

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

IDENTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS INMUNORREGULADORAS  
INDUCIDAS POR LA BACTERIA *HELICOBACTER PYLORI*  
EN MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de  
Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología  
para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología

LUCÍA FIGUEROA PROTTI

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2023

## **Dedicatoria**

Esta tesis está dedicada a mis cuatro abuelos y abuelas, en gratitud a su amor, a su apoyo y a su mayor regalo, mi familia.

## **Agradecimientos**

Agradezco a mi compañera de vida, por la motivación y el apoyo constante en el día a día, por celebrar los días buenos, por abrazarme en los días malos y porque no importa como haya sido el día, al final siempre me surge una sonrisa (o carcajada) a su lado.

Agradezco a mi mamá y a mi papá por sus consejos, sus enseñanzas, por escucharme y motivarme, más que todo por siempre creer en mí.

Agradezco a mi tutor, por apuntarse a ser mi guía académico, por emocionarse conmigo con cada resultado, pero sobre todo por la pasión con la que vive, enseña y transmite la ciencia.

Agradezco a mis lectores, por todo lo que me han enseñado en este proceso, de técnicas, de análisis, de logística, y también de vida.

Agradezco a las personas del CIEMIC y del Programa de Epidemiología del Cáncer del INISA, por el espacio y la invaluable colaboración para el desarrollo de este proyecto.

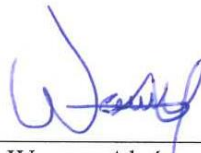
Por último, agradezco a la vida, por esta oportunidad.

“Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología”




---

PhD. Carlos Chacón Díaz  
**Representante de la Decana  
Sistema de Estudios de Posgrado**



---

PhD. Warner Alpizar Alpizar  
**Profesor Guía**



---

PhD. Silvia Molina Castro  
**Lectora**



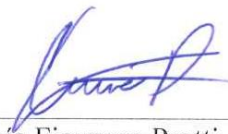
---

PhD. Javier Mora Rodríguez  
**Lector**



---

PhD. Luis Alberto Acuña Amador  
**Representante del Director  
Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e  
Inmunología**



---

Lucía Figueroa Protti  
**Sustentante**

# Tabla de contenido

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Hoja de aprobación.....	iv
Tabla de contenido.....	v
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de Cuadros.....	ix
Lista de Figuras.....	x
Lista de abreviaturas.....	xi
Introducción.....	1
Cáncer gástrico y la infección por <i>H. pylori</i> .....	1
El microambiente tumoral inmunosupresor.....	4
Inmunoterapia en cáncer.....	14
Moléculas inmunorreguladoras en la inflamación crónica inducida por <i>Helicobacter pylori</i> .....	21
Justificación.....	22
Pregunta e Hipótesis.....	23
Pregunta.....	23
Hipótesis.....	24
Objetivo general.....	24
Objetivos específicos.....	24
Materiales y métodos.....	24
Cepas de <i>H. pylori</i> y condiciones de cultivo bacteriano.....	24
Líneas celulares de cáncer gástrico y condiciones de cultivo celular.....	25
Condiciones de co-cultivos de líneas celulares de cáncer gástrico y <i>H. pylori</i> .....	26
Muestras gástricas humanas.....	26
Extracción de ARN.....	26
Retrotranscripción.....	26
PCR cuantitativa.....	27
Tejidos gástricos murinos parafinados.....	28

Inmunohistoquímica .....	29
Análisis estadístico .....	30
<b>Resultados .....</b>	<b>30</b>
<i>H. pylori</i> induce la expresión génica de moléculas inmunorreguladoras en líneas celulares de cáncer gástrico 30	
La sobreexpresión génica de moléculas inmunorreguladoras inducida por <i>H. pylori</i> es dependiente de CagPAI.....	33
<i>H. pylori</i> induce la infiltración de células inmunológicas positivas para PD-1 y PD-L1 en la mucosa y submucosa gástrica murina.....	35
Los ejes PVR/TIGIT, ICOSL/ICOS, TNFRSF14/BTLA y TNFRSF9/ TNFSF9 tienen una mayor expresión génica que el eje PD-L1/PD-1 en adenocarcinomas gástricos humanos.....	41
<b>Discusión .....</b>	<b>43</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>53</b>
<b>Fuentes de financiamiento.....</b>	<b>55</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>55</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>77</b>
Anexo 1 - Moléculas inmunorreguladoras: nombres, acrónimos y sinónimos (en inglés) .....	77
Anexo 2 - Expresión proteica de PD-L1 en mucosa y submucosa gástrica murina al colonizarse con <i>H. pylori</i> .....	78
Anexo 3 – Aprobación del Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica .....	79
Anexo 4 – Aprobación del Comité Ético Científico de la Caja Costarricense del Seguro Social .....	80
Anexo 5 – Aprobación del Consejo Nacional de Investigación en Salud .....	83
Anexo 6 – Aprobación del Comité Institucional del Cuido y Uso de Animales de la Universidad de Costa Rica .....	84

## Resumen

El cáncer gástrico (CG) es el cuarto tipo de cáncer más mortal a nivel mundial, principalmente por su detección tardía y la falta de terapias eficaces. La inmunoterapia ha mostrado ser muy prometedora en el tratamiento del cáncer al revitalizar la respuesta anti-tumoral que está inhibida en tumores por el establecimiento de microambientes inmunosupresores. Sin embargo, un porcentaje importante de pacientes no responde, lo cual evidencia que todavía queda mucho por comprender respecto al microambiente inmunológico en cada tipo de cáncer y cómo este se conforma durante el proceso carcinogénico. El fin último es que la comprensión del microambiente inmunológico se traduzca en estrategias aplicables a la práctica clínica para que más pacientes se beneficien de estas novedosas terapias. Siendo la inflamación crónica desencadenada ante la infección por *Helicobacter pylori* uno de los factores determinantes en la génesis del CG, es importante dilucidar el impacto que tiene esta infección en la expresión de moléculas inmunorreguladoras que contribuyen a la generación de un microambiente inmunosupresor y que, eventualmente, podrían ser blancos terapéuticos de la inmunoterapia. En el presente trabajo se analizó la expresión génica de ocho moléculas inmunorreguladoras en líneas celulares de CG expuestas a diferentes cepas de *H. pylori*. Se observó que la bacteria induce la expresión de estas moléculas, principalmente PD-L1, PVR, ICOSL, TNFRSF14 y TNFRSF9, lo cual es dependiente de la Isla de Patogenicidad Cag. Además, en un modelo murino, se evidenció que la infección de la mucosa gástrica por *H. pylori* provoca un aumento en el número de células inmunológicas infiltrantes positivas para PD-L1 y para su receptor PD-1. También, se analizó la expresión génica de las moléculas inmunorreguladoras PVR/TIGIT, ICOSL/ICOS, TNFRSF14/BTLA y TNFRSF9 en tejido tumoral de pacientes con CG y se determinó que la expresión de estas es mayor que la expresión génica de PD-L1/PD-1, el eje inmunorregulador que actualmente cuenta con inhibidores aprobados para uso clínico en varios tipos de cáncer, incluyendo CG. En conclusión, los resultados de este estudio sugieren que varias moléculas inmunorreguladoras que contribuyen a la generación de microambientes inmunosupresores en cáncer son inducidas en la mucosa gástrica ante la infección por *H. pylori*. La principal implicación de esto es que la infección estaría favoreciendo el establecimiento de un microambiente inmunosupresor muy tempranamente, lo cual facilitaría el avance en la secuencia de lesiones pre-malignas que culmina en CG. Asimismo, los resultados obtenidos apuntan a que otras moléculas inmunorreguladoras, diferentes de PD-L1/PD-1, podrían contribuir en mayor medida a la inmunosupresión del microambiente (pre)tumoral gástrico y, eventualmente, estas podrían valorarse como nuevos blancos terapéuticos de la inmunoterapia para CG.

## Abstract

Gastric cancer (GC) is the fourth most deadly type of cancer worldwide, mainly due to its late detection and the lack of effective therapies. Immunotherapy has displayed great promise in cancer treatment by revitalizing antitumor responses that are mostly inhibited in tumors through the development of immunosuppressive microenvironments. However, a significant percentage of patients do not respond, which shows that much remains to be understood regarding the immune microenvironment in each type of cancer and how it is shaped during the carcinogenic process. The overall purpose is that the understanding of the immune microenvironment translates into strategies applicable to clinical practice so that more patients benefit from these novel therapies. Since chronic inflammation triggered by *Helicobacter pylori* infection is one of the defining factors in GC genesis, it is important to elucidate the impact of this infection on the expression of immunoregulatory molecules that contribute to immunosuppressive microenvironments and, therefore, may eventually become therapeutic targets for immunotherapy. In this study, gene expression of eight immunoregulatory molecules was analyzed in GC cell lines exposed to different strains of *H. pylori*. It was observed that the bacterium induces the expression of these molecules, mainly PD-L1, PVR, ICOSL, TNFRSF14 and TNFRSF9, which was dependent on the Cag Pathogenicity Island. In addition, in a mouse model, *H. pylori* infection of the gastric mucosa prompted an increase in the number of PD-L1 positive infiltrating immune cells as well PD-1 positive infiltrating immune cells. Also, the gene expression of immunoregulatory molecules PVR/TIGIT, ICOSL/ICOS, TNFRSF14/BTLA, and TNFRSF9 was analyzed in tumor tissue of patients with GC and it was determined that the expression of these molecules is greater than the expression of PD-L1/ PD-1, the immunoregulatory axis that currently has inhibitors approved for clinical use in various types of cancer, including GC. In conclusion, the results of this study suggest that several immunoregulatory molecules that contribute to the generation of immunosuppressive microenvironments in cancer are induced in gastric mucosa upon *H. pylori* infection. The main implication of this is that the infection would be favoring the very early establishment of an immunosuppressive microenvironment, which would facilitate progress in the sequence of pre-malignant lesions that culminates in GC. Likewise, the results suggest that other immunoregulatory molecules than PD-L1/PD-1 could contribute to a greater extent to the immunosuppression of the gastric (pre)tumor microenvironment and, eventually, these could be considered as new therapeutic targets for GC immunotherapy.



## **Lista de Cuadros**

Cuadro 1.....	27
---------------	----

## Lista de Figuras

Figura 1.....	2
Figura 2.....	31
Figura 3.....	32
Figura 4.....	34
Figura 5.....	36
Figura 6.....	39
Figura 7.....	40
Figura 8.....	42
Figura 9.....	52

## Lista de abreviaturas

ACG	Adenocarcinoma gástrico
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ADNtc	Ácido desoxirribonucleico tumoral circulante
APC	Células presentadoras de antígeno
BPCI	Bloqueadores de puntos de control inmunitario
CagA	Gen asociado a la citotoxina A
CagPAI	Isla de Patogenicidad Cag
CG	Cáncer gástrico
EBV	Virus de Epstein-Barr
EMT	Transición epitelio-mesenquimal
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
ITIM	Motivos de inhibición de inmunorreceptores basados en tirosina
ITSM	Motivos de cambio del inmunorreceptor basados en tirosina
MDSCs	Células mieloides supresoras
MMR	Reparación de apareamiento erróneo de bases nitrogenadas
MSI	Inestabilidad microsatelital
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCI	Puntos de control inmunitario
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cualitativa
TAMs	Macrófagos asociados a tumores
Teffs	Linfocitos T efectoros
Tm	Linfocitos T de memoria
Tem	Linfocitos T de memoria efectoros
Tex	Linfocitos T agotados
TGF	Factor de crecimiento tumoral
TMAAs	Antígenos del microambiente tumoral
Tregs	Linfocitos T reguladores
Trm	Linfocitos T de memoria residentes de tejidos
WT	Cepa silvestre



UNIVERSIDAD DE  
COSTA RICA

SEP Sistema de  
Estudios de Posgrado

**Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.**

Yo, Lucía Figueroa Protti, con cédula de identidad 113570278, en mi condición de autor del TFG titulado Identificación de moléculas inmunorreguladoras inducidas por la bacteria *Helicobacter pylori* en modelos in vitro e in vivo

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI  NO \*

\*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: \_\_\_\_\_ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

**INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:**

Nombre Completo: Lucía Figueroa Protti

Número de Carné: Ab2221 Número de cédula: 113570278

Correo Electrónico: lucia.figueroa@ucr.ac.cr

Fecha: 03-01-2022 Número de teléfono: 8912-3747

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): PhD. Warner Alpízar Alpízar

**FIRMA ESTUDIANTE**

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

## Introducción

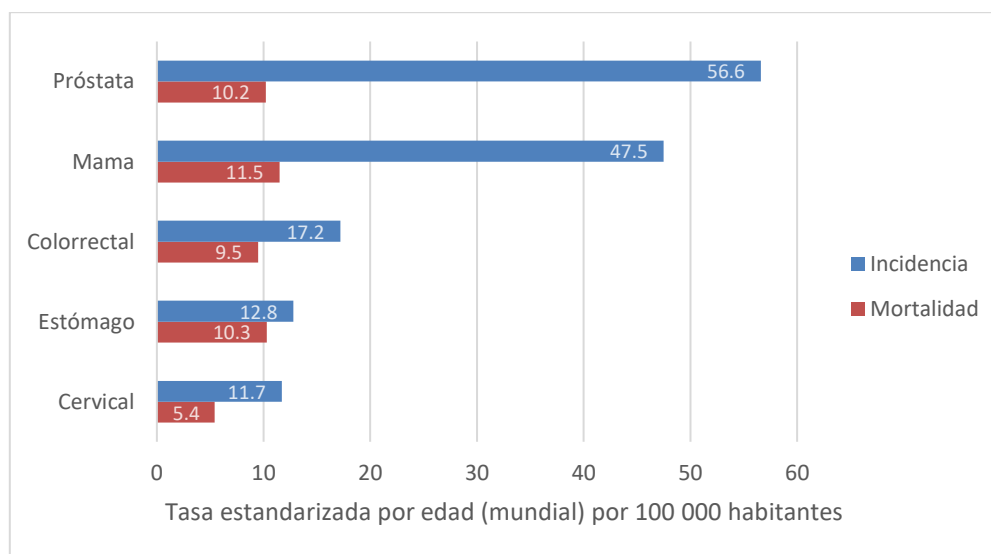
### **Cáncer gástrico y la infección por *H. pylori***

El cáncer gástrico (CG) es una enfermedad de alta incidencia a nivel mundial (1). A pesar de su gran heterogeneidad molecular, tradicionalmente los abordajes terapéuticos utilizados en la clínica para el tratamiento del CG son enfoques uniformes, en parte debido a que las opciones son limitadas (2). Esto, junto con otros factores como el diagnóstico tardío, lo han posicionado como el cuarto tipo de cáncer más mortal a nivel mundial (1). Estas estadísticas son reflejadas en Costa Rica, donde el CG es el cuarto en incidencia y el segundo en mortalidad (Figura 1). Además, la relación entre incidencia y mortalidad evidencia que, aunque mueren más pacientes por cáncer de mama que por CG en el país, la sobrevida es mucho menor para los pacientes diagnosticados con CG que para los de cáncer de mama (Figura 1). De hecho, la tasa de supervivencia a 5 años para CG en la mayoría de los países es menor al 30% (3). Desafortunadamente, los programas de tamizaje masivo que permiten una detección temprana y por consiguiente un mejor pronóstico, como los aplicados en Japón (4,5), uno de los países con mayor incidencia de CG, no son costo-efectivos en la mayoría de los países en vías de desarrollo (6). No obstante, el ejemplo japonés demuestra que la prevención primaria y secundaria son las mejores opciones que existen para reducir la mortalidad por CG en países con alta incidencia como Costa Rica. De hecho, el Centro de Detección Temprana de Cáncer Gástrico del Hospital Max Peralta en Cartago, creado como una réplica del método japonés, así lo evidencia (7).

El CG es un grupo heterogéneo de enfermedades, las cuales presentan características histológicas distintas. Más del 90% de los CG son adenocarcinoma gástrico (ACG) (6). La clasificación más utilizada para el ACG es el sistema de clasificación histológica de Laurén que tiene tres categorías: intestinal, difuso y mixto (8). El ACG de tipo intestinal es el más prevalente en áreas de alto riesgo (9). Sin embargo, en los últimos 50 años existe una tendencia a la disminución en su incidencia a nivel mundial (1,6,9). Por el contrario, el ACG de tipo difuso es más prevalente en áreas de bajo riesgo y su incidencia a nivel mundial también ha sufrido una disminución, aunque menos marcada (9). Otro parámetro utilizado para clasificar el ACG es el sitio anatómico; este puede estar localizado en la parte proximal

o en la parte distal del estómago (3). Las tres categorías histológicas se pueden presentar en ambos sitios anatómicos (8).

En el 2014, se propuso un esquema de clasificación basado en aspectos moleculares (10). Esta clasificación divide el ACG en cuatro subtipos: [1] tumores positivos por virus de Epstein-Barr (EBV, por sus siglas en inglés), en los cuales son características las mutaciones en el gen *PIK3CA*, la hipermetilación del ADN y la amplificación de los genes *JAK2*, *PDCD1L1* y *PDCD1L2*; [2] tumores con inestabilidad microsatelital (MSI, por sus siglas en inglés), los cuales tienen tasas mutacionales elevadas; [3] tumores genómicamente estables, que son comunes en la variante histológica difusa y en los cuales son características las mutaciones de *RHOA* o fusiones que involucran a la familia de proteínas RHO con actividad GTPasa; y [4] tumores con inestabilidad cromosomal, con una marcada aneuploidía y amplificación focal de receptores de tirosina quinasa. Aunque la clasificación molecular no se emplea con fines clínicos, ha sido muy útil para comprender aspectos sobre la etiología y el pronóstico, e incluso sobre la respuesta al tratamiento.



**Figura 1.** Tasas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad en el 2020 de los 5 tipos de cáncer más incidentes en Costa Rica para ambos sexos y todas las edades (11).

La patogénesis del ACG difiere dependiendo del subtipo histológico. En el caso del ACG de tipo intestinal, los eventos que se dan en la carcinogénesis están bien descritos y se conocen

como la Cascada de Correa (12–14). Esta comienza con la colonización de la mucosa gástrica por la bacteria *Helicobacter pylori*, la cual, en conjunto con factores ambientales como la dieta y el estilo de vida, desencadenan una reacción inflamatoria prolongada que resulta en una gastritis crónica. En algunos individuos, la inflamación crónica progresa a gastritis atrófica multifocal, posteriormente a metaplasia intestinal, displasia y, finalmente, a un ACG invasivo. Por el contrario, la patogénesis del ACG de tipo difuso está muy poco comprendida ya que no hay lesiones precancerosas claramente identificables. Sin embargo, anomalías genéticas en factores de adherencia celular como la E-cadherina y la infección por *H. pylori* se han descrito como factores asociados con su desarrollo (15). En la génesis del ACG de tipo difuso no es indispensable que haya inflamación crónica, por lo que se cree que los mecanismos por los cuales la bacteria induce malignidad en este tipo de ACG son diferentes a los del ACG de tipo intestinal (16).

*H. pylori* es un bacilo flagelado Gram negativo con forma de hélice que cuenta con varios factores de virulencia, los cuales le permiten sobrevivir en el ambiente hostil del estómago, infectar las glándulas gástricas, evadir el sistema inmunológico e inducir alteraciones morfológicas y moleculares que contribuyen a la transformación de células epiteliales. Uno de los factores de virulencia más destacados es la citotoxina CagA (*cytotoxin-associated gene A*) asociada con cambios en el citoesqueleto celular, disrupción de las uniones intercelulares, estimulación de proliferación celular, inhibición de apoptosis e inducción de genes asociados a inflamación a través de la activación sostenida del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (16–18). De hecho, las cepas CagA positivas usualmente están asociadas con respuestas inflamatorias más prevalentes y, consecuentemente, con mayor daño a la mucosa gástrica (17). Esta citotoxina es considerada una oncoproteína (19) y está codificada por un gen que se encuentra en una región del genoma llamada la Isla de Patogenicidad Cag (CagPAI, por sus siglas en inglés) (20). Dicha región también codifica por el Sistema de Secreción de tipo IV que inyecta a CagA directamente en el citoplasma de las células epiteliales gástricas (20). A pesar de la fuerte respuesta inmunitaria que se genera contra esta bacteria, *H. pylori* tiene la notable capacidad de persistir durante mucho tiempo en la mucosa gástrica (incluso de por vida en ausencia de tratamiento), para lo cual modula y evade activamente la respuesta del huésped, que conlleva al establecimiento de una infección crónica (18). Esta infección crónica da como

resultado una profunda alteración del microambiente de la mucosa gástrica donde la inflamación y el daño persisten en el tiempo, lo que eventualmente provoca que las células experimenten una transformación maligna (18).

Ante la evidencia científica existente en torno al papel de *H. pylori* en la carcinogénesis del ACG, la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó en el 1994 a esta bacteria como un carcinógeno de tipo I (21). Intrigantemente, la mayoría de los individuos infectados se mantienen asintomáticos o desarrollan otras patologías diferentes de ACG (22). Los factores que probablemente determinan los distintos desenlaces clínicos de la infección son el tipo de cepa de *H. pylori*, la respuesta del hospedero ante la infección y los factores ambientales como estilo de vida y co-infecciones. Es claro que las cepas más virulentas de *H. pylori* (CagPAI+, CagA+) desencadenan una respuesta inflamatoria más fuerte que se asocia a un riesgo mayor de ACG (23,24). Por otra parte, algunas variantes polimórficas de genes que codifican para citoquinas que son importantes en la respuesta inmunitaria hacia la bacteria se han relacionado con un mayor riesgo de ACG (25). También, la alta ingesta de irritantes de la mucosa gástrica aumenta el riesgo de ACG (26). Por último, se ha propuesto que el EBV es un factor etiológico importante en los ACG, principalmente en aquellos localizados proximalmente (cardias y el fondo del estómago) (27). Se especula, entonces, que la evolución clínica de la infección por *H. pylori* depende de la combinación de los factores mencionados; sin embargo, las interacciones entre todos estos son muy complejas por lo que todavía queda mucho por dilucidar sobre la patogénesis del ACG.

### **El microambiente tumoral inmunosupresor**

Conforme un tumor se va estableciendo, se dan una serie de eventos que repercuten en la dinámica evolutiva y ecológica de las células (pre)tumorales, lo cual también impacta la composición del entorno tisular en el que se encuentran estas células. Dentro de este entorno se encuentran las células inmunológicas que, en un principio, fueron reclutadas para detener el progreso tumoral; sin embargo, las células transformadas van modulando gradualmente el infiltrado inmunológico hacia un perfil tolerante o supresor (28,29). Este microambiente tumoral inmunosupresor está conformado por varios tipos de células y moléculas que no sólo “no atacan” el tumor, si no que en muchos casos colaboran activamente con el



establecimiento y el crecimiento de las células malignas, es decir, tienen un carácter protumoral. Dentro de estas células destacan cuatro poblaciones: las células mieloides supresoras (MDSCs, por sus siglas en inglés), los macrófagos asociados a tumores (TAMs, por sus siglas en inglés), los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reguladores (Tregs) y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en estado de agotamiento (conocidas como *exhausted T cells*) (30,31). Este trabajo se enfoca en las últimas dos, que corresponden a las poblaciones supresoras de linaje linfoide.

Los Tregs corresponden a una pequeña fracción (5-10%) de todos los linfocitos T CD4<sup>+</sup> circulantes (32). En circunstancias normales, su función principal es mantener la tolerancia periférica mediante la secreción de citoquinas inmunosupresoras, como la interleuquina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ , por sus siglas en inglés), así como la interrupción de la activación de linfocitos T efectoras (Teffs); todo lo anterior con el fin de mantener la homeostasis y evitar el desarrollo de enfermedades autoinmunes (33). Sin embargo, cuando forman parte del microambiente tumoral, las acciones supresoras de los Tregs generalmente contribuyen al escape de las células tumorales, evitando que sean reconocidas y eliminadas por el sistema inmunológico (34). De hecho, la infiltración por Tregs se ha asociado a un mal pronóstico en varios tipos de cáncer (35). Al igual que los demás linfocitos T, los Tregs pueden tener diferentes grados de activación, por lo que en muchos casos la sola presencia de Tregs infiltrantes no es suficiente para conferir un mal pronóstico, lo cual resalta la importancia de caracterizar las poblaciones de Tregs infiltrantes para así entender el papel que están ejerciendo en el microambiente tumoral.

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en estado de agotamiento se caracterizan por la alta expresión de unas moléculas inmunorreguladoras con función co-inhibidora conocidas como *immune checkpoints* o puntos de control inmunitario (PCI). En condiciones fisiológicas normales, la expresión de PCI es inducida posterior a una activación inflamatoria, ejerciendo así un papel de reguladores negativos de las señales co-estimuladoras de la respuesta inmunológica; esto con el fin de evitar respuestas exacerbadas y mantener el equilibrio homeostático (36). En el contexto tumoral, se ha comprobado que los PCI están comúnmente sobreexpresados, tanto en células cancerosas como en células no neoplásicas del microambiente tumoral (37). Esto se asocia con la persistencia de un estímulo inmunológico, similar a lo que ocurre en una

infección crónica (38). La sobreexpresión de PCI favorece la activación de vías de señalización que ejercen regulación negativa a nivel local, lo cual les confiere a las células cancerígenas la capacidad de evadir al sistema inmunológico. Típicamente, los receptores de los PCI se expresan en la membrana de linfocitos T CD8+ que se encuentran en un estado de agotamiento, mientras que sus ligandos son expresados en la membrana por células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés) o células cancerígenas y, en algunos casos, son secretados al espacio extracelular. La interacción entre receptores y ligandos inactiva la función de los linfocitos T CD8+ por medio de tres mecanismos: 1) el secuestro de ligandos co-estimuladores, 2) la modulación de los mediadores intracelulares del receptor del linfocito T y sus co-estimuladores y 3) la inducción de la expresión de genes relacionados con la supresión del sistema inmune (38). Los dos últimos mecanismos se desencadenan a través de motivos intracelulares que se encuentran en diferentes PCI: los motivos de inhibición de inmunorreceptores basados en tirosina (ITIM, por sus siglas en inglés) y los motivos de cambio del inmunorreceptor basados en tirosina (ITSM, por sus siglas en inglés) (39,40).

Un estudio en el que se caracterizó el panorama unicelular de linfocitos T infiltrantes mediante secuenciación de ARN de una sola célula de 21 tipos de tumores, reveló que hay distintas rutas celulares que llevan al estado terminal de agotamiento de linfocitos T (Tex) (41). Según sus resultados, en la mayoría de los cánceres, los Tex derivan principalmente de dos tipos de poblaciones de linfocitos T de memoria (Tm): los linfocitos T de memoria efectores (Tem) o los linfocitos T de memoria residentes en tejidos (Trm), sin embargo, en ciertos tipos de cáncer existe una asociación de los Tex con otros tipos de células. Por ejemplo, en CG encontraron que los Tex comparten la expresión de genes asociados con linfocitos T CD4+ de tipo Th17 y linfocitos T CD8+ de tipo Tc17.

Si bien los PCI y el estado de agotamiento se describieron clásicamente para linfocitos T CD8+, en la actualidad sabemos que estas moléculas también cumplen una función reguladora en las otras células linfoides citotóxicas: las células NK (42). Además, el término agotamiento se ha extrapolado a Teffs CD4+ con alta expresión de PCI, los cuales también experimentan una disminución en sus funciones efectoras, entre ellas la producción de

citoquinas y el otorgamiento de la licencia para que las células dendríticas maduras activen linfocitos T CD8+ vírgenes (43). Por ende, estas poblaciones en estado de agotamiento impiden que se desarrolle una respuesta anti-tumoral adecuada. Por otro lado, en la subpoblación de linfocitos T CD4+ con función reguladora, los Tregs, la alta expresión de PCI generalmente se asocia con un incremento de su actividad supresora (34,44,45). Además, la presentación antigénica a linfocitos T CD4+ vírgenes en presencia de la interacción de algunos PCI se ha asociado con la diferenciación hacia Tregs (46). De manera que los PCI también influyen en la inducción y el mantenimiento de los mecanismos supresores de los Tregs en el microambiente tumoral.

A continuación, se describen algunas de las moléculas inmunorreguladoras de células linfoides más estudiadas que contribuyen al establecimiento de un microambiente tumoral inmunosupresor (ver Anexo 1 para nombres completos y sinónimos). También, se resumen las publicaciones que las relacionan con CG.

### **PD-1/PD-L1**

El receptor PD-1 fue descrito en 1992 por un grupo de investigadores de la Universidad de Kyoto liderado por Tasuku Honjo que realizaba estudios sobre apoptosis de linfocitos T autorreactivos en el timo, de ahí que su nombre completo es “proteína de muerte celular programada 1” (47). Sin embargo, años más tarde, se descubrió que esta proteína es expresada en linfocitos T y B posterior a la estimulación antigénica y que su función no está relacionada con muerte celular, si no con eventos secundarios a la activación de los receptores de estos linfocitos (48). Hasta 1999, año en que se reportó por primera vez su ligando PD-L1, se reconoce a PD-1 como un receptor co-inhibitorio de Teffs que cumple esta función a través de sus dominios intracelulares ITIM y ITSM (49–51). En la actualidad, se conoce que PD-1 también es expresado en otras células inmunológicas como células NK y células mieloides, mientras que PD-L1 se puede expresar en APC, linfocitos y varios tipos de células no inmunológicas como las endoteliales, epiteliales y tumorales (48,52). La expresión de PD-L1 en células tumorales puede ser inducida mediante dos maneras: 1) la expresión oncogénica constitutiva, que se da a partir de cambios (epi)genéticos que aumentan la expresión ya sea del locus que alberga PD-L1 o de otros loci que codifican por moléculas

involucradas en la señalización que desencadena la inducción de la expresión de PD-L1, y 2) la expresión adaptada, que se da como respuesta al microambiente tumoral, ya sea por la infiltración de linfocitos T activados, la presencia de citoquinas pro-inflamatorias o por condiciones adversas como la hipoxia (48,53).

En general, la función inmunosupresora del eje PD-1/PD-L1 en el microambiente tumoral es la de un PCI clásico: la interacción de PD-1 en la membrana de Teffs CD4+ o CD8+ con PD-L1 en APC o células tumorales induce un estado de agotamiento (48). Esta misma interacción puede conducir a la diferenciación de un linfocito T CD4+ virgen en Treg y al mantenimiento de las funciones inmunosupresoras de Tregs previamente diferenciados (46). En los últimos años, se ha destacado el papel inmunosupresor de estas moléculas en el microambiente tumoral. La expresión de PD-1 en linfocitos T infiltrados y/o la expresión de PD-L1 en células tumorales y APC ha sido correlacionada con mal pronóstico en muchos tipos de cáncer, incluyendo el CG (52–54). Algunos autores también han demostrado que en ciertos tumores los Tregs que tienen una alta expresión de PD-1 (PD-1<sup>high</sup>) pueden entrar en un estado disfuncional similar al agotamiento (*exhaustion-like*), lo cual implica la inhibición de las funciones supresoras de los Tregs, es decir, favorece la respuesta anti-tumoral (43,55,56). Entonces, todavía no está del todo claro el papel que cumple PD-1 en Tregs, aunque algunos autores sugieren que PD-1 modula el umbral de activación de estas células, lo que posiblemente depende de los niveles en que se expresa (57).

El eje PD-L1/PD-1 es el más estudiado en el contexto del CG. La prevalencia de ACG positivo para PD-L1 se encuentra entre 30-90%, dependiendo de la población estudiada (58–71). Existe un número considerable de publicaciones que han estudiado la posible correlación de PD-L1 con parámetros clínicopatológicos. En síntesis, la expresión de PD-L1 es significativamente más prevalente en ACG con las siguientes características: 1) tipo histológico difuso (72,73), 2) positivo para EBV (2,10,58–62,72–74), 3) con MSI y/o deficiencia del sistema de reparación de apareamiento erróneo de bases nitrogenadas (MMR, por sus siglas en inglés) (2,59,61,62,75–77), 4) con mutaciones en *PIK3CA* (58,61,78), 5) en estado avanzado (75,79,80) y 6) con metástasis en nódulos linfáticos (61,77,80,81). En

cuanto a su potencial como factor pronóstico, no existe consenso en la literatura. No obstante, algunos polimorfismos del gen de PD-L1 se asocian con mejor supervivencia (82).

#### **CTLA-4**

CTLA-4 fue el primer co-inhibidor descrito (83) que interactúa con moléculas de la familia B7; su expresión se limita principalmente a linfocitos T (52). Ejerce su función como PCI al interactuar con B7-1 o B7-2 en la membrana de las APC impidiendo que estas moléculas interactúen con el receptor co-estimulador CD28, es decir, actúa como un secuestrador de ligandos co-estimuladores (84). Esto se da porque CTLA-4 tiene mayor afinidad por B7-1 y B7-2 que el receptor CD28 (52). CTLA-4 se expresa principalmente de manera constitutiva en Tregs, funcionando como uno de sus principales mecanismos supresores de linfocitos T y, además, su expresión puede ser inducida en Tregs posterior a su activación, regulando negativamente dicha activación (85–87). En CG, se ha descrito que CTLA-4 se expresa ampliamente en tejido tumoral en comparación con tejido no tumoral adyacente y que su expresión puede inducir angiogénesis (52).

#### **TIGIT/PVR**

PVR es un miembro de la familia de las nectinas que, en general, tiene una baja o nula expresión en tejidos sanos, pero se encuentra sobreexpresado en muchos tipos de cáncer (88), tanto en células tumorales como en células mieloides y dendríticas (45,89). En un inicio, esta familia de proteínas fue involucrada en procesos de adhesión celular, invasión, migración y proliferación que contribuyen a la progresión tumoral; más recientemente, se ha reconocido el papel de PVR y otras moléculas de esta familia como inmunorreguladores (88). PVR puede actuar como un ligando activador o inhibidor, dependiendo de si interactúa con CD226 o con TIGIT, respectivamente (44,88,90). TIGIT es un receptor co-inhibitorio que se expresa en la membrana de linfocitos T y células NK y puede interactuar con varios ligandos, siendo PVR el ligando con mayor afinidad (44). Cuando PVR y TIGIT interactúan, el agotamiento de las células linfoides que expresan TIGIT se da tanto por la señalización de sus dominios intracelulares como por el secuestro de PVR para que este no interactúe con el receptor co-estimulador CD226 (44,45,89). Además, esta interacción permite un flujo bidireccional de señales que modula la secreción de citoquinas hacia un perfil inmunosupresor por parte de la

célula que expresa PVR (44,45,89). Por otro lado, los Tregs positivos para TIGIT se han asociado al microambiente inmunosupresor tumoral porque tienen una mejor capacidad supresora (44,45).

En CG se ha descrito que la expresión de TIGIT en linfocitos T CD8+ infiltrantes es elevada (90,91). Aunado a esto, se ha demostrado que la alta expresión de PVR y de TIGIT en CG está asociada con un mal pronóstico (91,92). También, en un estudio, se observó que el aumento en la expresión de TIGIT en linfocitos T CD8+ infiltrantes posterior al tratamiento con ciertas quimioterapias está estrechamente asociado con la recurrencia del CG (91).

### **B7-H3**

B7-H3 es un miembro de la familia de moléculas inmunorreguladoras B7, al igual que PD-L1. En condiciones fisiológicas, la expresión proteica de B7-H3 es infrecuente, en niveles bajos y se limita a ciertos tipos de células inmunológicas en su estado de activación, como células NK, linfocitos B, linfocitos T, monocitos y células dendríticas (52,93). La mayoría de los estudios han demostrado que esta molécula tiene un rol predominantemente inhibitor sobre los linfocitos T, sin embargo, a la fecha, todavía no está claro cuál es su receptor de membrana en linfocitos T humanos (52,93). Por otro lado, algunos estudios sugieren que B7-H3 puede activar vías de regulación positivas si es reconocido por un receptor diferente, también desconocido, aunque ninguno de estos estudios es realmente concluyente (52,93). A pesar de ser tan pobremente expresada en tejidos sanos, la expresión de B7-H3 en células tumorales es considerablemente alta en varios tipos de cáncer, por lo que esta molécula se ha llegado a clasificar como un antígeno tumoral (54).

En CG, la expresión de B7-H3 es considerablemente mayor en comparación con tejido gástrico normal y se ha asociado con la capacidad de invasión y metástasis, la inhibición de la apoptosis, baja densidad de linfocitos T CD8+ y con mal pronóstico, aunque hay algunos estudios con resultados contradictorios (52,54,93–98).

## **ICOS/ICOSL**

ICOS es una molécula con función co-estimuladora cuya expresión es inducida ante la activación de linfocitos T (de ahí su nombre *Inducible T Cell Costimulator*). Su ligando, ICOSL, se expresa constitutivamente en APC (principalmente en las células dendríticas plasmacitoides), en células mieloides y en gran variedad de otras células somáticas, incluidas las células tumorales (52,99). En general, la interacción de ICOS con ICOSL se ha descrito como un desencadenante de vías de señalización que llevan a la activación de T<sub>eff</sub>s y T<sub>m</sub>, tanto CD8<sup>+</sup> como CD4<sup>+</sup>; sin embargo, la expresión de ICOS también puede ser inducida en Tregs, lo cual potencia su función inmunosupresora (52,99). Las células dendríticas plasmacitoides tienen una capacidad inmunomoduladora más débil como APC que las células dendríticas convencionales, por lo que se relacionan con varios procesos de inmunotolerancia y con la activación de Tregs (100,101). En síntesis, a nivel del microambiente tumoral, el eje ICOS/ICOSL puede estimular o suprimir la respuesta anti-tumoral según la célula en la que se expresen estas moléculas.

Algunos estudios en CG han reportado una baja expresión de ICOSL en comparación con tejido de pacientes con otro tipo de patologías gástricas (102). Un estudio reporta una mayor expresión de ICOS que de la molécula co-estimuladora B7-1 en biopsias de pacientes con CG (103). Otras investigaciones en CG han demostrado que la alta cantidad de Tregs ICOS<sup>+</sup> infiltrantes correlaciona con estados avanzados (100,104) o un mal pronóstico (101,105).

## **BTLA/TNFRSF14**

TNFRSF14 es una molécula que se expresa en gran variedad de células: linfocitos T, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, neutrófilos, células NK y células no hematopoyéticas (106). Esta se ha descrito como un “*switch* molecular” porque tiene la capacidad de participar como receptor o ligando en señalizaciones co-activadoras o co-inhibitorias, las cuales van a depender de la célula en la que se exprese y la molécula con la que está interactuando. Cuando TNFRSF14 se expresa en la membrana de linfocitos T funciona como un receptor que puede recibir dos tipos de señales: la unión con las citoquinas TNFSF14 (LIGHT) o TNFSF1 (linfotóxina- $\alpha$ ) activa una vía de señalización co-estimuladora que contribuye a la proliferación y activación de la célula (107,108), mientras

que la unión con BTLA, expresado en la membrana de células dendríticas en el contexto de la presentación antigénica, desencadena una vía de señalización que induce a la diferenciación hacia Tregs (109,110). Cuando TNFRSF14 se expresa en la membrana de otros tipos celulares, este funciona como un ligando para BTLA, expresado en la membrana de linfocitos T durante la sinapsis inmunológica; esta interacción genera señales co-inhibidoras a través de los motivos citoplasmáticos ITIM e ITSM de BTLA, actuando entonces como PCI y contribuyendo al agotamiento de linfocitos T (107,108,111,112).

Se ha descrito que varios tipos de cáncer presentan una alta expresión de TNFRSF14 y BTLA (106,112) y el CG no es una excepción. Un estudio con muestras de pacientes con estados avanzados demuestra que TNFRSF14 y BTLA están significativamente elevados en tejido tumoral en comparación con tejido gástrico de individuos sanos (113,114). Otros estudios han asociado la alta expresión de estas moléculas en el microambiente tumoral con un mal pronóstico (114,115).

### **TNFRSF9/TNFSF9**

La superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral (TNFSF, por sus siglas en inglés) se caracteriza por desencadenar vías de señalización co-estimuladoras y de supervivencia a través de sus receptores (TNFRSF), cuya expresión es inducida en células inmunológicas tras su activación (116). El receptor TNFRSF9 se puede expresar en linfocitos T, células NK, mastocitos y neutrófilos, mientras que su ligando, el TNFSF9, se expresa en APC, linfocitos T, células NK, mastocitos e, inclusive, en células no inmunológicas; de manera que, la interacción receptor-ligando puede mediar la comunicación entre diversos tipos de células (116). Al igual que la interacción ICOS/ICOSL, la interacción de TNFRSF9 en la membrana de linfocitos T con su ligando induce señalización co-estimuladora, lo cual se cumple tanto en la población de T<sub>H</sub>17 (116) como en las poblaciones de Tregs, en las cuales TNFRSF9 se ha relacionado con señalización proliferativa y actividad supresora (117–119). De esta manera, a nivel del microambiente tumoral, TNFRSF9 puede tener un rol anti- o pro-tumoral dependiendo del tipo de linfocitos T que lo expresen.



Recientemente, se ha descrito que TNFRSF9 se expresa preferiblemente en Tregs intratumorales en comparación con otros tipos de linfocitos T que infiltran los tumores (e.g. Teffs) o con poblaciones de Tregs fuera del tumor (117,120–124). También, se ha visto que una alta infiltración de Tregs TNFRSF9+ en el microambiente tumoral se asocia con un mal pronóstico (117,119,122,125). Un estudio que caracterizó mediante secuenciación de ARN en células únicas (*single cell RNA sequencing*) los linfocitos T infiltrantes en 21 tipos diferentes de tumores, incluido el CG, determinó que, de la población CD4+, los Tregs TNFRSF9+ fueron las células más frecuentemente catalogadas como potencialmente “tumor-reativas”, un parámetro que establecieron tomando en cuenta distribución en el tejido, fenotipos transcripcionales, proliferación y expansión clonal (41). Al analizar la trayectoria funcional que toman las células para adquirir este fenotipo, Zheng *et al.* indican que los Tregs hacen una transición gradual de un estado de reposo TNFRSF9– hacia un estado activado TNFRSF9+, pasando por un estado intermedio que expresa genes inducidos por interferones de tipo I (41).

### **LAG3/Gal-3 y TIM3/Gal-9**

Las galectinas son una familia de lectinas solubles con uno o más dominios de reconocimiento de carbohidratos, que se expresan ampliamente en varios tipos de células y tienen funciones tanto a nivel intracelular como extracelular (126). En el espacio extracelular, las galectinas interactúan con receptores que contienen diferentes grados de modificación de oligosacáridos y algunas de estas interacciones regulan la activación de células inmunológicas (126). Gal-3 y Gal-9 inducen señalización co-inhibitoria cuando son reconocidas por los receptores LAG3 y TIM3 en la membrana de Teffs, respectivamente (54). Por lo tanto, ambos funcionan como PCI a pesar de que ninguno tiene los dominios citoplasmáticos ITIM o ITSM característicos de moléculas co-inhibidoras (127). La expresión de LAG3 y TIM3 en Tregs se asocia con mayor capacidad inmunosupresora (127). De esta manera, la interacción de estos receptores en linfocitos T con las respectivas galectinas solubles en el microambiente tumoral puede atenuar la respuesta anti-tumoral (54,126). En CG, se ha descrito el aumento en la expresión de Gal-9 y TIM3 y, en ambos casos, esto se ha asociado con un mal pronóstico (128,129)

## **Inmunoterapia en cáncer**

Tradicionalmente, los tratamientos utilizados en un paciente con cáncer se han enfocado mayoritariamente en remover o eliminar las células cancerígenas mediante cirugía, radioterapia, quimioterapia o la combinación de estas. No obstante, muchos de los pacientes recaen o no obtienen mayor beneficio en términos de sobrevida y calidad de vida. Lo anterior denota la relevancia de buscar formas novedosas de tratar el cáncer, o refinar las estrategias existentes.

El conocimiento que se tiene en la actualidad sobre el inicio, la promoción y la progresión de un tumor, así como el desarrollo de técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales, ha revolucionado la forma de tratar el cáncer. Por un lado, la descripción de la heterogeneidad celular y molecular de las células tumorales entre pacientes con un mismo tipo de cáncer, e incluso dentro de un mismo tumor, ha conllevado a la aplicación de la oncología de precisión, cuya premisa es hacer una caracterización a nivel celular y molecular del tumor del paciente, con el fin de elegir la estrategia terapéutica que tiene mayor probabilidad de ser eficaz para cada individuo. Por otro lado, el haber comprendido que el microambiente tumoral es trascendental para el crecimiento de las células cancerígenas y la formación de un tumor maligno trajo como consecuencia el desarrollo de terapias avocadas a manipular el microambiente tumoral con el fin de obstaculizar su función pro-tumoral. Dentro de este grupo de estrategias terapéuticas destaca la inmunoterapia, que engloba varios tratamientos cuyo objetivo es la estimulación de la respuesta inmune anti-tumoral (130). Este enfoque terapéutico es sustentado por varios estudios que han demostrado que el alcance de la reacción inmunológica local contra el tumor correlaciona de forma robusta con un mejor pronóstico (131). Estos novedosos tratamientos han logrado aumentar la sobrevida de los pacientes con cáncer, generando respuestas muy eficaces y duraderas (89).

En cualquier contexto tisular, el establecimiento de un microambiente proinflamatorio vs. un microambiente inmunosupresor depende del balance global entre vías reguladoras co-estimuladoras (o activadoras) y co-inhedoras (o supresoras) que son desencadenadas tanto en las células inmunológicas infiltrantes como en otras células de ese microambiente. Teniendo en cuenta lo anterior, una de las estrategias de la inmunoterapia actualmente

utilizada se basa en el uso de anticuerpos monoclonales para manipular las vías reguladoras inmunitarias con el fin de revitalizar o generar *de novo* respuestas inmunitarias de memoria que ataquen el tumor y, además, que estas células inmunitarias reconozcan a largo plazo las células tumorales circulantes, diseminadas o residuales que expresan antígenos asociados o específicos del tumor y así evitar recaídas (99). Dependiendo de la vía que se quiera manipular, se pueden utilizar anticuerpos que bloqueen la interacción entre receptor-ligando o anticuerpos agonistas que estimulen la activación de receptores.

En el marco de esta estrategia, los anticuerpos monoclonales que a la fecha han demostrado tener un gran potencial terapéutico son los que funcionan como bloqueadores de puntos de control inmunitario (BPCI), es decir, que bloquean vías co-inhibitorias (132). Los primeros BPCI utilizados en la clínica son los que se dirigen contra CTLA-4 o PD-1/PD-L1. Estos han mostrado ser altamente exitosos en diferentes estudios en fase clínica y, a la fecha, están aprobados en varios tipos de cáncer, incluyendo el ACG (133–135). En el 2017, la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó el uso de Pembrolizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra PD-1, en pacientes con ACG avanzado o recurrente que expresen PD-L1, lo cual se basó en los resultados del ensayo clínico KEYNOTE-059 (136). Asimismo, en Japón, los resultados de los ensayos clínicos ONO-4538 y ATTRACTION-2 permitieron la aprobación de la administración de Nivolumab, también dirigido contra PD-1, para el tratamiento de pacientes con ACG avanzado que progresa después de la terapia quimioterapéutica sistémica estándar, sin importar el estatus de expresión de PD-L1 (137).

Este gran potencial que tienen los PCI como blanco terapéutico en cáncer ha despertado mucho interés por el estudio de estas moléculas y, a la fecha, se han descrito gran cantidad de PCI, los cuales se pueden consultar en diversas revisiones bibliográficas (37,89,131,138–140). Paralelamente, cada día surgen más estudios pre-clínicos y clínicos que evalúan el bloqueo de estas vías regulatorias en diversos tipos de cáncer (141). Por ejemplo, en varios tipos de cáncer, las terapias con anticuerpos anti-TIGIT han demostrado ser eficaces para revertir el agotamiento de linfocitos T CD8+ y CD4+ y, además, disminuir la población de Tregs en el microambiente tumoral (44). Específicamente en ACG, varios ensayos clínicos están evaluando BPCI dirigidos contra PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3 y TIGIT (resumidos

por Cai *et al.* (142); para detalles consultar la página web de ensayos clínicos del NIH (143). Cabe destacar que la significancia clínica de la expresión diferencial de estas moléculas inmunorreguladoras entre los pacientes no ha sido completamente dilucidada. Es fundamental estudiar primeramente los aspectos básicos, como sus perfiles de expresión en circunstancias no tumorales, pre-malignas y en los diferentes tipos de cáncer, incluyendo CG, y los posibles mecanismos de inducción para eventualmente hacer evaluaciones de su relevancia clínica.

Además de las respuestas duraderas, otra gran ventaja de las terapias con los BPCI es que provocan pocas reacciones adversas, generalmente manejables clínicamente (89). No obstante, estos alcances son parcialmente opacados por el hecho de que solo una fracción menor al 50% de los pacientes se benefician de la terapia (89). Esto posiblemente se debe a que hay múltiples factores que determinan la eficacia de la terapia, como el estatus de la respuesta inmune de cada individuo, características intrínsecas de las células tumorales, el microambiente tumoral, e incluso factores ambientales como la composición y diversidad de la microbiota intestinal (144). Concretamente, la falta de respuesta al tratamiento con BPCI se ha asociado a tumores con: 1) activación redundante de vías de señalización de otros PCI sobreexpresados por linfocitos T que no están siendo bloqueados (145,146), 2) poca infiltración de Teffs, lo cual implica que si no están presentes, no pueden ser reactivados por los BPCI (147), 3) escasez de neoantígenos o antígenos asociados a tumores que puedan ser reconocidos por los linfocitos reactivados (144), 4) falta de moléculas de señalización co-estimuladoras (30) y/o 5) presencia de otras poblaciones celulares supresoras (como Tregs y TAMs) o moléculas inmunosupresoras (como IL-10 o TGF- $\beta$ ) que impiden el “desagotamiento” de linfocitos T (146,148). En este último punto, es importante resaltar la alta infiltración de *exhausted-like* Tregs (PD-1<sup>high</sup>) que, al bloquear el eje PD-1/PD-L1, reactivan su capacidad proliferativa y sus mecanismos inmunosupresores (34,43,149). Este evento se ha descrito en ciertos pacientes con CG avanzado que, al ser tratados con bloqueadores de PD-1, evolucionan a un estado de progresión rápida llamado enfermedad hiperprogresiva (150).

Para superar la resistencia a los BPCI y aumentar la cantidad de pacientes que son beneficiados con este tipo de terapias, las prioridades de investigación son dos: por un lado, la definición de biomarcadores que permitan establecer un algoritmo para la elección adecuada de pacientes que responderán a la terapia y, por otro lado, la combinación de esta terapia con otros tratamientos que complementen la manipulación de las vías reguladoras inmunitarias en el microambiente tumoral.

### **Biomarcadores en la terapia con BPCI**

La búsqueda de biomarcadores predictivos de la respuesta a BPCI es indispensable para maximizar el control de la enfermedad y a la vez disminuir efectos adversos y costos. Aunque la expresión de PD-L1 se ha utilizado como un biomarcador en varios tipos de cáncer, incluyendo ACG, su utilidad es cuestionada porque no todos los pacientes que son positivos para PD-L1 responden a la terapia e, incluso, algunos pacientes negativos sí responden (54,136,137,151–154). Esto puede explicarse por la heterogeneidad intratumoral, la cual podría no verse reflejada en una biopsia pues esta representa una pequeña porción de todo el tumor. Sin embargo, como se explicó anteriormente, la expresión de PD-L1 puede darse en consecuencia a cambios genéticos de las células tumorales independientes del microambiente tumoral, por lo que puede haber tumores PD-L1 positivos sin la infiltración de linfocitos agotados que reactivar, lo que lleva a la siguiente estrategia de biomarcadores: la caracterización de las células inmunológicas infiltrantes en el tumor. Se ha visto que los tumores con una alta cantidad de linfocitos infiltrantes, denominados tumores “calientes”, tienden a responder mejor a este tratamiento que los tumores con menor cantidad de linfocitos infiltrantes, denominados tumores “fríos” (130,155). No obstante, esta caracterización no es suficiente para separar con éxito los pacientes que pueden responder de los que no porque, más allá de la presencia y cantidad de linfocitos infiltrantes, también es importante conocer la distribución espacial y la polarización funcional de esos linfocitos infiltrantes. En este sentido, surgen biomarcadores más precisos como la cantidad de linfocitos T (CD3+) infiltrantes (147) o, mejor aún, la relación entre T<sub>eff</sub>s y T<sub>reg</sub>s (34,56) y la caracterización de receptores co-estimuladores y co-inhibidores en estas dos poblaciones celulares a nivel tumoral (156).

Aunado a lo anterior, varios estudios proponen hacer la caracterización de las poblaciones celulares inmunológicas en sangre periférica y utilizar esto como biomarcador predictivo de respuesta a terapia con BPCI. Esto sustentado por la evidencia de que la terapia con BPCI no actúa únicamente a nivel tumoral, si no que tiene efectos a nivel sistémico que pueden contribuir con la activación de una respuesta anti-tumoral efectiva y que los cambios en las poblaciones inmunológicas a nivel sistémico posterior a la terapia con BPCI se han correlacionado con la eficacia de la terapia (157).

En la actualidad, la MSI es uno de los biomarcadores predictivos más prometedores, ya que se asocia con una alta cantidad de neoantígenos en el tumor, lo cual implica una mayor inmunogenicidad y, por ende, contribuye al desarrollo de una respuesta anti-tumoral eficaz. De hecho, la FDA aprobó el uso de Pembrolizumab en cualquier tumor sólido inoperable o metastásico con MSI o deficiencia de MMR, lo cual fue un acontecimiento importante porque fue la primera vez que se aprobó un tratamiento en cáncer sin importar su localización anatómica u origen. En ACG hay varios estudios que respaldan el uso de MSI como biomarcador (136,152,158,159). Interesantemente, en el ensayo clínico NCT02589496, el único paciente con MSI que no respondió al tratamiento con Pembrolizumab tenía un patrón heterogéneo de MSI (159), lo cual refleja que puede ser importante considerar la heterogeneidad intratumoral para la elección de pacientes. Además, este obstáculo puede ser superado por medio de la secuenciación del ADN tumoral circulante (ADNtc), lo cual es respaldado por un ensayo que incluye 23 tipos de cáncer y reporta que el número de mutaciones en ADNtc está positivamente asociado con la respuesta a BPCI (160).

Otros biomarcadores con resultados promisorios en ACG también relacionados con la capacidad inflamatoria y la inmunogenicidad tumoral son la presencia del EBV en células tumorales (159); la expresión de genes asociados a IFN- $\gamma$  (161), a inflamación (136,159) y a proliferación (159); y la ausencia de expresión de genes asociados a la transición epitelio-mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés) (159). Más recientemente, la infección por *H. pylori* en pacientes con CG se ha propuesto como un posible biomarcador que predice la respuesta a BPCI (162–165). Aunque estos biomarcadores han mostrado ser útiles, no son suficientes para derivar en el beneficio clínico de todos los pacientes. De aquí radica la

importancia de buscar otros biomarcadores para la implementación de terapias individualizadas según el perfil de expresión de cada paciente con ACG.

### **BPCI en combinación con otras terapias**

El objetivo de combinar los BPCI con otro tipo de terapias es contrarrestar las condiciones tumorales que desfavorecen el éxito terapéutico (puntualizadas anteriormente). En este sentido, se han desarrollado cinco enfoques: 1) bloqueo simultáneo de otros PCI (166), 2) terapias que favorezcan la infiltración de linfocitos T a los tumores (30), 3) terapias que aumenten la inmunogenicidad del tumor (167), 4) terapias que desencadenen vías de co-estimulación de Teffs (30) y 5) terapias que disminuyan la cantidad de Tregs infiltrantes en el tumor (34). Para cada uno de estos enfoques existen múltiples estrategias que han mostrado ser eficaces; aquí profundizaremos únicamente en las últimas dos, que corresponden a la manipulación de las poblaciones linfoides intratumorales.

#### *Terapias que desencadenan vías de co-estimulación de Teffs*

El reconocimiento de la importancia de las vías co-inhibitorias de los PCI a nivel del microambiente tumoral renovó la atención de la comunidad científica por el estudio de las moléculas co-estimuladoras. Esto obedece principalmente a que estas son cruciales para la re-activación de los linfocitos infiltrantes de tumores y, como se mencionó anteriormente, el bloqueo de PCI no siempre es suficiente, más bien, en ocasiones la falta de respuesta a esta terapia se relaciona con la poca señalización en vías de activación.

Las inmunoterapias que se enfocan en activar vías de co-estimulación de Teffs intratumorales existen desde hace varios años, incluso antes que los BPCI. Esta estrategia se basa en utilizar anticuerpos monoclonales agonistas de los receptores co-estimuladores, como TNFRSF9 y ICOS, que no se expresan constitutivamente en estas células, sino que son inducidos post-activación. Se utilizan como blanco los co-estimuladores inducidos porque, a diferencia de los que se expresan constitutivamente, estos están prácticamente restringidos a células previamente activadas, lo que disminuye la probabilidad de que los pacientes desarrollen enfermedades autoinmunes como efecto secundario (116). A pesar de que se ha documentado cierto grado de respuesta a estos anticuerpos agonistas como monoterapia, la principal

limitante ha sido que, al ser activadores de linfocitos T, también pueden activar Tregs, los cuales, si están infiltrando el tumor, al activarse pueden más bien favorecer la progresión y el crecimiento tumoral (99,168). Esto reitera la importancia de la caracterización adecuada del microambiente tumoral para definir la mejor estrategia terapéutica. En este sentido, parece trascendental definir la cantidad relativa de Tregs en el microambiente tumoral y caracterizar los receptores co-estimuladores en los Tregs infiltrantes. Interesantemente, la combinación de la terapia con agonistas de los receptores co-estimuladores y BPCI parece contrarrestar eficazmente las limitantes de cada una de estas terapias (30), aunque el mecanismo exacto que explica este resultado clínico no está del todo claro. Por ejemplo, la utilización de ICOS como blanco terapéutico en cáncer ha mostrado una mejor eficacia en combinación con el bloqueo de los PCI clásicos, CTLA-4 y PD-1/PD-L1, que como monoterapia (99).

#### *Terapias que disminuyan la cantidad de Tregs infiltrando el tumor*

La descripción de los Tregs infiltrantes de tumores con alta expresión de receptores co-estimuladores sirvió de base para el desarrollo de inmunoterapias con anticuerpos que reconozcan estos receptores co-estimuladores, como TNFRSF9 y ICOS, pero en este caso no para bloquearlos o activarlos, si no como una forma de dirigir mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) hacia los Tregs y así disminuir la cantidad de Tregs infiltrando el tumor (34,99,149,169,170). A este nuevo tipo de blancos terapéuticos se les ha denominado recientemente “antígenos del microambiente tumoral” (TMAs, por sus siglas en inglés) ya que dirigen el ataque del sistema inmunológico hacia antígenos de células no tumorales que forman parte del microambiente tumoral y contribuyen de forma activa en la progresión tumoral (169); en este caso específico, los Tregs. De nuevo, este enfoque terapéutico solo sería útil si se caracterizan previamente estos TMAs en las poblaciones de Tregs infiltrantes de tumores. Esta estrategia también ha mostrado aumentar la efectividad de la terapia con BPCI al utilizarse de manera combinada (99,117).

Interesantemente, hay un estudio clínico en curso que evalúa un anticuerpo monoclonal anti-ICOS (KY1044) con función dual: la estimulación de T<sub>H</sub>17 y la depleción de Tregs ICOS+



(99,143,171). En este estudio, se hace la evaluación del anticuerpo como monoterapia o en combinación con anti-PD-L1 en varios tipos de cáncer en estado avanzado, incluido el CG (143). Hasta el momento, la fase I ha reflejado que ambos enfoques son bien tolerados y, además, se han visto respuestas mensurables, por lo que ya pasaron a la fase II (171).

Lo descrito anteriormente evidencia la importancia de identificar las moléculas inmunorreguladoras que son relevantes en cada tipo de cáncer para luego investigar sistemáticamente los mecanismos que subyacen en su inducción y su potencial como blancos terapéuticos. Adicionalmente, esto puede conducir a la identificación de posibles biomarcadores que sirvan en la práctica clínica para predecir cuáles pacientes se pueden beneficiar de estas inmunoterapias.

### **Moléculas inmunorreguladoras en la inflamación crónica inducida por *Helicobacter pylori***

Son varios los hallazgos que sirven de contexto como para pensar que la expresión de moléculas inmunorreguladoras se da tempranamente en la génesis del cáncer y en respuesta a agentes bacterianos, como por ejemplo *H. pylori*, y que esto podría ser un tema relevante de estudiar con detalle. En primer lugar, un estudio en cáncer de pulmón, el cual surge en un ambiente inflamatorio ocasionado por el humo del cigarrillo, demostró que hay un aumento marcado en la expresión de varios PCI en lesiones pre-neoplásicas, mucho antes de que el cáncer esté propiamente establecido (172). También, algunos estudios han revelado que la composición y la diversidad de la microbiota gastrointestinal difieren entre los pacientes que responden a la terapia con BPCI y los que no responden (173–177). Por otro lado, es muy importante tener en cuenta que el ACG surge en un contexto de inflamación crónica provocada por *H. pylori*, por lo que algunos autores sugieren estudiar más a fondo el rol de esta bacteria en la generación de microambientes inmunológicos que favorecen el crecimiento y progresión tumoral. En el contexto anterior, uno de los aspectos de particular relevancia es discernir el papel que tiene esta bacteria en la expresión de los diferentes PCI y otras moléculas inmunorreguladoras que son importantes en la creación del microambiente tumoral inmunosupresor del ACG. Hasta el momento, algunos estudios reportan que *H. pylori* induce la expresión de PD-L1 (178–187), CTLA-4 (188,189), B7-H3 (190), Gal-3

(191–194) y TIM-3 (195,196). Sin embargo, existen muchos más PCI y moléculas inmunorreguladoras que, a nuestro conocimiento, no han sido estudiados previamente en el contexto de la infección por *H. pylori*. Además, estas investigaciones estudian solamente una de estas moléculas; en ninguna de estas se ha hecho una comparación en paralelo de la expresión de múltiples PCI, lo cual ayudaría a dilucidar cuál (o cuáles) de estas moléculas tiene mayor peso en el contexto de la inflamación crónica con que inicia la cascada de eventos pre-cancerosos y que, en última instancia, culmina con ACG.

En el presente proyecto, se estudió el potencial papel de la infección por *H. pylori* en la inducción de varias moléculas inmunorreguladoras y sobre cuáles tiene mayor influencia. Lo anterior con el fin de establecer posibles candidatos para, posteriormente, llevar a cabo estudios con material biológico humano avocados a esclarecer las implicaciones que esto podría tener en el desarrollo y la progresión del ACG. Para esto, se eligió analizar ocho moléculas inmunorreguladoras, las cuales fueron escogidas según la relevancia clínica y el potencial terapéutico que se predice en la literatura para CG. Las moléculas inmunorreguladoras estudiadas fueron: PD-L1, PVR, B7-H3, ICOSLG, TNFRSF14, TNFRSF9, Gal-3 y Gal-9.

## **Justificación**

La alta mortalidad y la baja sobrevida del CG se atribuyen principalmente a dos razones: 1) la mayoría de los pacientes son diagnosticados en estados avanzados de la enfermedad, cuando la posibilidad de tratamiento con intento curativo es reducida, y 2) las opciones farmacoterapéuticas son limitadas y no consideran la heterogeneidad molecular entre tumores de diferentes pacientes, ni dentro del mismo tumor. Lo anterior pone en evidencia la urgente necesidad de investigar más a fondo aspectos relacionados con la biología celular y molecular del CG, su inicio, promoción y progresión, y así identificar posibles biomarcadores (diagnósticos, pronósticos o predictivos de respuesta a terapia) y/o blancos terapéuticos que, eventualmente, permitan mejorar las estrategias terapéuticas actuales.

En la última década, la aplicación clínica de BPCI como tratamiento de cáncer ha demostrado ser una estrategia exitosa y muy promisoría. Esto porque confiere un aumento significativo en la supervivencia de los pacientes en varios tipos de cáncer, entre ellos el CG. No obstante, la eficacia de estas terapias varía ampliamente entre pacientes. Esto se atribuye a que la respuesta a los BPCI depende de muchos factores, no únicamente a la alta expresión de PCI en células tumorales, como se planteó en un inicio. Existe un número creciente de estudios que proponen otros biomarcadores; sin embargo, aunque algunos muestran resultados significativos, ninguno es suficiente como factor predictivo. A la fecha, no se ha descrito un algoritmo ideal que permita discernir adecuadamente entre los pacientes que pueden obtener un beneficio clínico de los BPCI y los que no, lo cual se pone en manifiesto la inminente necesidad de realizar estudios que se enfoquen en la búsqueda de novedosos biomarcadores predictivos de estas terapias.

Dada la importancia que tiene la infección por *H. pylori* en el inicio de la carcinogénesis del ACG, es de suma importancia definir el posible efecto que tiene la bacteria sobre la expresión de PCI y otras moléculas inmunorreguladoras. Existen más de 40 moléculas inmunorreguladoras que han sido estudiadas en mayor o menor medida en cáncer u otras condiciones, no obstante, son muy pocas las investigaciones que reportan la relación entre la infección por *H. pylori* y la expresión de estas moléculas. En este contexto se llevó a cabo el presente proyecto, cuyo fin era determinar si la infección por *H. pylori* modula la expresión de moléculas inmunorreguladoras. Para esto, se trabajó principalmente con un sistema de cultivo *in vitro*, y se complementó con algunos experimentos en un modelo murino y material biológico humano.

## **Pregunta e Hipótesis**

### **Pregunta**

¿Cuál es el efecto de la infección por *Helicobacter pylori* en la expresión de moléculas inmunorreguladoras en modelos *in vitro* e *in vivo*?

## Hipótesis

La infección por *Helicobacter pylori* aumenta la expresión de algunas moléculas inmunorreguladoras en modelos *in vitro* e *in vivo*.

## Objetivo general

Identificar el efecto de la infección por *Helicobacter pylori* sobre la expresión de moléculas inmunorreguladoras en modelos *in vitro* e *in vivo*.

## Objetivos específicos

1. Determinar las moléculas inmunorreguladoras que son expresadas diferencialmente en líneas celulares de CG humanas en presencia de *H. pylori*.
2. Evaluar la influencia de los principales factores de virulencia de *H. pylori* sobre la expresión de moléculas inmunorreguladoras en líneas celulares de CG humanas.
3. Cuantificar el número de células que expresan algunas de las moléculas inmunorreguladoras que fueron expresadas diferencialmente en el sistema de cultivo *in vitro* y sus receptores en la mucosa gástrica murina infectada por *H. pylori*.
4. Comparar la expresión génica de las moléculas inmunorreguladoras que fueron expresadas diferencialmente en el sistema de cultivo *in vitro* y sus receptores en tejido tumoral y tejido no tumoral adyacente de pacientes con ACG.

## Materiales y métodos

### Cepas de *H. pylori* y condiciones de cultivo bacteriano

Se utilizaron las siguientes cepas de *H. pylori*:

- **7.13 o B128 silvestre (WT, *wild type*)**: derivada de un pasaje en roedores de la cepa B128, la cual fue aislada de un paciente con úlcera gástrica y proviene del laboratorio de Richard Peek (Universidad de Vanderbilt, Nashville, Tennessee, EUA) (197,198).

- **P12 silvestre (WT, *wild type*)**: aislada de un paciente con úlcera duodenal, proviene del laboratorio de Rainer Haas (Universidad Ludwig-Maximilians, Pettenkoferstr, München, Alemania) (199).
- **P12  $\Delta$ CagPAI**: obtenida por transformación secuencial de plásmidos a partir de la cepa WT, proviene del laboratorio de Rainer Haas (Universidad Ludwig-Maximilians, Pettenkoferstr, München, Alemania) (199).
- **SSI (WT, *wild type*)**: aislada de pacientes con síntomas dispépticos de una clínica de gastroenterología de Sydney, Australia, y adaptada a ratón (donada por el Dr. James Fox, Massachusetts Institute Technology, Cambridge, EUA) (200,201).

Estas cepas se encuentran almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y fueron cultivadas a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera microaerofílica (5%  $\text{O}_2$ , 10%  $\text{CO}_2$  y 85%  $\text{N}_2$ ) en Agar Anaerobio de Wilkins-Chalgren (Oxoid) suplementado con eritrocitos humanos, vancomicina, trimetoprima, cefsulodina y anfotericina B. Para los co-cultivos *in vitro* se prepararon suspensiones a partir de cultivos de menos de 24 horas en solución salina estéril con una  $\text{OD}_{600}$  de 0.95-1.1. Para confirmar la morfología, movilidad y vitalidad de *H. pylori*, las suspensiones se observaron a 100X al fresco y se les realizó la prueba de ureasa con rojo de fenol.

### **Líneas celulares de cáncer gástrico y condiciones de cultivo celular**

Se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- MKN74: línea epitelial gástrica humana derivada de un tumor gástrico secundario de tipo intestinal, E-cadherina positivo.
- MKN45: línea epitelial gástrica humana derivada de un tumor gástrico secundario de tipo difuso, E-cadherina negativo.

Estas se encuentran almacenadas en nitrógeno líquido y fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (penicilina, estreptomina y ciprofloxacina), a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera humidificada con  $\text{CO}_2$  al 5%.

## **Condiciones de co-cultivos de líneas celulares de cáncer gástrico y *H. pylori***

Los co-cultivos se realizaron a un MOI de 50 en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con antibióticos (vancomicina) por diferentes intervalos de tiempo, a 37°C en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5%. En todos los experimentos cada condición se montó por triplicado.

## **Muestras gástricas humanas**

Las muestras gástricas humanas de tejido tumoral y no tumoral adyacente fueron recolectadas por los médicos especialistas del Servicio de Cirugía del Hospital Max Peralta de manera post-operatoria a partir del tejido resecado de 14 pacientes mayores de 18 años con ACG (esta es la cantidad de pacientes para los que se había recolectado material hasta el momento). Las muestras de tejido fresco de aproximadamente 0.5 cm<sup>3</sup> se colocaron en un microvial con 800 µL de la solución de RNAlater (Thermo Scientific), se mantuvieron fríos (4°C) durante el transporte y se almacenaron a -80°C hasta su extracción.

Para la recolección y utilización de estas muestras se tramitó la aprobación por parte del Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica (Anexo 3), el Comité Ético Científico Central de la Caja Costarricense del Seguro Social (Anexo 4) y el Consejo Nacional de Investigación en Salud (Anexo 5).

## **Extracción de ARN**

El ARN de los co-cultivos y las muestras gástricas humanas se extrajo utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante, se cuantificaron por su absorbancia a 260nm (Nanodrop) y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

## **Retrotranscripción**

La síntesis de ADNc a partir del ARN extraído se realizó con el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) según las indicaciones del fabricante.

## PCR cuantitativa

Las PCRs cuantitativas (qPCR) se realizaron con el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) según las indicaciones del fabricante, con cebadores (*primers*) específicos para las moléculas inmunorreguladoras de interés diseñados con la plataforma en línea Primer-BLAST (Cuadro 1) a 0.3 mM. La expresión relativa con respecto a la condición control (células no infectadas y tejido no tumoral adyacente, en el modelo *in vitro* y en las muestras de tejido gástrico humano, respectivamente) se calculó usando el método comparativo  $\Delta\Delta C_t$ . Para la normalización de los datos se utilizaron los genes de referencia (*housekeeping genes*) *HRPT1* para la línea celular MKN74, *RPS20* para la línea celular MKN45 y *HPRT1* para las muestras de tejido gástrico humano. Estos genes fueron elegidos por tener un valor de estabilidad aceptable mediante el análisis con el software NormFinder, por lo que para la interpretación de resultados se asume que tienen una expresión constante.

**Cuadro 1.** Secuencia de los cebadores

Gen	Proteína	Cebador hacia adelante	Cebador reverso
<i>BTLA</i>	BTLA	TGGGTCATACCGCTGTTCTGCA	CTGCTTGCCATTTTCGTCCTTGG
<i>CD276</i>	B7-H3	CTGGCTTTCGTGTGCTGGAGAA	GCTGTCAGAGTGTTCAGAGGC
<i>HPRT1</i>	HPRT1	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
<i>ICOS</i>	ICOS	CCCATAGGATGTGCAGCCTTTG	GGCTGTGTTCCTGCTCTCATG
<i>ICOSLG</i>	ICOSL	GTTTCACTGCCTGGTGTGAGC	ACGACGGGCACGCTGAAGTTTG
<i>LGALS3</i>	Gal-3	CCATCTTCTGGACAGCCAAGTG	TATCAGCATGCGAGGCACCACT
<i>LGALS9</i>	Gal-9	ACACCCAGATCGACAACCTCTG	CAAACAGGTGCTGACCATCCAC
<i>RPS20</i>	RPS20	AGGACCAGTTCGAATGCCTACC	CTCATCTGGAACGATCCCACG
<i>PDCDI</i>	PD-1	AAGGCGCAGATCAAAGAGAGCC	CAACCACCAGGGTTTGGAACTG
<i>PDCD1L1</i>	PD-L1	TGCCGACTACAAGCGAATTACTG	CTGCTTGTCAGATGACTTCGG
<i>PVR</i>	PVR	CACTGTCACCAGCCTCTGGATA	TCATAGCCAGAGATGGATACCTC
<i>TIGIT</i>	TIGIT	TGGTGGTCATCTGCACAGCAGT	TTTCTCTGAGGTCACCTTCCAC
<i>TNFRSF9</i>	TNFRSF9	TCTTCCTCACGCTCCGTTTCTC	TGGAAATCGGCAGCTACAGCCA
<i>TNFRSF14</i>	TNFRSF14	TTCTCTCAGGGAGCCTCGTCAT	CTCACCTTCTGCCTCTGTCTT

## Tejidos gástricos murinos parafinados

Los tejidos gástricos murinos parafinados fueron donados por el Instituto Finsen del Hospital Universitario de Copenhague, Dinamarca como parte del proyecto de postdoctorado del PhD. Warner Alpízar, en el cual se obtuvo aprobación para el manejo y uso experimental de los animales del “Animal Experiments Inspectorate” (número de permiso: 2010/561-1394) del Instituto Finsen del Hospital Universitario de Copenhague. Para la utilización de los tejidos previamente parafinados en este proyecto, se tramitó el permiso ante el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de la Universidad de Costa Rica (Anexo 6). A continuación, se describirán los procedimientos que se realizaron en Dinamarca para la obtención de estos tejidos.

Se adquirieron ratones C57BL/6 hembra libres de patógenos de cinco a seis semanas de edad de Taconic (Silkeborg, Dinamarca) y se alojaron en condiciones específicas libres de patógenos (incluidos *H. pylori* y otras especies del género *Helicobacter*) en el bioterio del Departamento de Medicina Experimental, Universidad de Copenhague, con comida esterilizada en autoclave (Laboratory Autoclavable Rodent Diet 5010, LabDiet) y agua *ad libitum*. Cabe destacar que el bioterio tiene un programa de monitoreo exhaustivo para verificar si hay patógenos. Para los experimentos, se eligieron ratones entre 6 y 8 semanas de edad y se trasladaron a una sección experimental.

La cepa SS1 (adaptada a ratón) de *H. pylori* se cultivó en placas de agar chocolate a 37°C en condiciones microaerofílicas (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 85% N<sub>2</sub>). Cuarenta y ocho horas después del primer subcultivo, se suspendió en medio NaCl al 0,85% (p/v) (bioMérieux) y se ajustó a un estándar de turbidez McFarland de 3 (10<sup>8</sup> UFC/mL). Se inoculó a los ratones una dosis única de aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC en 0,2 mL de NaCl al 0,85% por sonda oral (agujas desechables para alimentación animal de 20 G y 3,8 cm, Fisher Scientific). Los ratones de control recibieron 0,2 mL de solución salina. Posterior a la inoculación, los ratones se mantuvieron en grupos de 3 ratones por 3, 6, 10, 14, 20, 25 y 30 semanas.

Para el aislamiento del tejido gástrico, los ratones se anestesiaron inicialmente mediante inyección i.p. de 0,1 mL/10 g de una mezcla 1:1 de Dormicum (Midazolam 5 mg/mL) e



Hypnorm (Fluanison 5 mg/mL y Fentanyl 0,1 mg/mL), y posteriormente perfundido con PBS frío, seguido de perfusión con 4% de paraformaldehído en PBS. Los estómagos resecaados se abrieron a lo largo de la curvatura mayor, se lavaron con PBS y se cortaron longitudinalmente en cuatro franjas, que se extendían desde el ante-estómago escamoso hasta el duodeno. Estas tiras se fijaron durante la noche en paraformaldehído al 4% y se embebieron en parafina.

### **Inmunohistoquímica**

A partir del tejido parafinado murino se realizaron cortes histológicos de 4  $\mu$ m con portaobjetos cargados, los cuales se desparafinaron en xileno y se hidrataron en una serie gradual de diluciones de etanol y agua. Los cortes se pretrataron en un procesador de microondas a 98°C durante 15 minutos en una solución buffer de pH 9,0 (Tris 10 mM, EGTA 0.5 mM). Posteriormente, la actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó mediante incubación en solución de peróxido de hidrógeno al 1% durante 15 minutos. Adicionalmente, para las tinciones de PD-1 se bloqueó con albúmina sérica bovina al 5% durante 30 minutos. Seguidamente, se agregó el anticuerpo primario (PD-1, Abcam, ab214421, IgG de conejo, diluido 1:1600; PD-L1, R&D Systems, AF1019, IgG de cabra, diluido 1:400) y se incubó a 4°C durante la noche. Al día siguiente, se agregó el anticuerpo secundario para la tinción de PD-L1 (Anti-IgG de cabra, R&D Systems, BAF017, IgG de conejo, diluido 1:200) y se incubó 45 minutos a temperatura ambiente. La detección para ambas tinciones (PD-1 y PD-L1) se realizó con anti-IgG de conejo conjugados con polímeros fusionados con peroxidasa de rábano picante (Dako, EnVision K4002) incubado por 45 minutos a temperatura ambiente. Cada paso de incubación fue seguido por lavados en TBS que contenía Triton X-100 al 0,5% (v/v). Finalmente, las reacciones se visualizaron incubando las secciones con el sustrato cromogénico DAB (Dako) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y contrateñidas con hematoxilina de Mayer. Para el conteo de las células inmunológicas positivas, se seleccionaron dos campos con un aumento de 20X en la región anatómica del cuerpo de la mucosa y submucosa gástrica donde se observó el mayor número de células positivas.

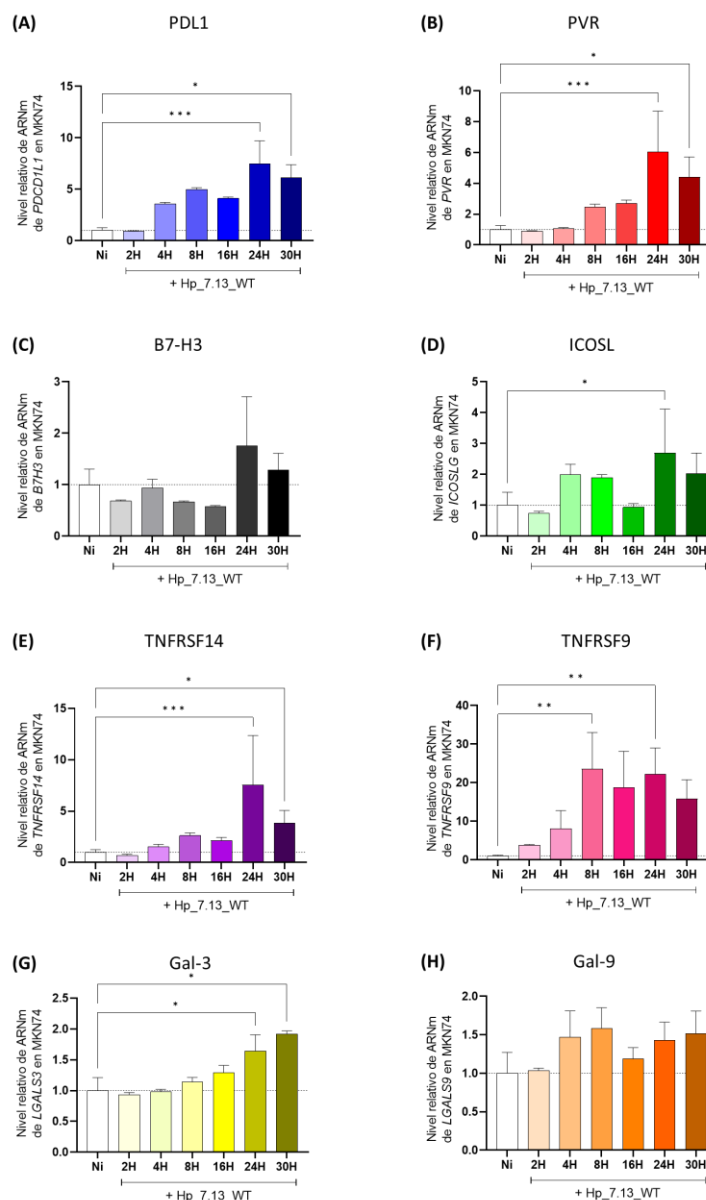
## **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se ejecutaron en GraphPadPrism 7.02 (EUA). Se realizó la prueba H de Kruskal-Wallis para comparar varios grupos con la prueba de Dunn para comparaciones múltiples entre cada grupo experimental y el grupo control. Se realizó la prueba de Mann-Whitney para comparar dos grupos. Se estableció una relación significativa cuando  $p < 0.05$ .

## **Resultados**

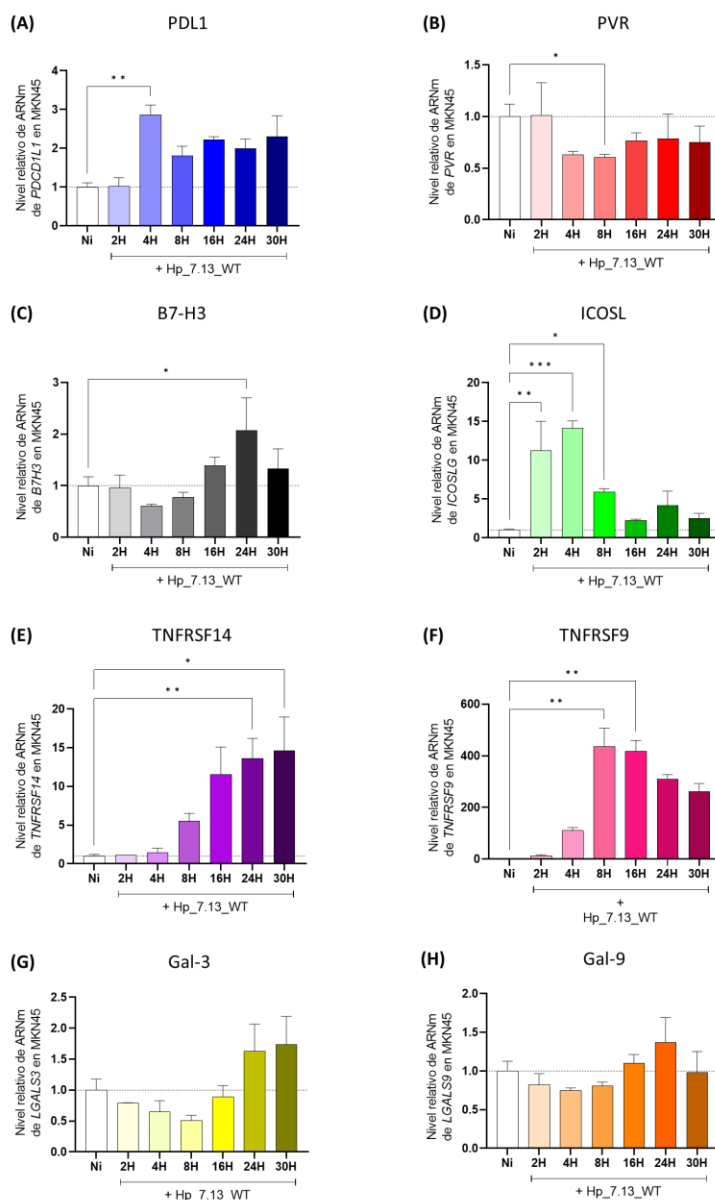
### ***H. pylori* induce la expresión génica de moléculas inmunorreguladoras en líneas celulares de cáncer gástrico**

Las líneas celulares de CG MKN74 y MKN45 se cultivaron en presencia de la cepa 7.13 de *H. pylori* (fenotipo silvestre) por diferentes intervalos para evaluar la expresión génica de las siguientes moléculas inmunorreguladoras: PD-L1, PVR, B7-H3, ICOSLG, TNFRSF14, TNFRSF9, Gal-3 y Gal-9. En ambas líneas celulares, se observó un aumento de varias de estas moléculas al exponerse a la bacteria aunque con una cinética algo distinta (Figuras 2 y 3). En la línea celular MKN74 hubo aumentos significativos en la expresión génica de la mayoría de las moléculas analizadas (PD-L1, PVR, ICOSL, TNFRSF14, TNFRSF9 y Gal-3) a las 24 horas post-exposición (hpe), mientras que en la línea celular MKN45 aumentaron significativamente dos (B7-H3 y TNFRSF14) a las 24 hpe. Adicionalmente, en la línea celular MKN45 hubo un aumento significativo más temprano de dos moléculas inmunorreguladoras: PD-L1 a las 4 hpe y ICOSL a las 2 hpe. Además, en ambas líneas celulares, TNFRSF9 tuvo un pico de expresión a las 8 hpe. En síntesis, la cepa silvestre 7.13 de *H. pylori* induce la expresión génica de la mayoría de las moléculas inmunorreguladoras aquí analizadas en las líneas celulares MKN74 y MKN45.



**Figura 2.** Expresión génica de moléculas inmunorreguladoras en la línea celular MKN74.

Niveles relativos de ARNm de (A) PD-L1 (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p=0.0008$ ), (B) PVR (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p=0.0012$ ), (C) B7-H3 (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p=0.0039$ ), (D) ICOSL (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p=0.0086$ ), (E) TNFRSF14 (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p=0.0008$ ), (F) TNFRSF9 (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p=0.0027$ ), (G) Gal-3 (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p=0.0024$ ) y (H) Gal-9 (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p=0.0643$ ) en células expuestas a *H. pylori* 7.13WT por diferentes intervalos de tiempo en comparación con células no expuestas. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$

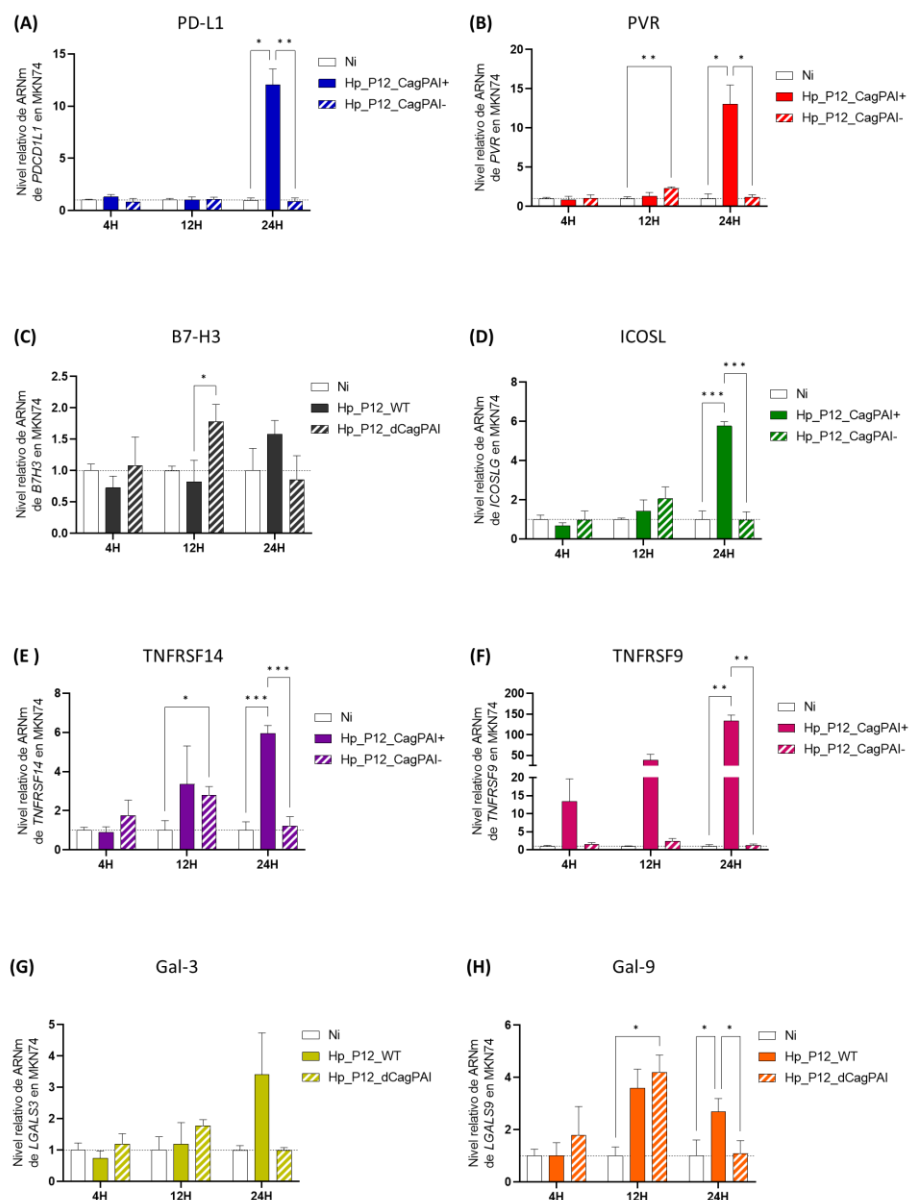


**Figura 3.** Expresión génica de moléculas inmunorreguladoras en la línea celular MKN45.

Niveles relativos de ARNm de (A) PD-L1 (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p=0.0064$ ), (B) PVR (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p=0.0409$ ), (C) B7-H3 (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p=0.0013$ ), (D) ICOSL (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p=0.0006$ ), (E) TNFRSF14 (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p=0.0044$ ), (F) TNFRSF9 (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p=0.0017$ ), (G) Gal-3 (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p=0.0031$ ) y (H) Gal-9 (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p=0.0139$ ) en células expuestas a *H. pylori* 7.13WT por diferentes intervalos de tiempo en comparación con células no expuestas. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$

## **La sobreexpresión génica de moléculas inmunorreguladoras inducida por *H. pylori* es dependiente de CagPAI**

Como ya se mencionó, las cepas de *H. pylori* que portan la región CagPAI son consideradas más patogénicas y están relacionadas con un mayor riesgo de CG, comparado con cepas negativas para esta región génica (23,24). Para evaluar si CagPAI tiene relevancia o no en la inducción de las moléculas inmunorreguladoras analizadas, se expuso la línea celular de CG MKN74 a las cepas P12 WT y P12  $\Delta$ CagPAI (deficiente de CagPAI) por intervalos de tiempo seleccionados a partir de los experimentos anteriores (*i.e.* 4, 12 y 24 hpe) y se midieron los niveles relativos de ARNm. Al igual que con la cepa 7.13 WT, la expresión de PD-L1, PVR, ICOSL, TNFRSF14, TNFRSF9 y Gal-9 aumentó significativamente en la línea celular MKN74 a las 24 hpe en presencia de la cepa P12WT. Por el contrario, en las células expuestas a la cepa P12 mutante, que carece de CagPAI, la expresión génica de estas moléculas fue similar que en las células control (no infectadas) (Figura 4). A las 12 hpe, la expresión de algunas de estas moléculas inmunorreguladoras sí fue inducida de manera significativa por la cepa mutante, pero en todos los casos esta inducción fue leve y no sostenida en el tiempo, pues regresó a niveles basales a las 24 hpe. Entonces, según estos resultados, la inducción de las moléculas inmunorreguladoras analizadas en esta investigación por parte de *H. pylori* es dependiente de CagPAI.

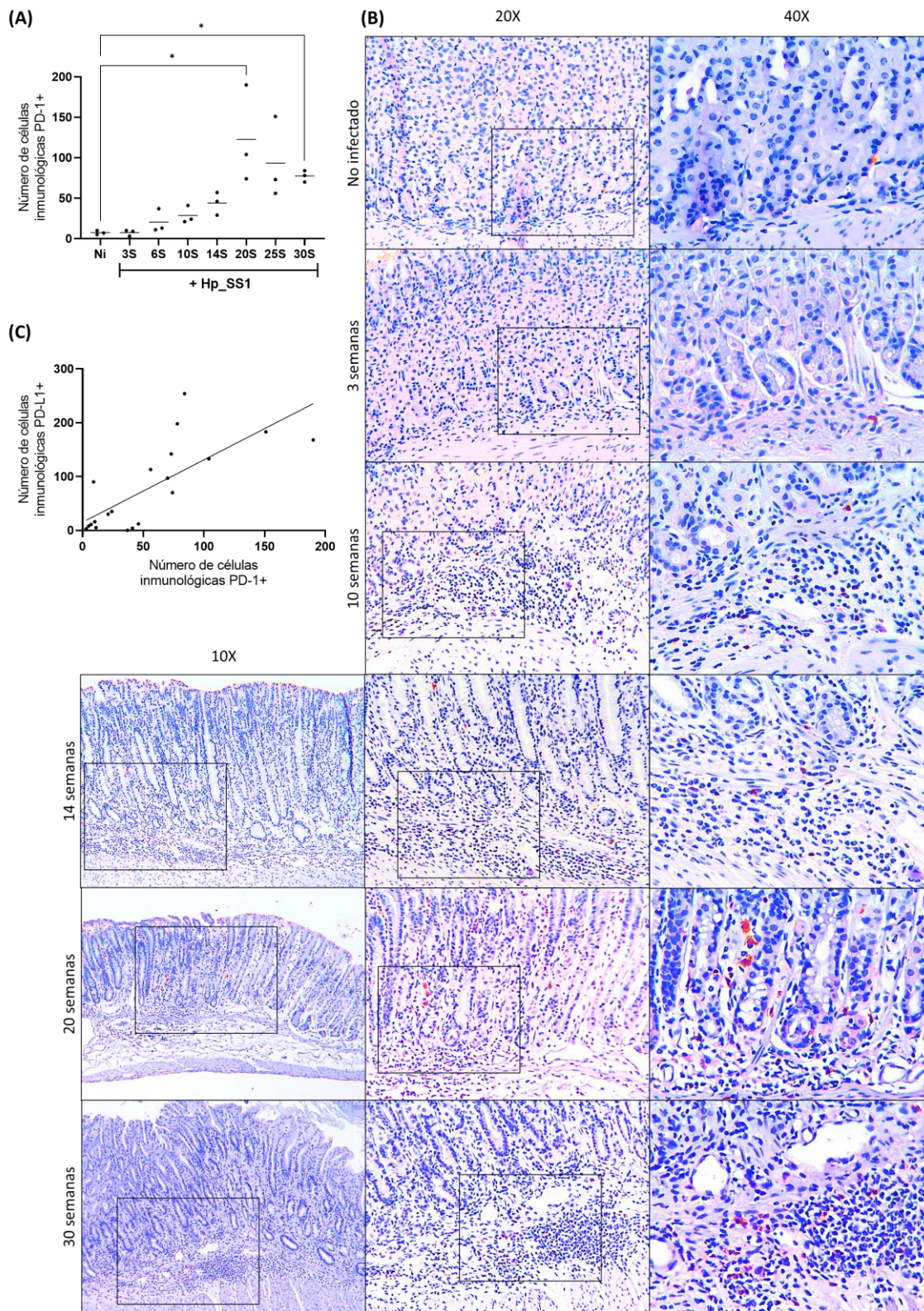


**Figura 4.** Expresión génica de moléculas inmunorreguladoras en la línea celular MKN74 al exponerse a cepa mutante de *H. pylori*.

Niveles relativos de ARNm de (A) PD-L1 (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p < 0.0001$ ), (B) PVR (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p < 0.0001$ ), (C) B7-H3 (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p = 0.0004$ ), (D) ICOSL (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p < 0.0001$ ), (E) TNFRSF14 (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p = 0.0001$ ), (F) TNFRSF9 (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p < 0.0001$ ), (G) Gal-3 (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p < 0.0001$ ) y (H) Gal-9 (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p < 0.0001$ ) en la línea celular MKN74 expuesta a *H. pylori* P12WT y P12 $\Delta$ CagPAI por diferentes intervalos de tiempo en comparación con células no expuestas. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

### ***H. pylori* induce la infiltración de células inmunológicas positivas para PD-1 y PD-L1 en la mucosa y submucosa gástrica murina**

Para confirmar los hallazgos obtenidos en el sistema de cultivo *in vitro* y evaluar la cinética de expresión, se realizaron tinciones de inmunohistoquímica en tejidos gástricos murinos infectados con *H. pylori* durante diferentes intervalos para algunas de las moléculas inmunorreguladoras, y sus receptores; específicamente, para aquellas con expresión más elevada y para los cuales se contaba con anticuerpos primarios para esta metodología. Es importante mencionar que, en estos mismos bloques de tejido, se había demostrado previamente que la inoculación con *H. pylori* de los ratones provoca la infiltración de células inmunitarias en la mucosa y submucosa, lo cual se ve exacerbado con el tiempo de infección (202). Primero, se estudió el eje PD-1/PD-L1. Se determinó que el número de células inmunológicas positivas para PD-1 que infiltran la mucosa y submucosa gástrica aumenta en función del tiempo post-inoculación de los ratones (Figura 5A y 5B). En paralelo, en el marco de un trabajo final de graduación, se realizaron tinciones contra PD-L1 y se encontró la misma tendencia: una mayor cantidad de células inmunológicas positivas para PD-L1 infiltrando la mucosa y submucosa en función del tiempo post-inoculación (Anexo 2). Estos resultados, en conjunto, indican que: 1) la inflamación crónica desencadenada por *H. pylori* induce la expresión de PD-1 y su ligando en las células inmunológicas que infiltran la mucosa y submucosa gástrica murina, y 2) que el grado de infiltración con células positivas para el eje PD-1/PD-L1 aumenta con el tiempo post-inoculación. Dado que la cinética de expresión de PD-1 y PD-L1 eran concordantes, se procedió a determinar la posible correlación de ambos y, efectivamente, se encontró una correlación significativa entre la cantidad de células inmunológicas positivas para PD-1 y PD-L1 que infiltran la mucosa y submucosa gástrica murina (Figura 5C).





**Figura 5.** Expresión proteica de PD-1 en la mucosa y submucosa gástrica murina en ratones colonizados con *H. pylori*.

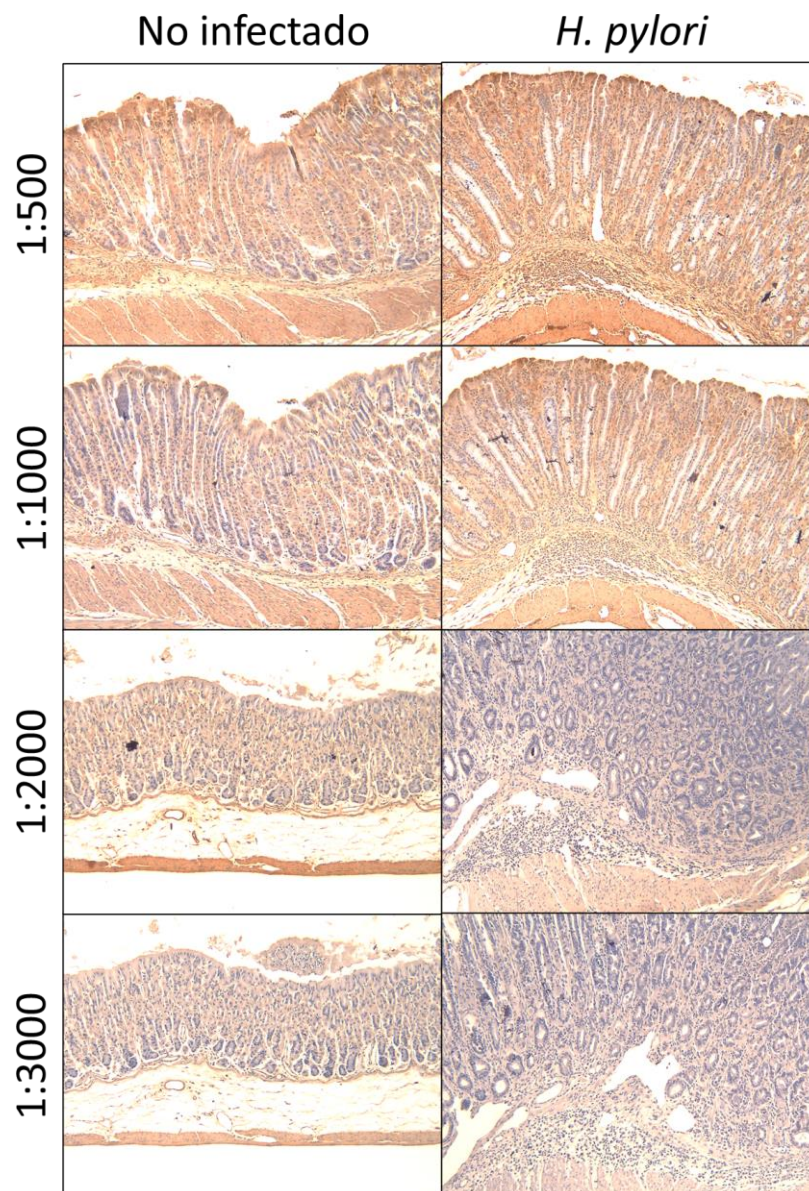
(A) Cuantificación del número de células PD-1 positivas en mucosa y submucosa gástrica murina a las 3, 6, 10, 14, 20, 25 y 30 semanas post-inoculación con la cepa SS1 de *H. pylori* (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p=0.0040$ ;  $*p<0.05$ ). (B) Tinciones de inmunohistoquímica para PD-1 en mucosa y submucosa gástrica murina a las 3, 10, 14, 20 y 30 semanas post-inoculación de la cepa SS1 de *H. pylori*. Los cuadros en las microfotografías corresponden a las regiones ampliadas en las microfotografías que se muestran al lado derecho. (C) Regresión lineal simple entre el número de células inmunológicas positivas para PD-1 y el número de células inmunológicas positivas para PD-L1 en la mucosa y submucosa gástrica murina ( $p=0.0002$ ;  $R^2=0.5539$ ).

También, se intentó analizar la expresión proteica de TNFRSF14 y PVR en tejidos gástricos murinos infectados con *H. pylori*, dado que se encontraron anticuerpos primarios comercialmente disponibles para los cuales había alguna indicación de que podían ser usados para inmunohistoquímica en tejido parafinado. Se adquirieron, entonces, los anticuerpos primarios para TNFRSF14 (Abcam, ab47677) y PVR (Abcam, ab233102); sin embargo, tras múltiples intentos no se logró estandarizar las tinciones para estos. Se probaron diferentes tipos de recuperación antigénica: solución buffer de pH 9,0 (Tris 10 mM, EGTA 0.5 mM) a 98°C, solución buffer de pH 6,0 (Citrato de sodio 10mM) a 98°C y Proteinasa K a 37°C con diferentes tiempos de incubación. Esto se combinó con variaciones en la dilución del anticuerpo primario (para TNFRSF14 se probaron diluciones desde 1:500 hasta 1:3000 y para PVR entre 1:200 y 1:1500).

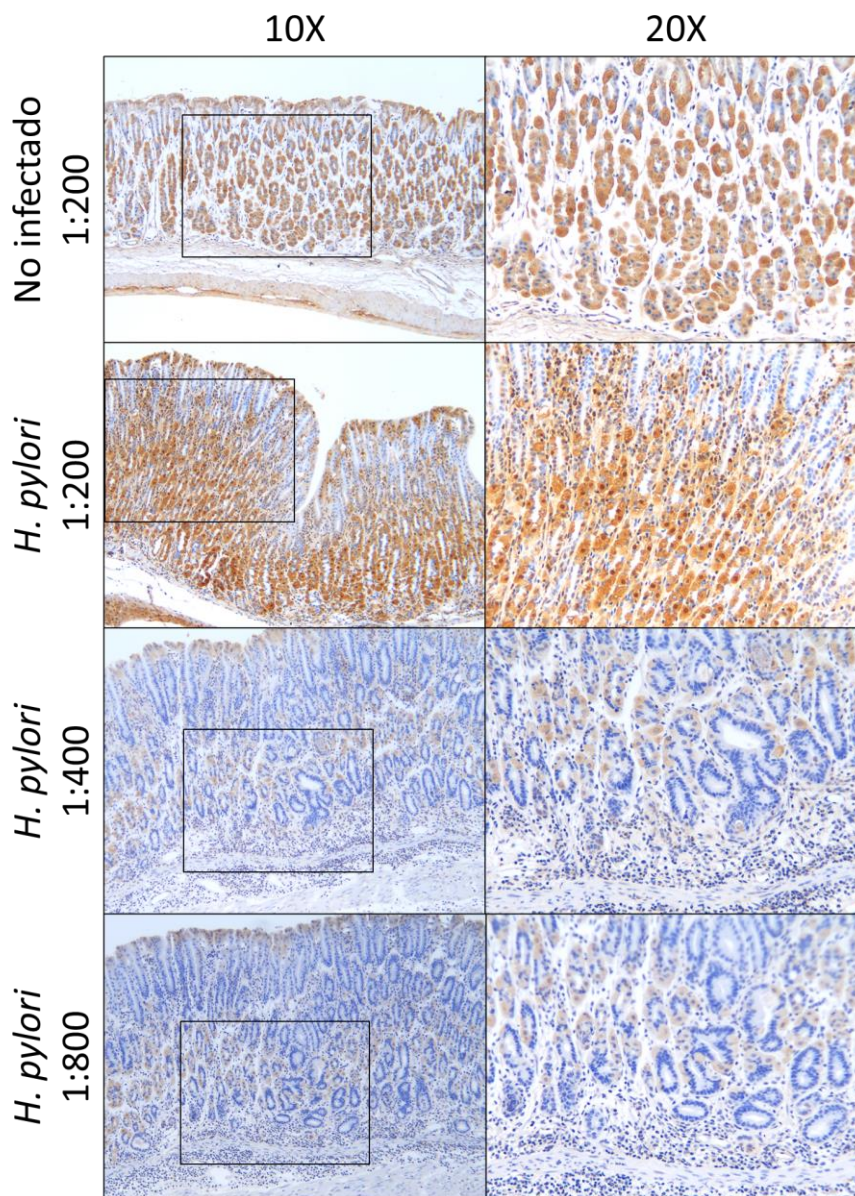
En el caso de TNFRSF14 (Figura 6), se obtuvo una tinción prácticamente homogénea del tejido, cuya intensidad disminuye al disminuir la concentración del anticuerpo primario, pero sin diferencias evidentes (no convincentes de su especificidad) entre las diferentes células que conforman la mucosa gástrica, tampoco entre tejido infectado y no infectado.

En el caso de PVR (Figura 7), aunque lejos de ser convincente, la tinción sugiere que esta molécula podría ser expresada en las células parietales de la mucosa gástrica, así como en células inmunológicas infiltrantes ante la infección por *H. pylori*. Es, sin embargo, muy cuestionable que siendo PVR una proteína de membrana se haya observado una tinción muy intensa en el núcleo de las células parietales cuando se utilizan altas concentraciones del anticuerpo (1:200), lo cual dejaba de observarse al diluir más el anticuerpo. De hecho, al usar menor concentración de anticuerpo también se perdía por completo la tinción en las células inmunológicas.

En síntesis, tras un largo proceso de optimización, los anticuerpos adquiridos para realizar las tinciones inmunohistoquímicas para TNFRSF14 y PVR no demostraron ser lo suficientemente específicos para llevar a cabo estudios avocados a comprender el patrón y la cinética de expresión de estos dos inmunorreguladores en tejido gástrico murino.



**Figura 6.** Tinciones de inmunohistoquímica con diferentes diluciones del anticuerpo primario anti-TNFRSF14 en mucosa gástrica murina infectada y no infectada por la cepa SS1 de *H. pylori* a un aumento de 10X.

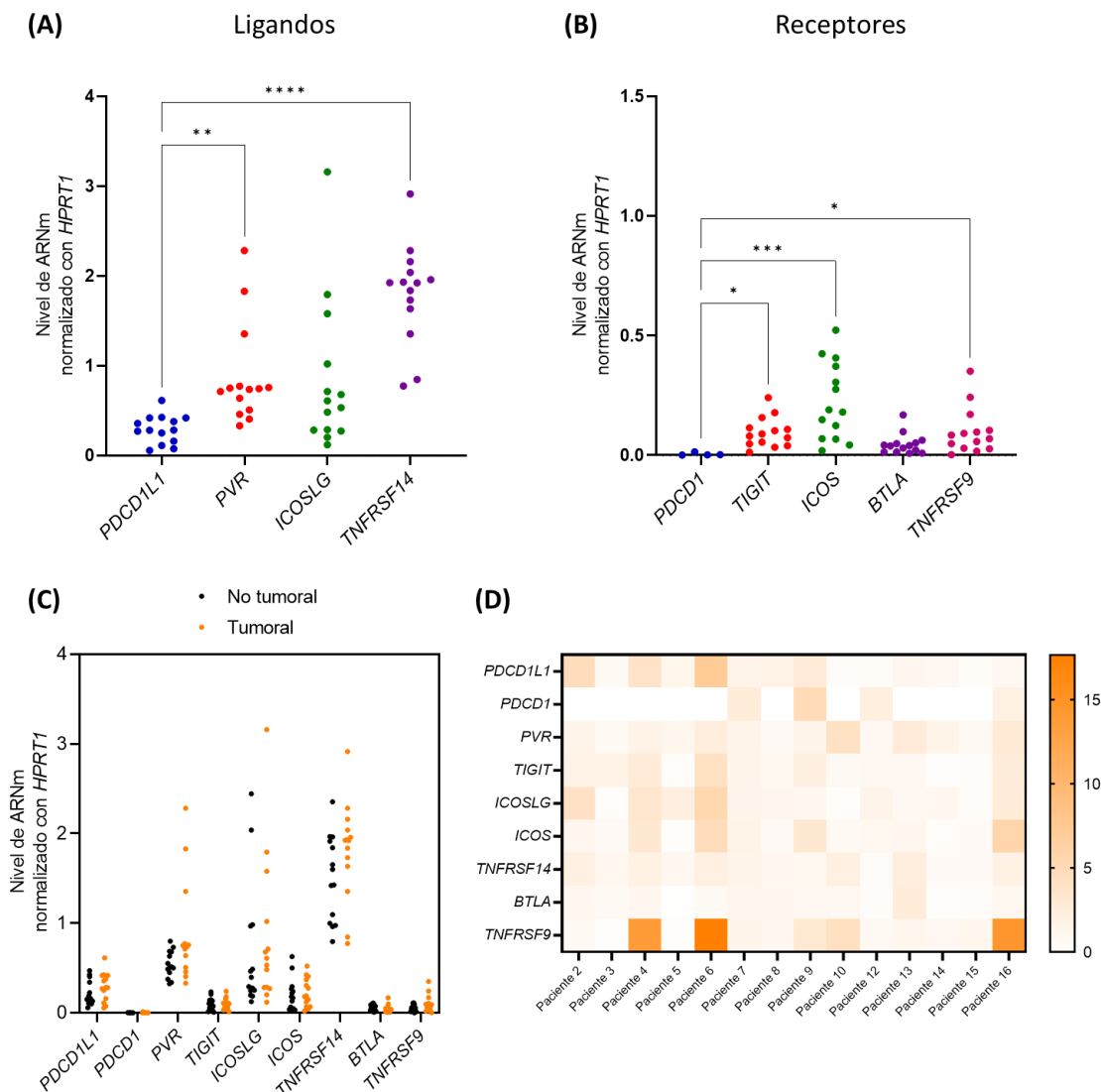


**Figura 7.** Tinciones de inmunohistoquímica con diferentes diluciones del anticuerpo primario anti-PVR en mucosa gástrica murina infectada y no infectada por la cepa SS1 de *H. pylori*. Los cuadros en las microfotografías corresponden a las regiones ampliadas en las microfotografías que se muestran al lado derecho.

**Los ejes PVR/TIGIT, ICOSL/ICOS, TNFRSF14/BTLA y TNFRSF9/TNFSF9 tienen una mayor expresión génica que el eje PD-L1/PD-1 en adenocarcinomas gástricos humanos**

Para determinar si las moléculas inmunorreguladoras con mayor sobreexpresión en presencia de *H. pylori* en el modelo *in vitro* son expresadas en el microambiente tumoral del CG en humanos, se midieron los niveles de ARNm normalizando con *HPRT1* (*housekeeping gene*). Para esto, se trabajó con el ARN aislado del tejido gástrico tumoral de 14 pacientes, en los cuales se determinó que los niveles de ARNm de los ligandos PVR, ICOSL y TNFRSF14 tienden a ser mayores que los de PD-L1, y en el caso de PVR y TNFRSF14 la diferencia es estadísticamente significativa (Figura 8A). Asimismo, en el caso de los receptores, los niveles de ARNm de TIGIT, ICOS, BTLA y TNFRSF9 tienden a ser más altos en comparación con PD-1, con significancia estadística para TIGIT, ICOS y TNFRSF9 (Figura 8B). Estos resultados apuntan a que los ejes PVR/TIGIT, ICOSL/ICOS, TNFRSF14/BTLA y TNFSF9/TNFRSF9 tienen una mayor expresión génica que el eje PD-L1/PD-1 en CG.

Al comparar los niveles de ARNm normalizado con *HPRT1* entre tejido tumoral y tejido no tumoral adyacente al cáncer, no se encontró una diferencia significativa en la expresión de las moléculas inmunorreguladoras (Figura 8C). Al analizar estos datos por paciente en un mapa de calor, graficando los niveles de ARNm normalizado con *HPRT1* en tejido de cáncer relativo a tejido no canceroso adyacente (Figura 8D), es de notar que el patrón de expresión de las moléculas inmunorreguladoras presenta una variabilidad (heterogeneidad) importante entre pacientes. De ese mismo análisis, se desprende que los pacientes con expresión elevada de al menos una molécula inmunorreguladora en tejido canceroso, respecto al no tumoral, generalmente sobreexpresan simultáneamente varias de estas moléculas. Esto es particularmente evidente en los pacientes 4, 6, 9 y 16 (Figura 8D).



**Figura 8.** Expresión génica de moléculas inmunorreguladoras en muestras de pacientes con CG.

(A) Nivel de ARNm de PD-L1, PVR, ICOSL y TNFRSF14 normalizado con HPRT1 en tejido gástrico tumoral (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p < 0.0001$ ;  $**p < 0.01$ ;  $****p < 0.0001$ ). (B) Nivel de ARNm de PD-1, TIGIT, ICOS, BTLA y TNFRSF9 normalizado con HPRT1 en tejido gástrico tumoral (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p < 0.0001$ ;  $*p < 0.05$ ;  $***p < 0.001$ ). (C) Nivel de ARNm de PD-L1 (Prueba de Mann-Whitney con  $p$  ajustado=0.7872), PD-1 (Prueba de Mann-Whitney con  $p$  ajustado=0.8363), PVR (Prueba de Mann-Whitney con  $p$  ajustado=0.2746), TIGIT (Prueba de Mann-Whitney con  $p$  ajustado=0.9820), ICOSL (Prueba de Mann-Whitney con  $p$  ajustado=0.8236), ICOS (Prueba de Mann-Whitney con  $p$  ajustado=0.8363), TNFRSF14 (Prueba de Mann-Whitney con  $p$  ajustado=0.7272), BTLA (Prueba de Mann-Whitney con  $p$  ajustado=0.7872) y TNFRSF9 (Prueba de

Mann-Whitney con p ajustado=0.7272) normalizado con HPRT1 en tejido gástrico tumoral y no tumoral adyacente. (D) Gráfico de calor de los niveles de ARNm de PD-L1, PD-1, PVR, TIGIT, ICOSL, ICOS, TNFRSF14, BTLA y TNFRSF9 normalizados con HPRT1 en tejido gástrico tumoral relativo a tejido no tumoral adyacente.

## Discusión

Los modelos con líneas celulares de CG expuestas a *H. pylori* son ampliamente utilizados para estudiar aspectos muy diversos del papel que juega esta bacteria en la patogénesis del CG. *H. pylori* genera una infección que, en ausencia de tratamiento, persiste por años o incluso de por vida, lo cual se atribuye en parte a la manipulación que ejerce la bacteria sobre las respuestas inmunológicas innatas y adaptativas del hospedero. En esta investigación, se hizo uso de este modelo *in vitro* con el fin de dilucidar si *H. pylori* modula la expresión de un grupo específico de moléculas inmunorreguladoras para las cuales hay poca o nula información en el contexto de la infección por esta bacteria y la carcinogénesis gástrica.

Más específicamente, en este proyecto se determinó el efecto de la infección por *H. pylori* sobre el nivel y la cinética de expresión de inmunorreguladores de carácter co-inhibitorio (*i.e.* PD-1/PD-L1, B7-H3, Gal-3 y Gal-9), co-estimulador (*i.e.* ICOS/ICOSL y TNFRSF9) o con función dual (*i.e.* PVR y TNFRSF14). Las moléculas co-inhibitorias mencionadas son PCI que desencadenan vías de inhibición de Teffs, induciendo su agotamiento, y potencian la función inmunosupresora de Tregs, por lo cual están implicadas en la generación de microambientes tumorales inmunosupresores. Las moléculas co-estimuladoras aquí estudiadas son comúnmente expresadas en respuesta a estímulos inflamatorios y contribuyen a la activación de Teffs y Tregs, siendo estos últimos actores protagónicos en la creación de un microambiente inmunosupresor. Por último, la interacción de PVR y TNFRSF14 con los receptores TIGIT y BTLA, respectivamente, les confiere una actividad co-inhibitoria (como PCI); sin embargo, la interacción de PVR y TNFRSF14 con otros receptores genera señalización co-estimuladora.

Los resultados del presente proyecto revelaron que las cepas silvestres 7.13 y P12 de *H. pylori*, ambas CagPAI+, inducen de manera significativa la expresión génica de varias de las

moléculas inmunorreguladoras en las líneas celulares de CG MKN45 y MKN74. En general, las moléculas cuya función es clásicamente co-inhibitoria fueron sobreexpresadas de manera tardía, cerca de las 24 hpe, mientras que el pico máximo de expresión de las moléculas consideradas clásicamente co-estimuladoras se alcanzó más tempranamente, cerca de las 8 hpe. Esto refleja el comportamiento biológico esperable de estas moléculas: ante un estímulo inmunológico se desencadena una reacción proinflamatoria en la cual es crucial la participación de moléculas co-estimuladoras y, eventualmente, esta reacción es controlada por las moléculas co-inhibitorias (38).

Interesantemente, la inducción de las moléculas con un rol dual también se da de manera tardía, lo cual sugiere que en el contexto de la infección por *H. pylori* cumplen un rol co-inhibidor. Es importante, sin embargo, tener en cuenta que aquí se trabajó con un modelo *in vitro* y que, como ya se mencionó, en el caso de moléculas con función dual, la actividad co-inhibitoria o co-estimuladora depende en gran medida de las interacciones con distintos receptores. En este sentido, el hallazgo obtenido en este sistema de cultivo *in vitro* podría no ser recapitulado en sistemas *in vivo*, dada la complejidad de interacciones que se pueden dar entre los distintos componentes del microambiente tisular.

Otra observación que deriva de los análisis cinéticos de expresión realizados en el sistema de cultivo *in vitro*, es que la expresión de las moléculas co-estimuladoras sobreexpresadas tempranamente no siempre disminuía en las etapas tardías. Lo anterior fue particularmente evidente para TNFRSF9, que aumentó de forma sostenida o mantuvo un nivel alto de expresión a lo largo de los experimentos. A partir de esta observación se podría especular que esta molécula tiene una participación activa y más prolongada en diferentes etapas de la infección por *H. pylori*. Un estudio reciente en 21 tipos de tumores (incluido el CG) demostró que los Tregs TNFRSF9+ son una de las poblaciones de linfocitos T CD4+ infiltrantes con mayor protagonismo en el microambiente tumoral, esto basado en las siguientes variables: la distribución en el tejido, los fenotipos transcripcionales, la proliferación y la expansión clonal (41). Con esto en mente, en un futuro, sería relevante dilucidar *in vivo* cuáles células del microambiente tisular expresan TNFRSF9 en el transcurso de la infección por *H. pylori*.



Al comparar los niveles de expresión génica de las moléculas inmunorreguladoras en las dos líneas celulares de CG (MKN74 y MKN45) expuestas a la cepa silvestre 7.13 de *H. pylori*, se evidencian diferencias en la cinética de expresión de dichas moléculas. Estas líneas celulares fueron escogidas precisamente porque derivan de subtipos histológicos de ACG diferentes, con etiología distinta, y de esta manera nuestro modelo incluye cierta variabilidad genética y molecular inherente en ambas líneas celulares. El hecho de que haya un aumento de expresión significativo de las moléculas inmunorreguladoras en dos líneas celulares diferentes en presencia de *H. pylori* refuerza su posible relevancia e inclina a seguirlas estudiando en el contexto de esta infección.

Un resultado relevante de este estudio fue que la expresión de todas las moléculas inmunorreguladoras analizadas regresó a sus niveles basales cuando las líneas celulares se co-cultivaron con la cepa de *H. pylori* negativa para CagPAI. Varios autores han reportado que la proteína CagA participa de forma activa en la regulación de la respuesta inflamatoria contra *H. pylori* (18), lo cual va en línea con el resultado mencionado. La región génica CagPAI comprende más de 30 genes (24), por lo que un aspecto pendiente de analizar en futuros estudios es si este efecto se debe a que en las cepas deficientes de CagPAI la citotoxina oncogénica CagA no es translocada a las células epiteliales, en este caso las células cultivadas, o si hay otros genes de CagPAI implicados.

A pesar de lo anterior, la mayoría de estas moléculas fueron inducidas de manera leve a 12 hpe con la cepa mutante para CagPAI, en algunos casos a niveles significativamente más altos que la cepa silvestre, aunque en todos los casos la expresión retornó a estados basales a las 24 hpe. Este comportamiento apunta a que otros componentes de la bacteria podrían inducir estas moléculas inmunorreguladoras de manera temporal ante la infección por *H. pylori*. Además, esto concuerda con lo reportado en la literatura en relación con el hecho de que la respuesta inmunológica contra cepas CagPAI positivas es más intensa que contra las cepas CagPAI negativas (203).

A partir de los datos obtenidos en el modelo *in vitro*, se concluye que las moléculas PD-L1, PVR, ICOSL, TNFRSF14 y TNFRSF9 son las que podrían tener una mayor inducción en

respuesta a la infección por *H. pylori*. Es importante destacar que, de estas, únicamente PD-L1 había sido relacionada anteriormente con la bacteria; hasta donde sabemos, no existía ningún estudio sobre las otras cuatro en el contexto de esta infección. Sí se ha visto que la cantidad de Tregs ICOS<sup>+</sup> y de células dendríticas plasmacitoides ICOSL<sup>+</sup> (asociadas al reclutamiento de Tregs ICOS<sup>+</sup> al tejido tumoral (104)) es significativamente mayor en tejido tumoral de pacientes de CG que son positivos para *H. pylori* (100,105). También, se reportó que la erradicación de la bacteria pre-operatoriamente en los pacientes se traduce en una disminución en la densidad de Tregs ICOS<sup>+</sup> infiltrando el tumor (105). Estos grupos de investigación proponen que el tratamiento con antibióticos podría funcionar como un tipo de inmunoterapia que modula el microambiente tumoral inmunológico en CG.

Como se detalló en la introducción de esta tesis, en investigaciones anteriores de otros autores se relacionó B7-H3, Gal-3 y Gal-9 con la infección por *H. pylori*. En nuestro estudio, estas tres moléculas fueron analizadas y se demostró que sí son inducidas en presencia de la bacteria; sin embargo, su inducción fue notablemente menor que para las otras moléculas inmunorreguladoras arriba discutidas. Esto refleja que la inducción de moléculas inmunorreguladora en respuesta a la infección por *H. pylori* es compleja y heterogénea. También, resalta la importancia de analizar la cinética de expresión de varias de estas moléculas paralelamente en el mismo modelo *in vitro*, ya que un análisis global permite comprender mejor las interrelaciones para luego dilucidar cuáles podrían tener mayor relevancia en sistemas *in vivo*. Si bien nuestros resultados no apuntan a que Gal-3 y Gal-9 sean las moléculas inmunorreguladoras más relevantes en el contexto de la infección por *H. pylori*, sus receptores co-inhibidores LAG3 y TIM3, respectivamente, son de los más reconocidos en el microambiente tumoral inmunosupresor de muchos tipos de cáncer, incluido el CG (128,129). Con esto en mente, es importante mencionar que ambos receptores son afines a otros ligandos (no estudiados en este trabajo) que también desencadenan vías supresoras, por lo que sería relevante incluir estos otros ligandos en futuros estudios.

El modelo experimental *in vivo* de carcinogénesis gástrica con ratones C57BL/6 expuestos a la cepa SSI de *H. pylori* permite estudiar la evolución de la infección por esta bacteria en etapas pre-cancerígenas (ya que no desarrollan cáncer). Las primeras lesiones (*i.e.* gastritis)

se observan a partir de las 10 semanas posterior a la inoculación de la bacteria. En este proyecto, este modelo se utilizó para evaluar la expresión proteica, mediante inmunohistoquímica, de las moléculas inmunorreguladoras que, según los resultados del modelo *in vitro*, tienen una mayor expresión ante la infección por *H. pylori*. Además, se pretendía analizar la expresión proteica de los receptores con los que interactúan estas moléculas, ya que, como se detalló anteriormente, está bien descrito que esta interacción es necesaria para ejercer su función inmunorreguladora. Por cuestiones presupuestarias, únicamente se evaluaron las siguientes moléculas: PD-L1, PD-1, PVR y TNFRSF14.

En el modelo animal, se observó una tendencia creciente (y significativa) del número de células inmunológicas positivas para PD-L1 y PD-1 que infiltran la mucosa y submucosa gástrica de los ratones experimentales en función del tiempo de infección por *H. pylori*. Es de notar que a pesar de haber mucha variabilidad intragrupal en los conteos y un bajo número de ratones incluidos en este análisis (n=3) la tendencia es apreciable y significativa. Es de esperar que al aumentar el número de ratones en cada grupo la tendencia observada sea estadísticamente más robusta. Estos resultados concuerdan con los de Aydin *et al.*, quienes reportaron en humanos un aumento de PD-1 y PD-L1 en lesiones pre-cancerígenas que progresan a CG, aunque cabe mencionar que obtuvieron una correlación negativa entre las cepas de *H. pylori* positivas para CagA y la expresión génica de PD-L1 (204), lo cual no concuerda con nuestros resultados obtenidos en el modelo *in vitro*.

Es importante mencionar que a pesar de que la inducción de la expresión proteica de PD-L1 ante la infección por *H. pylori* en el modelo animal se observó mayoritariamente en células inmunológicas, lo cual complementa los resultados de Wu *et al.* que describen la inducción de PD-L1 en macrófagos (205), en algunos ratones también se observó tinción de PD-L1 en células epiteliales gástricas (Anexo 2B). Aunque fueron pocos los ratones en los que se observaron células epiteliales PD-L1 positivas (razón por la cual no se realizó el conteo en dichas células), esta observación es relevante ya que en el microambiente tumoral de CG la expresión de PD-L1 se observa tanto en células inmunológicas como en células tumorales, por lo que la inducción temprana de PD-L1 en células epiteliales gástricas podría ser un factor facilitador de la transformación celular. No obstante, Mommersteeg *et al.* reportaron una baja

expresión de PD-L1 en las células de las glándulas metaplásicas en comparación con las glándulas gástricas normales adyacentes en biopsias humanas (206), lo cual, junto con nuestras observaciones, sugieren que el papel de PD-L1 en etapas pre-cancerígenas es más importante en células inmunológicas del microambiente tisular gástrico que en las células epiteliales en proceso de transformación propiamente.

PD-L1 y PD-1 actúan como ligando y receptor, respectivamente, por lo que su función inhibitoria depende de la presencia de ambas en el mismo microambiente tisular y que puedan interactuar. Al no tener la posibilidad de realizar tinciones dobles para visualizar la localización cercana de las células positivas para PD-L1 y PD-1, se realizó un análisis de correlación lineal simple, el cual evidenció una correlación positiva entre el número de células positivas para ambas moléculas. En otras palabras, conforme aumentan las células positivas para el receptor, también aumentan las células positivas para el ligando. Presumiblemente, estas células podrían estar interactuando en el tejido gástrico de animales infectados por *H. pylori* y, por ende, contribuyendo al establecimiento de un microambiente inmunosupresor. Este análisis además tiene la ventaja de que no es afectado por la variabilidad intragrupal. Sin embargo, aunque se obtuvo una correlación significativa ( $p=0.0002$ ), el bajo  $n$  y la inherente variabilidad interindividual biológica hacen que la correlación tenga un bajo nivel de ajuste ( $R^2=0.5539$ ).

Con respecto a las tinciones de inmunohistoquímica que no se lograron estandarizar, tomando en cuenta que tanto PVR como TNFRSF14 son moléculas con un rol dual en la inmunorregulación y que su función depende del receptor con el que interactúen, se propone que, para un futuro, la estrategia más adecuada para complementar los resultados obtenidos en el modelo *in vitro* utilizando los tejidos parafinados de ratones, sería realizar tinciones de inmunohistoquímica de BTLA y TIGIT, los receptores con función supresora de PVR y TNFRSF14, respectivamente. Esto si se consiguen comercialmente los anticuerpos adecuados. Otra estrategia sería utilizar técnicas alternativas, como el Western Blot o la citometría de flujo, para lo cual habría que repetir los experimentos con nuevos ratones.

El propósito de estudiar moléculas inmunorreguladoras en el contexto de la infección por *H. pylori* es identificar candidatos moleculares que podrían ser importantes en el proceso de carcinogénesis gástrica. A partir de nuestros resultados *in vitro*, PVR, ICOSL, TNFRSF14 y TNFRSF9 resaltan como candidatos potencialmente atractivos para investigar más a fondo en este contexto. Por esto, de forma preliminar, se analizó la expresión génica de estas moléculas, así como de los receptores TIGIT, ICOS y BTLA, en tejido tumoral de 14 pacientes operados por CG que se están recolectando actualmente en el marco del proyecto que engloba a esta tesis. Dicho análisis reveló que la expresión de los ejes PVR/TIGIT, ICOS/ICOSL, TNFRSF14/BTLA y TNFSF9/TNFRSF9 en el tejido tumoral de los pacientes fue mayor que la de PD-L1/PD-1. Este es un resultado particularmente interesante porque sugiere que otras moléculas inmunorreguladoras podrían tener un papel más importante en el microambiente tumoral de CG que PD-L1/PD-1, las cuales en la actualidad cuentan con terapias de bloqueo aprobadas para su uso clínico en varios tipos de cáncer, incluyendo el CG. En un futuro, estas podrían convertirse en nuevos blancos terapéuticos de la inmunoterapia, por lo que el hallazgo preliminar aquí mencionado debe servir de base para estudiar estas moléculas con mayor profundidad, al menos en el contexto de la carcinogénesis gástrica.

Como se detalló en la introducción, muchas de estas moléculas inmunorreguladoras sí habían sido estudiadas en el contexto de CG por otros autores, en donde en general se han relacionado con etapas avanzadas y mal pronóstico. Sin embargo, son muy pocas las investigaciones que han evaluado de forma global y comparado el patrón de expresión para varias de estas moléculas al mismo tiempo, como lo realizamos en este estudio. Cabe mencionar que, al analizar la expresión génica en todo el tejido, no es posible discernir las subpoblaciones celulares que expresan cada molécula, ni en qué medida contribuyen al microambiente. Entonces, es necesario utilizar otras estrategias metodológicas para evaluar la expresión de esas moléculas a nivel proteico, así como la contribución en las distintas subpoblaciones celulares del microambiente, además de aspectos funcionales, mecanísticos y las implicaciones biológicas y clínicas.

Interesantemente, de los cuatro ejes de moléculas inmunorreguladoras que mostraron mayor relevancia en el contexto de la infección por *H. pylori* en los estudios *in vitro* y que además se expresan más que PD-1/PD-L1 en tumores gástricos, ninguno es considerado como un PCI clásico. En el caso de PVR y TNFRSF14, son moléculas cuya función depende del receptor con el que interactúan, mientras ICOS y TNFRSF9 cumplen un rol inmunosupresor porque son moléculas co-estimuladoras de Tregs. Es indiscutible que los BPCI han venido a revolucionar el tratamiento del cáncer, no obstante, hay otras estrategias que permiten la revitalización de la respuesta anti-tumoral a las que se les debería prestar mayor atención. De hecho, en un estudio que realizó secuenciación de ARN de una sola célula de tumores gástricos, no encontraron un *cluster* celular típico de Tex CD8+, los marcadores de agotamiento (como PD-1 y TIGIT) tenían una baja expresión en linfocitos T CD8+ y, por el contrario, encontraron una población significativa de Tregs (207). Esto, junto con el estudio mencionado anteriormente que destacó la población de Tregs TNFRSF9+ como una de las más relevantes en el microambiente tumoral de tumores como el CG (41), sugiere fuertemente que, en el contexto de las inmunoterapias, por lo menos en lo que respecta al CG, se deberían explorar los Tregs y sus moléculas inmunorreguladoras como blanco terapéutico, lo cual hasta el momento no ha sido investigado.

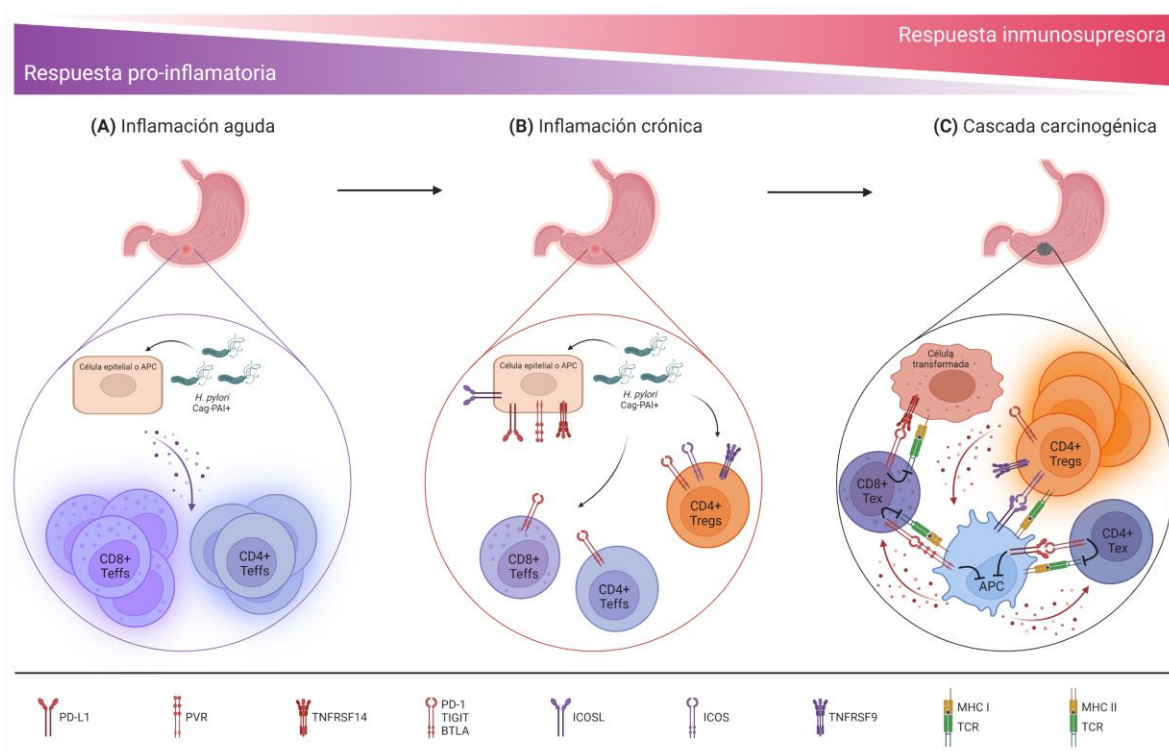
Al comparar la expresión génica de estas moléculas inmunorreguladoras en tejido tumoral con tejido no tumoral adyacente, no se observa una diferencia significativa. Estos resultados pueden deberse a que el tejido no tumoral deriva de una zona adyacente, no tan distante, de la masa tumoral, lo cual implica que podría haber influencia de las subpoblaciones celulares del microambiente tumoral sobre la conformación celular y el patrón de expresión de moléculas inmunorreguladoras en ese tejido gástrico no neoplásico. Además, al ser moléculas que probablemente son inducidas en el tejido adyacente colonizado por *H. pylori*, al menos así se desprende de los análisis *in vitro* realizados en este proyecto, la expresión en tejido tumoral y no tumoral adyacente podría ser similar. De hecho, de los 14 pacientes de CG para los que se analizó la expresión de moléculas inmunorreguladoras arriba mencionados, 13 resultaron positivos para *H. pylori* por cultivo a partir de las biopsias gástricas. En concordancia con nuestro resultado, un estudio con mayor cantidad de muestras que también comparó la expresión génica de tejido tumoral de CG relativo a tejido no tumoral

adyacente no reportó diferencia significativa para PD-1, PD-L1 o TIGIT (208). Posiblemente, lo ideal sería comparar la expresión génica en tejido tumoral relativa a tejido gástrico de pacientes sanos que no estén colonizados por *H. pylori*. No obstante, en el mapa de calor (Figura 8C) se puede observar que en algunos pacientes sí hay sobreexpresión de algunas de estas moléculas en tejido tumoral relativo a tejido no tumoral adyacente, entre las que destaca TNFRSF9. Además, en el mapa de calor (Figura 8C) se aprecia que hay una variabilidad importante en la expresión relativa de moléculas inmunorreguladoras entre los pacientes, lo cual es de esperarse ya que el CG se caracteriza por tener una gran heterogeneidad epidemiológica, histológica, molecular e inmunológica (8,9,209–211), lo cual tiene repercusiones importantes a nivel clínico.

Otro aspecto muy importante de resaltar del análisis realizado con el tejido de los pacientes de CG es el hecho de que varias moléculas potencialmente inmunorreguladoras se expresen en forma simultánea en el mismo tumor. Esto es relevante de considerar a la luz de estudios que han demostrado que la co-expresión de varios PCI podría contribuir a explicar el hecho de que las terapias de BPCI no confieran el beneficio deseado en todos los pacientes (145). Por ende, debería caracterizarse cuáles moléculas inmunorreguladoras predominan en el microambiente tumoral de cada paciente y cuáles son las poblaciones celulares que las expresan, con el fin de que los pacientes obtengan el máximo beneficio de las inmunoterapias con estos blancos terapéuticos. Estudios como el nuestro reflejan que la conformación del microambiente tumoral, así como la dinámica compleja de las interacciones heterotípicas entre los componentes celulares y no celulares que coexisten en dicho microambiente, es todavía una nebulosa que no comprendemos en su totalidad. Aunque lo que se sabe hasta el momento respecto a la conformación del microambiente tumoral se ha traducido en un beneficio clínico importante para muchos pacientes con diferentes tipos de cáncer, todavía hay un gran camino por recorrer.

Tomando en cuenta lo reportado en la literatura y los resultados obtenidos en esta investigación, en la Figura 9 de esta tesis se hace una propuesta simplificada del contexto inmunológico (de células linfoides, específicamente) en la carcinogénesis gástrica. De acuerdo con esta propuesta, la colonización de la mucosa gástrica con cepas de *H. pylori*

CagPAI+ desencadena una inflamación aguda que recluta y activa Teffs, tanto CD4+ como CD8+ (18). La ineficacia de esta respuesta inflamatoria para eliminar la bacteria provoca una inflamación crónica y persistente que induce la expresión de moléculas inmunorreguladoras que inducen un estado de agotamiento en los Teffs (PD-1/PD-L1, PVR/TIGIT, TNFRSF14/BTLA) y aumentan las capacidades inmunosupresoras de Tregs (ICOSL/ICOS, TNFRSF9, TIGIT). Consecuentemente, esto lleva a la generación de un microambiente inmunosupresor muy tempranamente en la carcinogénesis gástrica. El proceso de transformación de las células de la mucosa gástrica se da, entonces, en un microambiente donde predominan las poblaciones de Tex y Tregs que dificultan el establecimiento de una respuesta anti-tumoral eficiente, favoreciendo el desarrollo y la progresión tumoral.



**Figura 9.** Propuesta del contexto inmunológico de células linfoides en la carcinogénesis gástrica.

(A) La colonización de la mucosa gástrica con cepas de *H. pylori* CagPAI+ desencadena una inflamación aguda que recluta y activa Teffs. (B) La inflamación crónica y persistente contra cepas de *H. pylori* CagPAI+ induce la expresión de moléculas inmunorreguladoras (co-inhibidoras en color rojo y co-estimuladoras en color morado) tanto en linfocitos T como en células epiteliales y APC. Estas moléculas contribuyen al establecimiento de un microambiente inmunosupresor al disminuir y



desactivar las poblaciones de Teffs y, a la vez, reclutar y activar poblaciones de Tregs. (C) El proceso de transformación de las células de la mucosa gástrica se da en ese microambiente inmunosupresor donde predominan las poblaciones de Tex y Tregs que impiden el establecimiento de una respuesta anti-tumoral eficiente, favoreciendo el desarrollo y la progresión tumoral. APC: célula presentadora de antígenos; MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; TCR: receptor de linfocito T; Teffs: linfocitos T efectores; Tex: linfocitos T agotados; Tregs: linfocitos T reguladores.

## Conclusiones

*H. pylori* induce la expresión de diferentes moléculas inmunorreguladoras en las líneas celulares de CG MKN74 y MKN45, principalmente PD-L1, PVR, ICOSL, TNFRSF14 y TNFRSF9. Esta inducción es dependiente de CagPAI y podría estar relacionada con la actividad de la citotoxina CagA. Además, la cinética de expresión de las moléculas difiere en las dos líneas celulares de CG analizadas, lo cual refleja el hecho de que, al derivarse de subtipos histológicos de CG distintos, las líneas celulares tienen características genéticas y moleculares diferentes. Algunas moléculas inmunorreguladoras tienen un pico de expresión temprano a las 2-8 hpe (*i.e.* ICOSL y TNFRSF9) mientras que otras se elevan tardíamente a las 24 hpe (*i.e.* PD-L1, PVR y TNFRSF14). Esto último concuerda con el curso natural de una respuesta inmunológica ante un estímulo inflamatorio: primero hay una participación importante de las moléculas co-estimuladoras y luego estas son sustituidas por moléculas co-inhibidoras.

La infección de la mucosa gástrica murina por *H. pylori* provoca un aumento en el número de células inmunológicas infiltrantes positivas para PD-L1 y su receptor PD-1. Además, estas dos poblaciones celulares correlacionan entre sí, lo cual sugiere que están ejerciendo su función co-inhibidora. Esto implicaría que se estaría generando un microambiente inmunosupresor muy tempranamente en la secuencia de eventos preneoplásicos que culmina con CG. En este sentido, la expresión elevada de moléculas inmunorreguladoras como las mencionadas en respuesta a la infección por *H. pylori* en los modelos *in vitro* e *in vivo* posiblemente contribuye a explicar la relación de esta infección con el riesgo de desarrollar CG, específicamente porque facilita la conformación de un microambiente inmunológico pretumoral que propicia la génesis y progresión del CG.

PVR/TIGIT, ICOSL/ICOS, TNFRSF14/BTLA y TNFRSF9 se expresan genéticamente en mayor medida en biopsias de tumores de ACG humano en comparación con PD-L1 y PD-1. La expresión de otras moléculas reguladoras, además del eje PD-1/PD-L1, podría contribuir a explicar la poca o nula respuesta de muchos pacientes con ACG al tratamiento con BPCI, por lo que debería valorarse la caracterización de su expresión en pacientes que son candidatos para esta estrategia terapéutica. También, estos resultados sugieren que estas otras moléculas inmunorreguladoras sean valoradas en un futuro como posibles nuevos blancos terapéuticos de la inmunoterapia en ACG. Si bien es cierto que la inmunoterapia tiene estrategias que han revolucionado el tratamiento en cáncer, algunos enfoques todavía están muy poco estudiados. En el caso del ACG, basándose en los resultados de esta investigación, se sugiere explorar más a fondo el papel inmunosupresor de moléculas inmunorreguladoras diferentes de PD-L1/PD-1 y de las poblaciones celulares de Tregs en el microambiente tumoral.

La expresión génica de moléculas inmunorreguladoras en tejido tumoral de ACG es altamente variable entre pacientes. Esto refuerza la importancia de la medicina de precisión, con la cual se caracterizan celular y molecularmente los tumores para elegir cuáles pacientes pueden obtener beneficios de distintas terapias. Además, refuerza la necesidad de complementar las investigaciones de nuevas estrategias terapéuticas con la implementación de biomarcadores que permitan generar algoritmos eficaces en pronóstico y predicción.

El análisis simultáneo de varias moléculas inmunorreguladoras permite dilucidar cuáles de estas podrían tener mayor relevancia en el contexto en estudio. En el contexto de los tumores malignos, todavía queda mucho por investigar para comprender en su totalidad el papel de estas moléculas en la generación de microambientes inmunosupresores en cada tipo de cáncer. Esta investigación refleja la importancia de evaluar las moléculas inmunorreguladoras que están presentes durante el proceso carcinogénico y propiamente en el microambiente tumoral en el contexto de cada tipo de cáncer para así identificar posibles blancos terapéuticos de la inmunoterapia.

## Fuentes de financiamiento

Este proyecto se desarrolló dentro del marco de los proyectos 810-B9-108 y 810-B9-473 de la Vicerrectoría de Investigación.

## Referencias

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
2. Derks S, Liao X, Chiaravalli AM, Xu X, Camargo MC, Solcia E, et al. Abundant PD-L1 expression in Epstein-Barr Virus-infected gastric cancers. *Oncotarget.* 2016;7(22):32925–32.
3. Lochhead P, El-Omar EM. Gastric cancer. *Br Med Bull.* 2008;85(1):87–100.
4. Fukao A, Tsubono Y, Tsuji I, Hisamichi S, Sugahara N, Takano A. The evaluation of screening for gastric cancer in miyagi prefecture, Japan: A population-based case-control study. *Int J Cancer.* 1995;60(1):45–8.
5. Hamashima C, Kato K, Miyashiro I, Nishida H, Takaku R, Terasawa T, et al. Update version of the Japanese guidelines for gastric cancer screening. *Jpn J Clin Oncol.* 2018;48(7):673–83.
6. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Gastric Adenocarcinoma. In: *Robbins Basic Pathology.* 10th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier; 2018. p. 604–5.
7. Rosero-Bixby L, Sierra R. X-ray screening seems to reduce gastric cancer mortality by half in a community-controlled trial in Costa Rica. *Br J Cancer.* 2007;97(7):837–43.
8. Laurén P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965;64:31–49.
9. Ma J, Shen H, Kapesa L, Zeng S. Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer (Review). *Oncol Lett.* 2016;11(5):2959–64.
10. Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, Reynolds SM, Miller M, Bernard B, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*

- [Internet]. 2014;513(7517):202–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13480>
11. International Agency for Research on Cancer I. Cancer Today [Internet]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/home>
  12. Correa P. Human Gastric Carcinogenesis: A Multistep and Multifactorial Process—First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.* 1992;52(24):6735–40.
  13. Correa P, Houghton JM. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 2007;133(2):659–72.
  14. Correa P, Piazzuelo MB. The gastric precancerous cascade. *J Dig Dis.* 2012;13(1):2–9.
  15. Ansari S, Gantuya B, Tuan VP, Yamaoka Y. Diffuse gastric cancer: A summary of analogous contributing factors for its molecular pathogenicity. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):1–19.
  16. Polk DB, Peek Jr. RM. *Helicobacter Pylori: Gastric Cancer and Beyond.* *Nat Rev Cancer.* 2010;10(6):403–14.
  17. Baj J, Forma A, Sitarz M, Portincasa P, Garruti G, Krasowska D, et al. *Helicobacter pylori* virulence factors—mechanisms of bacterial pathogenicity in the gastric microenvironment. Vol. 10, *Cells.* MDPI; 2021. p. 1–37.
  18. Agnarelli A, Vella V, Samuels M, Papanastasopoulos P, Giamas G. Incorporating Immunotherapy in the Management of Gastric Cancer: Molecular and Clinical Implications. Vol. 14, *Cancers.* MDPI; 2022.
  19. Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, Matsui A, et al. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse [Internet]. 2008. Available from: [www.pnas.org/cgi/content/full/](http://www.pnas.org/cgi/content/full/)
  20. Hatakeyama M. Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer. Vol. 93, *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences.* Japan Academy; 2017. p. 196–219.
  21. International Agency of Research on Cancer I. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.* 1994;61:1–241.

22. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *New England Journal of Medicine*. 2002;347(15):1175–86.
23. Naumann M, Sokolova O, Tegtmeyer N, Backert S. *Helicobacter pylori*: A Paradigm Pathogen for Subverting Host Cell Signal Transmission. *Trends Microbiol* [Internet]. 2017;25(4):316–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.004>
24. Backert S, Tegtmeyer N, Fischer W. Composition, structure and function of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island encoded type IV secretion system. *Future Microbiol*. 2015 Jun 1;10(6):955–65.
25. Figueiredo C, Machado JC. RESPONSE: Re: *Helicobacter pylori* and Interleukin 1 Genotyping: An Opportunity to Identify High-Risk Individuals for Gastric Carcinoma. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(10):760–1.
26. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
27. Murphy G, Pfeiffer R, Camargo MC, Rabkin CS. Meta-analysis Shows That Prevalence of Epstein-Barr Virus-Positive Gastric Cancer Differs Based on Sex and Anatomic Location. *Gastroenterology*. 2009;137(3):824–33.
28. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
29. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting : Integrating Suppression and Promotion. *Science*. 2011;331(March):1565–70.
30. Benavente S, Sánchez-García A, Naches S, LLeonart ME, Lorente J. Therapy-Induced Modulation of the Tumor Microenvironment: New Opportunities for Cancer Therapies. Vol. 10, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
31. Tie Y, Tang F, Wei Y quan, Wei X wei. Immunosuppressive cells in cancer: mechanisms and potential therapeutic targets. Vol. 15, *Journal of Hematology and Oncology*. BioMed Central Ltd; 2022.
32. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3 + regulatory T cells in the human immune system. Vol. 10, *Nature Reviews Immunology*. 2010. p. 490–500.
33. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. Vol. 133, *Cell*. 2008. p. 775–87.

34. McRitchie BR, Akkaya B. Exhaust the exhausters: Targeting regulatory T cells in the tumor microenvironment. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
35. Fridman WH, Zitvogel L, Sautès-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. Vol. 14, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 717–34.
36. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. 2017;541(7637):321–30.
37. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252–64.
38. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015;15(8):486–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3862>
39. Fathi M, Pustokhina I, Kuznetsov S v., Khayrullin M, Hojjat-Farsangi M, Karpisheh V, et al. T-cell immunoglobulin and ITIM domain, as a potential immune checkpoint target for immunotherapy of colorectal cancer. Vol. 73, *IUBMB Life*. Blackwell Publishing Ltd; 2021. p. 726–38.
40. Baldanzi G. Immune Checkpoint Receptors Signaling in T Cells. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
41. Zheng L, Qin S, Si W, Wang A, Xing B, Gao R, et al. Pan-cancer single-cell landscape of tumor-infiltrating T cells. *Science* (1979). 2021 Dec 17;374(6574).
42. Sivori S, Vacca P, del Zotto G, Munari E, Mingari MC, Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2019;16(5):430–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-019-0206-4>
43. Nagasaki J, Togashi Y. A variety of “exhausted” T cells in the tumor microenvironment. Vol. 34, *International immunology*. NLM (Medline); 2022. p. 563–70.
44. Wu B, Zhong C, Lang Q, Liang Z, Zhang Y, Zhao X, et al. Poliovirus receptor (PVR)-like protein cosignaling network: new opportunities for cancer immunotherapy. Vol. 40, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. BioMed Central Ltd; 2021.

45. Wang D, Gu Y, Yan X, Huo C, Wang G, Zhao Y, et al. Role of CD155/TIGIT in Digestive Cancers: Promising Cancer Target for Immunotherapy. Vol. 12, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
46. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2009 Dec 21;206(13):3015–29.
47. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992;11(11):3887–95.
48. Schöniger S, Jasani B. The PD-1/PD-L1 Pathway: A Perspective on Comparative Immuno-Oncology. Vol. 12, *Animals*. MDPI; 2022.
49. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* [Internet]. 1999;5(12):1365–9. Available from: <http://medicine.nature.com>
50. Dong H, Chen L. B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity. *J Mol Med*. 2003;81(5):281–7.
51. Selenko-Gebauer N, Majdic O, Szekeres A, Höfler G, Guthann E, Korthäuer U, et al. B7-H1 (Programmed Death-1 Ligand) on Dendritic Cells Is Involved in the Induction and Maintenance of T Cell Anergy. *The Journal of Immunology*. 2003;170(7):3637–44.
52. Bolandi N, Derakhshani A, Hemmat N, Baghbanzadeh A, Asadzadeh Z, Nour MA, et al. The positive and negative immunoregulatory role of b7 family: Promising novel targets in gastric cancer treatment. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021.
53. Zhang Y, Yang Y, Chen Y, Lin W, Chen X, Liu J, et al. PD-L1: Biological mechanism, function, and immunotherapy in gastric cancer. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
54. Mansorunov D, Apanovich N, Apanovich P, Kipkeeva F, Muzaffarova T, Kuzevanova A, et al. Expression of immune checkpoints in malignant tumors: Therapy targets and biomarkers for the gastric cancer prognosis. Vol. 11, *Diagnostics*. MDPI; 2021.

55. Lowther DE, Goods BA, Lucca LE, Lerner BA, Raddassi K, van Dijk D, et al. PD-1 marks dysfunctional regulatory T cells in malignant gliomas. *JCI Insight*. 2016 Apr 21;1(5).
56. Kumagai S, Togashi Y, Kamada T, Sugiyama E, Nishinakamura H, Takeuchi Y, et al. The PD-1 expression balance between effector and regulatory T cells predicts the clinical efficacy of PD-1 blockade therapies. *Nat Immunol*. 2020 Nov 1;21(11):1346–58.
57. Zhang B, Chikuma S, Hori S, Fagarasan S, Honjo T. Nonoverlapping roles of PD-1 and FoxP3 in maintaining immune tolerance in a novel autoimmune pancreatitis mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Jul 26;113(30):8490–5.
58. Böger C, Behrens HM, Mathiak M, Krüger S, Kalthoff H, Röcken C. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. *Oncotarget*. 2016;7(17):24269–83.
59. Kawazoe A, Kuwata T, Kuboki Y, Shitara K, Nagatsuma AK, Aizawa M, et al. Clinicopathological features of programmed death ligand 1 expression with tumor-infiltrating lymphocyte, mismatch repair, and Epstein–Barr virus status in a large cohort of gastric cancer patients. *Gastric Cancer*. 2017;20(3):407–15.
60. Xing X, Guo J, Wen X, Ding G, Li B, Dong B, et al. Analysis of PD1, PDL1, PDL2 expression and T cells infiltration in 1014 gastric cancer patients. *Oncoimmunology*. 2018;7(3).
61. Kawazoe A, Shitara K, Kuboki Y, Bando H, Kojima T, Yoshino T, et al. Clinicopathological features of 22C3 PD-L1 expression with mismatch repair, Epstein–Barr virus status, and cancer genome alterations in metastatic gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2019;22(1):69–76.
62. Valentini AM, Di Pinto F, Coletta S, Guerra V, Armentano R, Caruso ML. Tumor microenvironment immune types in gastric cancer are associated with mismatch repair however, not HER2 status. *Oncol Lett*. 2019;18(2):1775–85.
63. Tamura T, Ohira M, Tanaka H, Muguruma K, Toyokawa T, Kubo N, et al. Programmed death-1 ligand-1 (PDL1) expression is associated with the prognosis of patients with stage II/III gastric cancer. *Anticancer Res*. 2015;35(10):5369–76.



64. Schlöber HA, Drebbler U, Kloth M, Thelen M, Rothschild SI, Haase S, et al. Immune checkpoints programmed death 1 ligand 1 and cytotoxic T lymphocyte associated molecule 4 in gastric adenocarcinoma. *Oncoimmunology*. 2016;5(5):1–11.
65. Thompson ED, Zahurak M, Murphy A, Cornish T, Cuka N, Abdelfatah E, et al. Patterns of PD-L1 expression and CD8 T cell infiltration in gastric adenocarcinomas and associated immune stroma. *Gut*. 2016;66(5):794–801.
66. Jin S, Xu B, Yu L, Fu Y, Wu H, Fan X, et al. The PD-1, PD-L1 expression and CD3+ T cell infiltration in relation to outcome in advanced gastric signet-ring cell carcinoma, representing a potential biomarker for immunotherapy. *Oncotarget*. 2017;8(24):38850–62.
67. Koh J, Ock CY, Kim JW, Nam SK, Kwak Y, Yun S, et al. Clinicopathologic implications of immune classification by PD-L1 expression and CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes in stage II and III gastric cancer patients. *Oncotarget*. 2017;8(16):26356–67.
68. Choi YY, Kim H, Shin SJ, Kim HY, Lee J, Yang HK, et al. Microsatellite Instability and Programmed Cell Death-Ligand 1 Expression in Stage II/III Gastric Cancer: Post Hoc Analysis of the CLASSIC Randomized Controlled study. *Ann Surg*. 2019;270(2):309–16.
69. Kim JY, Kim WG, Kwon CH, Park DY. Differences in immune contextures among different molecular subtypes of gastric cancer and their prognostic impact. *Gastric Cancer*. 2019;22(6):1164–75.
70. Kim MH, Zhang X, Jung M, Jung I, Park HS, Beom SH, et al. Immunohistochemistry biomarkers predict survival in stage II/III gastric cancer patients: From a prospective clinical trial. *Cancer Res Treat*. 2019;51(2):819–31.
71. Yan R, Yang X, Wang X, Wang B, Zhao Y, Huang W, et al. Association between intra-tumoral immune response and programmed death ligand 1 (PD-L1) in gastric cancer. *Medical Science Monitor*. 2019;25:6905–10.
72. Li Z, Lai Y, Sun L, Zhang X, Liu R, Feng G, et al. PD-L1 expression is associated with massive lymphocyte infiltration and histology in gastric cancer. *Hum Pathol*. 2016;55:182–9.

73. Saito R, Abe H, Kunita A, Yamashita H, Seto Y, Fukayama M. Overexpression and gene amplification of PD-L1 in cancer cells and PD-L1 + immune cells in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: The prognostic implications. *Modern Pathology*. 2017;30(3):427–39.
74. Gullo I, Carvalho J, Martins D, Lemos D, Monteiro AR, Ferreira M, et al. The transcriptomic landscape of gastric cancer: Insights into Epstein-Barr virus infected and microsatellite unstable tumors. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):1–23.
75. Morihiro T, Kuroda S, Kanaya N, Kakiuchi Y, Kubota T, Aoyama K, et al. PD-L1 expression combined with microsatellite instability/CD8+ tumor infiltrating lymphocytes as a useful prognostic biomarker in gastric cancer. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–9.
76. Sun Y, Yu W, Guan W, Cai L, Qiao M, Zheng L, et al. Integrated assessment of PD-L1 expression and molecular classification facilitates therapy selection and prognosis prediction in gastric cancer. *Cancer Manag Res*. 2019;11:6397–410.
77. Svensson MC, Borg D, Zhang C, Hedner C, Nodin B, Uhlén M, et al. Expression of PD-L1 and PD-1 in chemoradiotherapy-Naïve esophageal and gastric adenocarcinoma: Relationship with mismatch repair status and survival. *Front Oncol*. 2019;9(MAR):1–13.
78. Menyhárt O, Pongor LS, Gyórfy B. Mutations defining patient cohorts with elevated PD-L1 expression in gastric cancer. *Front Pharmacol*. 2019;9(JAN):1–6.
79. Kim JH, Kim SY, Shin EY, Jung JH, Choi HJ, Jun KH. Expression patterns of programmed death-1 and programmed death-1 ligand-1 on T cells in gastric cancer. *Oncol Lett*. 2019;18(3):2661–9.
80. Shigemori T, Toiyama Y, Okugawa Y, Yamamoto A, Yin C, Narumi A, et al. Soluble PD-L1 Expression in Circulation as a Predictive Marker for Recurrence and Prognosis in Gastric Cancer: Direct Comparison of the Clinical Burden Between Tissue and Serum PD-L1 Expression. *Ann Surg Oncol*. 2019;26(3):876–83.
81. Zhang M, Dong Y, Liu H, Wang Y, Zhao S, Xuan Q, et al. The clinicopathological and prognostic significance of PD-L1 expression in gastric cancer: A meta-analysis of 10 studies with 1,901 patients. *Sci Rep*. 2016;6(November).

82. Wu Y, Zhao T, Jia Z, Cao D, Cao X, Pan Y, et al. Polymorphism of the programmed death-ligand 1 gene is associated with its protein expression and prognosis in gastric cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. 2019;34(7):1201–7.
83. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily-CTLA-4. *Nature*. 1987;328(6127):267–70.
84. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 Have Opposing Effects in the Response of T cells to Stimulation. *Journal of Experimental Medicine*. 1995;182:459–65.
85. Walker LSK, Sansom DM. Confusing signals: Recent progress in CTLA-4 biology. Vol. 36, *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd; 2015. p. 63–70.
86. Walker LSK. Treg and CTLA-4: Two intertwining pathways to immune tolerance. Vol. 45, *Journal of Autoimmunity*. 2013. p. 49–57.
87. Tang AL, Teijaro JR, Njau MN, Chandran SS, Azimzadeh A, Nadler SG, et al. CTLA4 expression is an indicator and regulator of steady-state CD4 + FoxP3 + T cell homeostasis 1. *The Journal of Immunology*. 2008;181(3):1806–13.
88. Ren X, Peng M, Xing P, Wei Y, Galbo PM, Corrigan D, et al. Blockade of the immunosuppressive KIR2DL5/PVR pathway elicits potent human NK cell-mediated antitumor immunity. *Journal of Clinical Investigation*. 2022 Nov 15;132(22).
89. Rotte A, Jin JY, Lemaire V. Mechanistic overview of immune checkpoints to support the rational design of their combinations in cancer immunotherapy. *Annals of Oncology*. 2018;29(1):71–83.
90. He W, Zhang H, Han F, Chen X, Lin R, Wang W, et al. CD155T/TIGIT signaling regulates CD8+ T-cell metabolism and promotes tumor progression in human gastric cancer. *Cancer Res*. 2017 Nov 15;77(22):6375–88.
91. Tang W, Pan X, Han D, Rong D, Zhang M, Yang L, et al. Clinical significance of CD8+ T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains+ in locally advanced gastric cancer treated with SOX regimen after D2 gastrectomy. *Oncoimmunology*. 2019 Jun 3;8(6).
92. Xu D, Zhao E, Zhu C, Zhao W, Wang C, Zhang Z, et al. TIGIT and PD-1 may serve as potential prognostic biomarkers for gastric cancer. *Immunobiology*. 2020 May 1;225(3).

93. Rasic P, Jovanovic-Tucovic M, Jeremic-Marija, Djuricic SM, Vasiljevic Z v, Milickovic M, et al. B7 homologue 3 as a prognostic biomarker and potential therapeutic target in gastrointestinal tumors. *World J Gastroenterol*. 2021;13(8):799–821.
94. Guo L, Liu Z, Zhang Y, Quan Q, Huang L, Xu Y, et al. Association of increased B7 protein expression by infiltrating immune cells with progression of gastric carcinogenesis. *Medicine (United States)*. 2019 Feb 1;98(8).
95. Li D, Xiang S, Shen J, Xiao M, Zhao Y, Wu X, et al. Comprehensive understanding of B7 family in gastric cancer: Expression profile, association with clinicopathological parameters and downstream targets. *Int J Biol Sci*. 2020;16(4):568–82.
96. Sun M, Xie J, Zhang D, Chen C, Lin S, Chen Y, et al. B7-H3 inhibits apoptosis of gastric cancer cell by interacting with Fibronectin. *J Cancer*. 2021;12(24):7518–26.
97. Shao X, Zhan S, Quan Q, Shen Y, Chen S, Zhang X, et al. Clinical significance of B7-H3 and HER2 co-expression and therapeutic value of combination treatment in gastric cancer. *Int Immunopharmacol*. 2022 Sep 1;110:108988.
98. Ulase D, Behrens HM, Krüger S, Zeissig S, Röcken C. Gastric carcinomas with stromal b7-h3 expression have lower intratumoural cd8+ t cell density. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 2;22(4):1–8.
99. Solinas C, Gu-Trantien C, Willard-Gallo K. The rationale behind targeting the ICOS-ICOS ligand costimulatory pathway in cancer immunotherapy. Vol. 5, *ESMO Open*. BMJ Publishing Group; 2020.
100. Nagase H, Takeoka T, Urakawa S, Morimoto-Okazawa A, Kawashima A, Iwahori K, et al. ICOS+ Foxp3+ TILs in gastric cancer are prognostic markers and effector regulatory T cells associated with *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer*. 2017 Feb 1;140(3):686–95.
101. Liu X, Yu H, Yan C, Mei Y, Lin C, Hong Y, et al. Plasmacytoid dendritic cells and ICOS+ regulatory T cells predict poor prognosis in gastric cancer: A pilot study. *J Cancer*. 2019;10(26):6711–5.
102. Espinoza-Contreras JG, Torres-Ruiz MI, Waller-González LA, Ramírez-García JDJ, Torres-López J, Ventura-Juárez J, et al. Immunological markers and helicobacter

- pylori in patients with stomach cancer: Expression and correlation. *Biomed Rep.* 2020 May 1;12(5):233–43.
103. Chen XL, Cao XD, Kang AJ, Wang KM, Su BS, Wang YL. In situ expression and significance of B7 costimulatory molecules within tissues of human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2003;9(6):1370–3.
  104. 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 Sci.* 2014 Feb;105(2):150–8.
  105. Urakawa S, Yamasaki M, Makino T, Kurokawa Y, Yamamoto K, Goto K, et al. The impact of ICOS+ regulatory T cells and Helicobacter pylori infection on the prognosis of patients with gastric and colorectal cancer: potential prognostic benefit of pre-operative eradication therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy.* 2021 Feb 1;70(2):443–52.
  106. Pasero C, Speiser DE, Derré L, Olive D. The HVEM network: New directions in targeting novel costimulatory/co- inhibitory molecules for cancer therapy. Vol. 12, *Current Opinion in Pharmacology.* 2012. p. 478–85.
  107. Croft M. The evolving crosstalk between co-stimulatory and co-inhibitory receptors: HVEM-BTLA. Vol. 26, *Trends in Immunology.* 2005. p. 292–4.
  108. Zhao Q, Zhang GL, Zhu X, Su D, Huang ZL, Hu ZX, et al. The paradoxical changes of membrane and soluble herpes virus entry mediator in hepatocellular carcinoma patients. *J Gastroenterol Hepatol [Internet].* 2017 Aug 1 [cited 2022 Nov 19];32(8):1520–4. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jgh.13678>
  109. Jones A, Bourque J, Kuehm L, Opejin A, Teague RM, Gross C, et al. Immunomodulatory Functions of BTLA and HVEM Govern Induction of Extrathymic Regulatory T Cells and Tolerance by Dendritic Cells. *Immunity.* 2016 Nov 15;45(5):1066–77.
  110. Bourque J, Hawiger D. The BTLA–HVEM–CD5 immunoregulatory axis—an instructive mechanism governing P<sub>reg</sub> cell differentiation. Vol. 10, *Frontiers in Immunology.* Frontiers Media S.A.; 2019.

111. Carreno BM, Collins M. BTLA: a new inhibitory receptor with a B7-like ligand. Vol. 24, Trends in Immunology. Elsevier Ltd; 2003. p. 524–7.
112. Ning Z, Liu K, Xiong H. Roles of BTLA in Immunity and Immune Disorders. Vol. 12, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2021.
113. Azarafza M, Tehrani M, Valadan R, Maleki I, Mohammad Mehdi Ghaffari-Hamedani S, Ghanadan A, et al. Role of BTLA/HVEM network in development of gastric cancer. Hum Immunol. 2022 Aug 1;83(8–9):637–44.
114. Feng XY, Wen XZ, Tan XJ, Hou JH, Ding Y, Wang KF, et al. Ectopic expression of B and T lymphocyte attenuator in gastric cancer: A potential independent prognostic factor in patients with gastric cancer. Mol Med Rep. 2015 Jan 1;11(1):658–64.
115. Lan X, Li S, Gao H, Nanding A, Quan L, Yang C, et al. Increased BTLA and HVEM in gastric cancer are associated with progression and poor prognosis. Onco Targets Ther. 2017 Feb 16;10:919–26.
116. Croft M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. Vol. 9, Nature Reviews Immunology. 2009. p. 271–85.
117. Freeman ZT, Nirschl TR, Hovelson DH, Johnston RJ, Engelhardt JJ, Selby MJ, et al. A conserved intratumoral regulatory T cell signature identifies 4-1BB as a pan-cancer target. Journal of Clinical Investigation. 2020 Mar 2;130(3):1405–16.
118. Zhang P, Gao F, Wang Q, Wang X, Zhu F, Ma C, et al. Agonistic anti-4-1BB antibody promotes the expansion of natural regulatory T cells while maintaining Foxp3 expression. Scand J Immunol. 2007 Oct;66(4):435–40.
119. Guo X, Zhang Y, Zheng L, Zheng C, Song J, Zhang Q, et al. Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing. Nat Med. 2018 Jul 1;24(7):978–85.
120. Xu L, Lu Y, Deng Z, Li X, Shi Y, Zhao K, et al. Single-cell landscape of immunocytes in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma. J Transl Med. 2022 Dec 1;20(1).
121. Kumar P, Arbieva ZH, Maienschein-Cline M, Ganesh BB, Ramasamy S, Prabhakar BS. Induction of Antigen-Independent Proliferation of Regulatory T-Cells by TNF Superfamily Ligands OX40L and GITRL. Methods in Molecular Biology [Internet]. 2021 [cited 2022 Dec 9];2248:63–71. Available from: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-1130-2\\_4](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-1130-2_4)

122. Cho JW, Son J, Ha SJ, Lee I. Systems biology analysis identifies TNFRSF9 as a functional marker of tumor-infiltrating regulatory T-cell enabling clinical outcome prediction in lung cancer. *Comput Struct Biotechnol J*. 2021 Jan 1;19:860–8.
123. Liechti T, Roederer M. OMIP-060: 30-Parameter Flow Cytometry Panel to Assess T Cell Effector Functions and Regulatory T Cells. *Cytometry Part A*. 2019 Nov 1;95(11):1129–34.
124. Fujimoto H, Saito Y, Ohuchida K, Kawakami E, Fujiki S, Watanabe T, et al. Deregulated Mucosal Immune Surveillance through Gut-Associated Regulatory T Cells and PD-1 + T Cells in Human Colorectal Cancer . *The Journal of Immunology*. 2018 May 1;200(9):3291–303.
125. Yi L, Jin X, Wang J, Yan Z, Cheng X, Wen T, et al. CD137 Agonists Targeting CD137-Mediated Negative Regulation Show Enhanced Antitumor Efficacy in Lung Cancer. *Front Immunol*. 2022 Feb 7;13.
126. Chou FC, Chen HY, Kuo CC, Sytwu HK. Role of galectins in tumors and in clinical immunotherapy. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2018.
127. Joller N, Kuchroo VK. Tim-3, Lag-3, and TIGIT. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Verlag; 2017. p. 127–56.
128. Naghavi-Alhosseini M, Tehrani M, Ajami A, Rafiei A, Taghvaei T, Vahedi-Larijani L, et al. Tim-3 up-regulation in patients with gastric cancer and peptic ulcer disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2017;18(3):765–70.
129. Wang Y, Zhao E, Zhang Z, Zhao G, Cao H. Association between Tim-3 and Gal-9 expression and gastric cancer prognosis. *Oncol Rep*. 2018;40(4):2115–26.
130. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med*. 2018;24(5).
131. Nishino M, Ramaiya NH, Hatabu H, Hodi FS. Monitoring immune-checkpoint blockade: Response evaluation and biomarker development. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(11):655–68.
132. Hegde PS, Chen DS. Top 10 Challenges in Cancer Immunotherapy. *Immunity*. 2020;52(1):17–35.

133. Darvin P, Toor SM, Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med*. 2018;50(12):1–11.
134. Hargadon KM, Johnson CE, Williams CJ. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *Int Immunopharmacol*. 2018;62(May):29–39.
135. Figueroa-Protti L, Soto-Molinari R, Calderón-Osorno M, Mora J, Alpízar-Alpízar W. Gastric cancer in the era of immune checkpoint blockade. *J Oncol*. 2019;2019.
136. Fuchs CS, Doi T, Jang RW, Muro K, Satoh T, Machado M, et al. Safety and efficacy of pembrolizumab monotherapy in patients with previously treated advanced gastric and gastroesophageal junction cancer: Phase 2 clinical KEYNOTE-059 trial. *JAMA Oncol*. 2018;4(5):1–8.
137. Kang YK, Boku N, Satoh T, Ryu MH, Chao Y, Kato K, et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* [Internet]. 2017;390(10111):2461–71. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31827-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31827-5)
138. Collin M. Immune checkpoint inhibitors: A patent review (2010-2015). *Expert Opin Ther Pat*. 2016;26(5):555–64.
139. Hahn AW, Gill DM, Pal SK, Agarwal N. The future of immune checkpoint cancer therapy after PD-1 and CTLA-4. *Immunotherapy*. 2017;9(8):681–92.
140. Sadreddini S, Baradaran B, Aghebati-Maleki A, Sadreddini S, Shanehbandi D, Fotouhi A, et al. Immune checkpoint blockade opens a new way to cancer immunotherapy. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):8541–9.
141. Marin-Acevedo JA, Dholaria B, Soyano AE, Knutson KL, Chumsri S, Lou Y. Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: New developments and challenges. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):1–20.
142. Cai H, Li M, Deng R, Wang M, Shi Y. Advances in molecular biomarkers research and clinical application progress for gastric cancer immunotherapy. Vol. 10, *Biomarker Research*. BioMed Central Ltd; 2022.



143. National Institutes of Health N. Clinical Trials [Internet]. U.S. National Library of Medicine. Available from: <https://clinicaltrials.gov/>
144. Cogdill AP, Andrews MC, Wargo JA. Hallmarks of response to immune checkpoint blockade. *Br J Cancer* [Internet]. 2017;117(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2017.136>
145. Gao J, Ward JF, Pettaway CA, Shi LZ, Subudhi SK, Vence LM, et al. VISTA is an inhibitory immune checkpoint that is increased after ipilimumab therapy in patients with prostate cancer. *Nat Med* [Internet]. 2017;23(5):551–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4308>
146. Ma X, Wu J, Wang B, Liu C, Liu L, Sun C. Epigenetic modifications: Critical participants of the PD-L1 regulatory mechanism in solid tumors (Review). *Int J Oncol*. 2022 Nov 1;61(5).
147. Teng MWL, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. Vol. 75, *Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc.; 2015. p. 2139–45.
148. Tang Q, Chen Y, Li X, Long S, Shi Y, Yu Y, et al. The role of PD-1/PD-L1 and application of immune-checkpoint inhibitors in human cancers. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
149. Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2019 16:6 [Internet]. 2019 Jan 31 [cited 2022 Dec 19];16(6):356–71. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41571-019-0175-7>
150. Kamada T, Togashi Y, Tay C, Ha D, Sasaki A, Nakamura Y, et al. PD-1+ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 May 14;116(20):9999–10008.
151. Bang YJ, Kang YK, Catenacci D v., Muro K, Fuchs CS, Geva R, et al. Pembrolizumab alone or in combination with chemotherapy as first-line therapy for patients with advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma: results from the phase II nonrandomized KEYNOTE-059 study. *Gastric Cancer* [Internet]. 2019;0(0):0. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10120-018-00909-5>

152. Janjigian YY, Bendell J, Calvo E, Kim JW, Ascierto PA, Sharma P, et al. CheckMate-032 study: Efficacy and safety of nivolumab and nivolumab plus ipilimumab in patients with metastatic esophagogastric cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(28):2836–44.
153. Doi T, Iwasa S, Muro K, Satoh T, Hironaka S, Esaki T, et al. Phase 1 trial of avelumab (anti-PD-L1) in Japanese patients with advanced solid tumors, including dose expansion in patients with gastric or gastroesophageal junction cancer: the JAVELIN Solid Tumor JPN trial. *Gastric Cancer* [Internet]. 2019;22(4):817–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10120-018-0903-1>
154. Doroshov DB, Bhalla S, Beasley MB, Sholl LM, Kerr KM, Gnjatic S, et al. PD-L1 as a biomarker of response to immune-checkpoint inhibitors. Vol. 18, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Research; 2021. p. 345–62.
155. Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. Vol. 19, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2019. p. 133–50.
156. Chen Y, Jia K, Sun Y, Zhang C, Li Y, Zhang L, et al. Predicting response to immunotherapy in gastric cancer via multi-dimensional analyses of the tumour immune microenvironment. *Nat Commun*. 2022 Dec 1;13(1).
157. Escors D, Bocanegra A, Chocarro L, Blanco E, Piñeiro-Hermida S, Garnica M, et al. Systemic CD4 Immunity and PD-L1/PD-1 Blockade Immunotherapy. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 31;23(21):13241.
158. Shitara K, Özgüroğlu M, Bang YJ, Di Bartolomeo M, Mandalà M, Ryu MH, et al. Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated, advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (KEYNOTE-061): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 2018;392(10142):123–33.
159. Kim ST, Cristescu R, Bass AJ, Kim KM, Odegaard JI, Kim K, et al. Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer. *Nat Med*. 2018;24(9):1449–58.
160. Khagi Y, Goodman AM, Daniels GA, Patel SP, Sacco AG, Randall JM, et al. Hypermutated circulating tumor DNA: Correlation with response to checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(19):5729–36.

161. Ayers M, Nebozhyn M, Cristescu R, McClanahan TK, Perini R, Rubin E, et al. Molecular profiling of cohorts of tumor samples to guide clinical development of pembrolizumab as monotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2018;25(5):1564–73.
162. Zhu Y, Zhu F, Ba H, Chen J, Bian X. Helicobacter pylori infection and PD-L1 expression in gastric cancer: A meta-analysis. *Eur J Clin Invest* [Internet]. 2022 Oct 26 [cited 2022 Nov 14];e13880. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/eci.13880>
163. Zhang M jun, Chen D sheng, Li S, Chen L, Qi Y xue, Zhang C jun. Helicobacter pylori infection as a potential favorable factor for immune checkpoint inhibitor therapy for gastric cancer. *Invest New Drugs*. 2021 Oct 1;39(5):1436–8.
164. Shi Y, Zheng H, Wang M, Ding S. Influence of Helicobacter pylori infection on PD-1/PD-L1 blockade therapy needs more attention. *Helicobacter* [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2022 Nov 14];27(2):e12878. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/hel.12878>
165. Liu X, Choi MG, Kim K, Kim KM, Kim ST, Park SH, et al. High PD-L1 expression in gastric cancer (GC) patients and correlation with molecular features. *Pathol Res Pract*. 2020 Apr 1;216(4).
166. Katz H, Biglow L, Alsharedi M. Immune Checkpoint Inhibitors in Locally Advanced, Unresectable, and Metastatic Upper Gastrointestinal Malignancies. *J Gastrointest Cancer*. 2019;
167. Fabian KP, Kowalczyk JT, Reynolds ST, Hodge JW. Dying of Stress: Chemotherapy, Radiotherapy, and Small-Molecule Inhibitors in Immunogenic Cell Death and Immunogenic Modulation. Vol. 11, *Cells*. MDPI; 2022.
168. Wang YT, Ji WD, Jiao HM, Lu A, Chen KF, Liu QB. Targeting 4-1BB for tumor immunotherapy from bench to bedside. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
169. Andersen MH. Tumor microenvironment antigens. *Seminars in Immunopathology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2022.
170. Santiago-Sánchez GS, Hodge JW, Fabian KP. Tipping the scales: Immunotherapeutic strategies that disrupt immunosuppression and promote immune activation. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.

171. Patel MR, Naing A, III HAB, Lin CC, Curigliano G, Thistlethwaite F, et al. A phase 1/2 open-label study of KY1044, an anti-ICOS antibody with dual mechanism of action, as single agent and in combination with atezolizumab, in adult patients with advanced malignancies. [https://doi.org/10.1200/JCO20213915\\_suppl2624](https://doi.org/10.1200/JCO20213915_suppl2624). 2021 May 28;39(15\_suppl):2624–2624.
172. Mascaux C, Angelova M, Vasaturo A, Beane J, Hijazi K, Anthoine G, et al. Immune evasion before tumour invasion in early lung squamous carcinogenesis. *Nature* [Internet]. 2019;571(7766):570–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1330-0>
173. Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* (1979). 2015;350(6264):1084–9.
174. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets T v., et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* (1979). 2018;359(6371):97–103.
175. Matson V, Fessler J, Bao R, Chongsuwat T, Zha Y, Alegre ML, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* (1979). 2018;359(6371):104–8.
176. Routy B, le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* (1979). 2018;359(6371):91–7.
177. Oster P, Vaillant L, Riva E, McMillan B, Begka C, Truntzer C, et al. *Helicobacter pylori* infection has a detrimental impact on the efficacy of cancer immunotherapies. *Gut*. 2022 Mar 1;71(3):457–66.
178. Das S, Suarez G, Beswick EJ, Sierra JC, Graham DY, Reyes VE. Expression of B7-H1 on Gastric Epithelial Cells: Its Potential Role in Regulating T Cells during *Helicobacter pylori* Infection . *The Journal of Immunology*. 2006;176(5):3000–9.
179. Beswick EJ, Pinchuk I v., Das S, Powell DW, Reyes VE. Expression of the programmed death ligand 1, B7-H1, on gastric epithelial cells after *Helicobacter pylori* exposure promotes development of CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells. *Infect Immun*. 2007;75(9):4334–41.

180. Mitchell P, Germain C, Fiori PL, Khamri W, Foster GR, Ghosh S, et al. Chronic exposure to *Helicobacter pylori* impairs dendritic cell function and inhibits Th1 development. *Infect Immun*. 2007;75(2):810–9.
181. Wu YY, Lin CW, Cheng KS, Lin C, Wang YM, Lin IT, et al. Increased programmed death-ligand-1 expression in human gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori* infection. *Clin Exp Immunol*. 2010;161(3):551–9.
182. Lina TT, Alzahrani S, House J, Yamaoka Y, Sharpe AH, Rampy BA, et al. *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island's role in B7-H1 induction and immune evasion. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(3):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121841>
183. Xie G, Li W, Li R, Wu K, Zhao E, Zhang Y, et al. *Helicobacter pylori* promote B7-H1 expression by suppressing miR-152 and miR-200b in gastric cancer cells. *PLoS One* [Internet]. 2017;12(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0168822>
184. Holokai L, Chakrabarti J, Broda T, Chang J, Hawkins JA, Sundaram N, et al. Increased Programmed Death-Ligand 1 is an Early Epithelial Cell Response to *Helicobacter pylori* Infection. *PLoS Pathog*. 2019;15(1):1–30.
185. Shen B, Qian A, Lao W, Li W, Chen X, Zhang B, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* and expression of programmed death-1 and its ligand in gastric intraepithelial neoplasia and early-stage gastric cancer. *Cancer Manag Res*. 2019;11:3909–19.
186. Go DM, Lee SH, Lee SH, Woo SH, Kim K, Kim K, et al. Programmed Death Ligand 1-Expressing Classical Dendritic Cells Mitigate *Helicobacter*-Induced Gastritis. *CMGH*. 2021 Jan 1;12(2):715–39.
187. Li X, Pan K, Vieth M, Gerhard M, Li W, Mejías-luque R. JAK-STAT1 Signaling Pathway Is an Early Response to *Helicobacter pylori* Infection and Contributes to Immune Escape and Gastric Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 1;23(8).
188. Anderson KM, Czinn SJ, Redline RW, Blanchard TG. Induction of CTLA-4-Mediated Anergy Contributes to Persistent Colonization in the Murine Model of Gastric *Helicobacter pylori* Infection. *The Journal of Immunology*. 2006 May 1;176(9):5306–13.

189. Lundgren A, Strömberg E, Sjöling Å, Lindholm C, Enarsson K, Edebo A, et al. Mucosal FOXP3-expressing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Infect Immun*. 2005 Jan;73(1):523–31.
190. Lina TT, Gonzalez J, Pinchuk I v., Beswick EJ, Reyes VE. *Helicobacter pylori* elicits B7H3 expression on gastric epithelial cells: Implications in local T cell regulation and subset development during infection. *Clin Oncol Res [Internet]*. 2019;2(5). Available from: file:///C:/Users/Carla Carolina/Desktop/Artigos para acrescentar na qualificação/The impact of birth weight on cardiovascular disease risk in the.pdf
191. Park AM, Hagiwara S, Hsu DK, Liu FT, Yoshie O. Galectin-3 plays an important role in innate immunity to gastric infection by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 2016;84(4):1184–93.
192. Subhash VV, Ling SSM, Ho B. Extracellular galectin-3 counteracts adhesion and exhibits chemoattraction in *Helicobacter pylori*-infected gastric cancer cells. *Microbiology (United Kingdom)*. 2016;162(8):1360–6.
193. Subhash VV, Ho B. Galectin 3 acts as an enhancer of survival responses in *H. pylori*-infected gastric cancer cells. *Cell Biol Toxicol*. 2016;32(1):23–35.
194. Estevam RB, Wood da Silva NMJ, Wood da Silva, Fonseca FM, Oliveira AG de, Nogueira, et al. Modulation of Galectin-3 and Galectin 9 in gastric mucosa of patients with chronic gastritis and positive *Helicobacter pylori* infection. *Pathol Res Pract*. 2017;213(10):1276–81.
195. Hu S, Xie Y, Zhou N, Jin L, Tan Y, Liu D, et al. Expression of T-cell Immunoglobulin- and Mucin-domain- containing Molecules-1 and -3 ( Tim-1 and Tim-3 ) in *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*. 2011;16:373–81.
196. Wang F, Mao Z, Liu D, Yu J, Wang Y, Ye W, et al. Overexpression of Tim-3 reduces *Helicobacter pylori*-associated inflammation through TLR4/NFκB signaling in vitro. *Mol Med Rep*. 2017;15(5):3252–8.
197. McClain MS, Shaffer CL, Israel DA, Peek RM, Cover TL. Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric cancer. *BMC Genomics*. 2009;10(1):1–14.

198. Israel DA, Salama N, Arnold CN, Moss SF, Ando T, Wirth HP, et al. *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray influence host inflammatory responses. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;107(5):611–20.
199. Fischer W, Windhager L, Rohrer S, Zeiller M, Karnholz A, Hoffmann R, et al. Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: Genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(18):6089–101.
200. Crabtree JE, Ferrero RL, Kusters JG. The mouse colonizing *Helicobacter pylori* strain SS1 may lack a functional *cag* pathogenicity island. *Helicobacter*. 2002;7(2):139–40.
201. Lee A, O’rourke J, de Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A Standardized Mouse Model of *Helicobacter pylori* Infection: Introducing the Sydney Strain. Vol. 112, *GASTROENTEROLOGY*. 1997.
202. Alpízar-Alpízar W, Skindersoe ME, Rasmussen L, Kriegbaum MC, Christensen II, Lund IK, et al. *Helicobacter pylori* colonization drives urokinase receptor (UPAR) expression in murine gastric epithelium during early pathogenesis. *Microorganisms*. 2020;8(7):1–20.
203. Javed S, Skoog EC, Solnick J v. Impact of *Helicobacter pylori* Virulence Factors on the Host Immune Response and Gastric Pathology. In: Backert S, editor. *Molecular Mechanisms of Inflammation: Induction, Resolution and Escape by Helicobacter pylori* [Internet]. Springer; 2019. p. 21–52. Available from: <http://www.springer.com/series/82>
204. Aydın EM, Demir TD, Seymen N, Said SS, Oktem-Okullu S, Tiftikci A, et al. The crosstalk between *H. pylori* virulence factors and the PD1:PD-L1 immune checkpoint inhibitors in progression to gastric cancer. *Immunol Lett*. 2021 Nov 1;239:1–11.
205. Wu J, Zhu X, Guo X, Yang Z, Cai Q, Gu D, et al. *Helicobacter urease* suppresses cytotoxic CD8+T-cell responses through activating Myh9-dependent induction of PD-L1. *Int Immunol*. 2021 Sep 1;33(9):491–504.
206. Mommersteeg MC, Yu BT, van den Bosch TPP, von der Thüsen JH, Kuipers EJ, Doukas M, et al. Constitutive programmed death ligand 1 expression protects gastric G-cells from *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Helicobacter*. 2022 Oct 1;27(5).

207. Li Y, Hu X, Lin R, Zhou G, Zhao L, Zhao D, et al. Single-cell landscape reveals active cell subtypes and their interaction in the tumor microenvironment of gastric cancer. *Theranostics*. 2022;12(9):3818–33.
208. Yang Y, He W, Wang ZR, Wang YJ, Li LL, Lu JZ, et al. Immune Cell Landscape in Gastric Cancer. *Biomed Res Int*. 2021;2021.
209. Molina-Castro S, Pereira-Marques J, Figueiredo C, Machado JC, Varon C. Gastric cancer: Basic aspects. Vol. 22, *Helicobacter*. Blackwell Publishing Ltd; 2017.
210. Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, Kim KM, Ting JC, Wong SS, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med*. 2015 May 1;21(5):449–56.
211. Zhang D, He W, Wu C, Tan Y, He Y, Xu B, et al. Scoring system for tumor-infiltrating lymphocytes and its prognostic value for gastric cancer. *Front Immunol*. 2019;10(JAN).

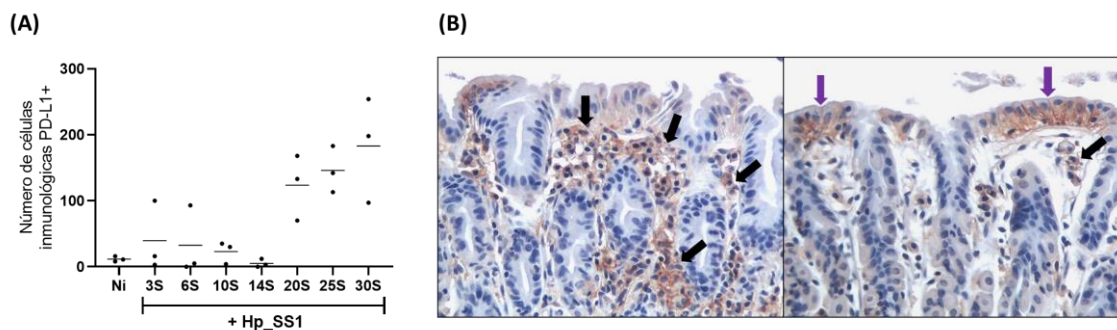


## Anexos

### Anexo 1 - Moléculas inmunorreguladoras: nombres, acrónimos y sinónimos (en inglés)

Receptor					Ligand				
Gene	Protein Acronym	Name	CD	Protein Family	Gene	Protein Acronym	Name	CD	Protein Family
<i>PDCD1</i>	PD-1	Programmed Cell Death 1	CD279	Immunoglobulin superfamily	<i>PDCD1L1</i>	PD-L1	Programmed Cell Death Ligand 1	CD274	B7 family
						B7-H1	B7 homolog 1		
<i>CTLA4</i>	CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4	CD152	CD28 family (Ig superfamily)	<i>CD80</i>	B7-1	T-Lymphocyte Activation Antigen CD80	CD80	B7 family
						<i>CD86</i>	B7-2		
<i>TIGIT</i>	TIGIT	T Cell Immunoreceptor with Ig and ITIM Domains		Immunoglobulin superfamily	<i>PVR</i>	PVR	Poliovirus Receptor	CD155	Nectin / Nectin-like family (Ig superfamily)
						Necl-5	Nectin-Like Protein 5		
Unknown					<i>CD276</i>	B7-H3	B7 homolog 3	CD276	B7 family
<i>ICOS</i>	ICOS	Inducible T Cell Co-stimulator	CD278	CD28 family (Ig superfamily)	<i>ICOSLG</i>	ICOSL	Inducible T Cell Co-stimulator Ligand	CD275	B7 family
						B7-H2	B7 homolog 2		
<i>BTLA</i>	BTLA	B And T Lymphocyte Attenuator	CD272	Immunoglobulin superfamily	<i>TNFRSF14</i>	TNFRSF14	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 14	CD270	TNF Receptor Superfamily
						HVEM	Herpes Virus Entry Mediator		
<i>TNFRSF9</i>	TNFRSF9	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 9	CD137	TNF Receptor Superfamily	<i>TNFSF9</i>	TNFSF9	Tumor Necrosis Factor Superfamily Member 9		TNF Superfamily
	4-1BB					4-1BB Ligand			
<i>LAG3</i>	LAG-3	Lymphocyte Activating Gene 3 Protein	CD223	Immunoglobulin superfamily	<i>LGALS3</i>	Gal-3	Galectin 3		Galectin family
<i>HAVCR2</i>	TIM-3	T-Cell Immunoglobulin and Mucin Domain-Containing Protein 3	CD366	TIM family	<i>LGALS9</i>	Gal-9	Galectin 9		Galectin family
	HAVCR-2	Hepatitis A Virus Cellular Receptor 2							

## Anexo 2 - Expresión proteica de PD-L1 en mucosa y submucosa gástrica murina al colonizarse con *H. pylori*




(A) Cuantificación del número de células PD-L1 positivas en mucosa y submucosa gástrica murina a las 3, 6, 10, 14, 20, 25 y 30 semanas post-inoculación de la cepa SS1 de *H. pylori* (Prueba H de Kruskal-Wallis con  $p=0.0221$ ). (B) Tinciones de inmunohistoquímica para PD-1 en mucosa y submucosa gástrica murina donde se observa que hay células inmunológicas (flechas negras) y células epiteliales gástricas (flechas moradas) positivas. **Fuente:** Estos resultados son parte del Trabajo Final de Graduación del estudiante de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica Eugenio Calvo Monge que pretende defender en julio del 2023.

## Anexo 3 – Aprobación del Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica

 <p>UNIVERSIDAD DE COSTA RICA</p>	<p>CEC Comité Ético Científico</p>
<p>30 de enero de 2020 CEC-21-2020</p>	
<p>Ph.D. Warner Alpizar Alpizar Investigador Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas</p>	
<p>Estimado Señor:</p>	
<p>El Comité Ético Científico (CEC) en su sesión No.162 celebrada el 23 de enero de 2020 sometió a consideración el proyecto de investigación "Efecto de la infección por <i>Helicobacter pylori</i> sobre marcadores inmunológicos, moleculares y microbianos clínicamente relevantes para la predicción de la respuesta a agentes inmunoterapéuticos en cáncer gástrico".</p>	
<p>Después del análisis respectivo, los miembros del CEC-UCR acuerdan:</p>	
<p><b>Acuerdo N°2.</b> Declarar <u>aprobado</u> el proyecto de investigación "Efecto de la infección por <i>Helicobacter pylori</i> sobre marcadores inmunológicos, moleculares y microbianos clínicamente relevantes para la predicción de la respuesta a agentes inmunoterapéuticos en cáncer gástrico". <b>Acuerdo Firme</b></p>	
<p>Quedamos en la entera disposición de colaborar ante cualquier consulta. Sin más por el momento, se suscribe cordialmente,</p>	
<p>Atentamente,</p>	
	
<p>M.Sc. Alfonso Chacón Mata Presidente Comité Ético Científico</p>	
<p>ACHM/dha C. Lic. José Pablo Mora Jiménez, Gestor de proyectos, Vicerrectoría de Investigación Archivo</p>	
<p>Adjunto: Formulario de consentimiento informado</p>	
<p>Tel: 2511-4201   Correo electrónico: CEC@ucr.ac.cr   Portal de Investigación: www.vinv.ucr.ac.cr.   Dirección: Cuarto piso de la Biblioteca Luis Demetrio Tinoco. Sede Rodrigo Facio.</p>	

## Anexo 4 – Aprobación del Comité Ético Científico de la Caja Costarricense del Seguro Social

 <b>CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL</b> Comité Ético Científico Central Teléfono: 2519-3044 / Fax 2220-1560	
28 de noviembre de 2019 CEC-CENTRAL-CCSS-9876-2019	
Dr. Warner Alpizar Alpizar Investigador	
<b>Asunto: Resultado de revisión de modificaciones solicitadas por el Comité en oficio CEC-CENTRAL-CCSS-4563-2019 del 10 de junio de 2019 al Protocolo R019-SABI-00215: Aprobado</b>	
Tipo de solicitud:	Revisión de modificaciones
Número(s) de sesión(es):	044-11-2019
Fecha(s) sesión(es):	18 de noviembre de 2019
Nombre de los miembros del Comité que participaron en la revisión de este protocolo de investigación:	Dr. Denis Landaverde Recinos Dr. Alfredo Sanabria Castro Dra. Floribeth Madrigal Méndez Dra. Angelina Sandoval Dinarte MA. Yamileth Chaves Soto
Título de la investigación:	Efecto de la infección por <i>Helicobacter pylori</i> sobre marcadores inmunológicos, moleculares y microbianos clínicamente relevantes para la predicción de la respuesta a agentes inmunoterapéuticos en cáncer gástrico (ITCG)
Número protocolo CCSS:	R019-SABI-00215
Nombre del investigador principal:	Dr. Warner Alpizar Alpizar
Nombre de los sub-investigadores:	Dr. Allan Ramos Esquivel Dr. Javier Mora Rodríguez Dra. Vanessa Ramírez Mayorga Dra. Clas Allan Une Dra. Silvia Molina Castro Dra. Wendy Malespín Bendaña Dra. Lucía Figueroa Protti Dr. Ricardo Chinchilla Monge Dr. Carlos Santamaría Quesada Dr. Jose Molina Mora Dr. Rodrigo Mora Rodríguez Dr. Steve Quirós Barrantes Dra. Elvira Salas Hidalgo Dra. Giovanna Mainieri Breedy Dr. Alexander Sánchez Cabo Dr. Marvin Yglesias Rosales Dra. Katherine Alfaro Segura Dra. Noelia Mora Rodríguez Dr. José Miguel Ramírez Valverde Dr. Diego Guillén Colombari Dra. Karina Sosa Barrantes Dr. Adolfo Ortiz Barboza Dr. Eduardo Alfaro Alcocer Dr. Fernando Brenes Pino Dr. Eduardo Trujillo Hering Dr. José Murillo Rodríguez



**CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL**  
Comité Ético Científico Central  
Teléfono: 2519-3044 / Fax 2220-1560

28 de noviembre de 2019  
CEC-CENTRAL-CCSS-9876-2019

	Dra. Dayè Rodríguez Bolaños
Nombre del patrocinador:	Universidad de Costa Rica, Caja Costarricense de Seguro Social
Número de protocolo del patrocinador (si aplica):	No aplica
Nombre del CRO (si aplica):	No aplica
Nombre del coordinador (si aplica):	No aplica
Nombre del tutor institucional (solo para investigaciones para optar por un título académico):	No aplica
Nombre de centro(s) asistencial(es) donde se realizará la investigación:	Hospital Max Peralta y Hospital México
Número de participantes propuesto por centro(s) asistencial(es):	Aproximado de 150 pacientes
Duración de la investigación (en meses):	60 meses
Versión del protocolo revisado:	Versión 02 de 04 de noviembre de 2019
Versión del consentimiento informado revisado (si aplica):	Versión 02 de 04 de noviembre de 2019
Versión del asentimiento informado revisado (si aplica):	No aplica
Versión de la Hoja de recolección de datos	Versión 02 de 04 de noviembre de 2019
Versión del anuncio de publicidad revisado (si aplica):	No aplica
Resolución del comité	<b>Aprobado.</b> Fecha de resolución de la revisión: <b>18 de noviembre de 2019.</b> No. de Sesión: 044-11-2019. <b>Importante: Usted podrá iniciar esta investigación hasta que presente el documento de exención de pago de canon o comprobante de pago de canon y reciba el oficio de la autorización de las Direcciones Médicas de los Hospitales Max Peralta y México y del Consejo Interinstitucional de Investigación (CCSS/UCR, Cláusula Novena del Convenio Marco) y el acuerdo de Transferencia de Muestras Biológicas.</b>

Estimado doctor Alpízar, me permito trasladarle la resolución del Comité Ético Científico Central.

**“CAPÍTULO V. REVISIÓN DE PROTOCOLO DIFERIDOS -----**

**ACUERDO 8.** Los señores Dennis Landaverde Recinos, Isidro José Arias Porras, Manuel Enrique Rojas Fernández y las señoras Floribeth Madrigal Méndez, Angelina Sandoval Dinarte, Yamileth Chaves Soto y Carmen María González Murillo, votan por aprobar el estudio. El señor Alfredo Sanabria Castro, vota por diferir el estudio, hasta que presente una propuesta de Acuerdo de MTA, por tanto, se acuerda aprobar el estudio y solicitan que la Secretaría Técnica le comunique al investigador y le recuerde que no puede iniciar el estudio hasta que presente el documento de exención de pago de canon o comprobante de pago de canon y reciba el oficio de la autorización de las Direcciones Médicas de los Hospitales Max Peralta y México y del Consejo Interinstitucional de Investigación (CCSS/UCR, Cláusula Novena del Convenio Marco) y el acuerdo de Transferencia de Muestras Biológicas. **ACUERDO FIRME.** -----



**CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL**  
Comité Ético Científico Central  
Teléfono: 2519-3044 / Fax 2220-1560

28 de noviembre de 2019  
CEC-CENTRAL-CCSS-9876-2019

Al ser este estudio una investigación compartida entre una entidad pública y la CCSS, regirá lo establecido en esta materia por el convenio marco vigente (si existe); en cuyo caso el investigador principal deberá:

- i) Si es funcionario de la CCSS seguir la siguiente ruta:
  - (a) Dirigir un oficio con la petición a la Dirección Ejecutiva del CENDEISSS para que se convoque al Consejo Interinstitucional de Investigación si estuviera normado, si no fuera así la Dirección Ejecutiva deberá canalizar dicho oficio y la carta de entendimiento a la asesoría legal para su revisión y emisión de criterio legal.
  - (b) Aportar la aprobación ético-científica del CEC-CENTRAL-CCSS (COM I).
  - (c) Aportar el protocolo de investigación aprobado por el CEC-CENTRAL-CCSS (AP-II).
  - (d) Presentar una propuesta preliminar de carta de entendimiento entre las instituciones participantes, para más información sobre este tema sírvase contactar al Área de Gestión de la Investigación al email: [inves2931@ccss.sa.cr](mailto:inves2931@ccss.sa.cr) Teléfonos: 2519-3028, 2519-2039 y 2519-3087 para la asesoría correspondiente.
- ii) Si no es funcionario de la CCSS, consultar a la instancia correspondiente de la institución colaboradora, con el fin de conocer el procedimiento a seguir.

También, le recuerdo realizar el "Proceso para la solicitud ante el CONIS de EXENCIÓN DEL CANON de una investigación" <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/consejos/conis>. O bien, le recomiendo pagar el 3% del presupuesto total del estudio por transferencia SINPE, esto para luego completar los requisitos de registro ante el CONIS del estudio y posteriormente entregarle a usted los documentos aprobatorios del estudio.

Las cuentas del CONIS son las siguientes:

**CUENTAS BANCARIAS CUENTAS BANCARIAS DEL CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD (CONIS) PARA EL PAGO DE CANON**

**INSTITUCIÓN:** Consejo Nacional de Investigación en Salud (CONIS)

**CÉDULA JURÍDICA N°** 3-00-7-691611

**ENTIDAD BANCARIA:** Banco Nacional de Costa Rica

**Cuenta en colones N°** 100012020005217

**Cuenta cliente N°** 15120210010005219

**Cuenta en dólares N°** 100022020003783

**Cuenta cliente N°** 15120210020003782

En el asunto indicar: Pago de canon y su nombre.

En caso de duda o requerir alguna aclaración, favor comunicarse con el Subárea de Bioética en Investigación al +506-2519-3044 o a las siguientes direcciones electrónicas - [msanchero@ccss.sa.cr](mailto:msanchero@ccss.sa.cr) - [jjacobo@ccss.sa.cr](mailto:jjacobo@ccss.sa.cr) y [mcarvajal@ccss.sa.cr](mailto:mcarvajal@ccss.sa.cr)

Cordialmente,

MAUREEN CARVAJAL  
CALDERON (FIRMA)

Firmado digitalmente por  
MAUREEN CARVAJAL CALDERON  
(FIRMA)

Fecha: 2019.11.29 09:54:59 -06'00'


**MSc. Maureen Carvajal Calderón**  
**Secretaría Técnica CEC-CENTRAL-CCSS**



CEC-CENTRAL-CCSS/MCC

Cc: Archivo

## Anexo 5 – Aprobación del Consejo Nacional de Investigación en Salud



**CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACION EN SALUD**  
San José, Calle 16, avenidas 6 y 8, Edificio Norte, Primer piso

San José, 06 de mayo de 2022  
CONIS-125-2022  
Página 1 de 1

Señores  
CEC-CENTRAL CCSS

Doctor  
Warner Alpizar Alpizar  
Investigador Principal


Estimados señores:

En la sesión ordinaria N° 22 modalidad virtual, por medio de la plataforma Teams, del 04 de mayo de 2022, mediante el acuerdo N° 6 se aprobó la solicitud de registro de inscripción del protocolo R019 SABI-00215 Estudio: “Efecto de la infección por *Helicobacter pylori* sobre marcadores inmunológicos, moleculares y microbianos clínicamente relevantes para la predicción de la respuesta a agentes inmunoterapéuticos en cáncer gástrico (ITCG).” Investigador principal: Dr. Warner Alpizar Alpizar y se le solicita subsanar en los documentos la duración del estudio según corresponda  
**Votación:** Aprobado por unanimidad y en firme.

Cordialmente,

PRISCILA  
UMAÑA ROJAS  
(FIRMA)

Firmado  
digitalmente por  
PRISCILA UMAÑA  
ROJAS (FIRMA)



**Dra. Priscilla Umaña Rojas**  
Presidente suplente  
Consejo Nacional de Investigación en Salud (CONIS)


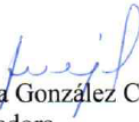


C. Archivo

---

Apdo. Postal 10123 – 1000 SJ, CR  
[www.ministeriodesalud.go.cr](http://www.ministeriodesalud.go.cr)

Tel (506) 2256-5201  
Email. [conis@misalud.go.cr](mailto:conis@misalud.go.cr)

## Anexo 6 – Aprobación del Comité Institucional del Cuido y Uso de Animales de la Universidad de Costa Rica

	UNIVERSIDAD DE COSTA RICA	<b>CICUA</b>	Comité Institucional de Cuido y Uso de Animales
11 de junio de 2018 CICUA-23-2018			
Lucía Figueroa Protti CIEMic			
Estimada señora:			
El Comité Institucional de Cuido y Uso de Animales (CICUA), en su sesión 179-2018, del 31 de mayo del 2018, valoró el proyecto “Identificación de moléculas inmunoreguladoras inducidas por la bacteria <i>Helicobacter pylori</i> en modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> ”.			
Este Comité considera que el proyecto no necesita aprobación del CICUA, ya que no va a utilizar animales vivos o sus partes, dado que el material a utilizar es un preparado.			
Atentamente,			
 Dra. Sara González Camacho Coordinadora			
NGS			
C. Dr. Fernando García, Vicerrector de Investigación Archivo			
 2018 Las Universidades Públicas por la Autonomía, la Regionalización y los Derechos Humanos			
Número de teléfono <a href="http://www.xx.ucr.ac.cr">http://www.xx.ucr.ac.cr</a> dirección electrónica			