por grupo, los grupos están basados en las 5 categorías establecidas de lesión gástrica; tamaño de muestra con un poder de 82% que permitió determinar diferencias entre las medias de los valores con un nivel de significancia de 0.05% (valor p) con un estimado de la desviación estándar de 10.

La media de los porcentajes de las sub-poblaciones de células en sangre y los niveles de maduración de citoquinas y estado de reversión fueron comparados entre los diferentes estadios mediante análisis de varianza ANOVA de dos vías. Posteriormente se realizó una prueba post-test para determinación de diferencias entre grupos (prueba de Bonferroni) (109-111). Los valores p fueron significativos de la siguiente forma: 0.05 (*), 0.01 (**) o 0.001 (***). Los datos se analizaron utilizando el “*software*” Prism v5 (Graph Pad).

INMUNO-MONITOREO POR CITOMETRIA DE FLUJO DE APCs Y LINFOCITOS T PRESENTES EN PBMCs DE PACIENTES CON LESIONES BENIGNAS Y MALIGNAS DE LA MUCOSA GASTRICA (ANÁLISIS MANUAL)

RACIONAL

El cáncer gástrico de tipo intestinal es una patología que se desarrolla en un tiempo prolongado, en el que la carcinogénesis es causada en parte por una respuesta inflamatoria a la infección crónica por el *H. pylori*. De otro lado, se considera que en el cáncer gástrico, como en otros tumores, la evasión de la inmuno-vigilancia de las células tumorales al sistema inmune está asociada a una supresión de distintos componentes celulares de la respuesta inmune.

Por lo anterior, el monitoreo de distintas sub-poblaciones de leucocitos en sangre periférica ha sido utilizado con el propósito de determinar el grado de disfunción inmune en los pacientes con cáncer (93). Con el fin de implementar mediciones inmunológicas conducentes a identificar posibles biomarcadores inmunológicos en cáncer gástrico de tipo intestinal, en este trabajo se monitorearon en PBMCs de individuos sanos y con lesiones de la mucosa gástrica (gastritis crónica, metaplasia intestinal, cáncer temprano y cáncer avanzado), la presencia *ex vivo* y el inmuno-fenotipo de distintas sub-poblaciones de monocitos, MDSCs y células dendríticas, así como de distintas sub-poblaciones de linfocitos T CD8+ y CD4+ totales, linfocitos T CD4+ supresores (Tregs), Th17 y TFh. Adicionalmente se exploró la inmuno-competencia tanto de las DCs como de linfocitos T para responder a sendos estímulos *in vitro*.

INMUNO-MONITOREO DE APCs

ESTADO DEL ARTE

MONOCITOS CD14/CD16

Los monocitos son células del sistema inmune innato que juegan un papel importante en procesos inflamatorios involucrados en la generación de inmunidad. Esta población de leucocitos, se desarrolla en la médula ósea a partir de monoblastos, los cuales se liberan a la periferia en donde, como precursores mieloides, responden eficientemente a estímulos pro-inflamatorios (p. ej., citoquinas y quimioquinas) y entran a los tejidos en donde se diferencian a macrófagos tisulares en procesos celulares determinados por el microambiente (112, 113).

Hasta hace pocos años, los monocitos se clasificaron como inflamatorios y no inflamatorios a partir de sus atributos funcionales *ex vivo*, sin embargo, esta clasificación es confusa ya que las propiedades funcionales de estas células van más allá de una respuesta inflamatoria (112). Actualmente, la nomenclatura clasifica estas células en monocitos clásicos (114) y no clásicos (115).

Además, en sangre esta población heterogénea de células se divide en tres subpoblaciones dependiendo de la expresión de los marcadores CD14 y CD16. La sub-población de monocitos clásicos (CD14⁺⁺ CD16⁻) constituye en condiciones fisiológicas la mayor parte de los monocitos; quienes en respuesta a LPS, secretan grandes cantidades de IL-10. La sub-población de monocitos intermedios (CD14⁺⁺ CD16⁺), representan un estadio intermedio en la diferenciación de monocitos a macrófagos y finalmente la subpoblación de monocitos no clásicos (CD14⁺ CD16⁺), son monocitos que en respuesta a LPS sintetizan altas cantidades de TNF- α y bajas cantidades de IL-10 en comparación con los monocitos clásicos, por lo que se les considera monocitos maduros similares a los macrófagos residentes en tejidos (113). Asimismo, esta población tiene un papel en la inflamación, en la respuesta a agentes infecciosos, en sepsis, así como en la patogénesis de algunos tumores (16, 116).

En el proceso de inflamación de la mucosa gástrica mediado por *H. pylori*, se ha descrito un infiltrado de monocitos y macrófagos durante el desarrollo de la gastritis crónica. En este proceso la bacteria induce supresión a través de la producción de Hp(2-20) (cecropin-like *H. pylori*-derived peptide) (117), que estimula a los monocitos a generar radicales de oxígeno derivados de la NADPH-oxidasa, que suprime la función de las células NK y linfocitos T mediante la inducción de apoptosis en éstas células (118, 119).

En cáncer, el papel de los monocitos no está aún bien definido, inicialmente se le atribuyó a la población de monocitos no clásicos (CD14⁺ CD16⁺) un papel antitumoral debido a la producción de TNF- α , IL-12P40 e IL-12P70 durante su interacción con células tumorales *in-vitro* (120). Sin embargo, en estudios más recientes, a los monocitos que se diferencian a macrófagos e infiltran los tumores se les ha atribuido un importante papel en la inmunoregulación, angiogénesis y capacidad de metástasis de algunas células tumorales (121, 122).

Por consiguiente, en el caso del cáncer gástrico ha sido descrita una disminución en sangre de los monocitos clásicos (CD14++ CD16-) a expensas de un aumento en la cantidad de TAMs (macrófagos infiltrantes de tumor) los cuales tienen carácter anti-inflamatorio reflejado en la secreción de IL-10 y baja producción de TNF- α , razón por la cual la infiltración tumoral por estos macrófagos es un factor de pronóstico desfavorable en este tipo de cáncer (123).

CÉLULAS SUPRESORAS DE ORIGEN MIELOIDE (MDSCs)

Dentro de las APCs, las MDSCs representan el componente supresor de la respuesta inmune más importante, razón por la cual, establecer el papel de estas células en la respuesta anti-tumoral ha sido motivo de interés en la investigación en cáncer en los últimos años.

(Autor, año - referencia)	Población estudio	Resultado	Definición MDSCs							
			HLA-DR	LIN	CD14	CD45	CD11b	CD33	CD15	p-STAT1
Fu et al., 2011 - (124)	Pacientes C. Gástrico (n=43)	PBMCs entre estadio I/II y estadio III/IV (MD= 1.64, 95% IC= (0.68-2.59), P=0.0015)	-	-	-					
Zhuang et al., 2012 - (125)	Pacientes con C. Gástrico después de cirugía (n=103)	MDSCs/ CD45+ entre estadio I/II y III/IV (MD=15%, 95% IC= (3.67-26.33) P<0.01)			-	+	+	+		
Wang et al., 2013 - (126)	Pacientes C. Gástrico (n=40)	PBMCs entre estadio I/II y estadio III/IV (MD= 12.62%, CI= (10.82-14.42), P<0.0001)	-	bajo/-	-		+	+	+	
Ye et al., 2015 - (127)	Pacientes C. Gástrico (n=77)	PBMCs entre estadio I y II/III/IV (MD= 12.05, CI= (0.22-23.88), P=0.046)	-		+					
Xia et al., 2014 - (128)	Pacientes con C. Gástrico después de cirugía (n=38)	Respuesta Clínica en pacientes con niveles altos vs. bajos en PBMCs, p > 0.05	-	-				+		
Dong et al., 2013 - (129)	Pacientes con C. Gástrico IIIa después de cirugía (n=100)	Respuesta Clínica niveles altos vs. bajos en Tumor, sobrevida y tiempo sin recaída, p < 0.0001						+		+
Gabitass et al., 2011 - (17)	Pacientes con C. Gastrointestinal (n=123)	Respuesta Clínica MDSCs >2% vs <2% en PBMCs, Sobrevida (HR=16.1, 95% CI= (3.08-84.27), P<0.001) p>0.005 en diferencia estadios	-	bajo/-			+	+		
Mundy-Bosse et al., 2011 - (130)	Pacientes con Cáncer Gastrointestinal (n=40)	2 veces de incremento en frecuencia de MDSCs CD14+ asociado a disminución de muerte (HR = 0.69; 95% CI: 0.49–0.97; P = 0.033)	-		+			+		
INMUNO-MONITOREO	Pacientes en uno de los 5 grupos: GASTRITIS, METAPLASIA, CANCER TEMPRANO, CANCER AVANZADO	Identificación m-MDSCs (similares a monocitos)	-		+					
		Identificación pmn-MDSCs (similares a neutrófilos)			-		+	+		
		Identificación mix-MDSCs (mezcla población m y pmn)	-				+	+		

Tabla 4. Revisión de estudios en los que se ha analizado el desempeño de las células MDSCs en la etiología del cáncer gástrico. Se resaltan los marcadores utilizados para evaluar MDSCs en diferentes estudios de pacientes con cáncer gástrico. En gris, los marcadores utilizados en el presente estudio para la identificación de distintas subpoblaciones de MDSCs.

Hoy en día se sabe que varias citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas secretadas por las células tumorales inducen un aumento de la frecuencia de MDSCs en sangre, en nódulo linfático y en tejido tumoral (131) por lo que el grado de infiltración de los tumores por éstas células tiene valor predictivo y pronóstico. Se ha descrito que estas células ejercen su función supresora mediante la expresión de arginasa (ARG1), NOS inducible (iNOS) (132-134), TFGβ (135, 136), IL-1β (137), IL-10 (138) y COX2 (139, 140). Además de lo anterior, el secuestro del aminoácido cisteína (141), la disminución de la expresión de la L-selectina en las células T (142) y la inducción Tregs (143) contribuyen a la supresión inducida por MDSCs.

En relación con su identificación, en humanos las MDSCs se encuentran en la fracción de células mononucleares y contrario a las identificadas en ratones, estas células expresan una gran heterogeneidad de marcadores celulares lo cual dificulta su definición como población y su evaluación funcional. Las MDSCs se clasifican principalmente en: (i) células progenitoras mieloides y células mononucleares inmaduras similares a monocitos (*m-MDSCs*) y (ii) células polimorfo nucleares inmaduras (pmn) con una morfología similar a la de los neutrófilos (*pmn-MDSCs*) (144).

Las *m-MDSCs* suprimen la respuesta de las células T (específicas o no de antígeno) y muestran una actividad supresora más fuerte que las *pmn-MDSCs*, estas células, ejercen su función supresora principalmente a expensas de la producción de NO y citoquinas (revisado en (145)). Por el contrario, las *pmn-MDSCs* son capaces de suprimir la respuesta inmune de una manera antígeno-específica mediante la producción de ROS y la generación de peroxinitrito (PNT) (reacción del NO con superóxido) el cual inhibe la respuesta inmune celular en parte debido a procesos de nitrilación de residuos de amino-ácidos en el TCR y el MHC, esto impide el reconocimiento del antígeno por los linfocitos T (146-148). En cáncer gástrico se han adelantado varios estudios en los que se ha evaluado el comportamiento de las MDSCs (Tabla 4). A estas células se les ha atribuido un carácter inmuno-supresor en pacientes con cáncer, asociado con altos niveles de MDSCs tanto en sangre periférica como en el microambiente tumoral lo cual está relacionado a una mayor mortalidad, recaída y progresión del tumor. Sin embargo, la heterogeneidad de marcadores utilizados para detectar y analizar a las MDSCs en los diferentes estudios (Tabla 4), ha dificultado enormemente la comparación de resultados entre estos.

Por esta razón la evaluación de MDSCs en este trabajo se hizo con base en marcadores utilizados en artículos previos, en los que se evaluó el valor pronóstico de estas células en cáncer gástrico, para lo cual se tuvo en cuenta el análisis de diferentes poblaciones de MDSCs: similares a monocitos (*M-MDSCs*), similares a neutrófilos (*pmn-MDSCs*) y una mezcla de las dos, tal y como lo recomienda Marvel y Col., (145).

CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs)

Las células dendríticas (DCs) son células presentadoras de antígeno profesionales (APC) que ejercen funciones de puente entre la respuesta inmune innata y adaptativa. Dentro de sus funciones principales está la presentación de antígenos a las células T, ejerciendo una función de inmuno-regulación importante (149). Debido al eficiente estímulo de las células T y el efecto de inmuno-modulación de la respuesta celular, las DCs son consideradas las células más importantes del compartimiento APC (150, 151).

Por su parte, en sangre se presentan ciertas dificultades a la hora de diferenciar estas células de los monocitos y macrófagos debido a la estrecha relación entre linajes, ya que los monocitos pueden diferenciarse a DCs (152) y las DCs pueden diferenciarse a macrófagos (153). Aunque las DCs en sangre no tienen las mismas características de DCs residentes en tejidos, estas se identifican por expresar altos niveles de HLA-DR (MHC-II) y ser negativas para los marcadores CD3, CD14, CD19, CD20, CD56 y CD34 (células del linaje de leucocitos negativo (LIN-)) (145).

Asimismo, en sangre periférica el compartimento de leucocitos LIN-/HLA-DR+ está compuesto por tres sub-poblaciones de DCs: las DC mieloides (mDCs) que expresan el marcador CD11c y las DC plasmacitoides (pDCs), productoras eficientes de interferones tipo I, caracterizadas por no expresar CD11c, pero sí el dominio alfa del receptor de IL-23 (CD123) (112). Dentro de este compartimento, a las células LIN-/HLA-DR+ que son CD11c-/CD123- se les considera células dendríticas inmaduras (154).

A diferencia de las DCs en el modelo murino, las sub-poblaciones de DCs en el humano no están definidas por su origen mieloides o linfoides sino por propiedades funcionales, como la producción de ciertas citoquinas en respuesta a los patógenos y la distribución tisular que les permite interactuar en órganos linfoides con distintas sub-poblaciones de leucocitos (155). Las pDCs reconocen componentes virales y secretan grandes cantidades de IFN tipo I, con lo cual contribuyen a la respuesta inflamatoria aguda y la diferenciación de células B a plasmocitos productores de anticuerpos de forma dependiente o no de linfocitos T (156). Sin embargo, estas células ejercen funciones tolerogénicas e inmuno-supresoras de los linfocitos T en respuesta a algunos estímulos mediante la producción deIDO, lo cual favorece la generación de Tregs, y la secreción de granzima B (GrB) que induce la apoptosis y suprime la proliferación de linfocitos T efectores (156).

Por su parte las mDCs reconocen eficientemente PAMS (patrones de reconocimiento de patógenos) bacterianos y de esta forma producen citoquinas como la IL-12, importante para la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia el fenotipo Th1 y que además promueve la actividad citotóxica de linfocitos T CD8+ y NKs. Las mDCs exhiben una gran plasticidad para responder a estímulos pro-inflamatorios y a su vez responden produciendo una gama de quimoquinas y citoquinas (TGF- β , GM-CSF, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-23) que modulan eficientemente la diferenciación de linfocitos T CD4+ vírgenes hacia los subtipos celulares Th1, Th2 y Th17 (157, 158).

Una vez las células dendríticas inmaduras capturan antígenos, estas se transforman en DCs maduras que estimulan eficientemente las células T. Esta transformación es inducida por el reconocimiento de patógenos, por estímulos pro-inflamatorios (citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α) o por señales de daño tisular (colágeno y matriz extracelular). Tras la maduración, las DCs aumentan la expresión de moléculas de adhesión y co-estimulación y secretan citoquinas. Por su parte, las células dendríticas inmaduras no proporcionan señales co-estimuladoras apropiadas a las células T, con lo cual pueden generar anergia en linfocitos y el aumento de células T reguladoras.

En relación con el cáncer, la disminución en número de DCs, su fenotipo inmaduro caracterizado por la expresión deficiente de moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86) y la

baja capacidad para estimular una respuesta efectora de las células T ha sido reportado en pacientes con distintos tipos de tumores y son algunas de las razones por las que las células tumorales escapan de la inmuno-vigilancia del sistema inmune (13, 159, 160). También se sabe que los pacientes pueden adquirir una respuesta adaptativa frente a antígenos asociados a tumor (TAAs), capaz de generar una respuesta antitumoral efectiva, la cual se correlaciona con una mayor sobrevida. No obstante, en distintos tipos de cáncer las DCs circulantes y aquellas que infiltran los tumores están reducidas en número y exhiben dificultad para madurar en respuesta a estímulos pro-inflamatorios (161, 162). En consecuencia, las iDCs en pacientes con cáncer no solo pierden su capacidad de activar linfocitos T vírgenes sino que inducen tolerancia gracias al aumento en la producción de citoquinas como IL-10, IL-6 y GM-CSF (163-166).

Particularmente en el caso del cáncer gástrico, el grado de infiltración de los tumores por DCs se correlaciona con una disminución de la metástasis, un aumento en la apoptosis tumoral y un mejor pronóstico clínico de la enfermedad (18, 167). Por el contrario, la producción aumentada de iNOS en carcinoma gástrico se relaciona con la secreción de VEGF que inhibe la maduración de DCs y reduce la infiltración del tumor por estas células (168-170). Además, algunos tumores gástricos expresan Granenzima B, que destruye linfocitos citotóxicos anti-tumorales y células dendríticas en el microambiente tumoral (171, 172).

RESULTADOS

EVALUACIÓN MONOCITOS CD14/CD16

Para evaluar los monocitos en individuos (n=5) de cada uno de los cinco grupos, inicialmente se seleccionó dentro de las PBMCs una población de células con la complejidad celular propia de monocitos (determinada por SSC-A) que a su vez expresan el marcador CD14. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas, el análisis de esta población CD14+ evidenció que mientras en los pacientes con cáncer avanzado la población de monocitos tiende a estar aumentada, estas células tienden a estar disminuidas en sangre de pacientes con metaplasia (Figura 14).

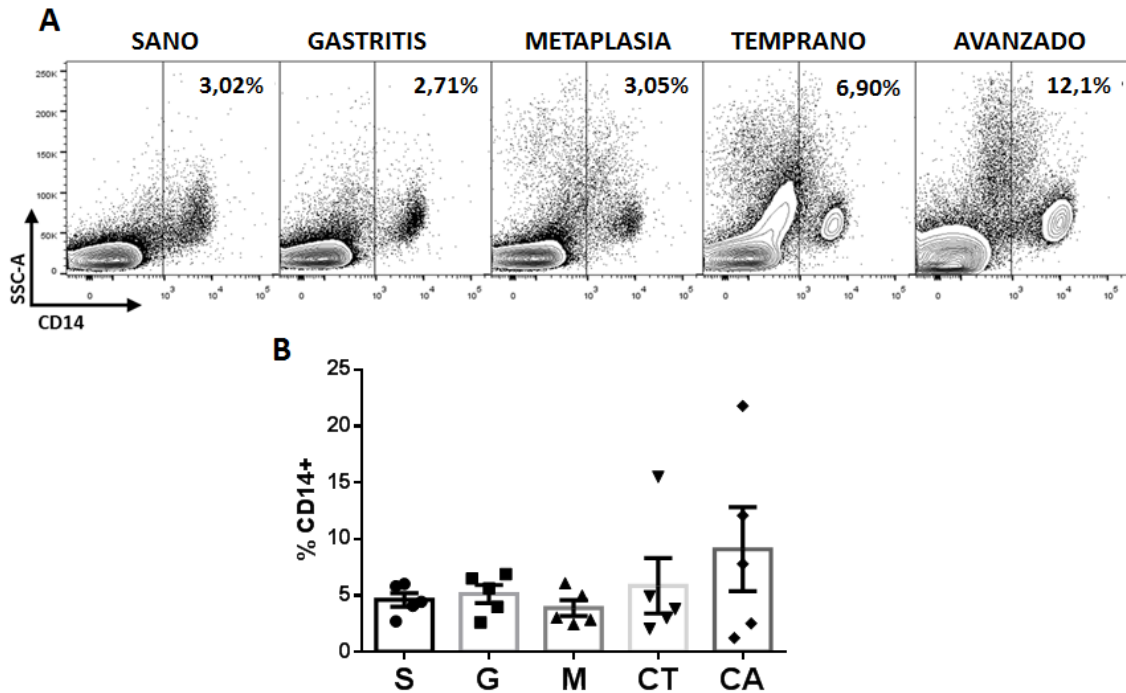


Figura 14. Análisis de la población de monocitos (definidos por SSC-A y CD14+) en PBMCs de individuos con diferentes lesiones de la mucosa gástrica. (A) Imagen representativa del análisis de monocitos definidos por SSC-A y CD14+ presentes en PBMCs de individuos de cada uno de los grupos de estudio analizados. (B) Cuantificación del porcentaje de la población de monocitos CD14+/SSC-A en individuos (n=5) de cada grupo.

Una vez determinado el porcentaje de monocitos, se analizó en las células CD14+, la expresión de los marcadores CD14 y CD16. En los monocitos así seleccionados se analizaron tres subpoblaciones: (i) **monocitos clásicos** los cuales expresan cantidades altas de CD14 y no expresan el marcador CD16 (células CD14⁺⁺ CD16⁻); (ii) **monocitos intermedios** que expresan niveles altos de CD14 e intermedios de CD16 (CD14⁺⁺ CD16⁺) y (iii) **monocitos no clásicos** los cuales expresan ambos marcadores (CD14⁺ CD16⁺) (Figura 15A).

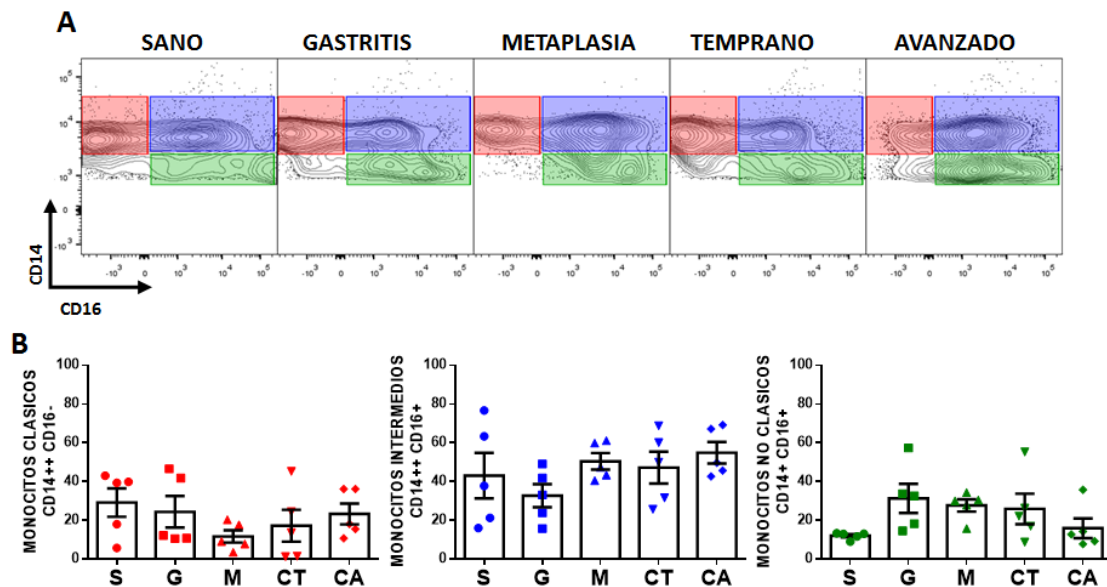


Figura 15. Análisis de las subpoblaciones de monocitos clásicos, intermedios y no clásicos en los diferentes grupos evaluados. (A) Imagen representativa de diagramas de contorno en el que se analiza por citometría de flujo la

distribución de las poblaciones de monocitos clásicos (CD14⁺⁺, CD16⁻, rojo), intermedios (CD14⁺⁺, CD16⁺, azul) y no clásicos (CD14⁺ CD16⁺, verde) dentro de la población de monocitos definidos por CD14⁺ y SSC-A. (B) Cuantificación de la población de monocitos clásicos (panel izquierdo), intermedios (centro) y no clásicos (derecha) en individuos (n=5) de cada uno de los cinco grupos.

La Figura 15B muestra los resultados de la distribución de las sub-poblaciones de monocitos en sangre periférica de individuos (n=5) en los cinco grupos. Este análisis mostró que comparados con los donantes sanos los individuos con metaplasia muestran una discreta disminución de la población de monocitos clásicos (CD14⁺⁺CD16⁻) (panel izquierdo), los pacientes con gastritis muestran una ligera disminución de monocitos intermedios (panel central) y los individuos sanos poseen los niveles más bajos de monocitos no clásicos (panel derecho).

EVALUACIÓN CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS (MDSCs)

A partir de marcadores característicos de células MDSCs (células HLA-DR⁻, CD33⁺ y CD11b⁺) sumado a la expresión positiva o negativa de CD14 y atendiendo diferencias en el origen ontogénico de distintos tipos de MDSCs, en este trabajo se realizó el análisis de tres poblaciones de MDSCs dentro de los monocitos presentes en PBMCs totales como se describe en materiales y métodos. Dentro de las células monocíticas, las pmn-MDSCs fueron definidas como células CD14⁻, CD11b⁺ y CD33⁺ (Figura 16A) y las m-MDSCs como células CD14⁺ HLA-DR⁻ (Figura 16B). Por su parte las mix-MDSCs fueron definidas dentro de las células monocíticas - independientemente de la expresión de CD14 - como una población mixta enriquecida en progenitores mieloides como células HLA-DR⁻ CD11b⁺ CD33⁺ (Figura 16C).

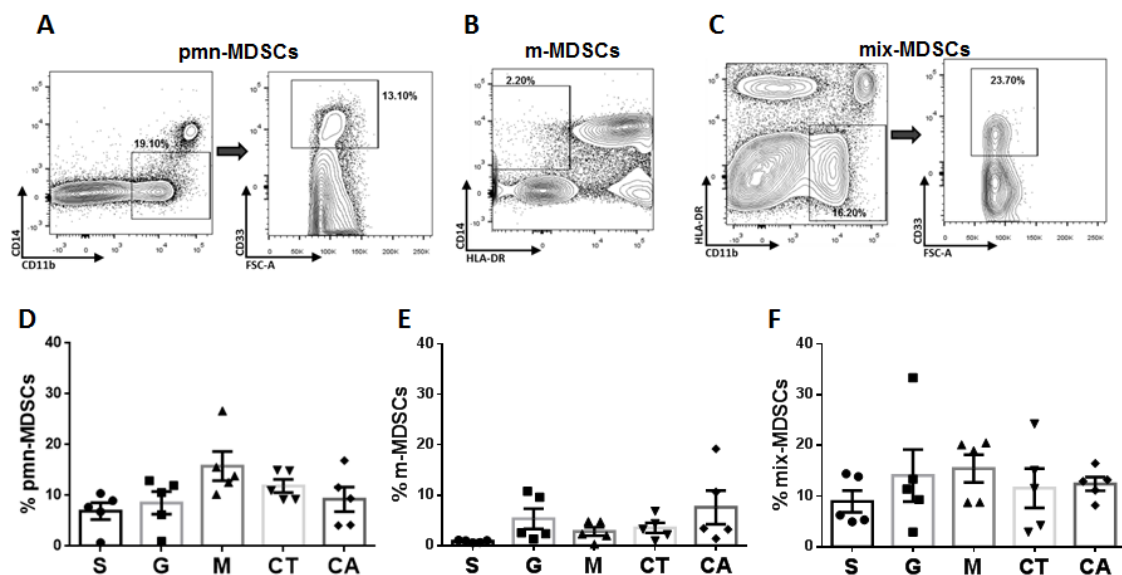


Figura 16. Análisis ex vivo de tres poblaciones de MDSCs en PBMCs de individuos de los 5 estadios de carcinogénesis gástrica estudiados. Esquema para la identificación de (A) pmn-MDSCs, seleccionados como células CD33⁺ dentro de la población CD14⁻/CD11b⁺; (B) m-MDSCs (células CD14⁺/HLA-DR⁻), y (C) MDSCs mixtas seleccionadas como células CD33⁺ dentro de la población CD11b⁺/HLA-DR⁻. (D) Porcentaje de células pmn-MDSCs, (E) m-MDSCs, y (F) mix-MDSCs en PBMCs de cinco individuos en cada uno de los cinco grupos analizados.

Los resultados de la cuantificación porcentual de las diferentes sub-poblaciones de MDSCs mostraron que los pacientes con metaplasia tienen tendencia a tener un porcentaje aumentado de pmn-MDSCs comparado con los demás grupos incluidos los donantes sanos. El

porcentaje de estas células en donantes sanos fue similar al encontrado en pacientes con cáncer (Figura 16D).

Por otra parte, se observó que, dentro de las poblaciones analizadas, las m-MDSCs mostraron los porcentajes más bajos de los tres tipos de MDSCs, siendo los donantes sanos los que poseen los niveles más bajos y los pacientes con gastritis y cáncer avanzado aquellos con los niveles relativamente más altos (Figura 16E).

Finalmente, la población de MDSCs mixta mostró tendencias similares a lo visto en las pmn-MDSCs, con porcentajes aumentados en gastritis y metaplasia en relación a donantes sanos quienes tuvieron niveles ligeramente más bajos que los otros grupos (Figura 16F).

EVALUACIÓN SUBPOBLACIONES DCs

La estrategia para el análisis *ex vivo* por citometría de flujo de tres sub-poblaciones de DCs (i) Mieloides (HLA-DR+ LIN- CD11c+); (ii) Plasmacitoides (HLA-DR+ LIN- CD123+) y (iii) Inmaduras (HLA-DR+ LIN- CD11c- y CD123-) presentes en PBMCs de individuos de los cinco grupos se presenta en la Figura 17A.

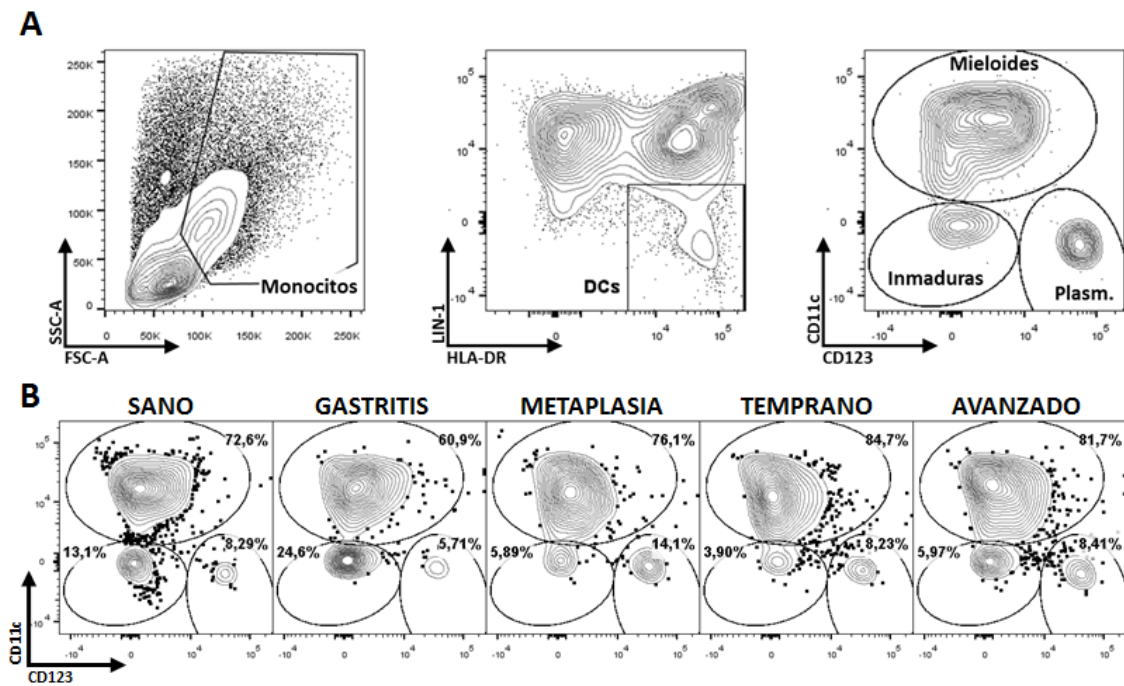


Figura 17. Esquema de la evaluación y cuantificación *ex vivo* de tres subpoblaciones de células dendríticas (DCs) en PBMCs de individuos sanos y con lesiones asociadas al desarrollo del cáncer gástrico. (A) Esquema utilizado para el análisis por citometría de flujo de células dendríticas. Inicialmente la población de monocitos fue delimitada por los parámetros FSC-A y SSC-A (panel izquierdo); en las células contenidas en esa región se seleccionó la población de células dendríticas totales LIN-1/HLA-DR+ (DCs en panel central) y dentro de ellas con base en la expresión diferencial de los marcadores CD11c y CD123 se analizaron las tres sub-poblaciones de DCs así: DCs Inmaduras (CD11c-CD123-); DCs Mieloides (CD11c+CD123-) y DCs Plasmacitoides (CD11c+CD123+). (B) Gráficos de contornos que muestra el patrón de distribución de las tres sub-poblaciones de DCs señaladas en PBMCs de un individuo representativo de cada grupo analizado.

Una vez definidas las tres sub-poblaciones se establecieron los porcentajes de cada población en la muestra de cada individuo como se muestra en la Figura 17B. Una vez establecidos los porcentajes de cada sub-población en los cinco individuos de cada grupo, los porcentajes fueron comparados entre los cinco grupos de individuos.

Este análisis evidenció un ligero aumento de las dendríticas inmaduras en los pacientes con gastritis y cáncer avanzado. Los pacientes con metaplasia tuvieron niveles bajos de DCs inmaduras similares a los observados en donantes sanos (Figura 18 A y D). Al evaluar las dendríticas mieloides CD11c+, se observó una discreta disminución en el porcentaje de esta población en los pacientes con gastritis, cáncer temprano y avanzado, en comparación con los pacientes con metaplasia, que exhibieron porcentajes similares a los observados en donantes sanos (Figura 18 B y D). Es de resaltar que los pacientes con cáncer avanzado mostraron una disminución estadísticamente significativa de las células dendríticas mieloides CD11c+ comparado con los individuos sanos (Figura 18 B y D).

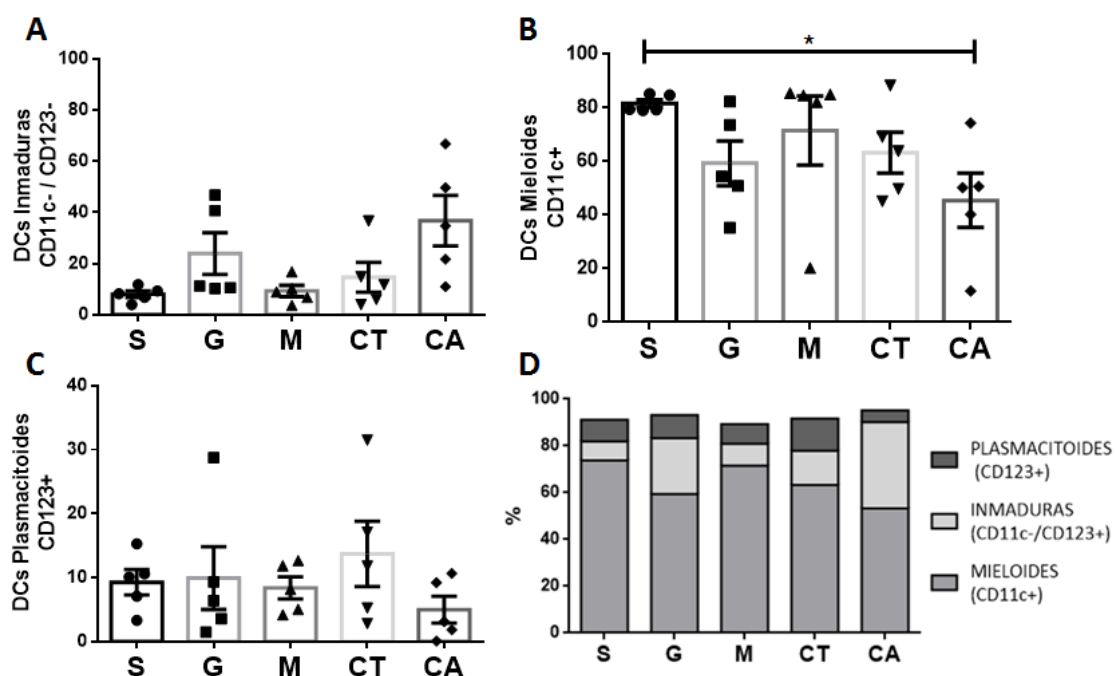


Figura 18. Evaluación de las sub-poblaciones de células dendríticas Inmaduras, Mieloides y Plasmacitoides en PBMCs de individuos en los cinco grupos estudiados. Cuantificación de las células dendríticas (HLA-DR+/LIN-) (A) inmaduras (CD11c-/ CD123-), (B) mieloides (CD11c+) y (C) plasmacitoides (CD123+) en PBMCs de cinco individuos por cada grupo analizado. (D) Análisis acumulativo de las tres subpoblaciones en los diferentes estadios. [* p < 0.05] Test de Friedman con post-test de Bonferroni.

Finalmente, la cuantificación de las dendríticas plasmacitoides mostró un comportamiento homogéneo entre los individuos de los cinco grupos. Con respecto a los donantes sanos, se observó una discreta disminución de estas células en los individuos con cáncer avanzado (Figura 18 C-D).

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE DCs A ESTÍMULOS DE MADURACIÓN

Para explorar la capacidad funcional de células del componente APC, se evaluó en PBMCs de los individuos de los cinco grupos la respuesta a las interleuquinas IL-4 y GM-CSF y al coctel de

citoquinas pro-inflamatorias (α DCs) de células dendríticas derivadas *in situ* a partir de monocitos caracterizados por tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A) tal y como ha sido reportado previamente (105). La Figura 19 muestra el grado de funcionalidad de estas células mediante la cuantificación del aumento en la expresión de las moléculas CD80 (Figura 19B) y CD83 (Figura 19B) en células dendríticas inmaduras (iDCs) derivadas de monocitos sin tratar (histograma blanco) o luego de ser tratadas (histograma gris) con el coctel de citoquinas α DCs.

Los resultados muestran una tendencia a la disminución de la expresión de los marcadores de activación CD80 y CD83 (Figura 19C paneles izquierdo y derecho respectivamente) en la población de DCs derivadas *in situ* a partir de monocitos en individuos con distintas patologías de la mucosa gástrica comparados con los donantes sanos. La disminución funcional de este tipo de APCs fue especialmente notoria en los pacientes con metaplasia y cáncer temprano quienes expresaron los niveles más bajos de CD80 en respuesta a la maduración (Figura 19C – panel izquierdo) y fue menos evidente cuando se utilizó CD83 (Figura 19C – panel derecho).

Adicionalmente, con la medición de los mismos marcadores se evaluó el grado de respuesta al coctel de citoquinas α DCs de las células dendríticas primarias presentes en las PBMCs (células mono-nucleares HLA-DR+/LIN-) (Figura 16 panel D). Diferencias en la frecuencia de DCs primarias en respuesta al estímulo “*in vitro*” no fueron detectados (datos no mostrados). Sin embargo, la inducción de los marcadores en respuesta al coctel de maduración mostró en las DCs primarias totales un comportamiento similar al observado en la población de DCs derivada de monocitos “*in situ*”. Aunque los valores de incremento fueron similares entre los cuatro grupos de individuos con patología gástrica, en respuesta al estímulo de maduración los donantes sanos mostraron el mayor incremento en la expresión de ambos marcadores (Figura 19D). Mientras en DCs primarias la expresión de CD80 tuvo los niveles más bajos en los pacientes con los estadios más avanzados de la carcinogénesis, en individuos con gastritis el CD80 alcanzó niveles casi similares a los de individuos sanos (Figura 19D- panel izquierdo). En cuanto a la expresión del marcador CD83, todas las patologías se comportaron de forma similar, con niveles de expresión equivalente a la mitad de los niveles observados en DCs totales de los donantes sanos (Figura 19D-panel derecho).

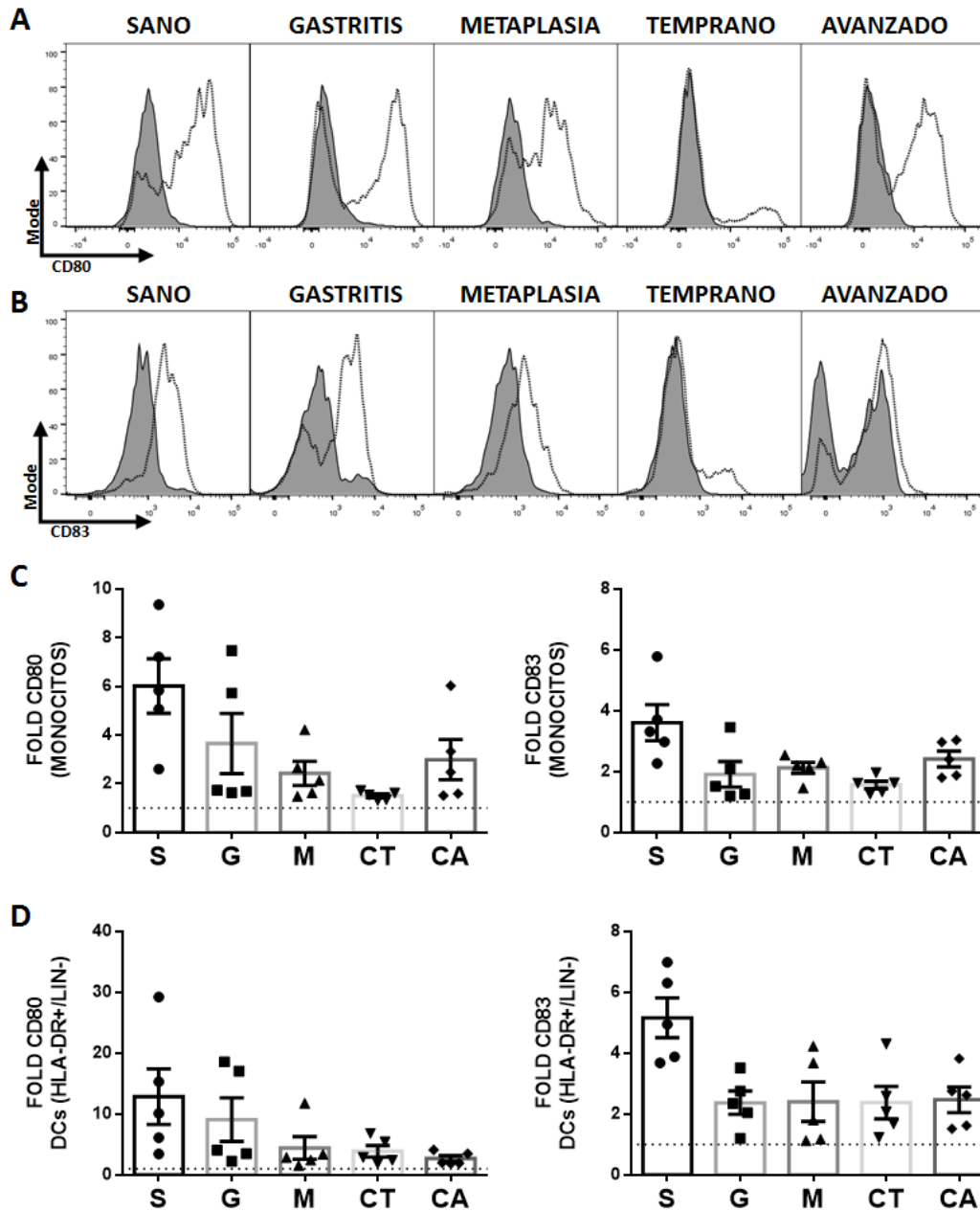


Figura 19. Evaluación del grado de maduración de DCs derivadas in situ a partir de monocitos y DCs primarias totales presentes en PBMCs de individuos en distintos estadios de la carcinogénesis gástrica. Histogramas del grado de expresión del marcador CD80 (A) y CD83 (B) en monocitos presentes en PBMCs (delimitados por los parámetros SSC-A y FSC-A) en respuesta al cultivo “in vitro” con GM-CSF e IL-4 por 24 horas seguido del estímulo por 24 horas con el coctel de citoquinas (α DC); iDCs - control (histograma gris) y DCs maduras derivadas de monocitos luego del tratamiento con el coctel de citoquinas α DCs (histograma blanco) en PBMCs. (C) Cuantificación del “Fold Increase” de CD80 (panel izquierdo) y CD83 (panel derecho) en monocitos presentes en PBMCs estimulados con coctel de maduración de citoquinas α DC. (D) Cuantificación del “Fold Increase” de CD80 (panel izquierdo) y CD83 (panel derecho) en células dendríticas totales primarias (HLA-DR+/LIN-) presentes en PBMCs de individuos en los cinco estadios evaluados luego del tratamiento con el coctel de maduración α DC. La línea punteada señala el valor de 1 en donde no existen diferencias en respuesta al estímulo entre iDCs y DCs maduras.

Adicionalmente a la expresión de los niveles de CD80 y CD83 evaluados luego de la exposición de las células a en cultivo a las citoquinas se cuantifico la secreción de las citoquinas IL-10 e IL-12 en los sobrenadantes de cultivo. En el caso de la IL-10 esta citoquina fue detectada en los

niveles más bajos en los sobrenadantes de cultivo de células de los donantes sanos; sin embargo se observó una tendencia al aumento en su secreción en todos los demás grupos de individuos, especialmente en los pacientes con gastritis y cáncer avanzado (Figura 20A).

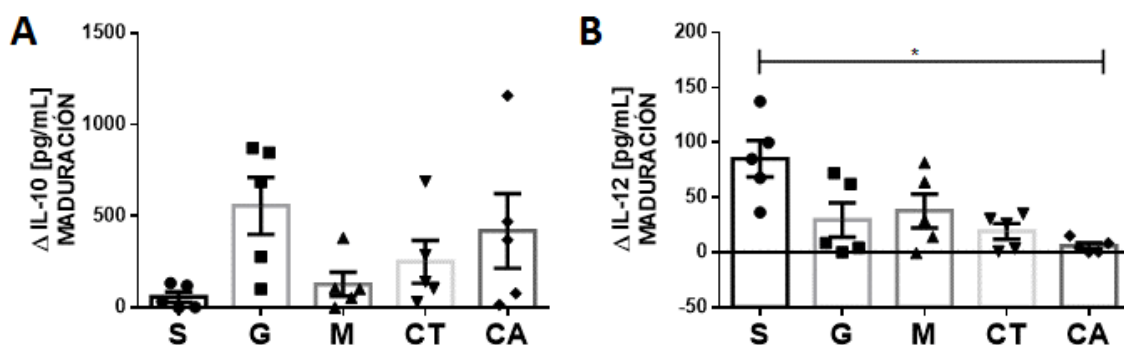


Figura 20. Cuantificación de la secreción de citoquinas presentes en sobrenadante de cultivos de PBMCs de individuos (n=5) de los cinco estadios analizados tratados con GM-CSF e IL-4 +/- y el coctel de maduración αDC. Estimación del cambio en la concentración (Δ delta pg/mL) de citoquinas IL-10 (A) e IL-12 (B) calculado mediante la sustracción de la concentración de la citoquina obtenida del cultivo sin madurar (tratamiento de PBMCs con GM-CSF + IL-4 solamente) de los niveles de citoquina obtenidos después 24 horas adicionales de cultivo en presencia del coctel de maduración αDC. [* p < 0.05] Test de Friedman con post-test de Bonferroni.

Finalmente, los niveles de IL-12 mostraron que en respuesta al coctel de citoquinas, en los cinco grupos evaluados, las células de los donantes sanos secretaron la mayor cantidad de IL-12, mientras que los niveles de producción de esta citoquina por células de los individuos de todas las patologías estuvo disminuido. La disminución de IL-12 fue deficiente especialmente en células de pacientes con cáncer avanzado en donde la disminución de niveles de producción de esta citoquina con respecto a los individuos sanos fue estadísticamente significativa (Figura 20B).

CORRELACIÓN ENTRE INFILTRADO DE CD33 EN MUCOSA GÁSTRICA VS. NIVELES PNM-MDSCs EN SANGRE

Finalmente, se analizaron las biopsias obtenidas de nueve de los pacientes a los cuales se les realizó el análisis de sangre (3 con gastritis crónica no atrófica, 3 con metaplasia, y 3 con cáncer temprano); inicialmente, se realizó la marcación por inmunohistoquímica, y se cuantificó el porcentaje de células CD33+ mediante el “software” de análisis de imagen CellProfiler. Al comparar estos porcentajes de expresión entre los tres grupos evaluados, se encontraron resultados similares a los observados en sangre para las MDSCs similares a neutrófilos (pnm-MDSCs), en donde los individuos con metaplasia tienen los niveles más altos, mientras que aquellos con gastritis y cáncer tienen valores similares de CD33 (Figura 21A).

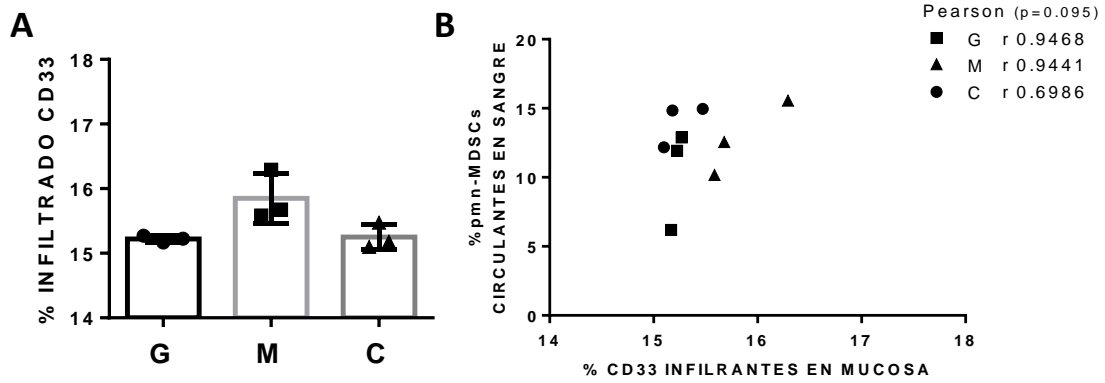


Figura 21. Cuantificación y correlación de infiltrado CD33+ en mucosa gástrica en individuos (n=3) de tres grupos de patología de la mucosa gástrica. (A) Cuantificación del porcentaje de infiltración de CD33 mediante cuantificación automatizada de marcación por inmunohistoquímica en individuos de 3 diferentes grupos de estudio analizados. (B) Correlación de Spearman entre el porcentaje de pmn-MDSCs (CD14-, CD11b+ y CD33+) en sangre periférica y el porcentaje de células CD33+ infiltrantes en mucosa gástrica para individuos pertenecientes a tres grupos evaluados, (cuadrados – gastritis, triángulos – metaplasia, círculos – cáncer temprano).

Paso seguido, se correlacionó el nivel de CD33 en la mucosa gástrica, con los niveles de pmn-MDSCs (CD14-, CD11b+ y CD33+) en sangre, observando una relación positiva entre estas dos mediciones para los tres grupos, con valores r (Spearman) cercanos a uno en las patologías benignas (gastritis y metaplasia) (Figura 21B).

INMUNO-MONITOREO DE LINFOCITOS

ESTADO DEL ARTE

La función de los linfocitos tanto CD4+ como CD8+ en inmunidad anti-tumoral ha sido ampliamente estudiada debido a que las células CD4+ son críticas para el *priming* de células CD8+ específicas de tumor, así como para la expresión de células T CD8+ de memoria (173, 174). Es por esta razón que el aumento de CD8+ tanto en sangre como en el microambiente tumoral es un biomarcador de buen pronóstico en cáncer (175). Sin embargo, el valor pronóstico de los valores bajos en la relación entre CD4+/CD8+ no es tan claro, y depende del tipo de cáncer y las subpoblaciones de estos linfocitos (176, 177).

Las células T ayudadoras CD4+ regulan tanto la respuesta celular citotóxica como la producción de anticuerpos por los linfocitos B mediante la interacción con componentes presentadores de antígeno, y responde a estímulos de las células dendríticas (inmuno-competencia). Inicialmente, las células CD4+ vírgenes, en respuesta a las citoquinas presentes en el microambiente y al estímulo APC, se pueden diferenciar en distintas subpoblaciones, entre las que se encuentran las Th1, Th2, Th17, ThF, y T reguladoras (Tregs); estos últimos generan un balance que dictamina y regula el tipo de respuesta adaptativa.

En el contexto pro-inflamatorio en el que se desarrolla la carcinogénesis gástrica, una población de gran interés son las células Treg, las cuales aumentan en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el gástrico (178, 179). Debido a que estas células modulan negativamente la activación, proliferación y citotoxicidad de los demás componentes del sistema inmunológico suprimiendo la respuesta efectora de otras células T y de células APC, mediante el contacto célula-célula y la secreción de las citoquinas supresoras IL-10 y TGF- β , a estas células se les atribuye un rol en el escape de los tumores a la inmuno-vigilancia y son factor de mal pronóstico (180).

La diferenciación de estas células está controlada por el factor de transcripción Foxp3 y se diferencian en respuesta a TGF- β . Debido a que Foxp3 también se expresa en otras células no reguladoras, es importante la medición de la expresión de otros marcadores para su identificación. Dentro de los marcadores asociados a Tregs están la ausencia del marcador CD127 (receptor de la IL-7) (181), la expresión de la cadena α del receptor de la IL-2 (CD25), el cual es indispensable para la supervivencia y la homeostasis de esta población (180). Una proporción aumentada de Tregs con respecto a células CD8 (citotóxicas) es un marcador de mal pronóstico en cáncer gástrico (182), y otros tipos de cáncer (183, 184).

Las células Th17, son otra subpoblación de células CD4+ caracterizadas principalmente por su producción de IL-17, cuya producción es regulada por la transcripción del factor ROR γ que se activa en respuesta a las citoquinas IL-6, IL-21 y TGF β , igual que las Treg, por lo que el balance en la concentración de estas citoquinas define la diferenciación de una u otra población (185), patrón que está alterado en el cáncer gástrico (19, 186).

Además de su importante papel en la eliminación de patógenos extracelulares (hongos y bacterias), las células Th17 participan en el desarrollo de algunos procesos autoinmunes, en la modulación de reacciones alérgicas y en procesos de inmunidad antitumoral. En el proceso de infección con *H. pylori*, se ha encontrado que el aumento de células Th17 genera un microambiente con niveles altos de IL-21 e IL-17, los cuales se asocian directamente con presencia de la bacteria, el desarrollo del ambiente inflamatorio y el desarrollo de cáncer (187-189).

Finalmente, dentro de las poblaciones de nuestro interés en la evaluación de carcinogénesis gástrica esta una población de linfocitos ayudadores poco estudiada en cáncer, conocida como Tfh o T foliculares, las cuales tienen una gran habilidad para migrar a órganos linfoides secundarios, donde interactúan con las células B, activándolas y diferenciándolas hacia células B productoras y secretoras de inmunoglobulinas. La diferenciación de células Tfh residentes en folículos linfoides y centros germinales, está regulada por la activación de los factores de transcripción Stat3 y Bcl6 que promueven su diferenciación, la expresión del receptor de quimioquina CXCR6 y de las moléculas ICOS, CD40L, PD1, BTLA en la superficie celular además de la secreción de IL-21 (niveles similares a las Th-17). Así mismo, estudios recientes han demostrado la existencia de esta población en sangre periférica (cTfh) con un fenotipo de memoria caracterizado por la expresión de los marcadores CD45RO+, CD62L^{LOW}, IL-2R^{LOW} y expresar CXCR5 (190).

En el proceso de inflamación crónica asociada a la presencia de *H. pylori*, las células Tfh juegan un papel importante, no solo en la ayuda a las células B, sino también en el aumento de la severidad de la respuesta inflamatoria y la patología de la mucosa (191, 192), funciones que han estado asociadas a la producción de IL-21 entre otras citoquinas involucradas en la diferenciación de linfocitos Th1 y Th17.

Además en cáncer, son pocos los estudios que reportan cambios en esta población, dentro de los estudios realizados, se ha encontrado que en cáncer de seno, existe un aumento correlacionado con mejor pronóstico (193), sin embargo su papel en la inmunidad antitumoral aun no es bien conocido y este efecto se le atribuye a su papel en la generación de la memoria de los linfocitos B, cuya respuesta ha sido asociada a un aumento en la supervivencia de individuos con distintos tipos de cáncer, entre los que se incluye ovario (194), melanoma (195), y cáncer colorectal (196).

RESULTADOS

RELACIÓN ENTRE LINFOCITOS CD4/CD8

Inicialmente se realizó una cuantificación de los linfocitos CD8 y CD4 en PBMCs en las diferentes etapas de la carcinogénesis por medio de citometría de flujo. A partir de las células totales, en donde se evaluaron los marcadores CD4 y CD8 (Figura 22A).

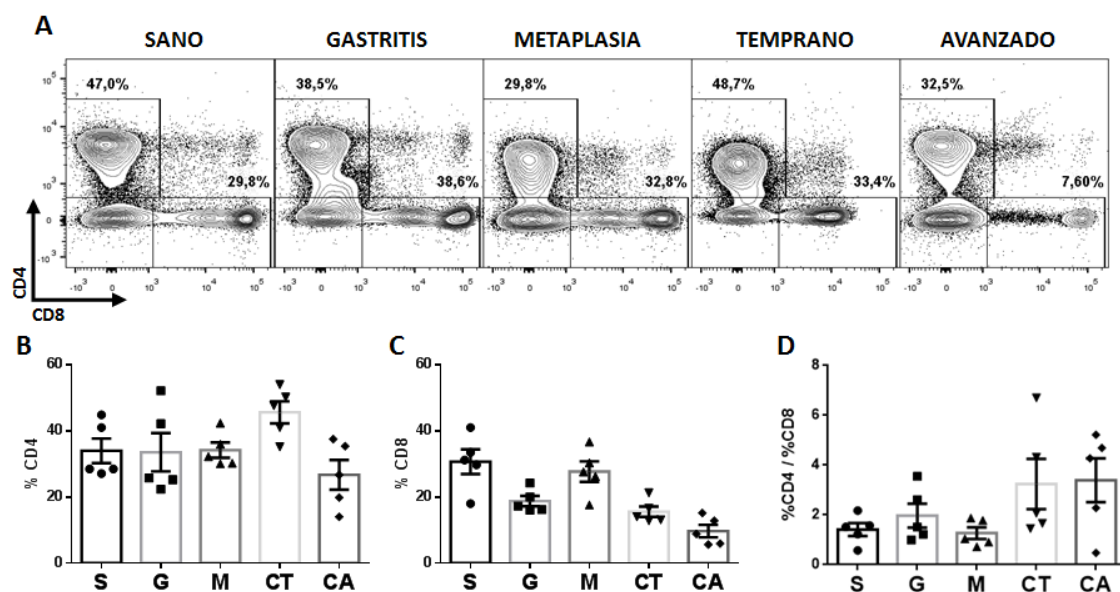


Figura 22. Evaluación de las poblaciones de linfocitos ayudadores CD4+ y CD8+ y relación CD4+/CD8+ en individuos sanos y con lesiones benignas y malignas de la mucosa gástrica. (A) Imagen representativa del análisis de las poblaciones CD4+ y CD8+ analizadas en cada individuo de cada uno de los cinco estadios evaluados dentro de la región de linfocitos la cual fue definida dentro de las PBMCs por los parámetros SSC-A y FSC-A. Cuantificación del porcentaje de las poblaciones CD4+ (B) y CD8+ (C). (D) Comparación de la relación CD4/CD8 entre los cinco grupos de individuos (n = 5) evaluados.

La cuantificación de estas dos poblaciones muestra que no existen diferencias significativas en la cantidad de linfocitos ayudadores CD4+ entre las PBMCs de individuos sanos y la cantidad de estos linfocitos en individuos con las diferentes patologías; solo un discreto aumento en pacientes con cáncer temprano y una discreta disminución en pacientes con cáncer avanzado comparados con los donantes sanos y los pacientes con gastritis y metaplasia (Figura 22B).

Al evaluar la población de linfocitos citotóxicos (CD8+), se encontraron niveles similares entre los donantes sanos y los pacientes con metaplasia, mientras que en las patologías de gastritis y cáncer (temprano y avanzado), se observó la tendencia de esta población a estar disminuida (Figura 22C).

Finalmente se calculó el ratio CD4+/CD8+ el cual mostró un aumento en esta relación en pacientes con ambos estadios de cáncer, en comparación con los estadios de gastritis y metaplasia en que la relación tuvo un valor menor y similar al observado en este análisis en los donantes sanos (Figura 22D).

ANÁLISIS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS AYUDADORES CD4+

Para el monitoreo de este componente, se analizaron las sub poblaciones de células: Treg, Th17 y TFh. La caracterización de las Treg se realizó mediante citometría de flujo seleccionando dentro de la población CD4+ la población que expresa la subunidad alfa del receptor de interleuquina-2 (células CD25+). A partir de ésta población, se seleccionó la

población que expresaba el factor de transcripción específico FoxP3 (Figura 23A). El porcentaje final de Treg se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$\% Treg = Frec. CD25 \times \frac{Frec. FoxP3}{100}$$

La evaluación de los niveles de Tregs (% de células CD4+/FoxP3+/CD25+ en la Figura 23B), mostro que en general la media de los niveles de esta población es similar en individuos sanos y en individuos con patología gástrica, sin embargo, algunos pacientes con cáncer (temprano y avanzado) mostraron la tendencia a tener un substancial aumento de esta población.

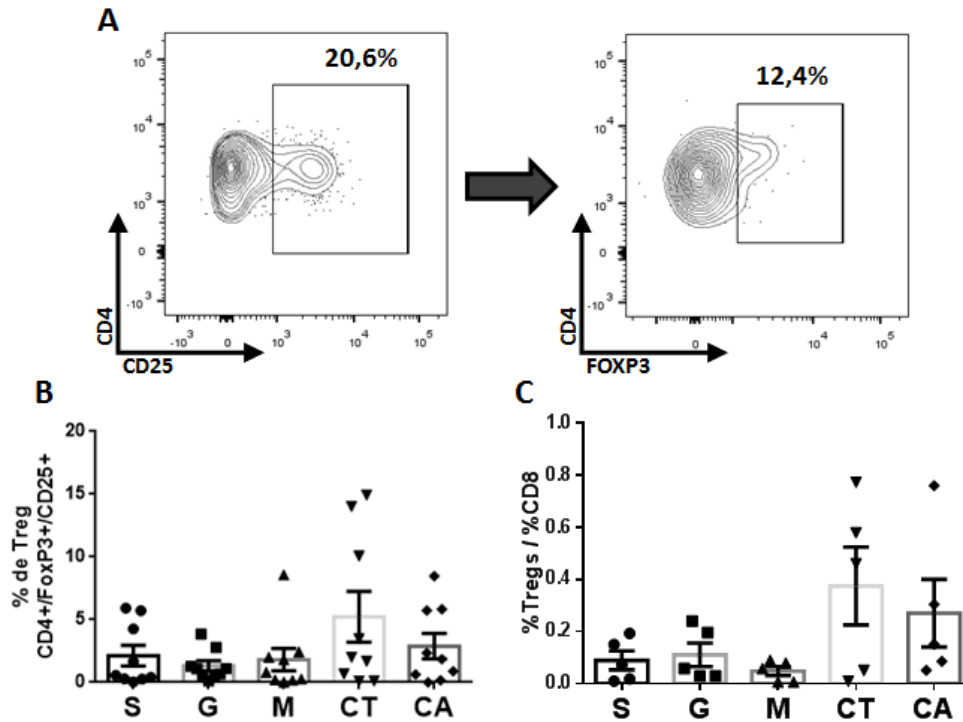


Figura 23. Esquema de la evaluación y cuantificación de los linfocitos T reguladores (Treg) en los diferentes estadios de la carcinogénesis gástrica. A) Esquema procedimental para delimitación dentro de PBMCs de la subpoblación Treg (células CD4+/FoxP3+/CD25+). Dentro de la población de linfocitos T CD4+ (definida como se describe en la leyenda de la Figura 22), se seleccionaron las células que expresaban tanto el marcador CD25 (panel izquierdo) como el factor de transcripción FoxP3 (panel derecho). (B) Comparación de los porcentajes de la población de células Treg en individuos de los 5 diferentes grupos analizados

Diferentes estudios han reportado como marcado pronóstico el ratio entre Tregs y CTL CD8+ en diferentes tipos de cáncer, incluido el gástrico (182, 197, 198), por esta razón, se quiso evaluar esta relación en los grupos de individuos analizados. En la Figura 23C, se observa un aumento en el ratio entre los porcentajes Tregs/CD8 en los pacientes con cáncer gástrico temprano y avanzado con respecto a la razón en individuos sanos y con estadios benignos de patología gástrica.

La segunda subpoblación evaluada, las células Th17 se cuantificaron por el porcentaje de linfocitos T CD4+ productores de IL-17 (Figura 24A). La comparación de los porcentajes *ex vivo* de células Th17 (CD4+/IL-17+) entre los diferentes grupos evaluados mostro tendencia al aumento en todas las patologías en comparación con los donantes sanos, lo que sugiere un

umentando de la cantidad de estas células a medida que progresa la enfermedad siendo los individuos con cáncer avanzado aquellos que mostraron los mayores porcentajes de esta población (Figura 24B).

La población de células Th17 se evaluó mediante la cuantificación de la IL-17 intracelular por medio de citometría de flujo. La cuantificación de las TH17 se obtuvo mediante la selección inicial del a población de linfocitos identificada por los parámetros SSC-A y FSC-A. Paso seguido se seleccionaron las células CD4+, y finalmente la población positiva para la citoquina IL-17 (Figura 24A).

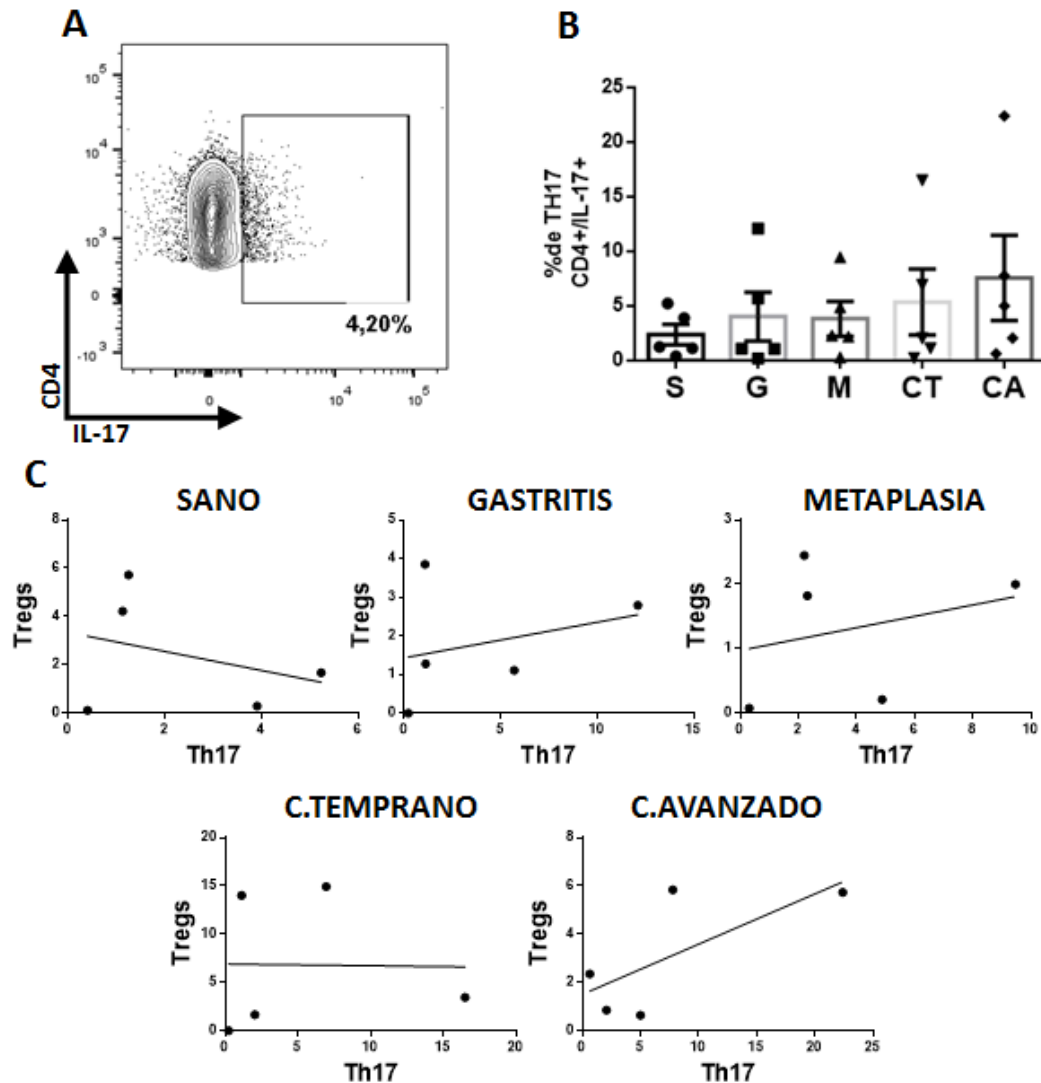


Figura 24 Evaluación, cuantificación y análisis de los linfocitos Th17 en los individuos (n=5) en diferentes estadios de la carcinogénesis gástrica. (A) Esquema como se procedió para el análisis por citometría de flujo de la subpoblación de células Th17 definida como linfocitos T CD4+ en los que se detectó la producción intracelular de IL17. (B) Cuantificación de la población de células Th17 en individuos de los 5 diferentes grupos de estudio analizados. (C) Relación entre la expresión de células Th17 vs Treg en individuos (n=5) de los 5 grupos evaluados.

Las células Treg y las células Th17 son células con acciones opuestas (anti- y pro-inflamatoria respectivamente). Ambas poblaciones se diferencian de las CD4+ vírgenes debido a la influencia de la TGF β dependiendo las concentraciones del medio, además de la presencia de otras citoquinas responsables de la activación de factores de transcripción característicos de cada población. Sin embargo la presencia del factor de transcripción FoxP3 inactiva a ROR γ lo que sugiere un efecto inhibitor de la diferenciación hacia Th17 (185).

Cuando se evaluó la relación de estas dos poblaciones para cada uno de los pacientes, se evidenció tendencia hacia una relación inversa en los donantes sanos una tendencia diferente en las distintas patologías, especialmente en el cáncer avanzado, en las que existe una relación directa (Figura 24C).

Finalmente se evaluó el grado de expansión de la población de linfocitos T CD4+ ayudadores foliculares o Tfh. Con el fin de determinar el porcentaje de células Tfh totales (CD4+/CD45RA-/CCR7-/CXCR5+), se realizó un análisis secuencial por citometría de flujo, tal y como se muestra en la Figura 25A, además de determinar sub-poblaciones Tfh PD1+ y Tfh PD1+/ICOS+ luego del estímulo *in vitro* de PBMCs con micro-esferas anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 realizado como se describe en materiales y métodos.

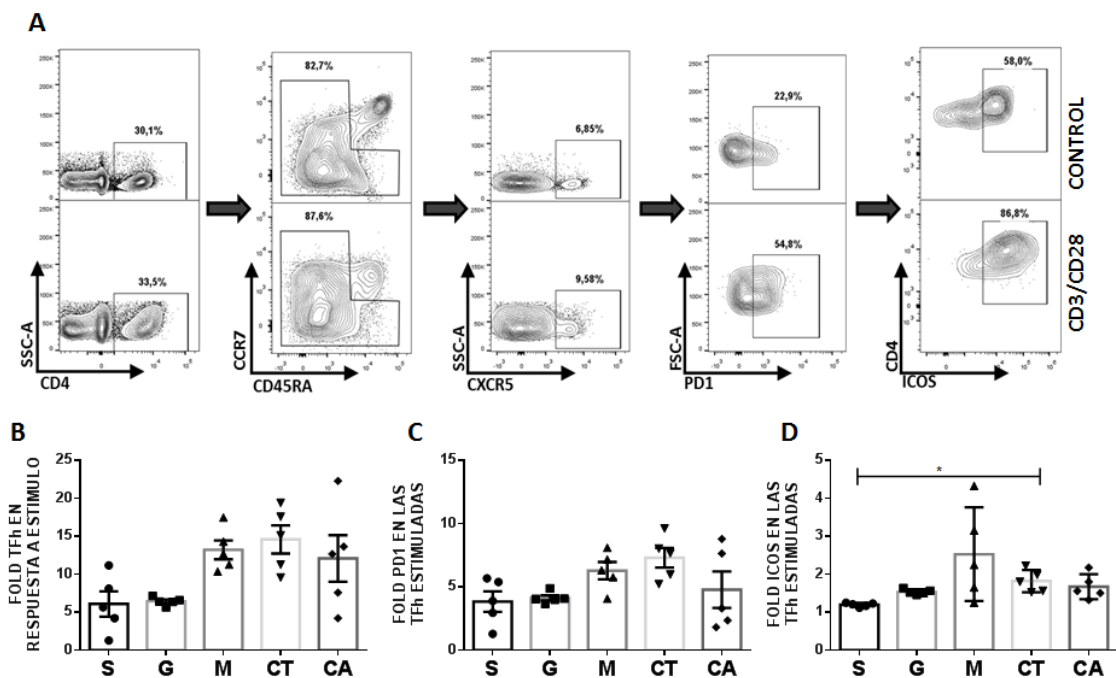


Figura 25. Esquema de identificación y cuantificación de la subpoblación de células Tfh en los diferentes estadios de la carcinogénesis gástrica. (A) Esquema procedimental para la obtención de los linfocitos T foliculares. A partir de la población de linfocitos determinado por SSC-A y FSC-A, se seleccionó la población CD4+, paso seguido, se evaluaron las poblaciones de memoria, mediante el uso de los marcadores CD45Ra y CCR7, seleccionando toda la población no virgen (excluyendo las células doble positivas). Finalmente, se seleccionaron las poblaciones positivas para CCR5, PD1, e ICOS. La evaluación de estas células se realizó estimulando con perlas anti CD3 (panel inferior) y cuantificando el cambio en comparación con las células sin estimular (panel superior). (B) Cuantificación del cambio en respuesta l estímulo de las células Tfh totales. Evaluación del incremento en la frecuencia de los marcadores PD1 (C) e ICOS (D) en respuesta al estímulo. (n=5) (Test de Friedman, con post-test Bonferroni * p<0.05).

La comparación entre grupos del grado de expansión en respuesta al estímulo de las Tfh totales (células CD4+/CD45RA-/CCR7-/CXCR5+) mostró, que mientras en individuos con gastritis estas células experimentaron un grado de expansión similar al observado en los individuos sanos, en individuos en los estadios avanzados de la enfermedad (metaplasia y cáncer) estas células experimentaron una mayor expansión (Figura 25B).

Además de evaluar el grado de expansión de la población de Tfh total, se analizó el incremento de PD1 en estas células en respuesta al estímulo. Este análisis evidenció niveles bajos de expresión de PD1 en Tfh de los donantes sanos y pacientes con gastritis y un discreto aumento de la expresión de este marcador en Tfh de pacientes con metaplasia y cáncer (Figura 25C).

Finalmente, la evaluación de las Tfh PD1+ se complementó mediante el análisis de la expresión de ICOS un marcador característico de la activación de células Tfh. Los resultados mostraron niveles bajos de expresión de ICOS en los individuos sanos y con gastritis y un aumento de la expresión de este marcador en linfocitos Tfh PD1+ de individuos con metaplasia y cáncer, especialmente, en los pacientes con cáncer temprano, los cuales mostraron un incremento significativo de PD1 en linfocitos Tfh comparados con el grupo control (Figura 25D).

ACTIVACIÓN LINFOCITOS T

Como parte de la evaluación funcional del componente de linfocitos T se evaluó el grado de internalización del complejo CD3 asociado al receptor para el antígeno de los linfocitos T (TCR) luego de 24 horas de estímulo de linfocitos T totales presentes en PBMCs con perlas anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2. Inicialmente, se evaluó por citometría de flujo el grado de internalización del complejo CD3 en linfocitos T totales, a partir de la cuantificación y el cálculo la población total CD3+ estimuladas (CD3/CD28/CD2) versus el control sin estímulo (Figura 26A) tal y como se describe en materiales y métodos. Los resultados obtenidos en estos experimentos mostraron una mayor capacidad de internalización en respuesta al estímulo de los linfocitos T de individuos con gastritis y metaplasia, seguida de los donantes sanos y una discreta deficiencia en esta función en linfocitos T de los pacientes con cáncer, principalmente, en pacientes con cáncer temprano (Figura 26B).

Como complemento al análisis de la eficiencia en la internalización del TCR y para ampliar la evaluación, se calculó de manera indirecta el grado de integridad de las vías de señalización proximales y distales involucradas en la activación de linfocitos T luego de la estimulación del TCR; se evaluó la expresión de los marcadores CD25 (IL-2R α), CD69 y CD154 (CD40L), marcadores de activación temprana, cuya expresión en respuesta al estímulo permiten explorar el grado de respuesta corriente debajo del TCR. Para esto se cuantificó el cambio de MFI (índice de fluorescencia media) de estos tres marcadores entre células cuyo TCR fue estimulado o no con perlas CD3/CD28/CD2.

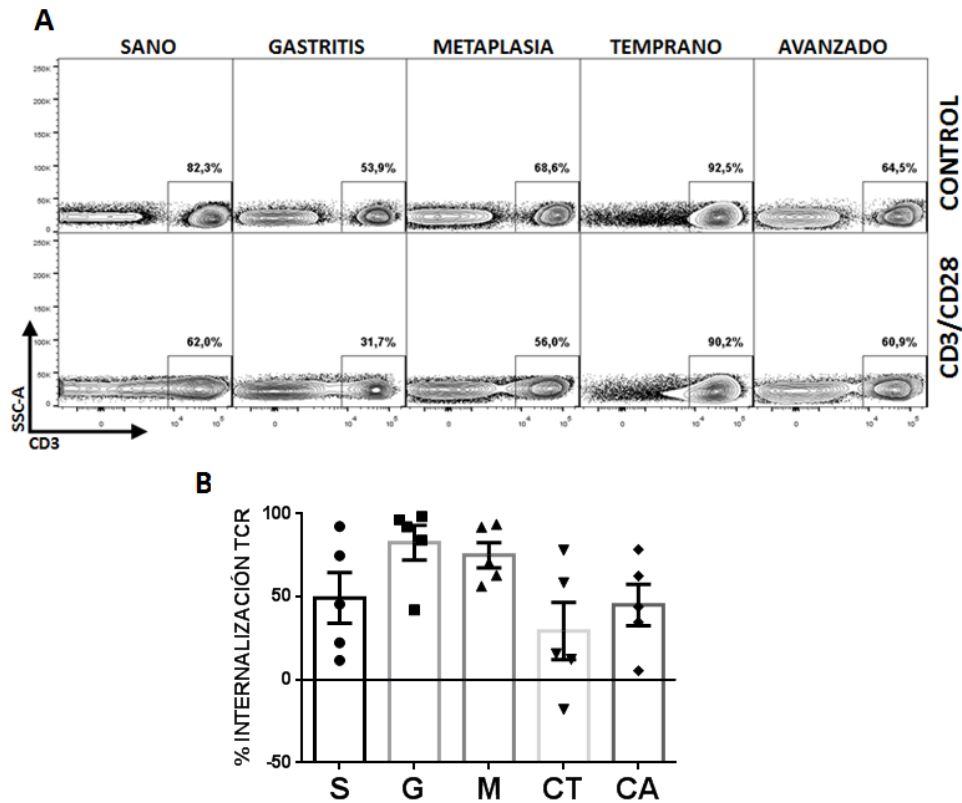


Figura 26. Evaluación de la internalización del TCR en linfocitos T totales de individuos sanos y con diferentes tipos de lesión de la mucosa gástrica. (A) Imagen representativa de la identificación y cuantificación de la población positiva para CD3 en los cinco estadios, sin ningún estímulo (panel superior) o después de 24 horas de estímulo con perlas anti CD3/CD28/CD2 (panel inferior). (B) Comparación del grado de internalización del TCR calculado mediante la variación de la expresión de CD3+ en superficie de linfocitos T CD3+ en individuos (n=5) de los 5 grupos evaluados.

En respuesta al estímulo el marcador CD69 mostró en todas las patologías un aumento en la expresión similar al observado en linfocitos T de individuos sanos (Figura 27A). Así mismo, la cantidad de molécula CD154 expresadas por célula (MFI) incrementó de manera similar en linfocitos T de individuos sanos y de todos los pacientes, sin embargo, los pacientes con cáncer temprano mostraron los valores de incremento más bajos (Figura 27B). Finalmente, se evaluó el marcador CD25, marcador que tuvo cambios en los niveles de expresión en los linfocitos T de individuos en los diferentes grupos, siendo los donantes sanos aquellos que tuvieron un mayor incremento de la expresión de CD25 en respuesta a la estimulación y los pacientes con gastritis, metaplasia y cáncer temprano los individuos con los valores de incremento más bajos (Figura 27C).

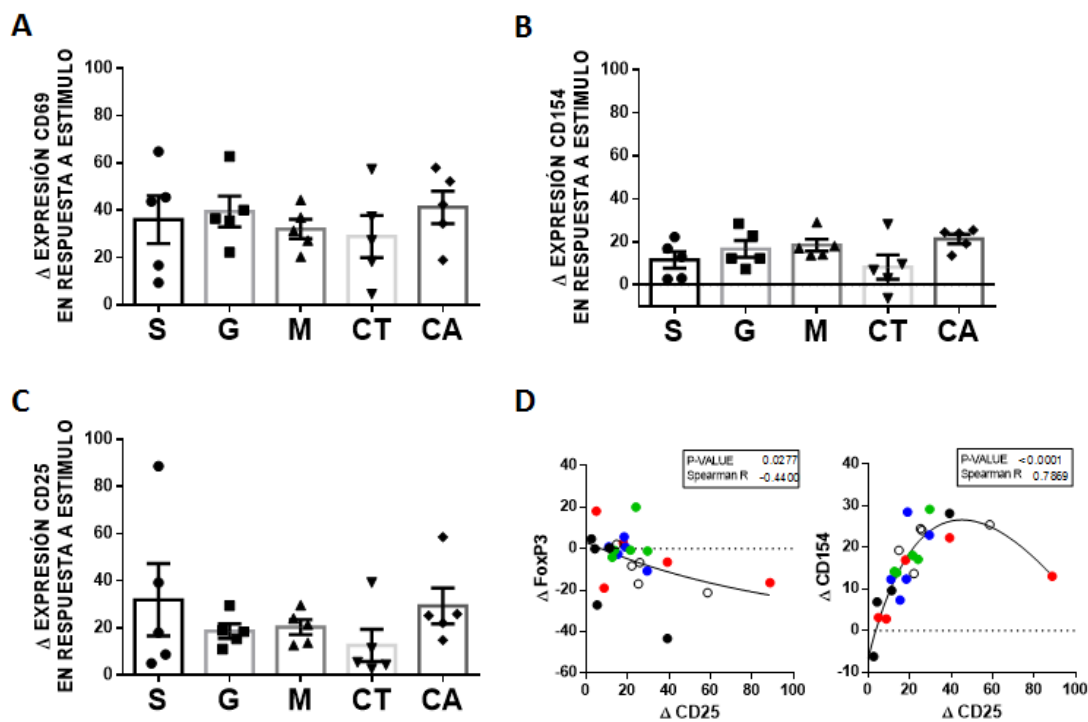


Figura 27. Caracterización fenotípica de la activación de los linfocitos T de individuos en diferentes estadios de la carcinogénesis gástrica en respuesta a un estímulo con perlas anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2. Cuantificación del aumento de la activación de la población linfocítica (CD3+) en muestras de sangre de individuos sanos y pacientes con patología de la mucosa gástrica, medida por el aumento en el MFI proporcional a la expresión en superficie de los marcadores CD69 (A), CD154 (B) y CD25 (C) en linfocitos T en respuesta al estímulo de activación. (D) Correlación del delta de expresión del marcador CD25 vs el factor de transcripción FoxP3 (panel izquierdo) y de este con el marcador CD154 (panel derecho) en individuos (n=5) de los diferentes grupos evaluados (● S, ● G, ● M, ● CT, ○ CA).

Debido a que los niveles de CD25 son interpretados no solo como una respuesta de activación expresada en linfocitos T efectores, sino además como un marcador de la población de linfocitos Tregs supresores, se realizó una correlación del delta de expresión de CD25 y el factor de transcripción de las Treg (FoxP3) (Figura 27D –panel izquierdo); o de este marcador con la molécula de activación CD154 (Figura 27D – panel derecho). Los resultados sugieren una correlación negativa entre el aumento de CD25 con el de Foxp3 y una correlación positiva entre la expresión de CD25 y la co-expresión del marcador CD154.

CORRELACIÓN ENTRE INFILTRADO DE LINFOCITOS EN MUCOSA GÁSTRICA VS. NIVELES EN SANGRE

Los resultados obtenidos en sangre se compararon con porcentajes de infiltración medidos por medio del “software” CellProfiler, que cuantifica el número de células con marcación positiva por inmunohistoquímica.

Los resultados de la cuantificación porcentual del infiltrado mostraron que para el marcador de leucocitos CD45, los pacientes con metaplasia tienen un aumento de estas células, mientras que la gastritis y el cáncer tienen niveles menores y similares (Figura 28A). Los niveles de CD4 mostraron un aumento en los individuos con cáncer, mientras que las gastritis mostraron aquellos más bajos (Figura 28B). Sin embargo, el porcentaje de infiltración de linfocitos CD8+

no mostraron diferencias entre grupos, ya que todos los individuos tuvieron niveles cercanos al 10% (Figura 28C).

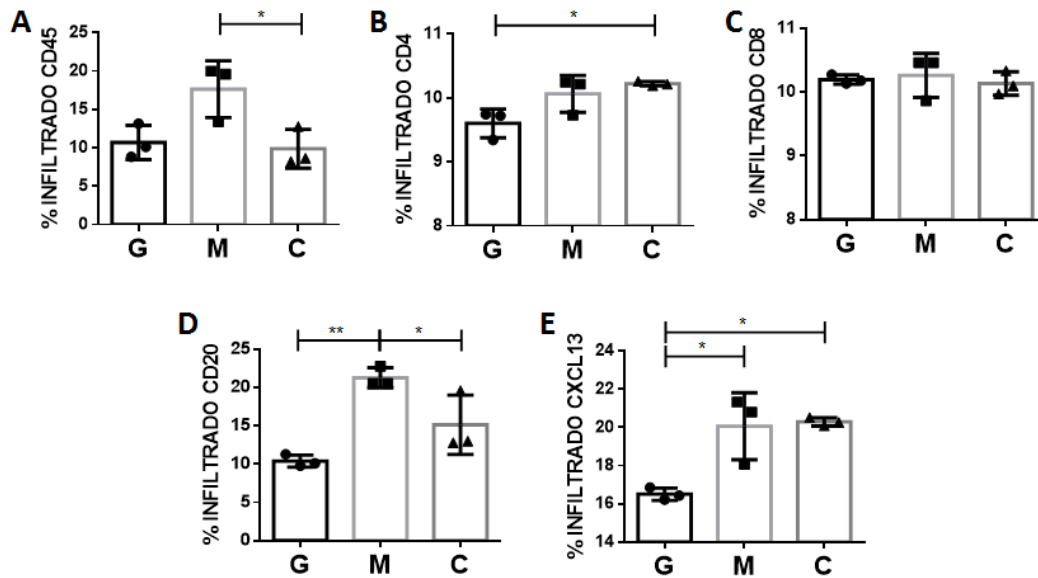


Figura 28. Porcentaje de infiltración de cinco poblaciones de linfocitos en la mucosa gástrica para tres grupos evaluados de la carcinogénesis. Cuantificación automatizada de la marcación por inmunohistoquímica para los marcadores: (A) CD45 (leucocitos totales), (B) CD4 (células T ayudadoras), (C) CD8 (células T citotóxicas), (D) CD20 (células B), y (E) CXCL13 (quimoquina Tfh) en individuos (n=3) de cada uno de los tres grupos evaluados. [* p<0.05, ** p<0.01] Test de Friedman con post-test de Bonferroni.

Por otra parte, se observó que el infiltrado de linfocitos B CD20+, exhibió diferencias significativas entre grupos, siendo los individuos con gastritis aquellos que tienen los niveles más bajos, seguido por aquellos con cáncer, y finalmente los que presentan metaplasia, que tienen los niveles más altos (Figura 28D).

Finalmente, el infiltrado de CXCL13 mostró tendencias similares a los visto con los CD20, con porcentajes aumentados en metaplasia y cáncer; y niveles significativamente más bajos en aquellos con gastritis (Figura 28E).

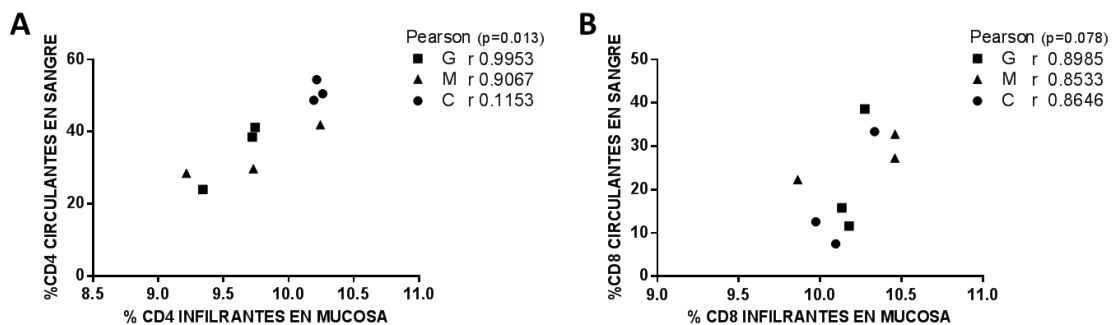


Figura 29. Correlación de las poblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ en sangre periférica y mucosa gástrica en individuos sanos y con lesiones benignas y malignas de la mucosa gástrica. Correlación de Spearman entre (A) células (A) CD4+ o (B) CD8+ en sangre (lectura PBMCs por citometría de flujo) versus mucosa gástrica (cuantificación automatizada de inmunohistoquímica) en individuos de los 3 diferentes grupos analizados (cuadrados – gastritis, triángulos – metaplasia, círculos – cáncer temprano).

La correlación de CD4 en periferia *versus* infiltrantes mostró una buena relación en los individuos con gastritis y metaplasia con valores r cercanos 1, sin embargo, esta correlación no es tan clara para los individuos con cáncer (Figura 29A).

En cuanto a la correlación de en los linfocitos CD8, se observan valores de r de 0,8 para los tres estadios, efecto que indica una buena representación de esta población en mucosa en comparación con la periferia (Figura 29B).

ANÁLISIS MULTIDIMENSIONAL COMPUTACIONALMENTE EFICIENTE DE CITOMETRÍA DE FLUJO COMPLEJA

RACIONAL

En el 2015 se cumplieron 50 años de la primera publicación de análisis celular basado en citometría de flujo (199) y desde ese entonces la técnica ha permitido la identificación de la mayoría de las subpoblaciones inmunológicas conocidas hoy en día. Recientemente, la técnica de citometría de flujo ha evolucionado al uso de anticuerpos cargados con isótopos de metales pesados en lugar de fluorocromos, permitiendo la identificación, cuantificación y análisis de poblaciones celulares con marcadores por medio de la masa atómica de dichos isótopos (200, 201). Este método, se conoce como “CyTOF” (cytometry by time-of-flight), y permite la detección de más de 100 parámetros en una misma célula.

El análisis tanto de la citometría multicolor basada en fluorocromos como de la espectrometría de masas proveen la plataforma técnica para investigar en mayor profundidad el inmunofenotipo de las distintas poblaciones celulares que componen el sistema inmune (201), sin embargo, el continuo aumento de los parámetros cuantificables por célula ha hecho emerger como el gran reto para el investigador su habilidad para analizar, procesar e interpretar los datos resultantes.

En los dos primeros capítulos de esta tesis se ilustró el monitoreo realizado de forma manual, seleccionando poblaciones en 2D y tratando de identificar las principales características propias del comportamiento de las sub-poblaciones de células APC y linfocitos T en los individuos de los cinco grupos estudiados, evaluando en su conjunto cerca de 40 variables. Si bien este enfoque sigue siendo adecuado para muchos procesos experimentales, este presenta varias limitaciones. En primer lugar, a medida que aumentan los parámetros evaluados, el número de posibles combinaciones 2D aumenta exponencialmente, es decir, una evaluación de 9 parámetros experimentales, requeriría de 36 *gates* 2D, lo cual impide mostrar y comprender el significado de cada combinación de marcadores utilizado. En segundo lugar, en numerosos estudios multi-variables, como el caso del proyecto del inmuno-fenotipaje en el proyecto del inmuno-genoma del humano, se ha demostrado que el *gating* manual es una de las mayores limitantes para la estandarización de la medición de inmuno-fenotipos (97). Finalmente, el *gating* manual se basa en el conocimiento previo del investigador, razón por la cual se incorpora en el análisis de los datos un sesgo hacia los resultados “esperados”, razón por la cual mucha de la información potencialmente relevante y novedosa dentro del conjunto de datos podría llegar a ser ignorada.

Por lo tanto con el ánimo de remontar estos problemas y generar una estrategia que permita ampliar la capacidad de monitorear los diferentes estadios e identificar biomarcadores y/o nuevas poblaciones ignoradas en el análisis manual, en los últimos años se han venido implementando distintos tipos de métodos computacionales que parten de datos de

citometría multicolor y brindan al investigador la capacidad de identificar automáticamente la expresión jerárquica de múltiples poblaciones celulares y diferencialmente expresadas.

Como resultado de lo anterior, en el 2010 inició el desarrollo de una serie de herramientas informáticas que haciendo uso de diferentes tipos de algoritmos automatizados, evidencian de manera automática en una muestra, la expresión jerárquica de poblaciones celulares y la caracterización semi-cuantitativa de poblaciones diferencialmente expresadas, a partir de muestras de citometría multi-paramétrica y conlleva a ventajas en la versatilidad de los resultados logrados con respecto a lo que se había alcanzado hasta ahora mediante el análisis manual (202).

RESULTADOS

GENERACIÓN DE LA ESTRATEGIA DE ANÁLISIS MULTIDIMENSIONAL

Debido a la complejidad de las citometría multicolor, las lecturas realizadas de los diferentes paneles se analizaron utilizando un modelo de trabajo que se basa en 4 programas estadísticos, los cuales se describen a continuación (Figura 30).

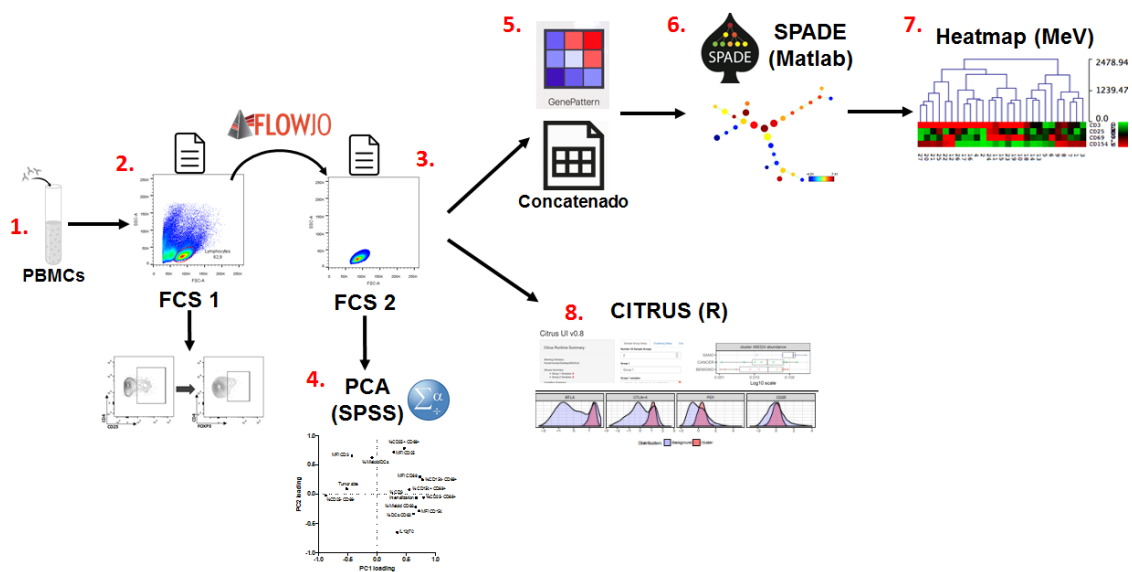


Figura 30. Modelo esquemático del análisis multivariado a partir de los datos de citometría. (1) Las PBMCs se tiñen con anticuerpos específicos conjugados con reporteros de fluorescencia, y se realiza la lectura por FACS. (2). La lectura obtenida a partir del citómetro de flujo se exporta en un archivo .FSC, el cual se analiza inicialmente por citometría manual en el “software” FlowJo. (3) Se genera un nuevo archivo en formato .FSC en el cual se exporta la población de linfocitos a partir de células únicas (FSC-A vs FSC-H y SSC-H vs SSC-W), y se eliminan los detritos y el ruido de fondo. (4) Análisis por componentes principales de los datos analizados. (5) En el programa GenePattern, se concatenan los archivos obtenidos por cada paciente, en un solo archivo que representa la patología. (6) Análisis por SPADE (Matlab) a partir de datos concatenados. (7) Creación de mapas de calor y análisis jerárquico (HCL) con la información generada a partir de SPADE (MFI de cada parámetro en cada grupo) mediante la herramienta MeV (TM4 “software”) (8) Comparación de pacientes e identificación de poblaciones características por medio del “software” CITRUS (R).

Inicialmente, las PBMCs de cada uno de los pacientes se marcan y leen por citometría de flujo, de donde se obtiene un archivo por muestra en formato FCS, que contiene la fluorescencia por célula de cada uno de los marcadores (anticuerpos) utilizados (Figura 30.1). Este archivo se analiza inicialmente de forma manual mediante la definición de las poblaciones en el programa FlowJo, y se obtienen los porcentajes vistos en las primeras secciones (Figura 30.2).

Una vez analizados los datos, se exporta una nueva versión del archivo FCS que solo incluye los datos de la población de interés, eliminando el ruido de fondo generado por poblaciones no específicas y por detritos celulares (Figura 30.3). Este nuevo archivo en formato .FCS es analizado por cuatro sistemas. El primero, es el análisis por componentes principales (PCA) utilizando la herramienta estadística SPSS (IBM) con el fin de “reducir” en dimensiones principales el comportamiento de los pacientes y los controles sanos en relación a las variables evaluadas (Ver análisis por componentes principales más adelante) (Figura 30.4).

A partir de los datos en formato .FSC, se genera un nuevo archivo con los datos concatenados por grupo, es decir, todos los pacientes analizados pertenecientes al grupo de cáncer avanzado se unen y se genera un nuevo archivo que contiene la lectura total del grupo. Este paso se repite para todos los 5 grupos (Figura 30.5), y se analizan a través del sistema SPADE (spanning tree progression of density normalized events) el cual consiste en una serie de algoritmos para generar clústeres (agrupamiento de células a partir de semejanzas en la intensidad de fluorescencia) y que además permite analizar de manera visual la comparación en la expresión de cada fluorocromo entre muestras distintas (Figura 30.6). A partir de este análisis, se obtienen los valores de frecuencia de cada marcador en cada uno de los clústeres generados por cada uno de los 5 grupos; estos datos se utilizan para construir una matriz, con la cual se genera un mapa de calor utilizando el “software” MEV. A estos datos se les realiza un análisis jerárquico de grupos (HCL), que genera un árbol de relación, y permite ver la diferencia en la expresión de una población o de un marcador específico para uno de los 5 grupos, y de esta forma identificar posibles patrones inmunológicos específicos para cada estadio (Figura 30.7) (Ver más adelante análisis por SPADE).

Finalmente los datos obtenidos en el paso 3 se analizan por un último algoritmo, conocido como CITRUS, el cual se ejecuta a través del programa R, y usa un análisis de clustering jerárquico seguido por la evaluación estadística con el objetivo de encontrar diferencias significativas entre grupos de forma automatizada, no solo para correlacionar las poblaciones con la enfermedad, sino también para poder clasificar una muestra X en uno de los grupos establecidos (Figura 30.8) (Ver más adelante análisis por Citrus)(203).

ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)

El análisis de componentes principales (PCA), es un método estadístico utilizado para reducir las dimensiones de un set de datos complejo a un nuevo conjunto de variables no correlacionadas (denominados componentes principales) que agrupan y resumen la variabilidad de los datos originales con el fin de explicar de manera simple el comportamiento de los individuos evaluados (204-206).

El PCA se basa en la relación entre la variabilidad y la información, en donde cuanto mayor sea la variabilidad de los datos (varianza) se considera que existe mayor información (entropía). Es por esta razón que este método se basa en transformar linealmente los datos en un nuevo sistema de coordenadas, proyectando los datos sobre nuevos ejes, siendo el primer eje el de mayor varianza (204-206).

Para el caso del inmuno-monitoreo realizado, se determinaron 46 variables por medio del análisis manual de la citometría de flujo, con el ánimo de explorar desde múltiples poblaciones el estado inmunológico del paciente y asociarlo con su enfermedad. Sin embargo, el manejo de toda la información resulta complejo, y entender cuál o cuáles de estas variables son aquellas que generan más información se torna arduo. Además, algunas de estas variables están relacionadas, (miden la misma respuesta desde distintos puntos de vista) por ejemplo los parámetros para determinar el grado de maduración de células dendríticas, donde la expresión de CD80, CD83 y producción de citoquinas están relacionadas y evalúan la respuesta desde distintos puntos; por lo que, es necesario reducir el número de variables sin perder la información importante.

Inicialmente, se construyó una matriz compuesta por las 46 variables de cada uno de los pacientes, para un total de 25 pacientes (cinco por cada uno de los cinco grupos evaluados - sanos, gastritis, metaplasia, cáncer temprano y cáncer avanzado). A partir de esta matriz, se analizó mediante PCA en “*software*” SPSS (IBM versión 16).

Entre los resultados obtenidos, se evaluaron los dos estadísticos que valoran la bondad de ajuste de los datos, es decir que tan bien explicados están las variables en el modelo. El primero, KMO, es un estadístico que varía entre 0 y 1; en donde los valores mayores a 0.5 indican que las correlaciones entre pares de variables son explicadas por otras variables, es decir que la magnitud de las correlaciones parciales es menor a la magnitud de la correlación general entre todas las variables. El segundo análisis de bondad de ajuste es la prueba de esfericidad de Bartlett, que utiliza *ji-cuadrado* para evaluar la matriz de correlaciones, buscando que ésta no sea una matriz de identidad. Un valor significativo ($p < 0.05$) probaría que en este ensayo las variables no están intercorrelacionadas.

Debido a la gran cantidad de variables en tan pocas muestras, ninguno de los dos estadísticos mostró niveles significativos, por lo cual se inició una nueva fase de análisis buscando resultados con una bondad de ajuste aceptable, que además incluyeran la mayor cantidad de variables explicadas en el ensayo.

Se realizaron diferentes análisis obteniendo finalmente un ensayo en donde se podía identificar las variables más importantes que diferenciaban los 5 grupos analizados, eliminando aquellas variables en donde la información era redundante (por ejemplo la expresión de CD83 y CD80 en la maduración de DCs). Este ensayo obtuvo un valor de KMO de 0.570, el cual si bien no es un resultado perfecto, presenta una buena adecuación de los datos. Así mismo, la prueba de esfericidad de Bartlett mostró un valor $p = 0.001$, efecto que muestra que la matriz de datos es válida para continuar con el análisis por PCA.

Paso seguido se evaluaron las comunalidades obtenidas en el análisis, es decir, que tanto los componentes explican la variable. Inicialmente, cada una de las variables evaluadas tiene un

valor de uno, una vez realizado el análisis se observa todas las variables tienen valores superiores a 0.4; y variables como las poblaciones de monocitos intermedios (CD14⁺⁺, CD16⁺) y a la población de monocitos clásicos (CD14⁺⁺, CD16⁻) son aquellas que tienen mejor explicada su varianza en el componente, mientras que variables como la expresión de CD80 en respuesta a la maduración y el porcentaje de CD8, se explican en menor medida en el modelo (Tabla 5).

Comunalidades		
	Inicial	Extracción
D-IL-12-MAD.	1.000	.634
F-CD80-MONO	1.000	.422
% CD8	1.000	.433
m-MDSCs	1.000	.607
REL TREG/CD8	1.000	.486
CD14 ⁺⁺ /CD16 ⁺	1.000	.868
CD14 ⁺⁺ /CD16 ⁻	1.000	.866
DCs INM	1.000	.600
DCs PLASM	1.000	.497

Método de extracción: análisis de componentes principales.

Tabla 5. Comunalidades obtenidas para cada una de las variables, una vez realizada la extracción. Los valores iniciales corresponden a uno, mientras que los de extracción muestran el grado de explicación de cada variable en los componentes obtenidos.

Posteriormente, se evaluó la extracción de los factores iniciales, a través de la agrupación de las 9 variables seleccionadas, en unas nuevas variables (componentes). Una herramienta para determinar el número de componentes a seleccionar es el gráfico de sedimentación, en el cual es posible visualizar y elegir el número de componentes cuyos valores propios (autovalores) sea mayor a uno. En el caso del modelo obtenido se indica que se deben extraer dos componentes (Figura 31A).

Así mismo, la tabla de varianza total explicada demuestra con más detalle la selección de los dos componentes, pues como se puede ver en la Figura 31B, únicamente los dos primeros factores tienen autovalores mayores que 1 y explican el 60.157% del total de la varianza de los datos originales (Figura 31B).

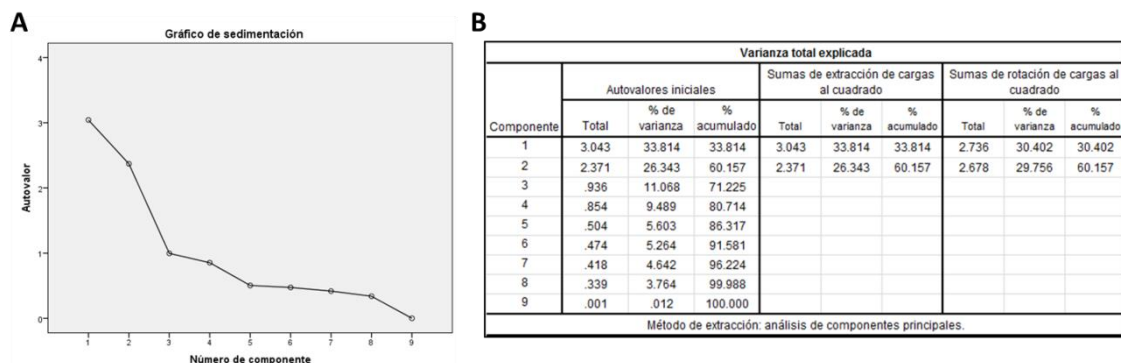


Figura 31. Evaluación extracción de factores iniciales. (A) Gráfico de Sedimentación, en donde el autovalor = 1 equivale a dos componentes. (B) Varianza total explicada; los dos componentes seleccionados explican el 60.2% de la varianza propia. Autovalores (valores propios)

Finalmente, se analizó la distribución de las variables en los dos componentes utilizados, encontrando una buena correspondencia entre la variable y el factor, es decir, que las

variables están bien representadas en uno u otro componente. Se observa además, que variables como los monocitos intermedios, monocitos clásicos y la expresión de CD80 en monocitos son atribuibles al componente 1, mientras que las m-MDSCs, las dendríticas inmaduras, la relación entre Treg y CD8 y el porcentaje de CD8 totales se atribuyen al componente 2 (Figura 32A).

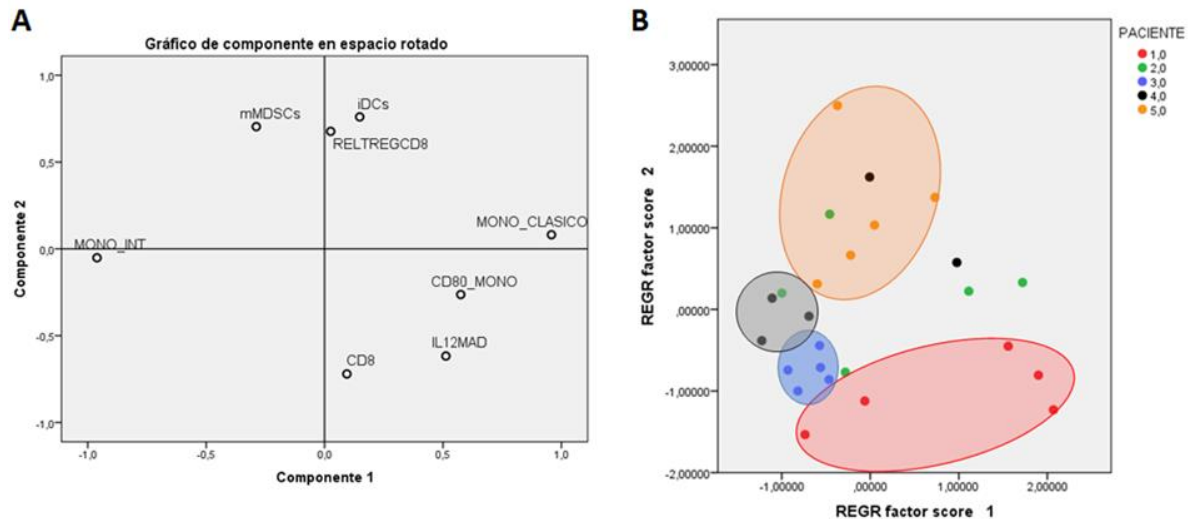


Figura 32. Gráfico de componentes y distribución de pacientes en el espacio rotado. (A) Espacio de distribución de cargas de las variables seleccionadas por PCA, y ubicación de las variables incluidas en el análisis por componentes principales. (B) Distribución de las muestras según el puntaje de PCA (PC score) de donantes sanos (rojo), gastritis (verde), metaplasia (azul), cáncer temprano (negro), y cáncer avanzado (naranja) n=5.

Posteriormente, se graficó la distribución de cada uno de los pacientes en relación con los componentes; pudiéndose observar que las muestras provenientes de las diferentes patologías se agrupan. Estas agrupaciones se resaltan en la Figura 32B, los donantes sanos (círculos rojos) tienden a presentar bajos valores en el componente 2, y de manera progresiva metaplasia (círculos azules), cáncer temprano (círculos negros) y avanzado (círculos naranjas) se desplazan en dirección del componente 2 (Ver Figura 32A).

ANÁLISIS POR SPADE

Una de las primeras herramientas utilizadas para analizar y visualizar computacionalmente datos de citometría es SPADE (*Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events*), el cual representa poblaciones celulares en una estructura de dendrograma, permitiendo de esta forma visualizar datos complejos (múltiples dimensiones) de una manera simplificada en un diagrama 2D (207).

El árbol generado por SPADE consiste en nodos que representan poblaciones de células con características similares de expresión de marcadores, la cantidad de células pertenecientes a este grupo es representada por el tamaño del círculo generado. Estos nodos, además están conectados dependiendo de la relación existente entre los grupos, y permiten identificar linajes de células. Adicionalmente, SPADE permite sobreponer una escala de color, que representa la expresión de un marcador determinado, o cambios de expresión entre dos individuos en los nodos, sin embargo, las características de una sola célula no son posibles de determinar.

Para crear el árbol SPADE el algoritmo ejecuta los siguientes pasos: primero, realiza un muestreo dependiente de la densidad, escogiendo con mayor probabilidad las células con pocos vecinos en el espacio de alta dimensión, asegurando de esta forma una representación similar de los tipos celulares raros y los abundantes, facilitando la identificación de los subconjuntos raros. Paso seguido el “software” realiza *clustering* jerárquico aglomerado, en donde agrupa las células cercanas hasta que alcanza el número de *clústeres* previamente determinado. Después de esto, SPADE construye un árbol de expansión mínima, enlazando todos los nodos de la red de forma directa o indirecta utilizando la menor cantidad de conexiones posibles. Finalmente, todas las células del conjunto de datos inicial son asignadas al *cluster* correspondiente.

SPADE se ha utilizado en varias publicaciones, las cuales en su mayoría, identifican poblaciones inmunes durante el proceso de hematopoyesis, evaluando moléculas de activación en respuesta a fármacos, y buscando brindar una visión de poblaciones inmunes que antes no eran centro de atención (208-211).

En el caso del análisis realizado en los pacientes de nuestro interés, se evaluó la población de linfocitos utilizando el panel de anticuerpos que contenía los siguientes anticuerpos: CD4, CD8, CD45Ra, CCR7, PD1, BTLA, CTLA-4, CD25, FoxP3 e IL-17. Debido a que este “software” por sí solo no es capaz de comparar dos archivos, se realizó un proceso de concatenación de los datos de citometría obtenidos en el formato *.fcs; en donde los 5 individuos analizados por patología se agruparon en un solo archivo, de esta forma los resultados obtenidos en SPADE representaran el grupo completo de la patología. Paso seguido, se verificó la compensación de cada una de los marcadores, y se eliminaron los detritos celulares y el ruido de fondo, y se seleccionó la población de interés inicial (linfocitos) mediante SSC-A y FSC-A. Una vez se obtuvieron los cinco archivos concatenados (uno por cada patología analizada), se ejecutó el algoritmo SPADE a través del “software” MATLAB (Mathworks, versión 2015) mediante el uso del código disponible en línea (207) (Figura 33).

Una vez cargados los archivos se definieron los siguientes parámetros para construir el SPADE. Inicialmente, se seleccionaron los marcadores CD4, CD8, CCR7 y CD45Ra como marcadores gruesos para la identificación de las principales poblaciones. Paso seguido, se ajustaron los valores de escala bi-exponencial a escala logarítmica aplicando la transformación Arcsinh con un cofactor de 150 (recomendado para lecturas en citometría de flujo)(212), y se ajustó a 1% el parámetro de densidad atípica (porcentaje de células o eventos con muy pocos vecinos, los cuales se consideran ruido), y a 20.000 el número mínimo de células que se debe extraer de cada muestra. Finalmente se ajustó el modelo de agrupamiento K-means, y la generación de 100 clústeres, los cuales deberían diferenciar poblaciones raras.

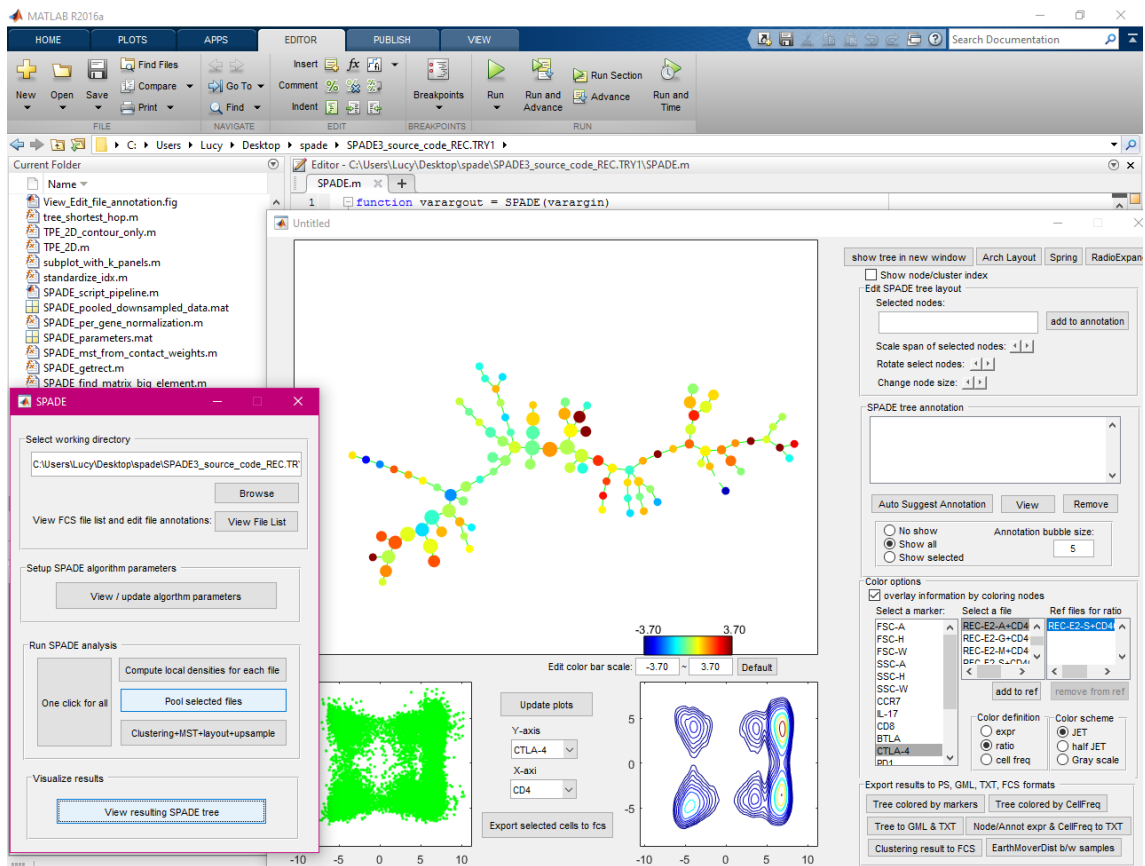


Figura 33. Plataforma de SPADE en el “software” MATLAB. En la izquierda se muestra cada uno de los pasos a realizar para ejecutar el “software”, en donde se selecciona la carpeta con los datos, los archivos .FSC a analizar, la selección de parámetros, y la ejecución del “software”. En la ventana de la derecha se observa la salida del análisis donde se muestra el árbol SPADE, la intensidad (escala de colores) de los diferentes marcadores en los grupos (proporción a un referente o total), ubicación del grupo seleccionado en relación con los datos originales.

Dado que SPADE incluye pasos que implican decisiones aleatorias (naturaleza no determinista), ejecutar el programa múltiples ocasiones, resultará en árboles organizados de forma diferente, lo que debe tenerse en cuenta al aplicar SPADE. Mientras que la organización del árbol en cada ejecución individual puede parecer distinta, se ha encontrado que las poblaciones identificadas son comparables a través de varias ejecuciones (207).

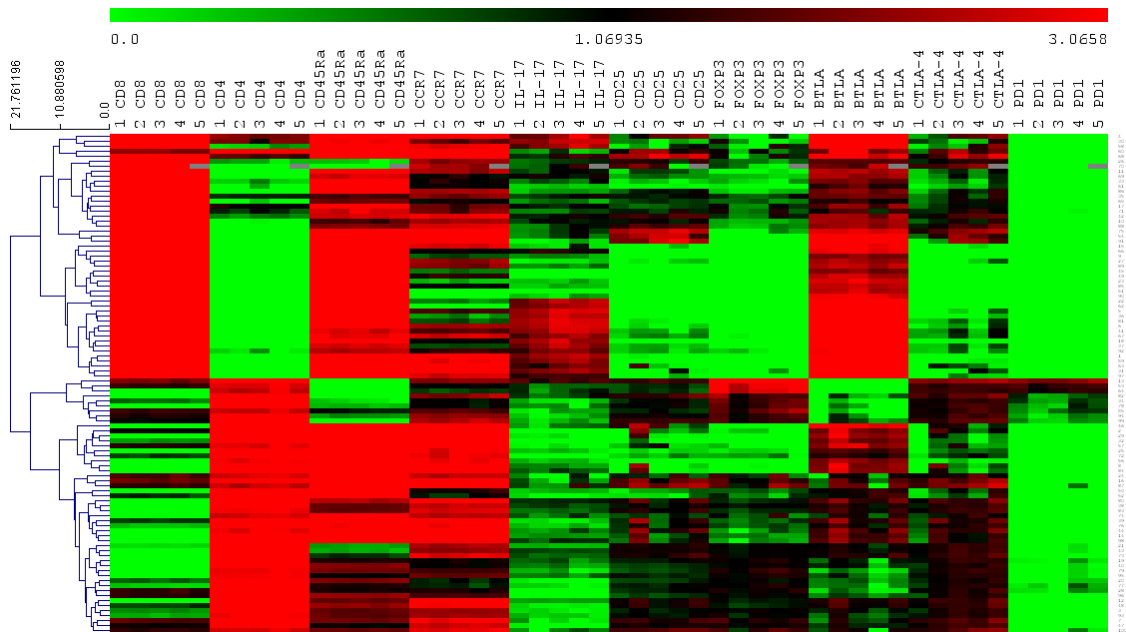


Figura 34. Mapa de calor y análisis por HCL a partir de los datos de obtenidos en SPADE. Sano (1), Gastritis (2), Metaplasia (3), Cáncer Temprano (4), Cáncer Avanzado (5).

Una vez se obtuvieron los resultados de SPADE, se exportaron los archivos del “software” y se generó una matriz que contenía los valores de la expresión media de cada marcador, por cada uno de los archivos de las 5 diferentes patologías. Esta matriz luego fue exportada a (MEV), en donde se realizó un mapa de calor y una organización jerárquica no supervisada (HCL – *hierarchical clustering*) (Figura 34).

Las 100 poblaciones obtenidas simultáneamente para los 5 grupos, permiten describir de manera global la expresión de cada marcador, y observar patrones y asociaciones entre grupos. Esta disposición compacta de los resultados, permite realizar comparaciones simultáneas, inicialmente, la separación clara entre los linfocitos CD4+ y CD8+, los cuales son principalmente poblaciones vírgenes (CD45Ra+ / CCR7 +) comunes para los cinco grupos. Por otra parte, se observa que la IL-17 está principalmente expresada en los linfocitos CD8+, y que la expresión varía entre grupos. Así mismo, se observa una expresión media de los marcadores CD25 y Foxp3 en el clúster CD4, sin embargo, existen algunos clústeres que muestran expresión alta de Foxp3, en poblaciones CD4+/ CD25+, sugiriendo la presencia de células Tregs, aumentadas sutilmente en las patologías con cáncer. Finalmente, el análisis de los receptores inhibitorios muestran que: BTLA tiene la mayor expresión dentro de los receptores evaluados, principalmente en la población CD8+; por otra parte, el CTLA-4 está expresado en menor cantidad en ambas poblaciones, y finalmente PD1, es el que tiene una menor expresión principalmente co-expresado con CD4 (Figura 34).

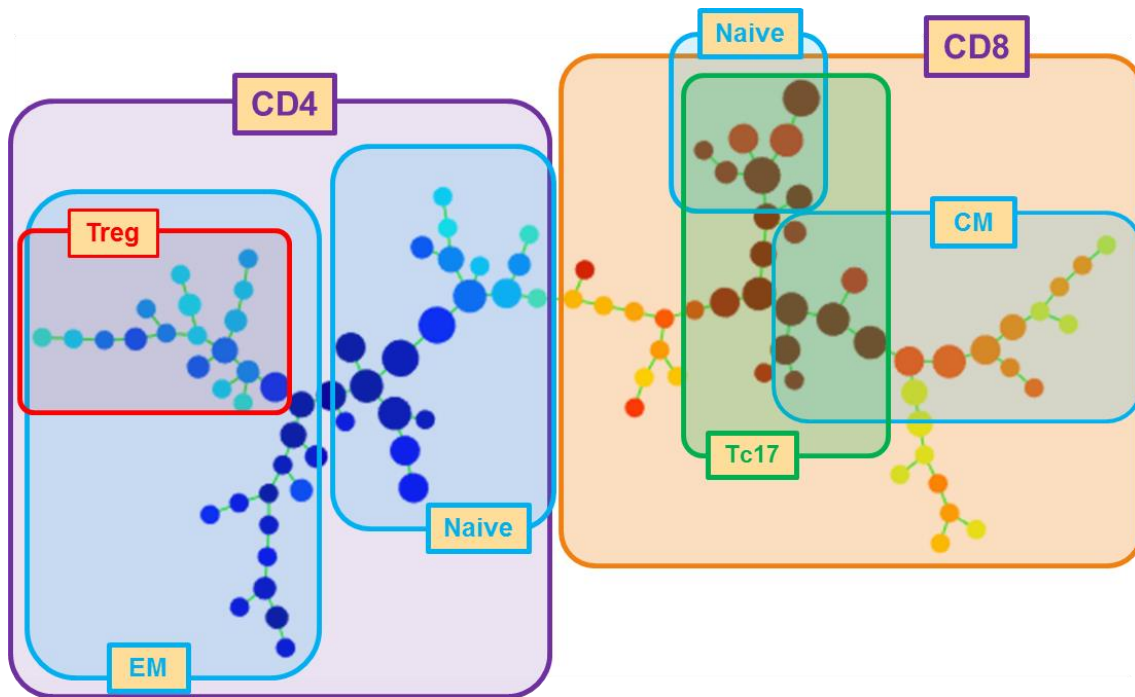


Figura 35. Identificación de las principales poblaciones de linfocitos a partir de la expresión de los marcadores específicos. Se observa una división clara entre los linfocitos CD4 y CD8, además de la identificación de las principales poblaciones de memoria (Naive – vírgenes, EM – memoria efectora, CM, memoria central), y de las poblaciones Tc17 y Treg.

A partir de estas observaciones del mapa de calor y con ayuda de los árboles generados por SPADE para la expresión de cada uno de los marcadores, se realizó la identificación de las principales poblaciones, inicialmente divididas entre las CD4+ y las CD8+, a partir de las cuales se identificaron las poblaciones de memoria, principalmente vírgenes, y memoria efectora, en las CD4+, y memoria central, en las CD8+. Finalmente se identificaron las poblaciones Tc17 (expresión positiva de IL-17 en CD8+) y Treg (CD4+ CD25+, FOXP3+). La identificación de los receptores inhibitorios dentro del árbol no fue realizada, debido a una distribución muy amplia (Figura 35).

Finalmente, basándose en las diferencias que sugiere el mapa de calor, se realizó una comparación de la proporción de cambio con respecto al grupo de los donantes sanos. Inicialmente se realizó la evaluación de la IL-17, encontrando que en gastritis, esta citoquina tiene niveles similares a los donantes sanos; sin embargo desde metaplasia empieza a aumentarse y permanece alta en ambos tipo de cáncer, tanto temprano, como avanzado (Figura 36 – panel superior).

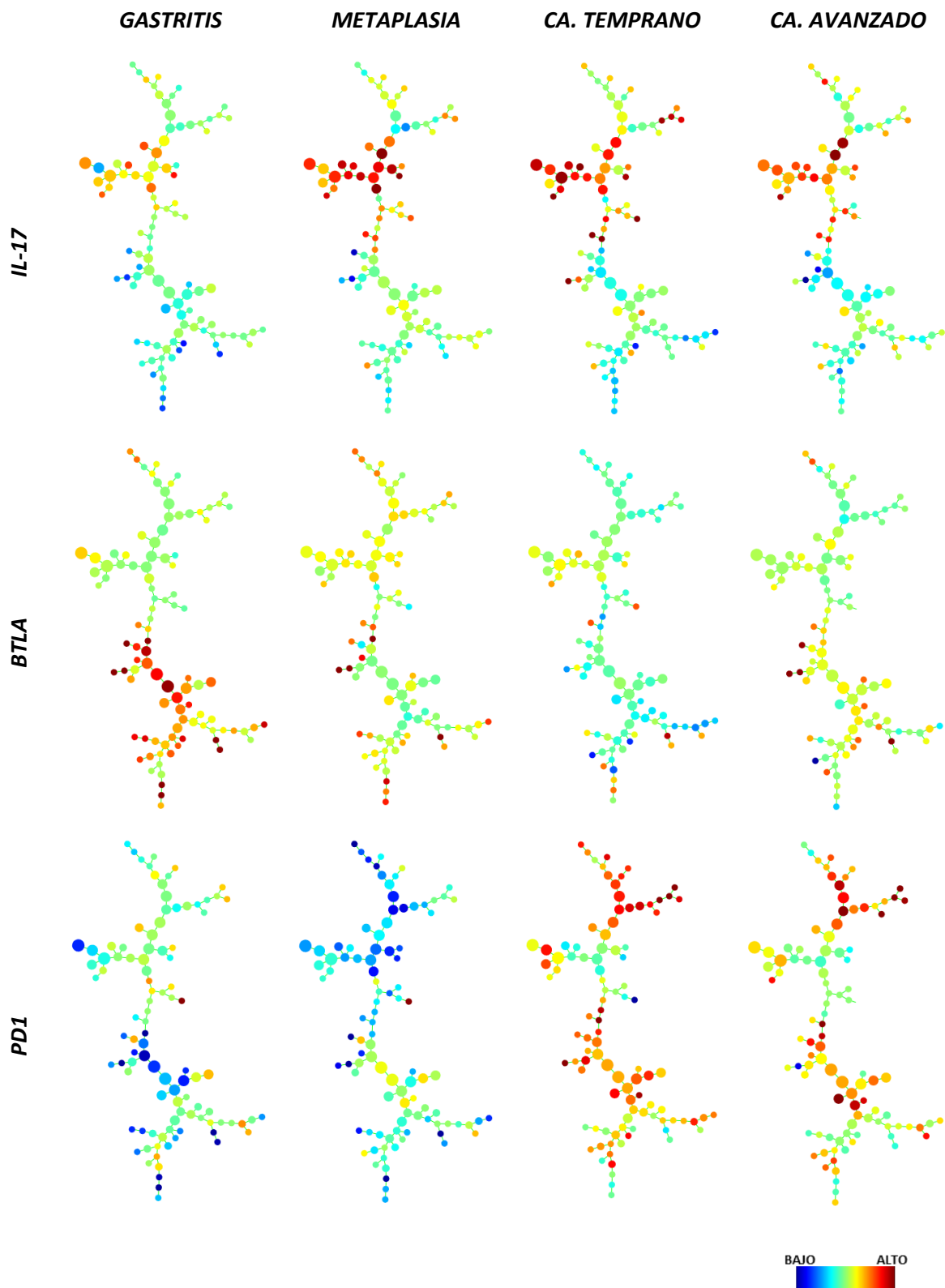


Figura 36. Proporción de cambio en la expresión de los marcadores IL-17, BTLA y CTLA-4 en cuatro grupos de la carcinogénesis gástrica en comparación con los donantes Sanos. Árboles generados por SPADE de la proporción de cambio entre sanos y gastritis, metaplasia, cáncer temprano y cáncer avanzado para los marcadores IL-17 (PANEL SUPERIOR), BTLA (PANEL CENTRAL) y CTLA-4 (PANEL INFERIOR). Escala de colores (azul – rojo) observando la disminución (círculos azules), el incremento (círculos rojos) o el no cambio de los grupos evaluados con respecto al donante sano.

La misma evaluación se realizó para los receptores BTLA Y PD1, en donde se encontró que, que BTLA está altamente expresado en el grupo de gastritis, sin embargo esta expresión disminuye para el resto de las patologías (Figura 36– panel central). Finalmente, la evaluación de PD1 mostro, de forma similar a lo reportado en la bibliografía, una alta expresión en los grupos con cáncer, tanto en poblaciones CD4 como CD8. Sin embargo, la evaluación de este receptor en estadios benignos, esta disminuido en comparación con los individuos sanos (Figura 36– panel inferior).

ANÁLISIS POR CITRUS

Además de SPADE, se utilizó un segundo algoritmo conocido como CITRUS (Identificación, caracterización y regresión de *clústeres*), ejecutado en R; algoritmo que también permite la visualización de los datos de citometría multiparamétrica, pero además, y contrario al primero, permite la identificación de poblaciones celulares con niveles de abundancia o expresión estadísticamente distinta entre grupos.

El algoritmo de CITRUS mediante un proceso automatizado y no supervisado, combina la identificación computacional de poblaciones celulares, y la asociación con un factor respuesta externo, (mejor o peor pronóstico, buenos o malos resultados clínicos o incluso tiempo de supervivencia)(203, 213-215), y en el caso de este trabajo, el grado de malignidad de la carcinogénesis gástrica.

El panel de marcadores utilizado para evaluar esta diferenciación fue el mismo utilizado en el análisis por SPADE, el cual contiene 9 marcadores para caracterizar linfocitos (CD4, CD8, CD45Ra, CCR7, PD1, BTLA, CTLA-4, CD25, FoxP3 e IL-17). Inicialmente, se realizó una evaluación de los 5 grupos (sano, gastritis, metaplasia, cáncer temprano, y cáncer avanzado), sin embargo la pequeña cantidad de pacientes (n=5 por grupo) no mostro poblaciones diferenciales. Por esta razón se realizó nuevamente el análisis evaluando solo 3 estadios: los 5 donantes sanos, los pacientes con un estadio benigno de la enfermedad (5 con gastritis y 5 con metaplasia), y los pacientes que ya padecían cáncer (5 en estadio temprano y 5 en avanzado).

CITRUS se inició a partir de los datos de citometría en formato FSC. de los 25 pacientes. Luego, el algoritmo seleccionó de forma aleatoria 30.000 células (numero definido manualmente) por cada una de las 25 muestras, células que el “*software*” combinó en un solo set de datos, a partir del cual se generaron los clústeres de células fenotípicamente parecidas, proceso similar al realizado por SPADE. Paso seguido, de forma aglomerativa y jerárquica, el algoritmo reduce el número de nodos cercanos en el espacio multidimensional, estableciendo a 1% el tamaño mínimo de los clústeres generados mediante el umbral MCST (mínimum cluster size threshold), con el objetivo de buscar poblaciones raras. Para un total de 750.000 células evaluadas (30.000 por cada uno de los 25 pacientes incluidos), un población debería tener mínimo 750 células para ser considerado un clúster y ser evaluada dentro del logaritmo de CITRUS.

Una vez que el total de las células se agruparon en los diferentes modelos, CITRUS traslado los parámetros descriptivos a una nueva matriz de propiedades, la cual contiene la información de la abundancia (proporción de células en cada clúster), y la expresión media de cada uno de los marcadores utilizados. Una vez generada la matriz, se separan los datos de cada una de las 25

muestras. Finalmente, esta matriz, es utilizada para identificar relaciones entre los clústeres generados y el factor de respuesta mediante modelos correlativos y predictivos.

El modelo correlativo SAM (significance análisis of microarrays), fue inicialmente utilizado para la evaluación de expresión génica en micro-arreglos (216), sin embargo se ha implementado en citometría ya que es utilizado para identificar las relaciones entre la medida de los parámetros y el factor respuesta.

A partir de los 25 pacientes evaluados en el estudio, se buscó relacionar la abundancia en la expresión de poblaciones particulares con uno de los tres principales estadios: *Sano*, *Benigno* (gastritis o metaplasia) o *Cáncer* (temprano o avanzado). Se obtuvieron dos modelos de interés con diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$). El clúster 96191 mostró que los donantes sanos tuvieron mayor abundancia que las dos patologías evaluadas ($p=0.004$); los pacientes con cáncer mostraron una media con niveles intermedios, seguidos por aquellos con patología benigna que tuvieron los niveles más bajos, pero una dispersión más marcada (Figura 37A). Por otra parte, los pacientes con el clúster 96186 mostraron una mayor dispersión, en la abundancia sin embargo se mantuvo la diferencia entre los donantes sanos y las patologías benigno y cáncer ($p=0.025$), que tuvieron niveles similares (Figura 37B).

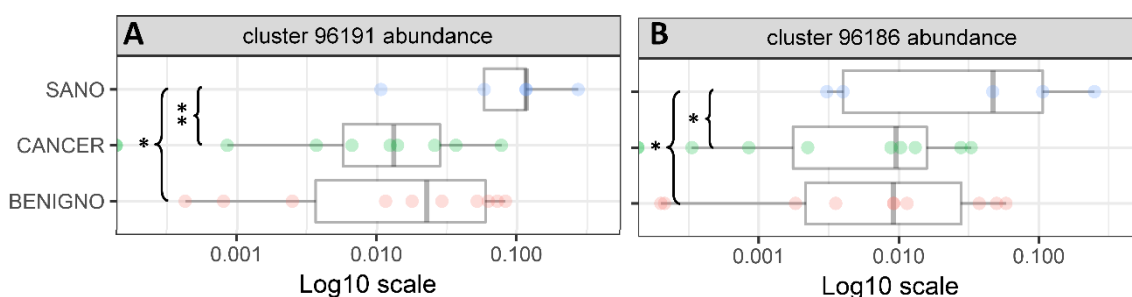


Figura 37. Clústeres identificados por CITRUS que permiten diferenciar entre las tres patologías analizadas. Los clústeres (A) 96191, y (B) 96186 diferencian de forma estadísticamente significativa los tres grupos de individuos analizados mediante la expresión diferencial de estos.

Una vez que se tuvieron los clústeres que permitían diferenciar los tres estadios evaluados, se procedió a caracterizarlos. Inicialmente, se observó su ubicación en el árbol jerárquico, en donde se encontró que los dos clústeres identificados se encuentran muy cercanos entre sí, y contienen una gran cantidad de células (identificado por el tamaño del círculo) (Figura 38A). Es importante aclarar que el árbol de CITRUS está formado representando eventos redundantes, es decir cada evento puede contribuir a múltiples clústeres (inicia con un clúster central – en este caso el 96193 que contiene todos los eventos incluidos en el análisis, este luego se divide en dos clústeres hijos y estos a su vez en otros dos clústeres y así sucesivamente hasta que los eventos contenidos en el clúster son menores al MCST (Figura 38A).

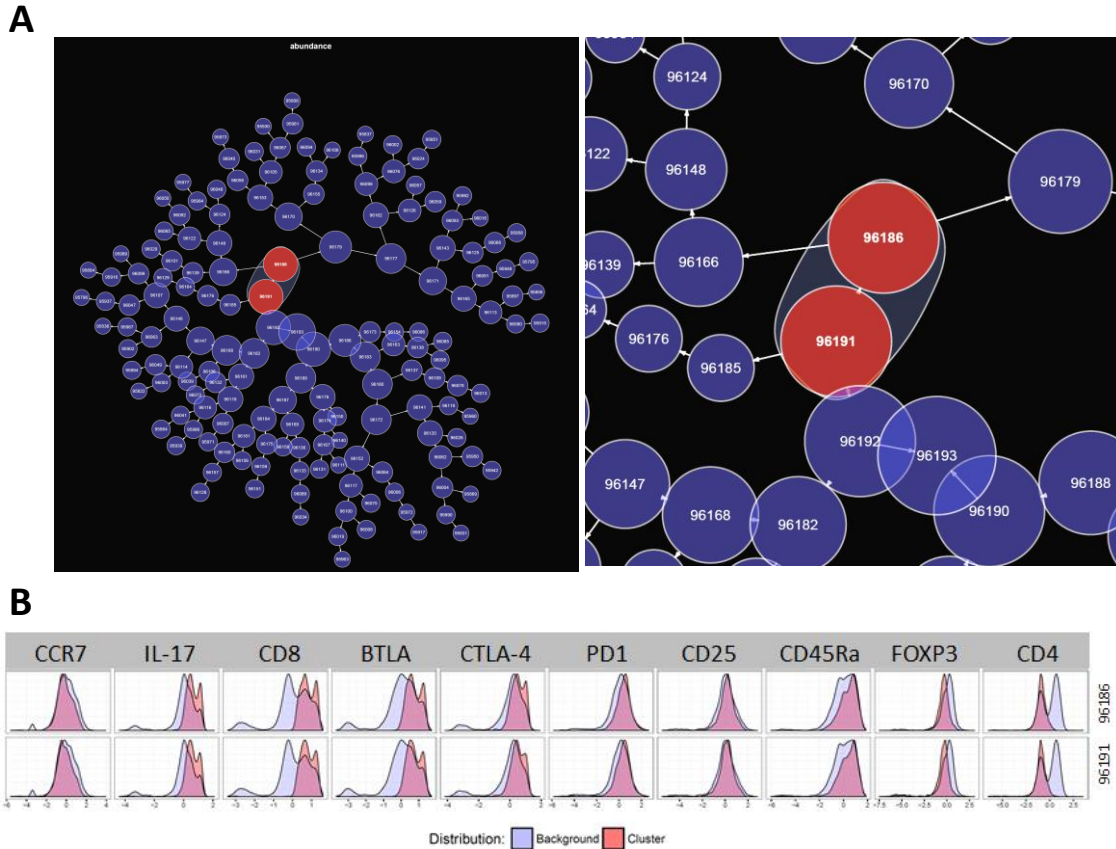


Figura 38. Caracterización de los clústeres que permiten diferenciar los tres estadios evaluados. (A) Árbol jerárquico en donde se señala la relación entre cada uno de los clústeres generados. En rojo se resaltan los dos clústeres de interés (96186 y 96191) que tienen una expresión diferencial significativa entre los tres grupos analizados. (B). Histogramas de expresión para cada uno de los 9 marcadores utilizados. En rosado se muestra la expresión de cada uno de los clústeres identificados, y en azul la distribución de la población total de células analizadas.

Paso seguido, se determinó la expresión de marcadores en estos clústeres a partir de la evaluación de los histogramas de expresión media normalizada ($\text{Arcsinh} = 150$) para cada uno de los 9 marcadores utilizados en los 2 modelos obtenidos. Inicialmente, se observó que como era de esperarse debido a la cercanía de las poblaciones en el árbol, existe una expresión muy similar de marcadores entre los dos clústeres, los cuales tienen una expresión positiva para los marcadores CD8, IL-17, BTLA, CTLA-4 y PD1, y valores negativos para los marcadores CD4 y FoxP3, por lo que se determina que esta población es una población citotóxica (CD8+), que expresa los tres receptores inhibitorios evaluados y además contiene IL-17 (Figura 38B).

Por otra parte, el modelo predictivo o modelo PAM (prediction analysis microarray), se basa en un algoritmo de aprendizaje no supervisado, que es capaz de identificar la combinación de clústeres que mejor predicen la asignación de una muestra a uno de los factores de respuesta, es decir, permite clasificar un individuo X en uno de los grupos establecidos de acuerdo a los niveles que este tenga en la combinación de clústeres. En el caso de este estudio, la clasificación del individuo dependerá de los niveles que este tenga de la población Tc17 CTLA-4+, BTLA+ PD1+, identificada anteriormente.

El resultado de este proceso de evaluación (PAM) se representa en un gráfico que evalúa la calidad del análisis predictivo, mostrando la tasa de error estimada para cada modelo (puntos rojos) a medida que se utilizan diferentes umbrales de regularización. Esta tasa tiene valores de 0 a 100% en donde un valor de 0% es igual a un valor predictivo perfecto. Además, de cada punto rojo sale una línea punteada que señala el error estándar de esta tasa. De la misma forma, el modelo genera una línea azul, que indica la tasa de falsos descubrimientos en cada modelo, con valores igualmente de 0 a 100%. Por último, la escala superior muestra el número de propiedades de cada modelo (Figura 39).

Citrus reporta tres modelos preseleccionados basándose en estas tasas de error y de falsos descubrimientos. El primero es el **cv.min**, representado por un punto verde, este es el modelo que representa el set de clústeres que diferencian los grupos con la menor tasa de error. El segundo es el **cv.1se**, identificado como un diamante naranja, representa el modelo más simple teniendo una tasa de error estándar de uno. En los casos en los que este modelo tiene cero propiedades, la evaluación debe considerarse nula, pues el punto final no puede ser descrito por la varianza de los datos (Figura 39B). El último modelo es el **cv.fdr.constrained** está representado por un triángulo amarillo, y representa el modelo con el mayor número de propiedades o clústeres, manteniendo una tasa de descubrimiento falso menor al 1%.

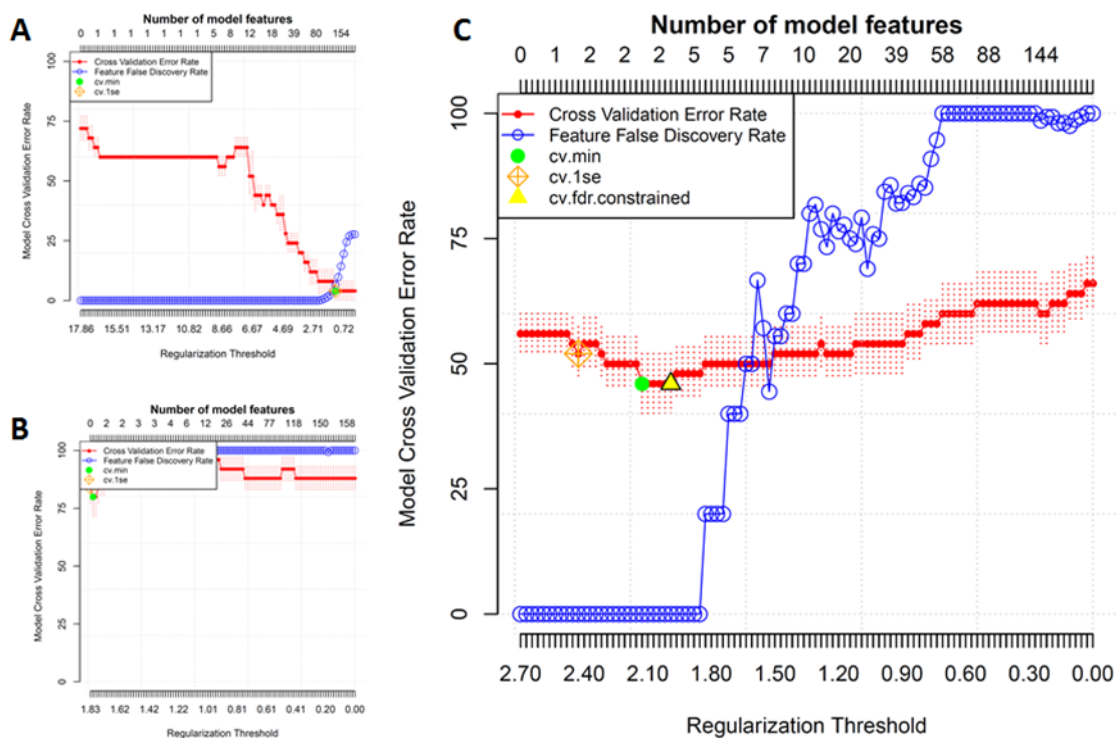


Figura 39. Validación del modelo predictivo a través del análisis de la Tasa de error. En rojo, la tasa de error estimada del modelo y en azul la tasa de descubrimientos falsos. En (A) y (B) se ejemplifican dos modelos no apropiados para el uso del modelo predictivo. En (C) se muestra el modelo obtenido para la clasificación de un individuo X en uno de los tres grupos evaluados de la carcinogénesis. Se resaltan tres modelos (cv.min, cv.1se y cv.fdr.constrained) los cuales se deberían utilizar para esta clasificación predictiva.

En la Figura 39, se muestran tres gráficos de calidad, en A y B se ejemplifican dos evaluaciones no apropiadas para el análisis predictivo. El primero muestra una tasa de error y de

descubrimiento falso del 0%, efecto que sería ideal, sin embargo la cantidad de propiedades que se deben tener en cuenta para clasificar un individuo es de 154 clústeres, por lo que este modelo no es factible, dada la variabilidad de cada individuo (Figura 39A). El siguiente grafico muestra el caso contrario en donde tanto la tasa de error como la de descubrimientos falsos es del 100% o muy cercana, por lo que ninguno de los modelos es válido (Figura 39B). Finalmente, en la Figura 39C se observa el modelo obtenido para la predicción del estadio de la carcinogénesis gástrica, modelo que tiene una tasa de descubrimiento falso del 0%, y una tasa de error menor al 50%.

DISCUSIÓN

El cáncer gástrico es la quinta enfermedad maligna más común y la tercera causa principal de muerte por cáncer en todo el mundo. Al igual que la mayoría de los cánceres, la incidencia aumenta con la edad, y a diferencia de la mayoría, se ha establecido una causa ambiental dominante, la infección crónica por *Helicobacter pylori*, que contribuye al 90% del riesgo de padecer cáncer gástrico de tipo intestinal (2).

Aunque existe abundante evidencia publicada en la que se analizan diferencias en el fenotipo de células del sistema inmune entre individuos sanos y con cáncer gástrico, no existe estudios de este tipo en el que se comparen los hallazgos del cáncer gástrico con lesiones benignas y pre-malignas de este tumor. Por lo anterior, en este trabajo se realizó el análisis fenotípico y funcional de células APCs y linfocitos T en sangre de individuos en diferentes etapas de la carcinogénesis gástrica. Los resultados confirman la inmuno-supresión reportada anteriormente en este tumor y además sugieren que el estadio de metaplasia es un punto de inflexión entre la respuesta activa de la gastritis no atrófica y la inmuno-supresión de estos dos compartimentos celulares que permiten el desarrollo tumoral.

MONITOREO APC Y LINFOCITOS

En las diversas poblaciones de células APC y linfocitos T evaluadas en PBMCs, se encontraron algunas tendencias que sugieren cambios durante el desarrollo del cáncer gástrico. Los monocitos de sangre periférica son blanco de efectos inmuno-moduladores y quimio-tácticos secretados bien sea por células del sistema inmune o por los tumores. En el cáncer colorectal, un elevado número de monocitos CD14+ es considerado un factor pronóstico en sangre (217). Acorde con esto, en el monitoreo de monocitos en sangre de individuos durante la carcinogénesis gástrica observamos un aumento de este tipo celular en pacientes con cáncer (temprano y avanzado) en comparación con los estadios benignos. Los niveles aumentados en cáncer podrían ser atribuidos a la disminución de la quimiotaxis de estas células al tejido, promovida por quimoquinas como MIP-3 α e IL-8 mediadas por la activación de NF- κ B inducida por *H. pylori* en el epitelio gástrico en lesiones benignas, como ha sido sugerido previamente (218, 219).

Dependiendo de los estímulos a los que se encuentra expuesta esta población CD14+, se induce la diferenciación hacia monocitos clásicos, intermedios o no clásicos, los cuales se caracterizan de acuerdo a su perfil de citoquinas, la capacidad de fagocitosis y la habilidad de presentar antígenos a los linfocitos T vírgenes (220). En este estudio, la población de monocitos no clásicos (CD14+/CD16+) mostro un incremento en sangre periférica en individuos con gastritis, metaplasia y cáncer temprano, concordante con lo reportado en distintos procesos infecciosos e inflamatorios y en algunos tipos de neoplasia (221, 222). Este aumento ha sido asociado al efecto antitumoral medido por la secreción de TNF- α , IL-12p40 e IL-12p70 y la baja liberación de IL-10 por estas células, por lo que inicialmente se consideraron una población pro-inflamatoria (120), que además, secreta especies reactivas de nitrógeno y tiene actividad citotóxica (120).

Por otra parte, la fracción de monocitos intermedios (CD14⁺⁺/CD16⁺), similares a los macrófagos de tejido, asociados a patologías gástricas activas (16), se encuentran aumentados en los individuos con metaplasia y cáncer avanzado, y son de mal pronóstico debido a que son altamente productores de IL-10, lo que promueve un ambiente anti-inflamatorio (220) con diferenciación a macrófagos M2 e inhibición de la diferenciación de células dendríticas (223) lo cual favorecería el crecimiento tumoral (123).

Un segundo set de células evaluadas corresponde a las MDSCs, una población supresora que se encuentra aumentada en diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, su evaluación representa un problema, ya que aún no existe un consenso sobre los marcadores que deberían estar incluidos para su estudio. Las MDSCs incluyen un pequeño grupo de progenitores mieloides, así como células mononucleares inmaduras, que son fenotípicamente similares a monocitos (m-MDSCs) o a células polimorfo nucleares inmaduras (pmn-MDSCs) (132, 145). En este estudio, y se propuso un nuevo análisis de MDSCs, en donde, a partir de una revisión bibliográfica, se estableció la evaluación de tres poblaciones principales: m-MDSCs, pmn-MDSCs y un grupo mixto de células evaluado en cáncer gástrico en diversos artículos (17, 126, 130) (mix-MDSCs) con el objetivo de abarcar el comportamiento general de estas poblaciones en la carcinogénesis gástrica, y el comportamiento diferencial de las tres poblaciones supresoras, que podrían dar lugar a un posible biomarcador. Como se vio en los resultados, las pmn-MDSCs permiten diferenciar de mejor manera los diferentes estadios de la carcinogénesis gástrica, sin embargo, su validación como biomarcador deberá estar sujeta a estudios con un número mayor de individuos.

Las tendencias mencionadas en los resultado acerca del comportamiento de las MDSCs concuerdan con lo reportado en la literatura (17, 126, 130). Sin embargo, el encontrar que los individuos con metaplasia tienen los niveles más elevados de dos poblaciones mieloides supresoras podría ser explicado por la inflamación crónica propia de esta patología, en donde el aumento de GM-CSF, TGF β , TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-10, promovido por *H. pylori* (224-226), favorece la expansión de estas poblaciones celulares (145) y conlleva a que el sistema exhiba una supresión inmunológica (141-145) que da paso al desarrollo tumoral, con niveles de MDSCs consolidados desde el inicio del cáncer. De acuerdo a lo anterior, el estadio de metaplasia genera un “switch” entre los estadios iniciales y los estadios malignos.

Por otro lado, se asume que algunos componentes del microambiente tumoral interfieren con la cantidad y funcionalidad (maduración) de las células dendríticas. En este estudio se encontró que los pacientes con cáncer tienen la mayor población de células dendríticas inmaduras, lo cual ha sido previamente asociado a los niveles de VEGF (169, 227, 228) los cuales inhiben la maduración y reduce la infiltración de estas células al tumor (170). Así mismo, en los pacientes con cáncer se encontró una mayor población de dendríticas plasmacitoides cuyo aumento en sangre periférica y tejido peri tumoral ha sido reportado por otros (229) y asociado este aumento a mal pronóstico clínico en otros tumores (230). Esto debido a un aumento en la expresión de IL10 y ICOS-L (229) y la deficiente producción de IFN- α (231, 232) que promueven la inmuno-supresión mediada principalmente por la expansión de Tregs (229, 233).

Además los pacientes con cáncer tienen una disminución significativa de dendríticas mieloides, las cuales están asociadas a una respuesta anti-tumoral mediada por la producción de IL-12;

crucial para el desarrollo de respuesta de tipo Th1, y/o inmunidad citotóxica de células T antígeno específica (157), las cuales se disminuyen en cáncer de tipo epitelial a causa de la apoptosis (234, 235) inducida por gangliósidos y mucinas (236, 237).

En cuanto a la maduración de las células dendríticas, se observó una disminución de la respuesta al estímulo de maduración de estas en todas las patologías en comparación con los donantes sanos. Tanto CD80 que al estimular CD28 activa linfocitos T (238) como el CD83 marcador de maduración (239), estuvieron discretamente disminuidos especialmente en cáncer. Así mismo, la cuantificación de la IL-12 secretada en respuesta a la maduración mostró un perfil disminuido a medida que se desarrolla la carcinogénesis, con valores cercanos a los sanos en las patologías benignas y una disminución significativa en cáncer, efecto que sugiere una disminución en la activación, la proliferación y diferenciación del componente de linfocitos T vírgenes a células de fenotipo tipo Th1 y por ende una respuesta anti-tumoral menos eficiente. Por otra parte, los niveles de IL-10 mostraron estar aumentadas en DCs de los individuos con gastritis y cáncer, al igual que lo reportado anteriormente en respuesta *H. pylori*. La limitada maduración de DCs y generación de células dendríticas tolerogénicas inducida por la bacteria disminuye el desarrollo de células efectoras y favorece un ambiente inmuno-supresor que permite la persistencia de la bacteria y limita la inmuno-vigilancia y eliminación del tumor (240-242).

El segundo módulo analizado en el inmuno-monitoreo realizado fue la caracterización de la respuesta adaptativa representada por el componente de linfocitos T (CD4+ y CD8+). Esta población responsable de la inmunidad celular está a cargo de la promoción y activación de otras muchas células inmunes que ejercen actividad citotóxica e inmuno-moduladora de la respuesta anti-tumoral. El monitoreo de linfocitos T es de tal importancia que la mera relación CD4/CD8 ha sido propuesto como un marcador útil para monitorear el estatus de inmunocompetencia inmunológico y inmuno-senescencia (243). En los individuos estudiados en el presente estudio esta relación se centró aumentada a expensas de la reducción de los linfocitos CD8 únicamente en los individuos con cáncer. Este resultado apoya el uso de esta relación como marcador pronóstico en cáncer gástrico y otros tipos de cáncer (glioma, colorectal y cervical) como ha sido sugerido por varios autores (176, 177, 244). La disminución de células T está asociada entre otros factores a agotamiento inmune asociado a la edad (27) y es mediado por diferentes factores entre los cuales vale la pena mencionar la apoptosis de linfocitos T mediada por TNF α (245) y la expresión de CD95 por estas células (246).

Los linfocitos T CD4+ son una población de células ayudadoras de la respuesta inmune innata y adaptativa. La plasticidad de linfocitos T CD4+ vírgenes les permite en respuesta a diferentes estímulos provistos por otros linfocitos T, por células APC y células del estroma, diferenciarse en diferentes sub-tipos celulares que modulan de manera global la respuesta inmune. Las células Tregs son una población de linfocitos T CD4+ que ejerce funciones supresoras en diferentes tipos de tumores, incluido el cáncer gástrico. En este estudio encontramos que mientras los niveles de esta población en sangre periférica son similares en individuos sanos, con gastritis o metaplasia, los pacientes con cáncer (temprano o avanzado) exhiben la tendencia a tener un aumento de esta población asociado a una relación positiva de la razón Treg/CD8+. En su conjunto, estos dos resultados de nuestro trabajo están de acuerdo con lo reportado en estudios previos por otros autores (182, 197, 198, 247). Algunos estudios han

reportado que en la mucosa gástrica el número de Tregs esta aumentado no solo en cáncer sino también en gastritis, con una relación directa del aumento de estas células con el grado de severidad de la infección con *H. pylori*. El hecho de que esta población reguladora se encuentra disminuida en metaplasia y aumentada en cáncer gástrico (248) podría explicarse por los niveles de TGF- β los cuales son críticos para la diferenciación de Tregs (249, 250) y los cuales se ha reportado están disminuidos en metaplasia pero aumentados casi 7 veces en cáncer gástrico (251).

Mientras que en cáncer gástrico, la acumulación de Tregs se asocia con progresión tumoral y metástasis promovidas por TGF- β (252), en la gastritis, la depleción de las Tregs aunque elimina la bacteria esto probablemente favorece el desarrollo de la gastritis (253, 254). Así las cosas, estas observaciones permiten sugerir que la tolerancia inmune en estadios benignos de la patología gástrica a expensas de la función de Tregs pudiese en parte proteger al individuo de la progresión hacia el desarrollo de lesiones más severas de la mucosa incluido el cáncer. En este sentido, la disminución de esta población en la metaplasia observada en nuestros resultados probablemente favorece la reactivación del proceso inflamatorio lo cual aumenta el riesgo de desarrollo tumoral.

Además de las Treg, las células Th17 promueven la inflamación crónica mediada por *H. pylori*; en los estadios evaluados por nosotros, esta población se encuentra levemente aumentada en los pacientes con cáncer gástrico, concordante con lo reportado en la literatura, en donde se le atribuye una correlación a los niveles de células Th17 con el TNM y la metástasis a nódulo linfático (19). Al evaluar la proporción entre estas dos poblaciones Treg/Th17, se encontró una relación inversa en los donantes sanos, efecto opuesto al observado en todas las patologías, especialmente en el cáncer avanzado, en las que existe una relación directa; este efecto es concordante con lo reportado en otros artículos en donde ambas poblaciones aumentan su frecuencia de forma sincrónica en respuesta al desarrollo tumoral, siendo máxima en cáncer avanzado (19, 186). Así mismo, en los pacientes con infección con *H. pylori* que cursan con niveles elevados de Th17, se ha encontrado un aumento de la inflamación (255) asociada al control de la infección. Esta inflamación promovida por células Th17 podría estar asociada al desarrollo tumoral como resultado de la disminución del ambiente supresor (mencionado previamente) y el aumento de ROS y RNS (58), COX-2/ prostaglandinaE2, WNT/ β -catenina (256), que promueven el daño al DNA, el recambio de células epiteliales y la neovascularización (257, 258).

Una forma de explicar la acumulación de las células Th17, se da a través de la diferenciación mediada por IL-21 (259), de células Th-foliculares, las cuales en respuesta a estímulo de activación, mostraron niveles elevados en pacientes con metaplasia y cáncer, de forma similar a lo reportado en cáncer de mama (193), con un aumento de ICOS y PD1, probablemente en respuesta a la inflamación crónica inducida por *H. pylori* (191).

Finalmente, la activación de las células T induce varios cambios en la proliferación, ciclo celular, adhesión, migración y función efectora de estas células, estos cambios están asociados a expresión diferencial de marcadores que aumentan o disminuyen concomitantemente con la activación. Entre estos cambios esta la disminución del CD3 en la superficie (260), y la expresión de los marcadores de activación CD25 (IL-2R α , importante en la proliferación), CD69

(marcador de activación temprana de linfocitos), y CD154 (CD40 ligando (CD40L), involucrado en la co-estimulación de células dendríticas luego de la activación de linfocitos T) (261). En este trabajo se observó una disminución de esta respuesta en individuos con cáncer, efecto explicado posiblemente debido a la anergia temprana inducida por el tumor (262), a la tolerancia y el agotamiento de la población T (69), que en conjunto generan un estatus refractario al estímulo de las células T (263).

CORRELACIÓN ENTRE PBMCs E INFILTRADO EN MUCOSA GÁSTRICA

Dado que el monitoreo por citometría de flujo se realizó en células circulantes en sangre, en un estudio piloto con tres individuos tratamos de cotejar los resultados obtenidos de algunas poblaciones celulares en sangre con la contextura del infiltrado de leucocitos en el tejido gástrico, mediante la cuantificación automatizada de poblaciones CD4, CD8 y CD33 infiltrantes por inmuno-histoquímica. Tal y como se muestra en los resultados, estas poblaciones tuvieron valores de correlación (r , Spearman) cercanos a 1 para los tres marcadores. Igualmente esta relación fue establecida con las poblaciones MDSCs y Treg al igual que ha sido reportado en otros trabajos en los cuales ha sido descrita una correlación directa entre la frecuencia de estas células en sangre y su detección en nódulo linfático y tejido tumoral gástrico (17, 182), por lo que se sugiere que el nivel de estas poblaciones circulantes en sangre en parte reflejan su comportamiento en el tejido.

De las 5 patologías evaluadas, solo fue posible cuantificar en mucosa los estadios de gastritis crónica no atrófica, metaplasia y cáncer in-situ (temprano), en donde se observó un aumento significativo de los marcadores CD45 (leucocitos totales), CD20 (células B) y CXCL13 (quimoquina Tfh) en el estadio de metaplasia, efecto que es explicado por el alto grado de inflamación, el cual es suficiente para generar un cambio morfológico del tejido (generación de células de tipo intestinal).

EVALUACIÓN MULTIDIMENSIONAL

La versatilidad y eficiencia de la citometría de flujo permite hoy en día evaluar múltiples parámetros de manera simultánea brindando información acerca de una amplia variedad de inmuno-fenotipos a partir de una muestra limitada de células. El uso de herramientas estadísticas computacionales permite monitorear la respuesta inmune de forma automatizada, además, es capaz de generar algoritmos de aprendizaje que van a permitir en un futuro cercano clasificar pacientes en diferentes estadios, basados en el monitoreo de distintos marcadores de respuesta inmune.

En el análisis por componentes principales, a través de la reducción de dimensiones, fue posible encontrar una secuencia de la distribución de las variables asociadas al comportamiento de los grupos. Los resultados evidencian una clara transición de individuos sanos asociada a: la población CD8, la expresión de CD80 y la secreción de IL-12 en respuesta a la maduración de DCs, hacia el cáncer avanzado en donde los pacientes se caracterizaron por altos niveles de DCs inmaduras, células mieloides supresoras y una alta relación Treg/CD8. Lo

anterior sugiere una transición de la respuesta inmune, comportamiento que está de acuerdo con los resultados observados en el monitoreo manual, donde inicialmente existe un sistema inmune activo en etapas benignas que se suprime a medida que la lesión transita hacia el cáncer. Consideramos interesante el resultado de la no agrupación de los pacientes con gastritis en este análisis y atribuimos el comportamiento de estos pacientes a la variabilidad de la respuesta en etapas iniciales de la lesión gástrica, concordante con lo visto en el análisis manual.

Por otra parte, a partir de los “software” SPADE y CITRUS fue posible la identificación automática de poblaciones a través de la agrupación en clústeres y la identificación de perfiles celulares que se correlacionan con resultados previamente reportados en la literatura, además de permitir la identificación de poblaciones con fenotipos menos conocidos o poco estudiados en el contexto del cáncer gástrico. Nuestros resultados demuestran que estas poblaciones que en un análisis tradicional habrían sido difícilmente consideradas, permiten establecer diferencias entre los grupos y postular posibles funciones inmuno-moduladoras que hasta ahora no habían sido tenidas en cuenta en el cáncer gástrico.

En comparación con los donantes sanos SPADE mostró un aumento de PD1 tanto en poblaciones CD8+ como en CD4+ únicamente en pacientes con cáncer; esta expresión de PD1 en cáncer gástrico está acorde con los reportes existentes para diferentes tipos de cáncer incluido el gástrico (264) que señalan que la expresión de este marcador es sugestivo de agotamiento celular (265), lo cual ha llevado al diseño de herramientas que persiguen su inhibición como terapia antitumoral en diferentes tipos de tumores (266).

Por otra parte, la evaluación intracelular de la interleucina IL-17 mostró una mayor expresión en células CD8 que según el mapa de calor es producida por células CD45RA+ CCR7+ (marcadores tanto de células de memoria central como de células Stem Cell) (271). Dentro de los estadios evaluados, esta población se encuentra aumentada principalmente en las patologías avanzadas. De manera interesante, estos resultados obtenidos con el análisis automatizado concuerdan con el aumento de células Tc17 en pacientes con tumores gástricos previamente reportado por Zhuang y colaboradores (125). La caracterización de esta población en ese trabajo reveló que estas células no expresan perforina, GrB, PD1 ni FoxP3, lo que sugiere por nuestros resultados que su función principal es la producción de IL-17 en lugar de tener funciones efectoras citotóxicas (125).

Así mismo, SPADE mostro un comportamiento particular del marcador BTLA en la población CD4+ virgen y de memoria efectora ya que en comparación con los sanos su expresión se encontró aumentada en individuos con gastritis o metaplasia y disminuida en individuos con cáncer. Aunque el papel de este receptor en la infección con *H. pylori* no ha sido investigada, distintos trabajos proponen que parte de su función es reducir la inflamación (267). BTLA es una molécula co-inhibitoria que tiene una estructura y función similar a CTLA-4 y PD1 (268), que se induce en el proceso de activación de linfocitos T vírgenes, se expresa en células Th1 y Th2 durante el proceso de activación y una vez activadas este receptor se pierde en células Th2 pero permanece expresado en células Th1 efectoras en las que disminuye la producción de IL-2 y por ende su proliferación (269).

Por su parte el uso del “*software*” CITRUS nos permitió comparar de forma automática los grupos en un análisis tanto predictivo como correlativo. Esta comparación dio como resultado la identificación de una población Tc17 que además expresa los receptores inhibitorios BTLA, PD1 y CTLA-4. Contrario a lo que se podría esperar basándose en los resultados de SPADE y lo reportado por otros (125), esta población se encontró selectivamente aumentada en los individuos sanos con una expresión diferencial en individuos con patologías benignas y cáncer de acuerdo a lo siguiente: mientras niveles intermedios de expresión de esta población identifican individuos con cáncer aquellos con patología benigna exhibieron la menor expresión. Este resultado nos permite proponer el uso de esta población para diferenciar individuos sanos de individuos con patología gástrica benigna o maligna, sin embargo, establecer relación entre la expresión diferencial de esta población entre grupos y su función debe ser materia de futuros estudios.

CONCLUSIONES

En este trabajo concordante con lo reportado en la literatura se muestra que los pacientes con cáncer gástrico tienen un perfil de supresión inmune evidenciado por: (i) aumento de los niveles de Tregs, MDSCs y DCs plasmacitoides; (ii) reducción en funciones efectoras como baja cantidad de DCs mieloides, linfocitos CD8+, respuesta deficiente de DCs y de linfocitos T al estímulo.

A nivel de metaplasia la respuesta inmune exhibe una disyuntiva, por una parte los niveles de monocitos no clásicos, DCs mieloides y linfocitos T CD8+ (células efectoras) se encuentran aumentados, y por la otra, la población supresora pmn-MDSCs y la capacidad de maduración de las células dendríticas se encuentran disminuidas. Este comportamiento, acompañado con el reporte de las Tregs en mucosa gástrica sugieren que la metaplasia representa un punto de inflexión en el cual se exagera el componente supresor el cual probablemente favorece el desarrollo tumoral.

La comparación realizada entre el monitoreo en sangre y la infiltración a mucosa gástrica muestran una buena correlación entre estos dos compartimientos. Efecto que podría estar en explicado por los factores solubles liberados tanto por la *H. pylori* en las patologías benignas, como por el tumor gástrico en cáncer, los cuales ejecutan funciones detectables en sangre y se relacionan con una mayor infiltración en microambiente.

El análisis multidimensional de variables inmunológicas permitió discriminar el comportamiento inmune de los donantes sanos de pacientes con los diferentes estadios de la patología gástrica. Como se observó en el PCA existe una progresión desde los individuos sanos hacia aquellos con cáncer avanzado.

Los “software” multiparamétricos permiten resaltar las diferencias entre las patologías analizadas en donde el aumento de marcadores como PD1 e IL-17 en CD8+, y disminución de BTLA diferencian los individuos con lesiones benignas de aquellos con cáncer. Por lo que en este estudio se corrobora lo reportado en la literatura, pero además se propone el análisis de las Tc17 y el BTLA como posibles biomarcadores de la progresión del cáncer gástrico en etapas tempranas.

El empleo de algoritmos multidimensionales para el análisis automatizado de citometría de flujo diseñados principalmente para la detección de poblaciones poco frecuentes, permiten determinar diferencias (funcionales y fenotípicas) entre agrupaciones celulares de pacientes y personas sanas evitando el sesgo asociado al análisis manual.

PERSPECTIVAS O ESTUDIOS FUTUROS

Este trabajo evalúa una serie de parámetros inmunes que deben ser validados aumentando de forma considerable en número la muestra, para ser usados como marcadores predictivos de la respuesta clínica de pacientes con estadios benignos o malignos de la patología gástrica.

Debido a la capacidad de diferenciar entre los grupos se propone la población Tc17 positiva para los receptores inhibitorios como una población interesante para un estudio más detallado.

Se espera que las aproximaciones metodológicas utilizadas en este estudio permitan explorar el comportamiento inmune de los pacientes con cáncer en estadios tempranos vs avanzados. Confiamos que este sistema se pueda explorar y aplicar a diferentes patologías malignas que al igual que en el cáncer gástrico cursen con un proceso de carcinogénesis mediado por un proceso inflamatorio crónico.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente protocolo hace parte del macro-proyecto titulado “MEDICINA TRASLACIONAL EN CANCER: EVALUACION DEL VALOR PREDICTIVO DE BIO-MARCADORES CELULARES Y MOLECULARES EN LA RESPUESTA CLINICA DE TUMORES EPITELIALES A LA QUIMIO-RADIOTERAPIA EN COLOMBIA”, presentado al Instituto Nacional de Cáncer en la convocatoria de la Red de Investigación en cáncer 2013. Actualmente, este proyecto se deriva de un proyecto conjunto con el Hospital el Tunal: “EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNOLÓGICOS EN CÁNCER GÁSTRICO”, el cual cuenta con la aprobación por el comité de ética del Hospital El Tunal y de la Universidad Nacional de Colombia en el acta No. 036-14 del 08 de mayo del 2014 (Anexo 2, Anexo 3).

La presente propuesta de investigación está acuerdo a la resolución N° 8430 de 1993 que establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en humanos (270), Artículo 11, este estudio se clasifica como investigación con riesgo mínimo: “ Son estudios prospectivos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes consistentes en: exámenes físicos o psicológicos de diagnóstico o tratamientos rutinarios, entre los que se consideran: pesar al sujeto, electrocardiogramas, pruebas de agudeza auditiva, termografías, colección de excretas y secreciones externas, obtención de placenta durante el parto, recolección de líquido amniótico al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes de leche (deciduales) y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, placa dental y cálculos removidos por procedimientos profilácticos no invasores, corte de pelo y uñas sin causar desfiguración, extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 mL en dos meses excepto durante el embarazo, ejercicio moderado en voluntarios sanos, pruebas psicológicas a grupos o individuos en los que no se manipulará la conducta del sujeto,

investigación con medicamentos de uso común, amplio margen terapéutico y registrados en este Ministerio o su autoridad delegada, empleando las indicaciones, dosis y vías de administración establecidas y que no sean los medicamentos que se definen en el artículo 55 de esta resolución”.

Las muestras obtenidas en el presente estudio solo fueron utilizadas para los experimentos aquí descritos, y se almacenaron las muestras solo de aquellos pacientes que autorizaron mediante la firma del consentimiento informado el almacenamiento y uso futuro de sus muestras en estudios relacionados con el presente proyecto. Estas muestras no fueron compartidas ni empleadas en otros proyectos sin la autorización del donante.

El proceso para la obtención del consentimiento informado se resume en los siguientes pasos:

- Verificación y obtención de datos de contacto de pacientes o controles que deseen participar en el estudio.
- Presentación del consentimiento informado y respuesta a cualquier duda al respecto a los grupos seleccionados de casos y controles.
- Obtención del consentimiento informado firmado tanto por el participante y dos testigos (Anexo 1).

Confidencialidad: Los datos obtenidos en el presente estudio fueron registrados de forma anónima a través de un código sin sus datos de identificación con el fin de proteger su información personal.

CONDICIONES DE BIOSEGURIDAD Y DECLARACIÓN DE IMPACTO AMBIENTAL DEL PROYECTO

A los pacientes que decidieron participar se les tomo una muestra de 20 mL de sangre periférica, actividad que fue realizada bajo estrictas normas de seguridad con uso de guantes, aguja y jeringa nuevas, alcohol desinfectante, algodón, un torniquete, y 5 tubos heparinizados de 4 mL con una técnica adecuada de asepsia y antisepsia. Además, las biopsias gástricas fueron tomadas como parte de la endoscopia de rutina; este procedimiento fue realizado por el gastroenterólogo tratante, velando por las condiciones de comodidad y seguridad del paciente.

Los experimentos desarrollados en el presente estudio están representados por ensayos in vitro y análisis *ex vivo*. Los reactivos y materiales necesarios para su desarrollo no revisten peligro mayor para la salud humana. El manejo de desechos y residuos tanto químicos como biológicos se realizó de acuerdo a los estándares establecidos para la protección del medio ambiente y siguiendo las normativas de bio-seguridad y protección de individuos que participan en actividades de investigación en el Laboratorio de Equipos Comunes ubicado en el tercer piso (Edificio 471) de la Facultad de Medicina en Bogotá. En atención a lo anterior, el

trabajo controló la exposición de los investigadores y demás personas del laboratorio a sustancias generadas en este estudio que requirieron especial cuidado (desecho de material corto-punzante, agujas, tubos con reductos de sangre humana, desechos químicos, etc.), con el fin de prevenir daños a otras personas y al medio ambiente, como lo dicta la resolución 8430 de 1993, Art. 63.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010;127(12):2893-917.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(2):69-90.
3. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet*. 1975;2(7924):58-60.
4. Gobert AP, Wilson KT. Human and Helicobacter pylori Interactions Determine the Outcome of Gastric Diseases. *Current topics in microbiology and immunology*. 2017;400:27-52.
5. Semper RP, Mejias-Luque R, Gross C, Anderl F, Muller A, Vieth M, et al. Helicobacter pylori-induced IL-1beta secretion in innate immune cells is regulated by the NLRP3 inflammasome and requires the cag pathogenicity island. *Journal of immunology*. 2014;193(7):3566-76.
6. Alvarez-Arellano L, Camorlinga-Ponce M, Maldonado-Bernal C, Torres J. Activation of human neutrophils with Helicobacter pylori and the role of Toll-like receptors 2 and 4 in the response. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2007;51(3):473-9.
7. Mai UE, Perez-Perez GI, Wahl LM, Wahl SM, Blaser MJ, Smith PD. Soluble surface proteins from Helicobacter pylori activate monocytes/macrophages by lipopolysaccharide-independent mechanism. *The Journal of clinical investigation*. 1991;87(3):894-900.
8. Gobert AP, Wilson KT. The Immune Battle against Helicobacter pylori Infection: NO Offense. *Trends in microbiology*. 2016;24(5):366-76.
9. Fan XG, Yakoob J, Fan XJ, Keeling PW. Enhanced T-helper 2 lymphocyte responses: immune mechanism of Helicobacter pylori infection. *Irish journal of medical science*. 1996;165(1):37-9.
10. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annual review of immunology*. 2004;22:329-60.
11. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004;21(2):137-48.
12. Pinzon-Charry A, Maxwell T, Lopez JA. Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. *Immunology and cell biology*. 2005;83(5):451-61.
13. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual review of immunology*. 2007;25:267-96.
14. Galon J, Pages F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, et al. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *Journal of translational medicine*. 2012;10:205.
15. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity*. 2013;39(4):782-95.

16. Eljaszewicz A JM, Gackowska L, Helmin-Basa A, Wiese M, Kubiszewska I, Kaszewski W, Michalkiewicz J, Zegarsk W. Gastric cancer increase the percentage of intermediate (CD14++CD16+) and nonclassical (CD14+CD16+) monocytes. *Centr Eur J Immunol*. 2012;37((4)):355-61.
17. Gabitass RF, Annels NE, Stocken DD, Pandha HA, Middleton GW. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2011;60(10):1419-30.
18. Ishigami S, Aikou T, Natsugoe S, Hokita S, Iwashige H, Tokushige M, et al. Prognostic value of HLA-DR expression and dendritic cell infiltration in gastric cancer. *Oncology*. 1998;55(1):65-9.
19. Li Q, Li Q, Chen J, Liu Y, Zhao X, Tan B, et al. Prevalence of Th17 and Treg cells in gastric cancer patients and its correlation with clinical parameters. *Oncology reports*. 2013;30(3):1215-22.
20. Kato I, Tominaga S, Ito Y, Kobayashi S, Yoshii Y, Matsuura A, et al. A prospective study of atrophic gastritis and stomach cancer risk. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 1992;83(11):1137-42.
21. Shichijo S, Hirata Y, Sakitani K, Yamamoto S, Serizawa T, Niikura R, et al. Distribution of intestinal metaplasia as a predictor of gastric cancer development. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2015;30(8):1260-4.
22. (IARC) IAfRoC. World cancer report. WHO Press, World Health Organization. 2014.
23. (OMS) OMDIS. Prevención de las enfermedades crónicas: una investigación vital REVENCIÓN DE LAS ENFERMEDADES CRÒNICAS: UNA INVESTIGACION VITAL. 2005.
24. Ministerio de Salud y Protección Social INDC. Plan Nacional para el control del cáncer en Colombia 2012-2020. 2012.
25. Pineros M, Hernandez G, Bray F. Increasing mortality rates of common malignancies in Colombia: an emerging problem. *Cancer*. 2004;101(10):2285-92.
26. Salud ONd. Aspectos relacionados con la frecuencia de uso de los servicios de salud, mortalidad y discapacidad en Colombia. 2011.
27. Foster AD, Sivarapatna A, Gress RE. The aging immune system and its relationship with cancer. *Aging health*. 2011;7(5):707-18.
28. Murillo Moreno R, Piñeros Petersen M, Hernández Suárez G. Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia: Instituto Nacional de Cancerología e Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Imprenta Nacional de Colombia. 2003.
29. Carneiro F CA, Huntsman D. G. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. IARC Scientific Publications. 2010;4th ed.(Hereditary diffuse gastric cancer.):59–63.
30. Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(1):60-9.
31. Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, Yokota J, Wiesner GL, Powell SM, et al. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *Journal of medical genetics*. 1999;36(12):873-80.
32. Siewert JR, Bottcher K, Stein HJ, Roder JD. Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Annals of surgery*. 1998;228(4):449-61.
33. Correa P. Cáncer gástrico: una enfermedad infecciosa. *Rev Colomb Cir* 2011;26:111-7.
34. Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2014;23(5):700-13.
35. Layke JC, Lopez PP. Gastric cancer: diagnosis and treatment options. *American family physician*. 2004;69(5):1133-40.
36. Bethesda NCIU. Stomach (Gastric) Cancer Prevention (PDQ(R)): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD)2002.

37. IARC. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 2012;100(Pt B):1-441.
38. Group H. Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut*. 2001;49(3):347-53.
39. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clinical microbiology reviews*. 1997;10(4):720-41.
40. Campuzano-Maya G, Hoyos-Castano D, Calvo-Betancur VD, Suarez-Ramirez OA, Lizcano-Cardona D, Rojas-Arbelaez CA. [Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in physicians in Medellin, Colombia]. *Acta gastroenterologica Latinoamericana*. 2007;37(2):99-103.
41. Brown LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiologic reviews*. 2000;22(2):283-97.
42. Jafar S, Jalil A, Soheila N, Sirous S. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children, a population-based cross-sectional study in west iran. *Iranian journal of pediatrics*. 2013;23(1):13-8.
43. Grad YH, Lipsitch M, Aiello AE. Secular trends in *Helicobacter pylori* seroprevalence in adults in the United States: evidence for sustained race/ethnic disparities. *American journal of epidemiology*. 2012;175(1):54-9.
44. Epplein M, Signorello LB, Zheng W, Peek RM, Jr., Michel A, Williams SM, et al. Race, African ancestry, and *Helicobacter pylori* infection in a low-income United States population. *Cancer Epidemiology, biomarkers & prev*. 2011;20(5):826-34.
45. Sanders MK, Peura DA. *Helicobacter pylori*-Associated Diseases. *Current gastroenterology reports*. 2002;4(6):448-54.
46. Ghoshal UC, Chaturvedi R, Correa P. The enigma of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Indian journal of gastroenterology : official journal of the Indian Society of Gastroenterology*. 2010;29(3):95-100.
47. Yang I, Woltemate S, Piazuelo MB, Bravo LE, Yopez MC, Romero-Gallo J, et al. Different gastric microbiota compositions in two human populations with high and low gastric cancer risk in Colombia. *Scientific reports*. 2016;6:18594.
48. Ying HY, Yu BW, Yang Z, Yang SS, Bo LH, Shan XY, et al. Interleukin-1B 31 C>T polymorphism combined with *Helicobacter pylori*-modified gastric cancer susceptibility: evidence from 37 studies. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2016;20(3):526-36.
49. Ramis IB, Vianna JS, Halicki PC, Lara C, Tadiotto TF, da Silva Maciel JB, et al. Relationship of interleukin-1B gene promoter region polymorphism with *Helicobacter pylori* infection and gastritis. *Journal of infection in developing countries*. 2015;9(10):1108-16.
50. Talebi Bezmin Abadi A, Perez-Perez G. Role of dupA in virulence of *Helicobacter pylori*. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2016;22(46):10118-23.
51. Smoot DT. How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? Direct mechanisms. *Gastroenterology*. 1997;113(6 Suppl):S31-4; discussion S50.
52. Hammond CE, Beeson C, Suarez G, Peek RM, Jr., Backert S, Smolka AJ. *Helicobacter pylori* virulence factors affecting gastric proton pump expression and acid secretion. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2015;309(3):G193-201.
53. Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(9):2475-87.
54. Brodsky IE, Monack D. NLR-mediated control of inflammasome assembly in the host response against bacterial pathogens. *Seminars in immunology*. 2009;21(4):199-207.
55. Crabtree JE, Wyatt JI, Trejdosiewicz LK, Peichl P, Nichols PH, Ramsay N, et al. Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. *Journal of clinical pathology*. 1994;47(1):61-6.
56. Kumar Pachathundikandi S, Brandt S, Madassery J, Backert S. Induction of TLR-2 and TLR-5 expression by *Helicobacter pylori* switches cagPAI-dependent signalling leading to the secretion of IL-8 and TNF-alpha. *PLoS one*. 2011;6(5):e19614.

57. Keates S, Hitti YS, Upton M, Kelly CP. Helicobacter pylori infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells. *Gastroenterology*. 1997;113(4):1099-109.
58. Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. Redox biology and gastric carcinogenesis: the role of Helicobacter pylori. *Redox report : communications in free radical research*. 2011;16(1):1-7.
59. Mitchell HM, Ally R, Wadee A, Wiseman M, Segal I. Major differences in the IgG subclass response to Helicobacter pylori in the first and third worlds. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2002;37(5):517-22.
60. Bergman MP, Engering A, Smits HH, van Vliet SJ, van Bodegraven AA, Wirth HP, et al. Helicobacter pylori modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *The Journal of experimental medicine*. 2004;200(8):979-90.
61. Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R. Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science*. 2003;301(5636):1099-102.
62. Lundgren A, Suri-Payer E, Enarsson K, Svennerholm AM, Lundin BS. Helicobacter pylori-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to H. pylori in infected individuals. *Infection and immunity*. 2003;71(4):1755-62.
63. Lundgren A, Stromberg E, Sjolting A, Lindholm C, Enarsson K, Edebo A, et al. Mucosal FOXP3-expressing CD4+ CD25high regulatory T cells in Helicobacter pylori-infected patients. *Infection and immunity*. 2005;73(1):523-31.
64. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.
65. Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Seminars in cancer biology*. 2004;14(6):433-9.
66. Baniyash M, Sade-Feldman M, Kanterman J. Chronic inflammation and cancer: suppressing the suppressors. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2014;63(1):11-20.
67. Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology*. 2002;16(2):217-26, 29; discussion 30-2.
68. Rook GA, Dalgleish A. Infection, immunoregulation, and cancer. *Immunological reviews*. 2011;240(1):141-59.
69. Baniyash M. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(9):675-87.
70. Kanterman J, Sade-Feldman M, Baniyash M. New insights into chronic inflammation-induced immunosuppression. *Seminars in cancer biology*. 2012;22(4):307-18.
71. Soutto M, Belkhir A, Piazuolo MB, Schneider BG, Peng D, Jiang A, et al. Loss of TFF1 is associated with activation of NF-kappaB-mediated inflammation and gastric neoplasia in mice and humans. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(5):1753-67.
72. Wu CY, Wang CJ, Tseng CC, Chen HP, Wu MS, Lin JT, et al. Helicobacter pylori promote gastric cancer cells invasion through a NF-kappaB and COX-2-mediated pathway. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2005;11(21):3197-203.
73. He G, Karin M. NF-kappaB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. *Cell research*. 2011;21(1):159-68.
74. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(4):239-52.
75. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1073-81.
76. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-44.
77. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. *International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. The American journal of surgical pathology*. 1996;20(10):1161-81.
78. Mera R, Fontham ET, Bravo LE, Bravo JC, Piazuolo MB, Camargo MC, et al. Re: long term follow up of patients treated for Helicobacter pylori infection. *Gut*. 2007;56(3):436.

79. De Re V, Orzes E, Canzonieri V, Maiero S, Fornasarig M, Alessandrini L, et al. Pepsinogens to Distinguish Patients With Gastric Intestinal Metaplasia and Helicobacter pylori Infection Among Populations at Risk for Gastric Cancer. *Clinical and translational gastroenterology*. 2016;7(7):e183.
80. Samloff IM, Varis K, Ihamaki T, Siurala M, Rotter JI. Relationships among serum pepsinogen I, serum pepsinogen II, and gastric mucosal histology. A study in relatives of patients with pernicious anemia. *Gastroenterology*. 1982;83(1 Pt 2):204-9.
81. Matsukura N, Suzuki K, Kawachi T, Aoyagi M, Sugimura T, Kitaoka H, et al. Distribution of marker enzymes and mucin in intestinal metaplasia in human stomach and relation to complete and incomplete types of intestinal metaplasia to minute gastric carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*. 1980;65(2):231-40.
82. Rokkas T, Filipe MI, Sladen GE. Detection of an increased incidence of early gastric cancer in patients with intestinal metaplasia type III who are closely followed up. *Gut*. 1991;32(10):1110-3.
83. Gutierrez-Gonzalez L, Graham TA, Rodriguez-Justo M, Leedham SJ, Novelli MR, Gay LJ, et al. The clonal origins of dysplasia from intestinal metaplasia in the human stomach. *Gastroenterology*. 2011;140(4):1251-60 e1-6.
84. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*. 2002;3(11):991-8.
85. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology*. 2011;29:235-71.
86. Tjon AS, Sint Nicolaas J, Kwekkeboom J, de Man RA, Kazemier G, Tilanus HW, et al. Increased incidence of early de novo cancer in liver graft recipients treated with cyclosporine: an association with C2 monitoring and recipient age. *Liver Transpl*. 2010;16(7):837-46.
87. Penn I. Tumors of the immunocompromised patient. *Annual review of medicine*. 1988;39:63-73.
88. Buckowitz A, Knaebel HP, Benner A, Blaker H, Gebert J, Kienle P, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. *British journal of cancer*. 2005;92(9):1746-53.
89. Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E, et al. High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *The American journal of pathology*. 1999;154(6):1805-13.
90. Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol*. 2012;23 Suppl 8:viii6-9.
91. Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(2):139-47.
92. Aranda F, Buque A, Bloy N, Castoldi F, Eggermont A, Cremer I, et al. Trial Watch: Adoptive cell transfer for oncological indications. *Oncoimmunology*. 2015;4(11):e1046673.
93. Santegoets SJ, Welters MJ, van der Burg SH. Monitoring of the Immune Dysfunction in Cancer Patients. *Vaccines*. 2016;4(3).
94. Chang S, Kohrt H, Maecker HT. Monitoring the immune competence of cancer patients to predict outcome. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2014;63(7):713-9.
95. Kohrt HE, Tumeh PC, Benson D, Bhardwaj N, Brody J, Formenti S, et al. Immunodynamics: a cancer immunotherapy trials network review of immune monitoring in immuno-oncology clinical trials. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2016;4:15.
96. Greenplate AR, Johnson DB, Ferrell PB, Jr., Irish JM. Systems immune monitoring in cancer therapy. *European journal of cancer*. 2016;61:77-84.
97. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(3):191-200.

98. Herati RS, Reuter MA, Dolfi DV, Mansfield KD, Aung H, Badwan OZ, et al. Circulating CXCR5+PD-1+ response predicts influenza vaccine antibody responses in young adults but not elderly adults. *Journal of immunology*. 2014;193(7):3528-37.
99. Sharma S, Stolina M, Lin Y, Gardner B, Miller PW, Kronenberg M, et al. T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *Journal of immunology*. 1999;163(9):5020-8.
100. Rashid RM, Achille NJ, Lee JM, Lathers DM, Young MR. Decreased T-cell proliferation and skewed immune responses in LLC-bearing mice. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*. 2005;24(3):175-92.
101. Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, Gooding W, Whiteside TL. Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(11):3755-62.
102. Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S, et al. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood*. 1998;92(11):4150-66.
103. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(12):941-52.
104. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Beury DW, Clements VK. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Seminars in cancer biology*. 2012;22(4):275-81.
105. Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, Wesa A, Hilkens CM, Kapsenberg ML, et al. alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer research*. 2004;64(17):5934-7.
106. Stolte M, Meining A. The updated Sydney system: classification and grading of gastritis as the basis of diagnosis and treatment. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*. 2001;15(9):591-8.
107. Dako. Immunohistochemical Staining Methods, Fourth Edition. Education Guide. 2006.
108. Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. *BioTechniques*. 2007;42(1):71-5.
109. Desu M, Raghavarao D. *Sample Size Methodology*. Academic Press New York. 1990.
110. Fleiss JL. *The Design and Analysis of Clinical Experiments*. John Wiley & Sons New York. 1986.
111. Kirk RE. *Experimental Design: Procedures for the Behavioral Sciences*. Brooks/Cole Pacific Grove, California. 1982.
112. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16):e74-80.
113. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(12):953-64.
114. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *Journal of immunology*. 2002;168(7):3536-42.
115. Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *Journal of leukocyte biology*. 2007;82(2):244-52.
116. Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunologic research*. 2012;53(1-3):41-57.
117. Bylund J, Christophe T, Boulay F, Nystrom T, Karlsson A, Dahlgren C. Proinflammatory activity of a cecropin-like antibacterial peptide from *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(6):1700-4.

118. Betten A, Bylund J, Christophe T, Boulay F, Romero A, Hellstrand K, et al. A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(8):1221-8.
119. Hansson M, Asea A, Ersson U, Hermodsson S, Hellstrand K. Induction of apoptosis in NK cells by monocyte-derived reactive oxygen metabolites. *Journal of immunology*. 1996;156(1):42-7.
120. Szaflarska A, Baj-Krzyworzeka M, Siedlar M, Weglarczyk K, Ruggiero I, Hajto B, et al. Antitumor response of CD14+/CD16+ monocyte subpopulation. *Experimental hematology*. 2004;32(8):748-55.
121. Lee HW, Choi HJ, Ha SJ, Lee KT, Kwon YG. Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1835(2):170-9.
122. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(8):618-31.
123. Hsu JT, Wang CC, Le PH, Chen TH, Kuo CJ, Lin CJ, et al. Lymphocyte-to-monocyte ratios predict gastric cancer surgical outcomes. *The Journal of surgical research*. 2016;202(2):284-90.
124. Fu D LH-W, Peng Q, Lin H, Li Y-Y. Myeloid-derived suppressor cells highly expressing CD14+DR low/ in peripheral blood and tumor tissues of stomach carcinoma. *Chinese J Cancer Biol*. 2011;18.
125. Zhuang Y, Peng LS, Zhao YL, Shi Y, Mao XH, Chen W, et al. CD8(+) T cells that produce interleukin-17 regulate myeloid-derived suppressor cells and are associated with survival time of patients with gastric cancer. *Gastroenterology*. 2012;143(4):951-62 e8.
126. Wang L, Chang EW, Wong SC, Ong SM, Chong DQ, Ling KL. Increased myeloid-derived suppressor cells in gastric cancer correlate with cancer stage and plasma S100A8/A9 proinflammatory proteins. *Journal of immunology*. 2013;190(2):794-804.
127. Ye N CW. Relationship between immunosuppressive cells Treg. *Chinese J Gasterol*. 2015;20:210-3.
128. Xia R, Wang F, Gao T, Wen W, Lu B, Zhu Y, et al. [The number of myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood and tumor tissues in patients with gastric cancer and its clinical significance]. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology*. 2014;30(7):740-3.
129. Dong J, Li J, Liu SM, Feng XY, Chen S, Chen YB, et al. CD33(+)/p-STAT1(+) double-positive cell as a prognostic factor for stage IIIa gastric cancer. *Medical oncology*. 2013;30(1):442.
130. Mundy-Bosse BL, Young GS, Bauer T, Binkley E, Bloomston M, Bill MA, et al. Distinct myeloid suppressor cell subsets correlate with plasma IL-6 and IL-10 and reduced interferon-alpha signaling in CD4(+) T cells from patients with GI malignancy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2011;60(9):1269-79.
131. Solito S, Marigo I, Pinton L, Damuzzo V, Mandruzzato S, Bronte V. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014;1319:47-65.
132. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of immunology*. 2008;181(8):5791-802.
133. Movahedi K, Guillems M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*. 2008;111(8):4233-44.
134. Dolcetti L, Peranzoni E, Ugel S, Marigo I, Fernandez Gomez A, Mesa C, et al. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *European journal of immunology*. 2010;40(1):22-35.
135. Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *Journal of immunology*. 2009;182(1):240-9.

136. Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer research*. 2006;66(2):1123-31.
137. Elkabets M, Ribeiro VS, Dinarello CA, Ostrand-Rosenberg S, Di Santo JP, Apte RN, et al. IL-1beta regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *European journal of immunology*. 2010;40(12):3347-57.
138. Hu CE, Gan J, Zhang RD, Cheng YR, Huang GJ. Up-regulated myeloid-derived suppressor cell contributes to hepatocellular carcinoma development by impairing dendritic cell function. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2011;46(2):156-64.
139. Mao Y, Poschke I, Wennerberg E, Pico de Coana Y, Egyhazi Brage S, Schultz I, et al. Melanoma-educated CD14+ cells acquire a myeloid-derived suppressor cell phenotype through COX-2-dependent mechanisms. *Cancer research*. 2013;73(13):3877-87.
140. Fujita M, Kohanbash G, Fellows-Mayle W, Hamilton RL, Komohara Y, Decker SA, et al. COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research*. 2011;71(7):2664-74.
141. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer research*. 2010;70(1):68-77.
142. Hanson EM, Clements VK, Sinha P, Ilkovitch D, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *Journal of immunology*. 2009;183(2):937-44.
143. Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology*. 2013;138(2):105-15.
144. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends in immunology*. 2016;37(3):208-20.
145. Marvel D, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(9):3356-64.
146. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nature medicine*. 2007;13(7):828-35.
147. Molon B, Ugel S, Del Pozzo F, Soldani C, Zilio S, Avella D, et al. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(10):1949-62.
148. Lu T, Ramakrishnan R, Altiok S, Youn JI, Cheng P, Celis E, et al. Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(10):4015-29.
149. GeurtsvanKessel CH, Lambrecht BN. Division of labor between dendritic cell subsets of the lung. *Mucosal immunology*. 2008;1(6):442-50.
150. Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006;311:17-58.
151. Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Journal of immunology*. 2005;175(3):1373-81.
152. Schlitzer A, McGovern N, Ginhoux F. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Seminars in cell & developmental biology*. 2015;41:9-22.
153. Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CD. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *European journal of immunology*. 1999;29(9):2769-78.

154. Pinzon-Charry A, Ho CS, Laherty R, Maxwell T, Walker D, Gardiner RA, et al. A population of HLA-DR+ immature cells accumulates in the blood dendritic cell compartment of patients with different types of cancer. *Neoplasia*. 2005;7(12):1112-22.
155. Puhr S, Lee J, Zvezdova E, Zhou YJ, Liu K. Dendritic cell development-History, advances, and open questions. *Seminars in immunology*. 2015;27(6):388-96.
156. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(8):471-85.
157. Skalova K, Mollova K, Michalek J. Human myeloid dendritic cells for cancer therapy: does maturation matter? *Vaccine*. 2010;28(32):5153-60.
158. Steinman RM, Inaba K. Myeloid dendritic cells. *Journal of leukocyte biology*. 1999;66(2):205-8.
159. Gabrilovich DI, Corak J, Ciernik IF, Kavanaugh D, Carbone DP. Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1997;3(3):483-90.
160. Chauv P, Moutet M, Faivre J, Martin F, Martin M. Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1996;74(5):975-83.
161. Tran Janco JM, Lamichhane P, Karyampudi L, Knutson KL. Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. *Journal of immunology*. 2015;194(7):2985-91.
162. Klarquist JS, Janssen EM. Melanoma-infiltrating dendritic cells: Limitations and opportunities of mouse models. *Oncoimmunology*. 2012;1(9):1584-93.
163. Young MR, Wright MA, Lozano Y, Prechel MM, Benefield J, Leonetti JP, et al. Increased recurrence and metastasis in patients whose primary head and neck squamous cell carcinomas secreted granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and contained CD34+ natural suppressor cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1997;74(1):69-74.
164. Shurin GV, Ma Y, Shurin MR. Immunosuppressive mechanisms of regulatory dendritic cells in cancer. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society*. 2013;6(2):159-67.
165. Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(5):1755-66.
166. Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *Journal of immunology*. 2001;166(1):678-89.
167. Huang HL, Wu BY, You WD, Shen MS, Wang WJ. [Influence of dendritic cell infiltration on prognosis and biologic characteristics of progressing gastric cancer]. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]*. 2003;25(5):468-71.
168. Yamaguchi K, Saito H, Oro S, Tatebe S, Ikeguchi M, Tsujitani S. Expression of inducible nitric oxide synthase is significantly correlated with expression of vascular endothelial growth factor and dendritic cell infiltration in patients with advanced gastric carcinoma. *Oncology*. 2005;68(4-6):471-8.
169. Saito H, Tsujitani S, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue. *British journal of cancer*. 1998;78(12):1573-7.
170. Lissoni P, Malugani F, Bonfanti A, Bucovec R, Secondino S, Brivio F, et al. Abnormally enhanced blood concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastatic cancer patients and their relation to circulating dendritic cells, IL-12 and endothelin-1. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 2001;15(2):140-4.
171. Zhou YJ, Xiong YX, Li CP, Shi D. Suppression of local immune response by GrB expression in gastric cancer cells. *Chinese medical journal*. 2004;117(10):1573-5.

172. Aloysius MM, Takhar A, Robins A, Eremin O. Dendritic cell biology, dysfunction and immunotherapy in gastrointestinal cancers. *The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland*. 2006;4(4):195-210.
173. Pardoll DM, Topalian SL. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Current opinion in immunology*. 1998;10(5):588-94.
174. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature*. 2003;421(6925):852-6.
175. Kirilovsky A, Marliot F, El Sissy C, Haicheur N, Galon J, Pages F. Rational bases for the use of the Immunoscore in routine clinical settings as a prognostic and predictive biomarker in cancer patients. *International immunology*. 2016;28(8):373-82.
176. Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lin RH, Torng PL, Huang SC. Reversed CD4/CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma. *Cancer*. 1999;86(8):1537-43.
177. Diederichsen AC, Hjelmborg J, Christensen PB, Zeuthen J, Fenger C. Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2003;52(7):423-8.
178. Kindlund B, Sjoling A, Yakkala C, Adamsson J, Janzon A, Hansson LE, et al. CD4+ regulatory T cells in gastric cancer mucosa are proliferating and express high levels of IL-10 but little TGF-beta. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*. 2017;20(1):116-25.
179. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(12):4404-8.
180. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(7):490-500.
181. Shen LS, Wang J, Shen DF, Yuan XL, Dong P, Li MX, et al. CD4(+)CD25(+)CD127(low/-) regulatory T cells express Foxp3 and suppress effector T cell proliferation and contribute to gastric cancers progression. *Clinical immunology*. 2009;131(1):109-18.
182. Shen Z, Zhou S, Wang Y, Li RL, Zhong C, Liang C, et al. Higher intratumoral infiltrated Foxp3+ Treg numbers and Foxp3+/CD8+ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2010;136(10):1585-95.
183. Preston CC, Maurer MJ, Oberg AL, Visscher DW, Kalli KR, Hartmann LC, et al. The ratios of CD8+ T cells to CD4+CD25+ FOXP3+ and FOXP3- T cells correlate with poor clinical outcome in human serous ovarian cancer. *PloS one*. 2013;8(11):e80063.
184. Gao Q, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Wang XY, Xiao YS, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(18):2586-93.
185. Eisenstein EM, Williams CB. The T(reg)/Th17 cell balance: a new paradigm for autoimmunity. *Pediatric research*. 2009;65(5 Pt 2):26R-31R.
186. Maruyama T, Kono K, Mizukami Y, Kawaguchi Y, Mimura K, Watanabe M, et al. Distribution of Th17 cells and FoxP3(+) regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer. *Cancer science*. 2010;101(9):1947-54.
187. Pinchuk IV, Morris KT, Nofchissey RA, Earley RB, Wu JY, Ma TY, et al. Stromal cells induce Th17 during *Helicobacter pylori* infection and in the gastric tumor microenvironment. *PloS one*. 2013;8(1):e53798.

188. Liu C, Zhang Y, Zhan J, Zhao Y, Wan Q, Peng H, et al. Interleukin-23A is associated with tumor growth in Helicobacter-pylori-related human gastric cancer. *Cancer cell international*. 2014;14(1):104.
189. Iida T, Iwahashi M, Katsuda M, Ishida K, Nakamori M, Nakamura M, et al. Tumor-infiltrating CD4+ Th17 cells produce IL-17 in tumor microenvironment and promote tumor progression in human gastric cancer. *Oncology reports*. 2011;25(5):1271-7.
190. Schmitt N, Bentebibel SE, Ueno H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends in immunology*. 2014;35(9):436-42.
191. Leber A, Abedi V, Hontecillas R, Viladomiu M, Hoops S, Ciupe S, et al. Bistability analyses of CD4+ T follicular helper and regulatory cells during Helicobacter pylori infection. *Journal of theoretical biology*. 2016;398:74-84.
192. King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annual review of immunology*. 2008;26:741-66.
193. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, et al. CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(7):2873-92.
194. Nielsen JS, Sahota RA, Milne K, Kost SE, Nesslinger NJ, Watson PH, et al. CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(12):3281-92.
195. Ladanyi A, Kiss J, Mohos A, Somlai B, Liskay G, Gilde K, et al. Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2011;60(12):1729-38.
196. Maletzki C, Jahnke A, Ostwald C, Klar E, Prall F, Linnebacher M. Ex-vivo clonally expanded B lymphocytes infiltrating colorectal carcinoma are of mature immunophenotype and produce functional IgG. *PloS one*. 2012;7(2):e32639.
197. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(51):18538-43.
198. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, Bosch R, Garcia JF, Jaen J, et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(4):1467-73.
199. Kametsky LA, Melamed MR, Derman H. Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis. *Science*. 1965;150(3696):630-1.
200. Bendall SC, Nolan GP. From single cells to deep phenotypes in cancer. *Nature biotechnology*. 2012;30(7):639-47.
201. Bendall SC, Nolan GP, Roederer M, Chattopadhyay PK. A deep profiler's guide to cytometry. *Trends in immunology*. 2012;33(7):323-32.
202. Aghaeepour N, Finak G, Flow CAPC, Consortium D, Hoos H, Mosmann TR, et al. Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. *Nature methods*. 2013;10(3):228-38.
203. Bruggner RV, Bodenmiller B, Dill DL, Tibshirani RJ, Nolan GP. Automated identification of stratifying signatures in cellular subpopulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(26):E2770-7.
204. Thurstone L. Multiple factor analysis. University of Chicago Press. 1947.
205. Cattell RB. The Scientific Use of Factor Analysis. New York: Plenum. 1978.
206. Lugli E, Pinti M, Nasi M, Troiano L, Ferraresi R, Mussi C, et al. Subject classification obtained by cluster analysis and principal component analysis applied to flow cytometric data. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2007;71(5):334-44.

207. Anchang B, Hart TD, Bendall SC, Qiu P, Bjornson Z, Linderman M, et al. Visualization and cellular hierarchy inference of single-cell data using SPADE. *Nat Protoc.* 2016;11(7):1264-79.
208. Qiu P, Simonds EF, Bendall SC, Gibbs KD, Jr., Bruggner RV, Linderman MD, et al. Extracting a cellular hierarchy from high-dimensional cytometry data with SPADE. *Nature biotechnology.* 2011;29(10):886-91.
209. Lujan E, Zunder ER, Ng YH, Goronzy IN, Nolan GP, Wernig M. Early reprogramming regulators identified by prospective isolation and mass cytometry. *Nature.* 2015;521(7552):352-6.
210. Bodenmiller B, Zunder ER, Finck R, Chen TJ, Savig ES, Bruggner RV, et al. Multiplexed mass cytometry profiling of cellular states perturbed by small-molecule regulators. *Nature biotechnology.* 2012;30(9):858-67.
211. Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, Amir el AD, Krutzik PO, Finck R, et al. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. *Science.* 2011;332(6030):687-96.
212. Herzenberg LA, Tung J, Moore WA, Herzenberg LA, Parks DR. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nature immunology.* 2006;7(7):681-5.
213. Hengst J, Theorell J, Deterding K, Potthoff A, Dettmer A, Ljunggren HG, et al. High-resolution determination of human immune cell signatures from fine-needle liver aspirates. *European journal of immunology.* 2015;45(7):2154-7.
214. Hansmann L, Blum L, Ju CH, Liedtke M, Robinson WH, Davis MM. Mass cytometry analysis shows that a novel memory phenotype B cell is expanded in multiple myeloma. *Cancer immunology research.* 2015;3(6):650-60.
215. Gaudilliere B, Fragiadakis GK, Bruggner RV, Nicolau M, Finck R, Tingle M, et al. Clinical recovery from surgery correlates with single-cell immune signatures. *Science translational medicine.* 2014;6(255):255ra131.
216. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001;98(9):5116-21.
217. Eljaszewicz A, Wiese M, Helmin-Basa A, Jankowski M, Gackowska L, Kubiszewska I, et al. Collaborating with the enemy: function of macrophages in the development of neoplastic disease. *Mediators of inflammation.* 2013;2013:831387.
218. Maeda S, Akanuma M, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, Yoshida H, et al. Distinct mechanism of *Helicobacter pylori*-mediated NF-kappa B activation between gastric cancer cells and monocytic cells. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276(48):44856-64.
219. Bhattacharyya A, Pathak S, Datta S, Chattopadhyay S, Basu J, Kundu M. Mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB regulate *Helicobacter pylori*-mediated interleukin-8 release from macrophages. *The Biochemical journal.* 2002;368(Pt 1):121-9.
220. Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scandinavian journal of immunology.* 2008;67(2):152-9.
221. Feng AL, Zhu JK, Sun JT, Yang MX, Neckenig MR, Wang XW, et al. CD16⁺ monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis. *Clinical and experimental immunology.* 2011;164(1):57-65.
222. Nockher WA, Scherberich JE. Expanded CD14⁺ CD16⁺ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infection and immunity.* 1998;66(6):2782-90.
223. Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, et al. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *European journal of immunology.* 1998;28(1):359-69.
224. Jung HC, Kim JM, Song IS, Kim CY. *Helicobacter pylori* induces an array of pro-inflammatory cytokines in human gastric epithelial cells: quantification of mRNA for

interleukin-8, -1 alpha/beta, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, monocyte chemoattractant protein-1 and tumour necrosis factor-alpha. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 1997;12(7):473-80.

225. Bagheri V, Memar B, Momtazi AA, Sahebkar A, Gholamin M, Abbaszadegan MR. Cytokine networks and their association with *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinoma. *Journal of cellular physiology*. 2017.

226. Karttunen R, Karttunen T, Ekre HP, MacDonald TT. Interferon gamma and interleukin 4 secreting cells in the gastric antrum in *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis. *Gut*. 1995;36(3):341-5.

227. Ke Q, Liang J, Wang LN, Hu ZB, Jin GF, Zhou Y, et al. Potentially functional polymorphisms of the vascular endothelial growth factor gene and risk of gastric cancer. *Molecular carcinogenesis*. 2008;47(8):647-51.

228. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 2005;69 Suppl 3:4-10.

229. Huang XM, Liu XS, Lin XK, Yu H, Sun JY, Liu XK, et al. Role of plasmacytoid dendritic cells and inducible costimulator-positive regulatory T cells in the immunosuppression microenvironment of gastric cancer. *Cancer science*. 2014;105(2):150-8.

230. Kini Bailur J, Gueckel B, Pawelec G. Prognostic impact of high levels of circulating plasmacytoid dendritic cells in breast cancer. *Journal of translational medicine*. 2016;14(1):151.

231. McCarty MF, Bielenberg D, Donawho C, Bucana CD, Fidler IJ. Evidence for the causal role of endogenous interferon-alpha/beta in the regulation of angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis of cutaneous neoplasms. *Clinical & experimental metastasis*. 2002;19(7):609-15.

232. Vermi W, Bonecchi R, Facchetti F, Bianchi D, Sozzani S, Festa S, et al. Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *The Journal of pathology*. 2003;200(2):255-68.

233. Sisirak V, Faget J, Vey N, Blay JY, Menetrier-Caux C, Caux C, et al. Plasmacytoid dendritic cells deficient in IFNalpha production promote the amplification of FOXP3+ regulatory T cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncoimmunology*. 2013;2(1):e22338.

234. Kiertscher SM, Luo J, Dubinett SM, Roth MD. Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Journal of immunology*. 2000;164(3):1269-76.

235. Esche C, Lokshin A, Shurin GV, Gastman BR, Rabinowich H, Watkins SC, et al. Tumor's other immune targets: dendritic cells. *Journal of leukocyte biology*. 1999;66(2):336-44.

236. Ma Y, Shurin GV, Peiyuan Z, Shurin MR. Dendritic cells in the cancer microenvironment. *Journal of Cancer*. 2013;4(1):36-44.

237. Ishida A, Ohta M, Toda M, Murata T, Usui T, Akita K, et al. Mucin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells during maturation. *Proteomics*. 2008;8(16):3342-9.

238. Lim TS, Goh JK, Mortellaro A, Lim CT, Hammerling GJ, Ricciardi-Castagnoli P. CD80 and CD86 differentially regulate mechanical interactions of T-cells with antigen-presenting dendritic cells and B-cells. *PloS one*. 2012;7(9):e45185.

239. Lechmann M, Berchtold S, Hauber J, Steinkasserer A. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends in immunology*. 2002;23(6):273-5.

240. Rizzuti D, Ang M, Sokollik C, Wu T, Abdullah M, Greenfield L, et al. *Helicobacter pylori* inhibits dendritic cell maturation via interleukin-10-mediated activation of the signal transducer and activator of transcription 3 pathway. *Journal of innate immunity*. 2015;7(2):199-211.

241. Chang LL, Wang SW, Wu IC, Yu FJ, Su YC, Chen YP, et al. Impaired dendritic cell maturation and IL-10 production following *H. pylori* stimulation in gastric cancer patients. *Applied microbiology and biotechnology*. 2012;96(1):211-20.

242. Hansen M, Andersen MH. The role of dendritic cells in cancer. *Seminars in immunopathology*. 2017;39(3):307-16.
243. Sainz T, Serrano-Villar S, Diaz L, Gonzalez Tome MI, Gurbindo MD, de Jose MI, et al. The CD4/CD8 ratio as a marker T-cell activation, senescence and activation/exhaustion in treated HIV-infected children and young adults. *Aids*. 2013;27(9):1513-6.
244. Han S, Zhang C, Li Q, Dong J, Liu Y, Huang Y, et al. Tumour-infiltrating CD4(+) and CD8(+) lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *British journal of cancer*. 2014;110(10):2560-8.
245. Gupta S, Gollapudi S. TNF-alpha-induced apoptosis in human naive and memory CD8+ T cells in aged humans. *Experimental gerontology*. 2006;41(1):69-77.
246. Gupta S, Gollapudi S. CD95-mediated apoptosis in naive, central and effector memory subsets of CD4+ and CD8+ T cells in aged humans. *Experimental gerontology*. 2008;43(4):266-74.
247. deLeeuw RJ, Kost SE, Kakal JA, Nelson BH. The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(11):3022-9.
248. Cheng HH, Tseng GY, Yang HB, Wang HJ, Lin HJ, Wang WC. Increased numbers of Foxp3-positive regulatory T cells in gastritis, peptic ulcer and gastric adenocarcinoma. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(1):34-43.
249. Shevach EM, Davidson TS, Huter EN, Dipaolo RA, Andersson J. Role of TGF-Beta in the induction of Foxp3 expression and T regulatory cell function. *Journal of clinical immunology*. 2008;28(6):640-6.
250. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(12):1875-86.
251. Mutoh H, Sashikawa M, Hayakawa H, Sugano K. Monocyte chemoattractant protein-1 is generated via TGF-beta by myofibroblasts in gastric intestinal metaplasia and carcinoma without *H. pylori* infection. *Cancer science*. 2010;101(8):1783-9.
252. Raghavan S, Quiding-Jarbrink M. Immune modulation by regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-associated diseases. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*. 2012;12(1):71-85.
253. Stein M, Ruggiero P, Rappuoli R, Bagnoli F. *Helicobacter pylori* CagA: From Pathogenic Mechanisms to Its Use as an Anti-Cancer Vaccine. *Frontiers in immunology*. 2013;4:328.
254. Arnold IC, Lee JY, Amieva MR, Roers A, Flavell RA, Sparwasser T, et al. Tolerance rather than immunity protects from *Helicobacter pylori*-induced gastric preneoplasia. *Gastroenterology*. 2011;140(1):199-209.
255. Freire de Melo F, Rocha AM, Rocha GA, Pedrosa SH, de Assis Batista S, Fonseca de Castro LP, et al. A regulatory instead of an IL-17 T response predominates in *Helicobacter pylori*-associated gastritis in children. *Microbes and infection*. 2012;14(4):341-7.
256. Echizen K, Hirose O, Maeda Y, Oshima M. Inflammation in gastric cancer: Interplay of the COX-2/prostaglandin E2 and Toll-like receptor/MyD88 pathways. *Cancer science*. 2016;107(4):391-7.
257. Pesic M, Greten FR. Inflammation and cancer: tissue regeneration gone awry. *Current opinion in cell biology*. 2016;43:55-61.
258. Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(11):759-71.
259. Deenick EK, Tangye SG. Autoimmunity: IL-21: a new player in Th17-cell differentiation. *Immunology and cell biology*. 2007;85(7):503-5.
260. Alcover A, Alarcon B. Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes. *Critical reviews in immunology*. 2000;20(4):325-46.

261. Moretta A, Ciccone E, Pantaleo G, Tambussi G, Bottino C, Melioli G, et al. Surface molecules involved in the activation and regulation of T or natural killer lymphocytes in humans. *Immunological reviews*. 1989;111:145-75.
262. Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, et al. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(3):1178-83.
263. Bernal-Estevez D, Sanchez R, Tejada RE, Parra-Lopez C. Chemotherapy and radiation therapy elicits tumor specific T cell responses in a breast cancer patient. *BMC cancer*. 2016;16:591.
264. Saito H, Kuroda H, Matsunaga T, Osaki T, Ikeguchi M. Increased PD-1 expression on CD4+ and CD8+ T cells is involved in immune evasion in gastric cancer. *Journal of surgical oncology*. 2013;107(5):517-22.
265. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(8):486-99.
266. Homet Moreno B, Ribas A. Anti-programmed cell death protein-1/ligand-1 therapy in different cancers. *British journal of cancer*. 2015;112(9):1421-7.
267. Steinberg MW, Turovskaya O, Shaikh RB, Kim G, McCole DF, Pfeffer K, et al. A crucial role for HVEM and BTLA in preventing intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(6):1463-76.
268. Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, Yang J, Fallarino F, Loftin SK, et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nature immunology*. 2003;4(7):670-9.
269. Carreno BM, Collins M. BTLA: a new inhibitory receptor with a B7-like ligand. *Trends in immunology*. 2003;24(10):524-7.
270. MinSalud. RESOLUCION NUMERO 8430 DE 1993. Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. In: Colombia, editor.: M. Salud, Editor. ; 1993. p. p. 1-19.
271. Gattinoni L1, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature Medicine*. 2011. (10):1290-7

ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento Informado

Anexo 2. Acta aprobación comité de Ética Universidad Nacional de Colombia

Anexo 3. Acta aprobación comité de Ética Hospital el Tunal E.S.E.