

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL PUNTO DE CONTROL INMUNOLÓGICO
TNFRSF9 EN TEJIDO GÁSTRICO DE UN MODELO MURINO INFECTADO CON
HELICOBACTER PYLORI Y DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA
GÁSTRICO.

Trabajo final de graduación sometido a la consideración de la Comisión del Programa de
Posgrado en Especialidades en Microbiología para optar el grado y título de Especialidad
en Inmunología Clínica

MELISSA CHAN CHENG

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2026

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mi familia, en gratitud al apoyo que siempre me han dado en cada paso académico que he realizado.

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi mamá, cuya perseverancia y constante apoyo fueron fundamentales para que pudiera culminar este trabajo de graduación.

A mi familia, amigos y compañeros de trabajo, gracias por su constante presencia, apoyo emocional y comprensión, especialmente en los momentos más exigentes de este proceso.

Agradezco sinceramente a mi tutor y a los lectores de este trabajo, por sus valiosas guías, enseñanzas y paciencia, que enriquecieron enormemente este proceso académico.

También extiendo mi gratitud a las personas del CIEMIC y del Programa de Epidemiología del Cáncer del INISA, por brindarme el espacio y la colaboración invaluable que hicieron posible el desarrollo de este proyecto.

Este trabajo final de graduación fue aceptado por la Comisión del Programa de Posgrado en Especialidades en Microbiología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Especialidad en Inmunología Clínica.

PhD. Warner Alpizar Alpizar
Profesor tutor

MSc. Lucía Figueroa Protti
Lectora

PhD. Silvia Molina Castro
Lectora

MSc. Ingrid Salas Campos
Directora
Programa de Posgrado en Especialidades en Microbiología

PhD. Javier Mora Rodríguez
Representante de la Coordinación
Especialidad en Inmunología Clínica

Melissa Chan Cheng
Sustentante

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTO	III
TABLA DE CONTENIDO	V
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE CUADROS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
INTRODUCCIÓN	1
MARCO DE REFERENCIA	1
A. CÁNCER GÁSTRICO	1
1. <i>Epidemiología del cáncer gástrico</i>	<i>1</i>
2. <i>Clasificación del cáncer gástrico</i>	<i>3</i>
3. <i>Factores de riesgo del cáncer gástrico</i>	<i>6</i>
4. <i>Prevención y tratamientos del cáncer gástrico</i>	<i>8</i>
B. HELICOBACTER PYLORI	10
1. <i>Generalidades de Helicobacter pylori</i>	<i>10</i>
2. <i>Papel de Helicobacter pylori en carcinogénesis</i>	<i>11</i>
3. <i>Diagnóstico y tratamiento de Helicobacter pylori</i>	<i>13</i>
C. PUNTOS DE CONTROL INMUNOLÓGICO	15
1. <i>Puntos de control inmunológico</i>	<i>15</i>
2. <i>Bloqueadores de punto de control inmunológico</i>	<i>16</i>
D. TNFRSF9	18
1. <i>Generalidades de TNFRSF9</i>	<i>18</i>
2. <i>Papel de TNFRSF9 en enfermedades</i>	<i>20</i>
3. <i>Opciones terapéuticas: agonistas de TNFRSF9</i>	<i>22</i>

JUSTIFICACIÓN	24
PROBLEMA.....	27
PREGUNTA	28
OBJETIVOS.....	29
A. OBJETIVO GENERAL.....	29
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
MARCO METODOLÓGICO.....	30
A. MATERIALES	30
B. METODOLOGÍA	33
RESULTADOS.....	39
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIÓN.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	68
ANEXOS	82

RESUMEN

La infección por *Helicobacter pylori* representa un factor de riesgo clave en la carcinogénesis gástrica. Este estudio evaluó la expresión del punto de control inmunológico TNFRSF9 (CD137) en tejidos gástricos murinos infectados con *H. pylori* y en muestras humanas con adenocarcinoma gástrico. Se intentó estandarizar un protocolo de inmunohistoquímica, aunque el anticuerpo utilizado no mostró especificidad adecuada, por lo que se redirigió el análisis hacia la expresión de ARNm mediante PCR. En el modelo murino, no se observaron diferencias significativas en la expresión de TNFRSF9 según el tiempo de infección, grado de inflamación o carga bacteriana, aunque sí se detectó una mayor expresión en tejidos con metaplasia. En humanos, se evidenció una expresión significativamente mayor de TNFRSF9 en tejido tumoral respecto al no tumoral, sin diferencias entre tipos histológicos ni estadios tumorales. Estos hallazgos sugieren que TNFRSF9 podría estar asociado a procesos de transformación tisular y modulación inmunológica, lo que lo posiciona como un potencial biomarcador en cáncer gástrico.

ABSTRACT

Helicobacter pylori infection is a major risk factor in gastric carcinogenesis. This study assessed the expression of the immune checkpoint protein TNFRSF9 (CD137) in gastric tissues from *H. pylori*-infected mice and human samples with gastric adenocarcinoma. Efforts to standardize an immunohistochemistry protocol were unsuccessful due to inadequate antibody specificity, leading to a transition toward mRNA expression analysis by PCR. In the murine model, no significant differences in TNFRSF9 expression were found based on infection duration, inflammation score, or bacterial load, although higher expression was observed in tissues with metaplasia. In human samples, TNFRSF9 expression was significantly elevated in tumor tissue compared to adjacent non-tumor tissue, with no differences across histological types or tumor stages. These findings suggest that TNFRSF9 may be linked to tissue transformation and immune modulation, highlighting its potential as a biomarker in gastric cancer.

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. CLASIFICACIÓN DE ADENOCARCINOMAS SEGÚN EL SISTEMA DE LAUREN Y DE LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (BERLTH ET AL., 2014).	4
CUADRO 2. CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LOS RATONES C57BL/6 EMPLEADOS PARA ESTUDIO CON PCR.....	32
CUADRO 3. SECUENCIAS DE CEBADORES EMPLEADAS EN LA PCR CUANTITATIVA EN HUMANOS	36
CUADRO 4. SECUENCIAS DE CEBADORES EMPLEADAS EN LA PCR CUANTITATIVA EN RATONES	36
CUADRO 5. ÍNDICES DE ESTABILIDAD PARA DIFERENTES GENES HOUSEKEEPING.....	36
CUADRO 6. CRITERIO PARA DETERMINAR PUNTAJE DE INFLAMACIÓN EN LÁMINAS DE TEJIDO MURINO GÁSTRICO (ROGERS, 2012).	37
CUADRO 7. CRITERIO PARA DETERMINAR PUNTAJE DE INFECCIÓN EN LÁMINAS DE TEJIDO MURINO GÁSTRICO.....	38
CUADRO 8. RESUMEN DE HALLAZGOS HISTOLÓGICOS EN TEJIDOS GÁSTRICOS MURINOS SEGÚN INFECCIÓN POR <i>H. PYLORI</i> , PUNTAJE INFLAMATORIO Y CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA.	39
CUADRO 9. CONDICIONES EVALUADAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA CON EL ANTICUERPO PRIMARIO PA5-116949 (S = SEMANAS) ..	44
CUADRO 10. RESUMEN DE HALLAZGOS HISTOLÓGICOS EN LOS PACIENTES DE CÁNCER GÁSTRICO DEL HOSPITAL MAX PERALTA.	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN DE LA INCIDENCIA DE CÁNCER POR TIPO EN COSTA RICA, AÑO 2022 (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2022).....	2
FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN DE LA MORTALIDAD POR TIPO DE CÁNCER EN COSTA RICA, AÑO 2022 (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2022).....	3
FIGURA 3. EL PAPEL DE TNFRSF9 EN LAS CÉLULAS INMUNITARIAS DENTRO DEL MICROAMBIENTE TUMORAL (HASHIMOTO, 2021).	20
FIGURA 4. EXPRESIÓN RELATIVA DE ARNm DE TNFRSF9 EN TEJIDO GÁSTRICO DE RATONES NO INFECTADOS Y RATONES INFECTADOS CON <i>HELICOBACTER PYLORI</i> EN DISTINTOS TIEMPOS POST-INFECCIÓN. SE MUESTRAN VALORES INDIVIDUALES Y LA MEDIANA DE CADA GRUPO (N = 25; PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS, P = 0.1789).	40
FIGURA 5. EXPRESIÓN RELATIVA DE ARNm DE <i>TNFRSF9</i> EN TEJIDO GÁSTRICO DE RATONES SEGÚN EL PUNTAJE DE INFLAMACIÓN HISTOLÓGICA. SE MUESTRAN VALORES INDIVIDUALES Y LA MEDIANA DE CADA GRUPO (N = 23; KRUSKAL-WALLIS, P = 0.0288).	41
FIGURA 6. EXPRESIÓN RELATIVA DE ARNm DE TNFRSF9 EN TEJIDO GÁSTRICO DE RATONES SEGÚN LA MORFOLOGÍA HISTOLÓGICA OBSERVADA. SE MUESTRAN VALORES INDIVIDUALES Y LA MEDIANA DE CADA GRUPO (N = 23; PRUEBA DE MANN-WHITNEY UNILATERAL, P = 0.0010).	42
FIGURA 7. EXPRESIÓN RELATIVA DE ARNm DE TNFRSF9 EN TEJIDO GÁSTRICO DE RATONES SEGÚN EL PUNTAJE DE INFLAMACIÓN POR <i>HELICOBACTER PYLORI</i> . SE MUESTRAN VALORES INDIVIDUALES Y LA MEDIANA DE CADA GRUPO (N = 23; PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS, P = 0.0199).....	43
FIGURA 8. EXPRESIÓN RELATIVA DE ARNm DE TNFRSF9 EN TEJIDO GÁSTRICO TUMORAL Y NO TUMORAL DE PACIENTES HUMANOS. SE MUESTRAN VALORES INDIVIDUALES Y LA MEDIANA DE CADA GRUPO (N = 80; PRUEBA DE WILCOXON PAREADA UNILATERAL, P = 0.0353).....	46
FIGURA 9. DISTRIBUCIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE ARNm DE <i>TNFRSF9</i> EN TEJIDO GÁSTRICO HUMANO SEGÚN EL TIPO HISTOLÓGICO DE CÁNCER. SE MUESTRAN VALORES INDIVIDUALES Y LA MEDIANA DE CADA GRUPO (N = 38; PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS, P = 0.7508).....	48

FIGURA 10. EXPRESIÓN RELATIVA DE ARNm DE TNFRSF9 EN TEJIDO GÁSTRICO HUMANO SEGÚN LA ETAPA CLÍNICA DEL CÁNCER. SE MUESTRAN VALORES INDIVIDUALES Y LA MEDIANA DE CADA GRUPO (N = 38; PRUEBA DE MANN-WHITNEY BILATERAL, P = 0.5588).

..... 49

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
BPCI	Bloqueadores de punto de control inmunológico
<i>cagA</i>	Gen asociado a la citotoxina A
CagPAI	Isla de Patogenicidad Cag
CG	Cáncer gástrico
EBV	Virus de Epstein Barr
ERG	Enfermedad de reflujo gastroesofágico
FDA	Food and Drug Administration
IARC	Agencia Internacional de Investigación en Cáncer
IFN	Interferón
II	Intervalo de incertidumbre
IL	Interleuquina
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCI	Puntos de control inmunológico
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cualitativa
TIC	Tasa de incidencia corregida por edad por cada 100 000 habitantes en un año
TI-Treg	Linfocitos T reguladores infiltrados en tumor
TMC	Tasa de mortalidad corregida por edad por cada 100 000 habitantes en un año
TNFRSF9	Miembro 9 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, sinónimos: CD137 o 4-1BB
Treg	Linfocito T regulador
Tc	Linfocito T citotóxico
<i>vaca</i>	Citotoxina vacuolizante

INTRODUCCIÓN

MARCO DE REFERENCIA

A. Cáncer gástrico

1. Epidemiología del cáncer gástrico

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, siendo el responsable de aproximadamente 1 de cada 6 muertes en el mundo (Bray et al., 2024). Según los datos más recientes del 2022, CG es el quinto cáncer con mayor incidencia (968 784 casos) y el quinto más mortal a nivel mundial (660 175 muertes). Las incidencias más altas se observan en Asia, con 691 791 casos (tasa de incidencia corregida por edad por cada 100 000 habitantes en un año (TIC): 8.7 y 71.4 % de los casos a nivel mundial), seguida por Europa con 135 610 casos (TIC: 6.6; 14.0 % de los casos a nivel mundial) y en tercer lugar Latinoamérica y el Caribe con 74 379 casos (TIC: 6.6; 7.7 % de los casos a nivel mundial). Adicionalmente, la incidencia a nivel mundial es mayor en hombres (627 458 casos, TIC: 12.8) que en mujeres (341 326 casos, TIC: 6.0), siendo dos veces más común en los hombres que en las mujeres (Bray et al., 2024). La tasa de incidencia aumenta progresivamente con la edad, siendo los 68 años la edad promedio de diagnóstico (Rodríguez et al., 2024). Sin embargo, en los últimos años ha habido un aumento en el diagnóstico de menores de 50 años, sobre todo en las personas nacidas entre 1980 y 1994, en donde la incidencia es aproximadamente el doble que en las nacidas en la década de 1950 (Sundar et al., 2025).

Los tres países con las TIC más altas de CG a nivel mundial son: Mongolia, con una TIC de 35.5 (1 000 casos), Japón, con una TIC de 27.6 (126 724 casos) y la República de Corea con una TIC de 27.0 (29 267 casos). En cuanto a la incidencia absoluta de CG, los países con mayor número de casos son: China, con 358 672 casos; Japón, con 126 724 casos; e India, con 64 611 casos. Respecto a la tasa de mortalidad corregida por edad (TMC), los tres países con los valores más altos por cada 100 000 habitantes son: Mongolia, con una TMC de 31.5 (854 muertes); Tayikistán, con 16.7 (1 021 muertes); e Irán, con 15.4 (13 845 muertes). A nivel mundial, Costa Rica se ubica en el puesto 13 en TIC con 13.97 y en la posición 23 en TMC con 9.53 (Bray et al., 2024).

En Costa Rica, el CG es el cuarto cáncer más común luego del cáncer de próstata, de piel no melanoma y de mama (**Figura 1**); y es el más mortal seguido por el cáncer colorrectal

y de próstata (**Figura 2**) (Bray et al., 2024). En el año 2022, las provincias con mayor tasa de incidencia por cada 100 000 habitantes en Costa Rica fueron, en el caso de las mujeres, San José (10.38), Puntarenas (8.39) y Alajuela (7.10). Además, en los hombres las tasas de incidencia más elevadas se registraron en San José (14.93), Puntarenas (12.69) y Guanacaste (10.71). Además, la tasa de incidencia en el sexo femenino (7.57) es menor en comparación a la masculina (11.54), lo cual concuerda con las estadísticas a nivel mundial (Ministerio de Salud de Costa Rica, 2023). Por otro lado, las tasas más elevadas de mortalidad por CG desde 1990 al 2022 en Costa Rica se registran en el sur y el este de la Gran Área Metropolitana, así como en el cantón de Hojancha (provincia de Guanacaste) (Vanegas et al., 2025).

Absolute numbers, Incidence, Both sexes, in 2022
Costa Rica

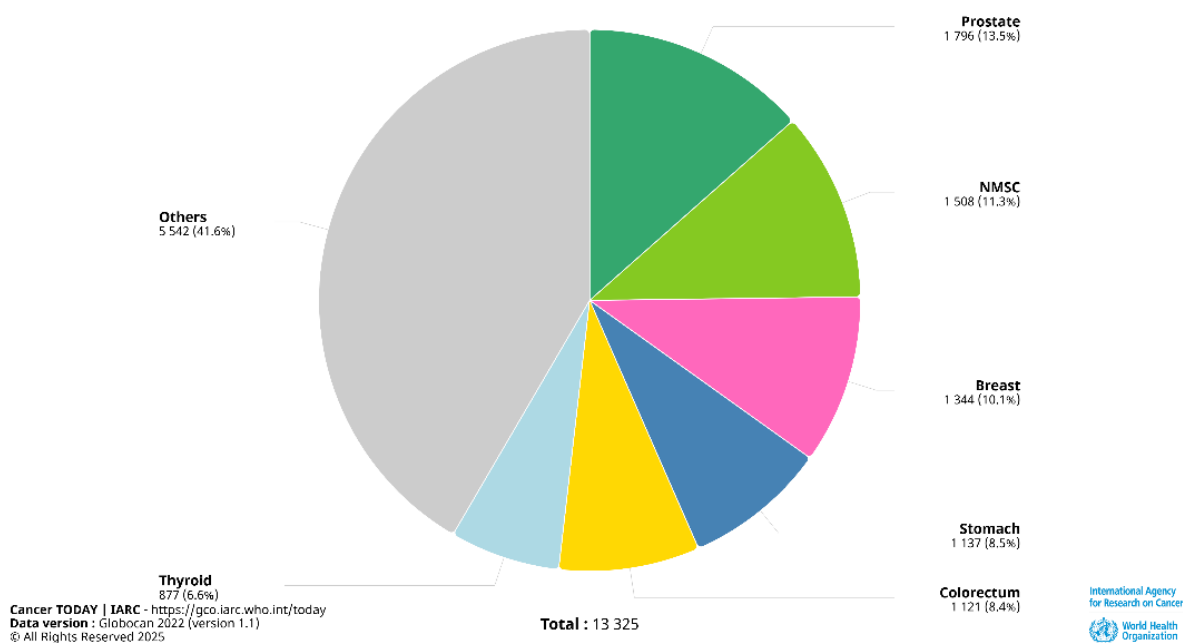


Figura 1. Distribución de la incidencia de cáncer por tipo en Costa Rica, año 2022
(International Agency for Research on Cancer, 2022)

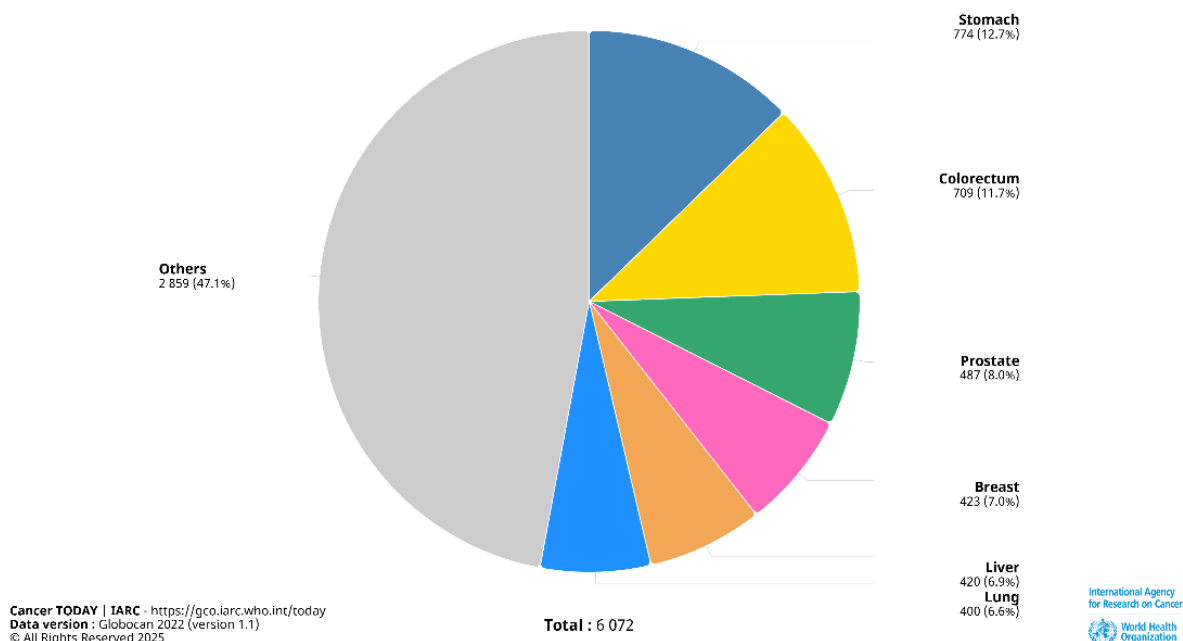


Figura 2. Distribución de la mortalidad por tipo de cáncer en Costa Rica, año 2022 (International Agency for Research on Cancer, 2022)

Las tasas de supervivencia a los 5 años para el CG son de aproximadamente un 20% para la mayoría de los países en el mundo, con excepción de Japón, en donde la tasa es mayor al 70% para los CG en etapa I y II. Estas altas tasas pueden explicadas por la implementación desde hace varias décadas de programas de tamizaje poblacional en Japón. La sobrevida en los CG asociados con el virus de Epstein-Barr (que constituye un 9% de los casos) es mejor, mientras que no es de muy buen pronóstico en fumadores, ya que estos por lo general desarrollan otras complicaciones adicionales (Karimi et al., 2014).

2. Clasificación del cáncer gástrico

Existen varias clasificaciones histológicas del CG, entre las más conocidas están la de Lauren y la de la Organización Mundial de la Salud (OMS). La clasificación de Lauren es de las más utilizadas, en donde se dividen los adenocarcinomas en tres subtipos: intestinal, difuso y mixto. El CG intestinal es el tipo más común (aproximadamente 54% de los casos) y se caracteriza por glándulas visibles y cohesión entre las células tumorales. El segundo CG más predominante es el difuso, el cual comprende células poco cohesivas que infiltran

difusamente la pared gástrica con poca o sin formación de glándulas. Finalmente, el menos frecuente es el CG mixto, que agrupa todos aquellos con histología infrecuente (Cisło et al., 2018; Machlowska et al., 2020). El CG intestinal ocurre principalmente en adultos mayores masculinos, mientras que el CG difuso es más común en jóvenes y no hay diferencias marcadas entre sexos. La patogénesis del CG difuso es menos entendida y presenta un mayor componente hereditario (Gullo & Carneiro, 2019).

La clasificación del CG según la OMS se basa netamente en la apariencia histomorfológica y describe otros tumores gástricos además de los adenocarcinomas. Los adenocarcinomas se dividen en: papilar, tubular, mucinoso y carcinoma de células en anillo de sello. El adenocarcinoma tubular se subdivide en 3 categorías: bien diferenciado, moderadamente diferenciado y poco diferenciado (Lai et al., 2016). Comparando la clasificación de Lauren con la de la OMS, los adenomas tubulares y papilares están comprendidos en los CG intestinales, mientras que el carcinoma de células en anillo de sello y otros carcinomas poco cohesivos se clasifican como CG difuso (Cisło et al., 2018) (Refiérase al **Cuadro 1**). La clasificación de la OMS es ampliamente utilizada para el diagnóstico y descripción de neoplasias infrecuentes y es empleada por muchos estudios en donde se investigan las características del CG. El 95% de los CG son adenocarcinomas, seguido por linfomas gástricos (Rawla & Barsouk, 2019). El tipo de carcinoma más común es el adenocarcinoma tubular, seguido por el papilar y luego el mucinoso. El adenocarcinoma de células en anillo de sello comprende aproximadamente un 10% de CG (Berlth et al., 2014).

Cuadro 1. Clasificación de adenocarcinomas según el sistema de Lauren y de la Organización Mundial de la Salud (Berlth et al., 2014).

Clasificación de Lauren	Clasificación de la Organización Mundial de la Salud
Tipo intestinal	Adenocarcinoma papilar Adenocarcinoma tubular Adenocarcinoma mucinoso
Tipo difuso	Carcinoma de células en anillo de sello y otros carcinomas poco cohesivos
Tipo mixto	Carcinoma mixto Carcinoma adenoescamoso Carcinoma de células escamosas Adenocarcinoma hepatoide Carcinoma con estroma linfoide Coriocarcinoma

Clasificación de Lauren	Clasificación de la Organización Mundial de la Salud
	Carcinosarcoma Carcinoma de células parietales Tumor maligno rabdoide Carcinoma mucoepidermoide Carcinoma de células de Paneth Carcinoma indiferenciado Carcinoma mixto adeno-neuroendocrino Tumor de seno endodérmico Carcinoma embrional Tumor gástrico puro de saco vitelino Adenocarcinoma oncocítico

Los adenocarcinomas pueden ser subdivididos también de acuerdo con el sitio anatómico: cardias y no cardias (Rawla & Barsouk, 2019). El estómago se compone de cinco regiones principales: cardias, fondo, cuerpo, antro y píloro. El cardias conecta con el esófago y es donde ingresa el alimento al estómago. El fondo está conectado con el cardias y es la parte superior del estómago. Seguidamente se encuentra el cuerpo, que es la parte más grande del estómago. Más distal se encuentra el antro y finalmente, está el píloro, que drena en el duodeno (Chaudhry et al., 2021; Di Natale et al., 2023). En el mundo por lo general es más común el CG no cardias (que comprende el resto del estómago) que de cardias, teniendo en la mayoría de los países una relación promedio de 2 a 1 (Colquhoun et al., 2015).

Los tumores gástricos también se pueden clasificar según su estadio, a través del sistema TNM del American Joint Committee on Cancer (AJCC). Esta clasificación exceptúa aquellos tumores que inician en la unión gastroesofágica, los que inician en el cardias y se extienden a la unión gastroesofágica, tumores gastrointestinales estromales y los linfomas, los cuales se categorizan de otra manera (American Cancer Society, 2021a). El sistema TNM clasifica a los pacientes según la profundidad de la infiltración del tumor (T), número de nódulos linfáticos metastásicos regionales (N) y el estado de metástasis a otras partes distantes del cuerpo (M). Luego de determinar la clasificación TNM, se le asigna un estadio, en donde la fase inicial del CG es el estado 0 (carcinoma *in situ*) y luego se categoriza del I al IV, en donde menor sea el número, hay menos expansión del cáncer (American Cancer Society, 2021a; M. Zhang et al., 2021).

La tasa de supervivencia a 5 años varía en gran medida según el estadio en la que se diagnostica el tumor. En etapas IA y IB, la tasa de supervivencia a 5 años luego de intervención quirúrgica es por lo general de un 94% y un 88%, respectivamente. Por el contrario, para tumores en fase IIIC tratados con cirugía, la tasa de supervivencia a 5 años es mucho menor, siendo solo un 18%. La mayoría de los casos que se diagnostica en fases metastásicas (estadio IV) tienen una tasa de supervivencia muy baja (Rawla & Barsouk, 2019).

3. Factores de riesgo del cáncer gástrico

Los factores de riesgo del CG se pueden dividir en dos tipos: aquellos que no son modificables (como la edad, el género, etnia, historial familiar y presencia de síndromes predisponentes) y los modificables (consumo de tabaco, consumo excesivo de alcohol, dieta, exposición a radiación, infección con *Helicobacter pylori*, entre otros). Así mismo, se puede clasificar a los factores de riesgo por sitio anatómico: cáncer gástrico de cardias y cáncer gástrico no cardias) (Cavatorta et al., 2018).

La mayoría de los CG son esporádicos, y aproximadamente un 3% de los CG presentan predisposición hereditaria. Se considera que el riesgo de padecer CG es 3 veces mayor en pacientes con historial familiar (Machlowska et al., 2020). Las mutaciones hereditarias de ciertos genes como el *CDHI* incrementan el riesgo de CG, la pérdida de una de las copias del gen *CDHI* resulta en CG hereditario difuso, en donde las células malignas proliferan debajo del revestimiento del estómago y, como consecuencia, hacen metástasis (Rawla & Barsouk, 2019).

Otros factores de riesgo para CG de cardias y no cardias son la edad, ser del sexo masculino, fumar tabaco, consumir alcohol y tener exposición a radiación. La tasa de incidencia de CG aumenta progresivamente con la edad, la mayoría de los CG se dan entre los 55 y 80 años (Thrift & El-Serag, 2020). Aunque las tasas globales de cáncer gástrico han disminuido en las últimas décadas, estudios recientes han reportado un aumento en adultos jóvenes (Park et al., 2025). Este cambio podría estar vinculado a gastritis autoinmune y alteraciones en el microbioma gástrico, favoreciendo la aparición de tumores cercanos a la unión gastroesofágica (Bray et al., 2024). Por otro lado, no existe una razón clara, pero se ha visto que los hombres tienen de 2 a 5 veces más riesgo de tener CG que las mujeres. Se ha

observado que los sobrevivientes al desastre de Hiroshima y Nagasaki, así como los sobrevivientes a linfoma de Hodgkin, los cuales han tenido exposición a radiación, tienen mayor riesgo de CG (Cavatorta et al., 2018). Los fumadores poseen hasta un 60% más de riesgo a padecer CG, mientras que las fumadoras tienen un 20% más de probabilidad (Karimi et al., 2014).

La obesidad y la enfermedad de reflujo gastroesofágico (ERG) son factores de riesgo de CG de cardias. Las personas con índices de masa corporal (IMC) menor a 25 tienen un menor riesgo de CG en comparación con aquellas que poseen un IMC entre 30 a 35 (que tienen el doble de riesgo) o un IMC mayor a 40 (los cuales tienen el triple de riesgo) (Cavatorta et al., 2018). Varios mecanismos han propuesto que la grasa abdominal puede directamente ocasionar ERG y también producir compuestos metabólicos como el factor similar a insulina y la leptina, que se han asociado con malignidades, probablemente favoreciendo su proliferación. El ERG está fuertemente asociado con el CG de cardias, llegando a tener un riesgo incrementado entre dos a cuatro veces; el ERG puede causar metaplasia columnar e intestinal con potencial progresión a adenocarcinoma (Karimi et al., 2014).

Dentro de los factores de riesgo de CG no cardias se encuentra la infección por *Helicobacter pylori*. Este microorganismo es considerado carcinógeno clase I de CG por la Organización Mundial de la Salud desde 1994 (Malfertheiner et al., 2023). Varios estudios epidemiológicos han evidenciado el papel de *H. pylori* en la carcinogénesis gástrica, se estima que un 90% de los casos de CG son ocasionados por *H. pylori*. La prevalencia global de *H. pylori* en adultos fue de aproximadamente 43% entre los años 2014 a 2020 (Malfertheiner et al., 2023). La bacteria induce una gastritis crónica que activa vías proinflamatorias y sus factores de virulencia (como CagA, VacA, ADP-heptosa) producen daño genómico y favorecen la inestabilidad genética y epigenética de las células epiteliales. Paralelamente genera pérdida de acidez que resulta en disbiosis lo cual permite la expansión de otros microorganismos pro-oncogénicos y virus asociados (como el virus de Epstein-Barr (EBV), facilitando la progresión desde mucosa sana a metaplasia y cáncer gástrico (Wizenty & Sigal, 2025).

El EBV se asocia aproximadamente con 5 a 10% de los casos de CG. Un metaanálisis de 70 estudios indicó que el CG asociado con EBV es dos veces más común en hombres que en mujeres (Rawla & Barsouk, 2019). El CG asociado con EBV tiene características únicas y es de buen pronóstico debido a los avances en inmunoterapias. Los CG EBV positivos se caracterizan por la expresión de PD-L1 y PD-L2, lo cual favorece su respuesta a inmunoterapias como Pembrolizumab, que bloquea la interacción PD-1 y sus ligandos, como PD-L1 (S. T. Kim et al., 2018).

El EBV por lo general permanece en fase latente sin replicación, sin embargo, durante el proceso de infección fomenta la metilación del ADN, la desregulación de señalización celular, la expresión génica aberrante y la conformación de un microambiente tumoral propicio para la proliferación de las células gástricas infectadas, lo que facilita la formación de CG. Por otro lado, en esta fase latente se expresan productos como EBERs, BARF-0, EBNA-1 y LMP2A, involucradas en la regulación a la baja de la familia miR-200, que resultan en una disminución de la expresión de E-cadherina, la cual es clave para la carcinogénesis gástrica inducida por EBV (Sun et al., 2020).

Por otro lado, se ha visto que hay una asociación significativa entre el consumo de sal, alimentos encurtidos, carnes procesadas y ahumadas con un riesgo incrementado de padecer CG. Altas concentraciones de sal pueden destruir la barrera mucosa del estómago, lo cual puede generar un subsecuente daño e inducir cambios proliferativos o favorecer el efecto de otros carcinógenos como *Helicobacter pylori* (B. Wu et al., 2021). Un consumo elevado de sal puede aumentar el riesgo de CG hasta en un 22%. En las comidas ahumadas se forman hidrocarburos policíclicos aromáticos que se han relacionado con la carcinogénesis gástrica. Mientras que los alimentos procesados y encurtidos favorecen la formación de compuestos N-nitrosos (Karimi et al., 2014).

4. Prevención y tratamientos del cáncer gástrico

Dentro de las estrategias de prevención del CG se encuentra mejorar la dieta. Según la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), el consumo de frutas y una mayor ingesta de vegetales probablemente reduce el riesgo del CG. Las frutas y vegetales son fuentes ricas en folato, carotenoides, vitamina C, que pueden tener un papel protector (Machlowska et al., 2020). Así mismo, se recomienda reducir el consumo

de alimentos con mucha sal, encurtidos, ahumados o altamente procesados y disminuir el consumo de alcohol (Richa et al., 2022).

Otra forma de prevención importante es la erradicación de las infecciones por *H. pylori*. En el ensayo aleatorizado de Linqu (China), con seguimiento 2011–2022 la erradicación confirmada de *H. pylori* se asoció con un riesgo relativo de cáncer gástrico de 0.81 (reducción del 19% en incidencia) frente al grupo control (Pan et al., 2024). La bacteria es capaz de generar gastritis, conllevando a una inflamación crónica de la mucosa gástrica, seguido por atrofia, displasia y finalmente cáncer (Eusebi et al., 2020). Una estrategia secundaria de prevención es la detección temprana, especialmente en países en donde la incidencia es alta. El estándar de oro para el diagnóstico de CG es la endoscopia, la cual tiene mejor sensibilidad que los métodos radiográficos (Machlowska et al., 2020).

Para pacientes con CG que se encuentran localizados, por lo general se combina la intervención quirúrgica y quimioterapia o quimiorradioterapia. La resección puede ser quirúrgica o mediante endoscopia, siendo menos invasiva la última técnica. Los pacientes candidatos a la remoción del tumor de forma endoscópica son aquellos en donde se encuentra bien diferenciado, con un tamaño menor o igual a 2 cm y sin invasión linfática y de la submucosa profunda (Joshi & Badgwell, 2021). Generalmente se emplean tres ciclos de epirubicina, cisplatino y fluoroacilo como quimioterapia pre y post operativa (Ilson, 2019).

En los casos en donde el CG es irresecable o metastásico, como tratamiento se emplea solo quimioterapia o en combinación con inmunoterapia, medicamentos dirigidos o radioterapia. Los medicamentos dirigidos tienen como blanco factores de crecimiento como VEGF (Ramucirumab) y HER2 (Trastuzumab). Por otro lado, la inmunoterapia potencia la respuesta antitumoral, para esto se han creado medicamentos que tienen como blanco los puntos de control inmunológico, como el Pembrolizumab y Nivolumab, que han mostrado beneficio en pacientes de CG cuando se administran solos o en combinación con quimioterapia. Para el caso específico de las terapias sistémicas neoadyuvantes, si luego de este tratamiento la extensión del tumoral de CG ha disminuido lo suficiente, puede considerarse la resección quirúrgica, de lo contrario se continúa con los tratamientos sistémicos para prevenir su expansión y complicaciones posteriores (American Cancer Society, 2021b; Luo et al., 2025).

B. *Helicobacter pylori*

1. Generalidades de *Helicobacter pylori*

H. pylori es un bacilo Gram negativo, con forma espiral que prolifera en el ambiente ácido de la mucosa gástrica (Poh et al., 2016). Se encuentra colonizando aproximadamente más de la mitad de la población mundial, adquiriéndose por lo general en la niñez (Lamont, 2022). Una vez establecida la infección, usualmente persiste de por vida a menos de que sea tratada (Thrift & Nguyen, 2021). A pesar de la alta prevalencia, la mayoría de las personas no presentan síntomas y no van a tener complicaciones. Solo un 30% desarrollan enfermedades gastrointestinales como gastritis, úlceras pépticas y con menor frecuencia CG y linfoma de tejido asociado a mucosas (Lamont, 2022).

H. pylori se transmite principalmente de persona a persona, particularmente en países desarrollados, siendo las vías oral-oral, fecal-oral y gástrica-oral las más reconocidas. Sin embargo, en países en desarrollo con sanitización inadecuada, la transmisión a través de comida y agua contaminada podría ocurrir, generando un mayor contagio con el microorganismo. En muestras de comida se ha encontrado a la bacteria en leche, vegetales, carne, así como en tejidos gástricos de algunos animales como vacas y oveja (Almashhadany et al., 2024; Zamani et al., 2017).

La transmisión oral-oral puede ocurrir por contacto directo como besos, compartir utensilios o contacto estrecho entre personas. Se ha observado que los individuos infectados pueden albergar *H. pylori* en la boca y la saliva, ya sea de forma permanente o transitoria. Por otro lado, la vía gastro-oral es posible debido a la presencia de la bacteria en el estómago y el duodeno, la cual puede facilitarse por mecanismos como la regurgitación o el vómito, lo que permite que *H. pylori* llegue a la boca y se transmita a otras personas mediante contacto oral. Finalmente, la transmisión fecal-oral puede ocurrir cuando heces contaminadas entran en contacto con alimentos o utensilios compartidos. Este tipo de contagio está estrechamente relacionado con condiciones de saneamiento deficiente o malas prácticas de manipulación de alimentos, especialmente en regiones donde la higiene es limitada (Almashhadany et al., 2024).

Los contagios son más prominentes en las zonas rurales en vías de desarrollo, en donde hay más de un 80% de prevalencia, mientras que en las zonas urbanas desarrolladas la

prevalencia es menor al 40%. Estas diferencias se atribuyen a diferencias en factores socioeconómicos y de higiene (Kayali, Manfredi, et al., 2018). Las prevalencias más altas se encuentran en América Central, América del Sur, ciertas partes de Asia y en Europa del Este (Thrift & Nguyen, 2021).

H. pylori causa cambios en el estómago y en el duodeno al infectar el tejido que protege el estómago, esto conlleva a la liberación de enzimas y toxinas que luego dañan estos órganos y los hacen más vulnerables al ácido estomacal (Kayali, Manfredi, et al., 2018).

2. Papel de *Helicobacter pylori* en carcinogénesis

H. pylori fue clasificado como carcinógeno de tipo I desde 1994 por la IARC, lo que posiciona a esta bacteria como un agente etiológico en la carcinogénesis gástrica (Duan et al., 2025). Existen varios estudios en donde se evidencia que personas infectadas tienen hasta seis veces más riesgo de CG no cardíacas (Karimi et al., 2014). Se estima que es el causante de al menos un 75% de los adenocarcinomas. Interesantemente, aunque colonice a más de la mitad de la población mundial, solo un 1 a 3 % de los infectados van a presentar CG. Dentro de los posibles factores que pueden explicar esta baja incidencia de CG es la duración de la infección, la patogenicidad de la bacteria, los polimorfismos en genes que codifican por moléculas pro- o anti-inflamatorias del hospedero y la dieta (Poh et al., 2016).

La patogénesis del CG por *H. pylori* se da gracias a: (1) la acción indirecta de los procesos inflamatorios crónicos generados por la colonización de la bacteria y (2) la acción directa de sus factores de virulencia (Karimi et al., 2014). La activación sostenida de la vía NF- κ B en células epiteliales gástricas, inducida por intermediarios del LPS de *H. pylori* como la ADP-heptosa a través del eje ALPK1/TIFA, promueve la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-8 y la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que generan daño genético y favorecen la inestabilidad genómica. NF- κ B también potencia la supervivencia celular y la proliferación desregulada, contribuyendo a la carcinogénesis gástrica. Además, esta activación induce la secreción de quimioquinas como CCL2, que reclutan monocitos, macrófagos y células dendríticas al sitio de infección, estableciendo un entorno inflamatorio crónico que facilita la persistencia de *H. pylori* y la transformación maligna del epitelio (Zhang et al., 2020).

Así mismo, ocurre una metilación aberrante del ADN de las células epiteliales gástricas paralelamente a la infección por *H. pylori*. La inflamación crónica conlleva a un aumento en el recambio celular, en donde luego de varios años se pueden acumular suficientes errores mitóticos para generar CG (Ishaq & Nunn, 2015). Este mecanismo fue inicialmente descrito por Correa, en donde explica que la inflamación crónica genera gastritis superficial que luego progresa a gastritis atrófica, seguido por metaplasia intestinal (en donde el epitelio gástrico adquiere un fenotipo intestinal), continuando con displasia y culminando con carcinoma invasivo (Correa & Houghton, 2007).

Los factores de virulencia más conocidos son el gen A asociado a citotoxina (*cagA*) y la toxina A vacuolizante (*vacA*), los cuales se han asociado con lesiones precancerosas gástricas (Ishaq & Nunn, 2015). Se ha visto que especialmente las *H. pylori* CagA positivas generan un mayor riesgo en el CG no cardial (Thrift & Nguyen, 2021). CagA actúa como una proteína oncogénica que interactúa con múltiples proteínas de señalización del hospedero, causando una desregulación. En un estudio *in vitro* con células del epitelio gástrico se observó que CagA puede por sí mismo promover la transformación maligna de las células al dotarles la capacidad de proliferación sostenida, evasión de los supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular e inestabilidad genómica (Takahashi-Kanemitsu et al., 2020). Adicionalmente, CagA induce en las células una producción incrementada de interleuquina 8, la cual produce respuestas inflamatorias intensas y la generación de radicales libres que pueden generar más daño (Brasil-Costa et al., 2022).

Además del gen *cagA*, también se han asociado a la patogenicidad de *H. pylori* los genes *vacA*, *iceA* y *babA* (Dadashzadeh et al., 2017). La proteína VacA es una toxina multifuncional que induce vacuolización, formación de canales de membrana, desregulación la función endosomal/lisosomal, apoptosis e inmunomodulación. A diferencia del *cagA*, el *vacA* este está presente en todas las cepas de *H. pylori*, sin embargo, es muy polimórfica. El genotipo s1m1 es más virulento por su mayor capacidad de producir la toxina vacuolizante y por lo tanto genera más inflamación y daño en la mucosa gástrica, siendo mayor el riesgo de CG (Brasil-Costa et al., 2022).

Adicionalmente, otro factor de virulencia es la γ -glutamyl-transpeptidasa (GGT) de *H. pylori*, que es una enzima clave para su persistencia, ya que modula la respuesta inmunitaria

del huésped. Cuando cataliza la hidrólisis de compuestos γ -glutamil, genera metabolitos como el glutamato, el cual activa receptores en células dendríticas e inhibe la señalización de cAMP, promoviendo un fenotipo tolerogénico. Esto reduce la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6 y favorece la diferenciación de células T reguladoras (Tregs), lo que permite a la bacteria evadir la respuesta inmune y mantener una colonización crónica del epitelio gástrico que puede facilitar la progresión hacia lesiones precancerosas (Zhang et al., 2020).

3. Diagnóstico y tratamiento de *Helicobacter pylori*

El diagnóstico de *H. pylori* se puede hacer por métodos invasivos como la detección histológica en la mucosa gástrica y el cultivo y también por métodos no invasivos, como la detección de antígenos en heces, la detección molecular en heces, la prueba de urea en aliento y detección serológica de anticuerpos (esta última ya no está recomendada para diagnóstico debido a que los anticuerpos pueden persistir por varios años) (Crowe, 2019; Q. Zhang et al., 2023).

En las pruebas histológicas se obtiene una biopsia de la mucosa gástrica y se le realizan tinciones con hematoxilina-eosina (HE), Giemsa modificado, Warthin-Starry, Genta o inclusive tinciones inmunohistoquímicas, para visualizar el microorganismo. Las tinciones más recomendadas son las de HE y Giemsa debido a su simplicidad y consistencia, aunque la inmunohistoquímica es útil en ciertas situaciones debido a su alta sensibilidad y especificidad. La histología tiene varias limitaciones, ya que es más costosa en comparación a las pruebas serológicas (por requerir endoscopia e histopatología), el tiempo para el diagnóstico es mayor, la detección depende del analista y la densidad del microorganismo varía según la zona que se haya muestreado (Lee & Kim, 2015).

Las pruebas serológicas se basan en que las personas infectadas con el microorganismo suelen desarrollar anticuerpos IgG, IgA e IgM contra *H. pylori*, y la mayoría de estos ensayos están orientados a detectar anticuerpos de tipo IgG. Esta prueba no se puede emplear para el monitoreo de la efectividad del tratamiento por la persistencia de los anticuerpos a pesar de la erradicación del microorganismo, a diferencia de la prueba de antígeno en heces y la detección de urea en aliento (Kayali, Aloe, et al., 2018). Por otro lado, la detección de

antígenos en heces se hace a través de una mezcla de anticuerpos monoclonales capaces de detectar la presencia de *H. pylori* en el momento de realizar la prueba (Crowe, 2019).

La prueba de urea en aliento es útil para el diagnóstico inicial y para el seguimiento de tratamiento, esta prueba se basa en el hecho de que los humanos no poseen la enzima ureasa, y de poseerla, se debe a la presencia de microorganismos ureasa positivos, como *H. pylori*. La ureasa es capaz de romper la urea en amonio y en dióxido de carbono, el amonio es empleado por *H. pylori* para neutralizar el ácido gástrico. Para la prueba, se emplea urea con carbones marcados, la cual en presencia de *H. pylori*, se va a degradar y el dióxido de carbono marcado es exhalado por el paciente y puede ser detectado con un espectrómetro de masas relación gas-isotopo (medición de isótopo ^{13}C) o un equipo de ionización (medición de isótopo ^{14}C) (Sankararaman & Moosavi, 2021).

Las sensibilidades y especificidades de las pruebas varían, siendo la más específica la detección histológica con un 99% y con una sensibilidad de 95%, con muestreos adecuados e interpretación apropiada. El cultivo se caracteriza por tener una alta sensibilidad de 100%, mientras que la especificidad varía entre el 85 al 95%. La detección de urea en aliento tiene una especificidad y sensibilidad de más de 95%, considerándose el estándar de oro en los métodos no invasivos. Por otro lado, la detección de antígeno de *H. pylori* en heces tiene una sensibilidad de 96% y una especificidad del 97%. La detección serológica de anticuerpos tiene sensibilidad entre 76 al 84% y una especificidad del 79 al 90% (Hussein et al., 2021; Lee & Kim, 2015). Finalmente, la detección molecular de *H. pylori* en heces tiene una sensibilidad de 92% y una especificidad de 96% aproximadamente (Q. Zhang et al., 2023).

Las personas que presentan historial de úlcera péptica, úlcera gástrica o úlcera duodenal debido a *H. pylori* deben ser tratadas para evitar la reaparición de úlceras y permitir que las actuales sanen. Del mismo modo, toda persona con una prueba positiva por *H. pylori* debe ser tratada. La mayoría de los regímenes de tratamiento implica la ingesta de varios medicamentos, incluyendo antibióticos y un inhibidor de bomba de protones por 2 semanas (Lamont, 2024). Dentro de los antimicrobianos más empleados se encuentran: claritromicina, amoxicilina, metronidazol, bismuto, tetraciclina, levofloxacina y nitroimidazol (Randel, 2018).

Es importante indicar que la erradicación de *H. pylori* no siempre previene el CG o permite una regresión de las lesiones preneoplásicas. La infección por este microorganismo puede dejar lesiones atróficas extensas que pueden permanecer, aunque se elimine *H. pylori*, lo cual es un factor de riesgo importante de CG. Como consecuencia, luego de la erradicación de la bacteria se debe dar seguimiento para asesorar una posible conversión a CG (Ishaq & Nunn, 2015).

C. Puntos de control inmunológico

1. Puntos de control inmunológico

Los puntos de control inmunológicos (PCI) son vías de transducción de señal estimuladoras o inhibitorias que mantienen la auto-tolerancia y asisten en la respuesta inmune. El primer PCI inhibitorio se descubrió en 1987 y se nombró antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) (Dobosz & Dzieciatkowski, 2019). Otros ejemplos de vías inhibitorias ampliamente estudiadas es el eje compuesto por el receptor 1 de muerte celular programada 1 (PD-1) y el ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1) (Marin-Acevedo et al., 2021).

La expresión de CTLA-4 es regulada positivamente luego de que se da una señalización a través del receptor de las células T (TCR), con el objetivo de atenuar efectivamente la activación de las células T luego de que se haya dado una respuesta. CTLA-4 compite con la molécula coestimuladora CD28 por los ligandos B7 en la célula presentadora de antígenos, en donde CTLA-4 tiene mayor avidéz y afinidad por estos ligandos. La regulación por la molécula CTLA-4 es fundamental para la tolerancia, tanto así que se ha visto que en modelos murinos en donde hay una delección de este gen, los ratones mueren a las 3 a 4 semanas de edad (Wei et al., 2018).

PD-1 limita la respuesta de las células T activadas para prevenir autoinmunidad. Este se une a los ligandos PD-L1 o PD-L2 que, al ser reconocidos por los linfocitos T CD8⁺, se activan vías de señalización que conllevan a apoptosis y a la disminución de la proliferación de las células T y la producción de citoquinas. A diferencia de CTLA-4, los ligandos de PD-1 (PD-L1 y PD-L2) están expresados significativamente en células tumorales de muchos tipos de cáncer (Ventola, 2017). PD-L1 es una molécula transmembrana que funciona como

un factor pro-tumoral, ya que atenúa la respuesta inmune hacia células tumorales y activa señales proliferativas y de supervivencia en las células tumorales (Han et al., 2020).

2. Bloqueadores de punto de control inmunológico

A pesar de los grandes avances en terapias contra el cáncer, siguen muriendo pacientes, por lo que se requieren tratamientos más efectivos, y dentro de estos, la inmunoterapia ha sido uno de los más prometedores. La inmunoterapia contra el cáncer busca reactivar la respuesta inmune antitumoral, resultando idealmente en la erradicación del cáncer (Ventola, 2017). Bajo condiciones homeostáticas, existe un equilibrio entre señales proinflamatorias y antiinflamatorias, regulado por PCI, que incluyen vías inhibitorias y estimuladoras que modulan directamente la función de las células inmunes. Sin embargo, las células malignas alteran este equilibrio promoviendo un estado inmunosupresor que favorece la evasión inmune y el crecimiento tumoral. Para lograrlo, las células tumorales reclutan linfocitos Tregs, inducen tolerancia y/o apoptosis de las células T, disminuyen la expresión de antígenos tumorales y secretan citoquinas inmunosupresoras que estimulan los PCI inhibitorios, contribuyendo a un microambiente tumoral altamente inmunosupresor (Marin-Acevedo et al., 2021).

Recientemente se han empleado los bloqueadores de punto de control inmunológico (BPCI) para el tratamiento de los tumores debido a su gran eficacia terapéutica y efectos prolongados. A diferencia de otros tratamientos como la quimioterapia, los BPCI son bien tolerados (Ventola, 2017). Se han visto mejoras en pacientes con un gran rango de cánceres como melanoma metastásico, cáncer de pulmón de células no pequeñas y carcinoma de células no renales, en donde se emplean anticuerpos monoclonales humanizados que se dirigen en contra de receptores inhibitorios como CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3 y ligandos como PD-L1, de tal manera que se mejora la actividad antitumoral del sistema inmune (Franzin et al., 2020).

El inicio de las inmunoterapias con BPCI es reciente, siendo el primer BPCI en ser aprobado por la FDA el Ipilimumab (anti-CTLA-4) en el 2011 (Marin-Acevedo et al., 2021). Actualmente, hay 12 BPCI aprobados por la FDA: 2 inhibidores de CTLA-4 (Ipilimumab y Tremelimumab), 6 inhibidores de PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab, Cemiplimab, Dostarlimab, Retifanlimab y Toripalimab), 3 inhibidores de PD-L1 (Atezolizumab,

Durvalumab y Avelumab) y un inhibidor de LAG-3 (Relatlimab) (Alsaafeen et al., 2025). Los BPCIs bloquean las señales inhibitorias que impiden la activación correcta de los linfocitos T reactivos contra tumores, de tal manera que puedan reconocer los antígenos tumorales y montar una respuesta efectiva (Wei et al., 2018).

Actualmente, para el CG los principales blancos terapéuticos para BPCI están dirigidos contra PD-1, PD-L1 y CTLA-4. Entre los fármacos anti-PD-1, Nivolumab ha sido aprobado por la FDA como tratamiento de primera línea en combinación con quimioterapia. Pembrolizumab, otro anti-PD-1, ha sido aprobado como tercera línea para pacientes con expresión positiva de PD-L1 (Puntuación combinada positiva (CPS) ≥ 1) y como primera línea en aquellos con inestabilidad microsatelital alta (MSI-H) o deficiencia en reparación de ADN (dMMR) (Luo et al., 2025). Esta última condición se caracteriza por una alteración en los genes encargados de corregir errores de apareamiento de bases nitrogenadas durante la replicación del ADN, lo que genera una acumulación de mutaciones, especialmente en regiones repetitivas del genoma conocidas como microsatélites. Como resultado, los tumores dMMR presentan una alta carga mutacional y una mayor expresión de neoantígenos, lo que favorece la infiltración de células T positivas para PD-L1 y una mejor respuesta a la inmunoterapia (Joshi & Badgwell, 2021). Además, Pembrolizumab está aprobado en combinación con Trastuzumab y quimioterapia para pacientes HER2 positivos (Luo et al., 2025).

En cuanto a los inhibidores de PD-L1, estos se encuentran en fases clínicas avanzadas. Atezolizumab, ha mostrado eficacia en combinación con quimioterapia en pacientes con cáncer gástrico resecable no metastásico, mientras que Avelumab y Durvalumab que han tenido resultados mixtos. Por otro lado, los inhibidores de CTLA-4 como Ipilimumab y Tremelimumab, que también están en fases clínicas avanzadas, han demostrado actividad antitumoral cuando se combinan con otros BPCI o quimioterapia, aunque su uso en monoterapia no ha sido satisfactorio. Actualmente, se investigan diversas combinaciones de ICI con terapias dirigidas, anticuerpos conjugados, virus oncolíticos e inmunomoduladores, con el objetivo de mejorar la eficacia terapéutica y superar la resistencia tumoral (Luo et al., 2025).

Los cánceres gástricos positivos para EBV constituyen un subtipo molecular distinto, caracterizado por una infiltración abundante de linfocitos T CD8+ y una sobreexpresión de los ligandos PD-L1 y PD-L2. Esta expresión elevada de moléculas inmunorreguladoras sugiere una mayor susceptibilidad al bloqueo de PD-1, lo que convierte a estos tumores en candidatos potenciales para inmunoterapia con inhibidores de puntos de control inmunológico. Diversos estudios han reportado respuestas robustas en tumores EBV positivos tratados con anti-PD-1 (Joshi & Badgwell, 2021). En este contexto, una alta expresión de PD-L1 y PD-1 se ha asociado con mejor pronóstico en pacientes con cáncer gástrico positivo para EBV (Cisło et al., 2018).

D. TNFRSF9

1. Generalidades de TNFRSF9

El miembro 9 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF9) es también conocido como 4-1BB o CD137. Se descubrió en 1989 y fue descrito primeramente como una proteína localizada en la superficie de las células T citotóxicas y cooperadoras activadas (Glorieux & Huang, 2019). TNFRSF9 es una proteína de membrana tipo I glicosilada, su región extracelular está compuesta por cuatro dominios repetidos ricos en cisteína; en la parte citoplasmática, posee un motivo de unión para factores asociados al receptor de TNF (TRAF) (Singh et al., 2024).

Actualmente, se describe como un receptor inmune coestimulador altamente regulado, expresado en distintas células inmunes como las células NK, linfocitos T y B, células dendríticas y macrófagos. Adicionalmente, también puede expresarse de forma inducible en neutrófilos activados, especialmente en contextos de inflamación sistémica. Estudios recientes en modelos murinos han demostrado que la señalización de TNFRSF9 en neutrófilos regula funciones efectoras clave de la inmunidad innata, como la fagocitosis y la actividad microbicida, contribuyendo de manera activa a la respuesta inflamatoria tisular (Tran et al., 2021). Por otro lado, también se ha observado en células endoteliales linfáticas activadas o hipóxicas y en células endoteliales de tumores (Fröhlich et al., 2020).

Los receptores de TNFRSF activan diversas funciones celulares, desde la producción de interferones tipo 1 hasta la modulación de la supervivencia de las células T activadas por

antígeno. TNFRSF9 en específico, participa en la expansión, adquisición de funciones efectoras, supervivencia y desarrollo de células T de memoria. El ligando principal de TNFRSF9, conocido como TNFSF9, 4-1BBL o CD137L, se expresa predominantemente en poblaciones de células presentadoras de antígenos profesionales. Su unión con TNFRSF9 activa vías de señalización intracelular a través de TRAF1 y TRAF2, que a su vez estimulan las rutas de NF- κ B, AKT, p38 MAPK y ERK. Estas vías inducen la expresión de genes relacionados con la supervivencia celular que codifican para survivina, Bcl-2, Bcl-XL y Bfl-1, y reducen la expresión de la proteína proapoptótica Bim (Ward-Kavanagh et al., 2016).

TNFRSF9 se expresa rápidamente en células T CD4⁺ y CD8⁺ tras el reconocimiento antigénico. La coestimulación simultánea de TNFRSF9 y del receptor de células T (TCR) en células T activadas genera señales que promueven la proliferación, supervivencia, formación de memoria y una mayor función efectora, incluyendo citotoxicidad y producción de citocinas. Este efecto es más marcado en células T CD8⁺ que en CD4⁺, convirtiendo a TNFRSF9 en un blanco terapéutico particularmente atractivo para el tratamiento contra el cáncer. Esta coestimulación es esencial para evitar la eliminación clonal o la anergia, fenómenos que limitan que las células T respondan a los antígenos presentados por células tumorales (Hashimoto, 2021).

La estimulación de TNFRSF9 en células inmunes del microambiente tumoral tiene efectos diversos (Hashimoto, 2021):

- **Células NK:** la expresión de TNFRSF9 es inducida por IL-2 e IL-15, que promueve en las células NK la proliferación y producción de IFN- γ , que luego apoya en la activación de las células T.
- **Células T CD8⁺:** Promueve su proliferación, supervivencia, función citotóxica (perforina y granzima) y formación de células T de memoria (CD8⁺ T_m).
- **Células T CD4⁺ y CD8⁺:** Producen IL-2 e IFN- γ tras la activación.
- **Células T reguladoras:** Su respuesta a TNFRSF9 es ambigua; puede inducir su proliferación y cambiar su función a citotóxica o mantener su función inmunosupresora.
- **Monocitos:** la estimulación de TNFRSF9 induce la producción de TNF- α e IL-8, suprime la producción de IL-10 y favorece su diferenciación a células dendríticas

(DCs). En DCs el reconocimiento de TNFSF9 promueve la producción de IL-12 e IL-6. Por otro lado, la señalización de TNFRSF9 también puede polarizar a los monocitos hacia un fenotipo de macrófago M2 y promover la apoptosis de células B.

- **Células B:** La estimulación de TNFRSF9 favorece la producción TNF- α y TNF- β , y también favorece la proliferación y supervivencia de células B, pero no contribuye al cambio de clase.

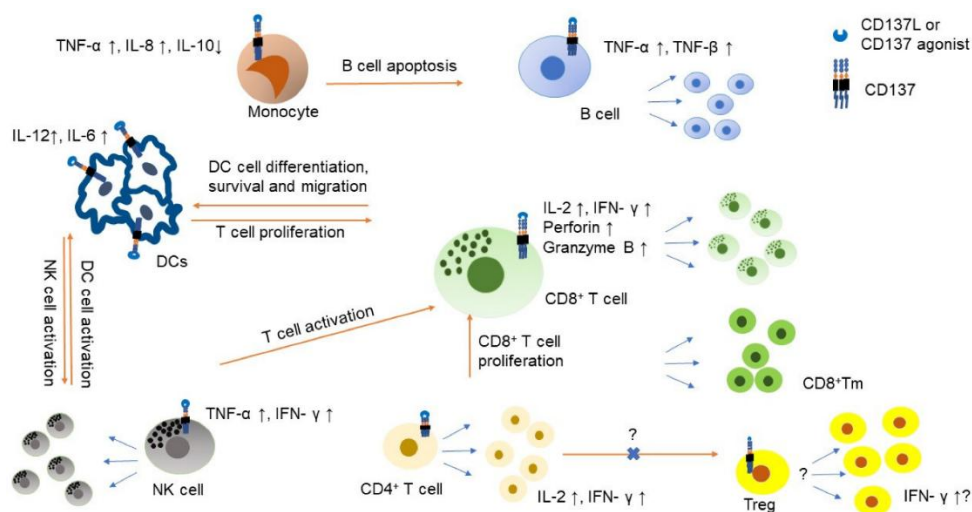


Figura 3. El papel de TNFRSF9 en las células inmunitarias dentro del microambiente tumoral (Hashimoto, 2021).

2. Papel de TNFRSF9 en enfermedades

En el estudio de Cho et al. (2021) se observó que una baja expresión de TNFRSF9 en células T reguladoras infiltradas en el tumor (TI-Tregs) se correlaciona con una mejor supervivencia y una mayor respuesta clínica a inhibidores de punto de control inmunitario, específicamente anti-PD-1, en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas. Estos hallazgos sugieren que TNFRSF9 podría potenciar la actividad inmunosupresora de las Tregs dentro del microambiente tumoral, contribuyendo a la evasión inmunológica del tumor.

Por otro lado, se describe en el trabajo de Glorieux & Huang (2019) que la interacción de TNFRSF9 en células presentadoras de antígeno activadas con su ligando TNFSF9, puede inducir una activación bidireccional. Este mecanismo no solo estimula la maduración de las

células presentadoras de antígenos, sino que también promueve la activación y supervivencia de células T efectoras, fortaleciendo la inmunidad antitumoral.

Adicionalmente, se ha identificado que TNFRSF9 actúa como un supresor tumoral en el cáncer de mama. La expresión de TNFRSF9 se encuentra significativamente disminuida en tejidos tumorales, lo que favorece la progresión de la enfermedad, ya que esta regulación negativa de TNFRSF9 promueve la fosforilación de p38 y la sobreexpresión de PAX6, eventos que contribuyen a la proliferación, supervivencia e invasión de células cancerosas (Xu, 2025). Por el contrario, la sobreexpresión de TNFRSF9 en un modelo murino inyectado con células MCF-7 (células de cáncer de mama) transfectadas con el vector pLV-TNFRSF9 redujo de manera significativa el tamaño tumoral y la malignidad a nivel histológico, en comparación con el grupo control. Este efecto se asoció con mayor expresión proteica de TNFRSF9 y menor expresión de Bcl-2 y PAX6, lo que respalda su potencial como blanco terapéutico en inmunoterapia para cáncer de mama (Liu et al., 2022).

En modelos de infección por el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), se ha demostrado que la ausencia de TNFSF9 provoca una disminución de dos a tres veces en la cantidad de células T CD8⁺ en comparación con ratones de tipo silvestre, aunque estos conservan la capacidad de generar linfocitos citotóxicos y eliminar la infección aguda. Esta reducción también se ha observado en modelos murinos infectados con influenza y gammaherpesvirus, lo que refuerza el papel de TNFSF9 en la optimización de la respuesta antiviral. En humanos, las deficiencias en TNFRSF9 se han asociado principalmente con respuestas comprometidas de células T CD8⁺ frente a infecciones virales. La activación de TNFSF9 favorece la supervivencia de las células T, promueve su proliferación y mantiene respuestas inmunes efectivas, principalmente mediante la supresión de la muerte celular. (Singh et al., 2024).

Sin embargo, también se ha observado que la interacción entre TNFSF9 y TNFRSF9 puede inducir señales inhibitorias en células T, suprimiendo su activación y proliferación. En condiciones tolerogénicas, las células T activadas expresan niveles elevados de TNFSF9 junto con TNFRSF9, lo que permite que TNFSF9 permanezca en la superficie de las células T activadas e interactúe en forma trans con células presentadoras de antígenos que expresan TNFRSF9. Esta interacción puede conducir a la supresión de las células T, aunque los

mecanismos moleculares que median estas señales negativas aún no se comprenden completamente. Estos hallazgos resaltan la complejidad del papel de TNFRSF9 en la regulación de la inmunidad durante infecciones, y su potencial como blanco terapéutico requiere una comprensión precisa de su dinámica funcional (Singh et al., 2024).

3. Opciones terapéuticas: agonistas de TNFRSF9

Según Cho et al. (2021) la inhibición directa de TNFRSF9 para suprimir células T reguladoras infiltradas en el tumor (TI-Tregs) debe abordarse con precaución. La eficacia de los anticuerpos bloqueadores de TNFRSF9 en el control del crecimiento tumoral parece depender del microambiente tumoral. Por ejemplo, en entornos inmunosupresores con alta proporción de Tregs y escasa presencia de células T CD8+, el bloqueo de TNFRSF9 podría favorecer la activación inmunitaria antitumoral al reducir la inmunosupresión. En contraste, en microambientes tumorales inmunogénicos, donde predominan las células T CD8+ sobre las Tregs, el uso de anticuerpos agonistas de TNFRSF9 podría potenciar la respuesta inmunitaria al estimular la supervivencia y función de las células T efectoras. Como consecuencia, es importante conocer la composición celular del microambiente tumoral antes de aplicar estrategias terapéuticas dirigidas a TNFRSF9, ya que el equilibrio entre células T efectoras e inmunosupresoras puede determinar si el bloqueo o la activación de TNFRSF9 será beneficioso para potenciar la inmunidad antitumoral.

En el contexto oncológico, se ha observado que la inmunoterapia agonista dirigida contra TNFRSF9 tiene la capacidad de eliminar tumores como el sarcoma Ag104A, que es poco inmunogénico, y el mastocitoma P815, que tiene una capacidad elevada para inducir o promover la formación de tumores (Chester et al., 2018). Esto sugiere que el bloqueo de TNFRSF9 puede tener efectos en ciertos tipos de cáncer.

Actualmente hay dos anticuerpos agonistas del TNFRSF9, el Urelumab y el Utomilumab, los cuales no se emplean aún en la clínica debido a la posible toxicidad hepática, en el caso de Urelumab, o por la menor eficacia de Utomilumab (H. Zhang et al., 2020). A pesar de la limitación de la actividad clínica de Urelumab a una dosis tolerable, dicha hepatotoxicidad puede reducirse mediante la administración intratumoral de los anticuerpos agonistas, disminuyendo la exposición sistémica (Chester et al., 2018). Adicionalmente, Urelumab, ha sido evaluado tanto como monoterapia como en combinación

con otros fármacos (incluyendo Rituximab, Cetuximab, Elotuzumab y Nivolumab) a dosis bajas, sin provocar toxicidad hepática. En particular, su combinación con Rituximab en pacientes con linfoma no Hodgkin refractario o en recaída ha demostrado ser segura y bien tolerada, además de mejorar la respuesta inmunitaria del huésped (Mascarelli et al., 2021).

Por otro lado, se están desarrollando nuevas generaciones de anticuerpos agonistas de TNFRSF9 con mecanismos de acción diferenciados para mejorar la eficacia antitumoral y reducir la toxicidad sistémica. Entre ellos se encuentran anticuerpos IgG1 como EU101, AGEN2373, ADG206 y HOT-1030, que varían en su afinidad por receptores Fc γ y en los dominios de unión, lo que influye en su capacidad agonista. También hay anticuerpos IgG4 como ADG106, ATOR-1017, PE0116 y CTX-471, que dependen del entrecruzamiento con receptores Fc γ y difieren en su capacidad para bloquear la interacción con TNFSF9. Finalmente, algunos anticuerpos como LVGN6051 y STA551 incorporan mutaciones en la región Fc para mejorar la selectividad tumoral y minimizar efectos adversos, activándose preferentemente en microambientes tumorales con alta concentración de ATP (Singh et al., 2024).

JUSTIFICACIÓN

Según las estadísticas del 2022, el cáncer gástrico (CG) a nivel mundial es el quinto cáncer más común con 968 784 nuevos casos (4.8%) y la quinta causa de muerte con 660 175 muertes (6.8%) (Bray et al., 2024; International Agency for Research on Cancer, 2022). Entre los años 2000 y 2020, las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer gástrico disminuyeron en la mayoría de los grupos étnicos, aunque en mujeres blancas, hispanas y personas indígenas americanas y nativas de Alaska, las tendencias fueron estables o crecientes. Para 2040, se proyecta un aumento significativo tanto en la incidencia (15.5% en hombres y 12.1% en mujeres) como en la mortalidad (18.9% en hombres y 10.6% en mujeres) (Huang et al., 2024). Estos datos reflejan la persistente carga global del cáncer gástrico y su posible incremento en las próximas décadas, lo que resalta la importancia de estudiar aspectos relacionados con la génesis, progresión del cáncer gástrico, así como potenciales biomarcadores diagnósticos, pronósticos y predictivos de respuesta a terapia de relevancia clínica.

El CG tiene una etiología compleja, que involucra factores ambientales, genéticos y microbiológicos en su patogénesis. Entre estos últimos, destaca *Helicobacter pylori*, una bacteria Gram negativa cuyo reservorio natural es el estómago humano. Desde 1994, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) la clasificó como carcinógeno del grupo I (Duan et al., 2025). Se estima que entre un 2-3% de los individuos con *H. pylori* desarrollan eventualmente CG y que aproximadamente el 50% de la población mundial alberga esta bacteria (Díaz et al., 2018; Duan et al., 2025). Considerando su alta prevalencia y que está implicada en el desarrollo de CG, es esencial profundizar en los mecanismos mediante los cuales *H. pylori* contribuye al desarrollo del CG, con el fin de avanzar en estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento más efectivos.

Los pacientes con CG en etapas tempranas por lo general no presentan síntomas o estos son inespecíficos, lo que se refleja en el hecho de que más de un 70% de los pacientes se presentan con CG avanzado al momento del diagnóstico (Tan, 2019). Los tratamientos actuales han permitido que la tasa de supervivencia a los 5 años posteriores al diagnóstico sea de un 60% para el CG en etapa IA, 80% para los tumores IB; para los tumores en fase III, la tasa de supervivencia a los 5 años varía entre el 18 a 50% (Sexton et al., 2020). Lo

anterior recalca la necesidad de identificar marcadores biológicos que permitan predecir la evolución del CG y/o que puedan ser utilizados como nuevos blancos terapéuticos.

Los bloqueadores de punto de control inmunológico (BPCI) son una estrategia de la inmunoterapia que ha revolucionado el tratamiento de tumores. Hasta la fecha, la FDA ha aprobado el uso de BPCI dirigidos contra cuatro moléculas diferentes: CTLA-4, PD-1, PD-L1 y LAG-3 (Alsaafeen et al., 2025). Estos novedosos tratamientos han logrado aumentar la supervivencia de los pacientes con cáncer, generando respuestas muy eficaces, duraderas y un perfil de seguridad manejable (Rotte et al., 2018). Los pacientes que responden tienen una regresión significativa del tumor (Bagchi et al., 2021). Sin embargo, esta respuesta favorable en pacientes que reciben BPCI se observa en un 40–70 % en ciertas neoplasias malignas, como el melanoma, el linfoma de Hodgkin y los tumores con alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H), mientras que en la mayoría de los demás tipos de cáncer puede ser tan baja como entre el 10 % y el 25 % (Alsaafeen et al., 2025). En CG estas terapias se han utilizado principalmente en fases avanzadas (Kono et al., 2020). No obstante, la tasa de respuesta es limitada, siendo menos del 20%, lo cual reitera la importancia de buscar nuevas estrategias (Joshi & Badgwell, 2021).

Actualmente, se han descrito más de 40 puntos de control inmunológico (PCI), pero pocos se han estudiado en CG. Dentro de estos puntos de control, se encuentra el miembro 9 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF9, llamado también 4-1BB o CD137), el cual es un nuevo blanco atractivo para la inmunoterapia contra el cáncer porque en modelos murinos se ha visto que su activación estimula fuertemente a los linfocitos T CD8⁺, promoviendo su proliferación, producción de citocinas y resistencia a la apoptosis. Además, puede modular funciones inmunosupresoras y facilitar la infiltración de células inmunes al tumor (Fröhlich et al., 2020).

A pesar del creciente interés en los PCI, son escasos los estudios que han explorado su relación con *H. pylori* en el contexto de la carcinogénesis gástrica. En particular, poco se ha investigado sobre cómo esta bacteria podría influir en la expresión de TNFRSF9, un PCI con potencial terapéutico. Por ello, este estudio busca dilucidar si *H. pylori* regula la expresión de TNFRSF9 en modelos murinos infectados en distintos intervalos de tiempo, así como evaluar su expresión en tejido gástrico de pacientes con adenocarcinoma gástrico.

Los modelos murinos son ventajosos porque son animales pequeños, de bajo costo, se reproducen rápido y pueden ser genéticamente manipulados (Cheon & Orsulic, 2011). A diferencia de los modelos de cáncer genéticamente definidos, los modelos de ratones en donde se induce el cáncer con carcinógenos presentan una mayor inestabilidad genómica, resultando en un microambiente fisiológicamente más relevante.

En esta investigación se utilizaron ratones C57BL/6 que se han inoculado con *Helicobacter pylori*, un modelo ampliamente empleado para estudiar la patogénesis del cáncer. Aunque la infección crónica por *H. pylori* en ratones no conduce típicamente al desarrollo de adenocarcinoma gástrico, este modelo reproduce alteraciones patológicas tempranas y respuestas inmunológicas comparables a las observadas en infecciones humanas, como la inflamación crónica y cambios epiteliales (K. Zhang et al., 2025). En conjunto, estas características permiten investigar los mecanismos moleculares e inmunológicos que preceden al desarrollo del cáncer gástrico humano.

PROBLEMA

Aunque *H. pylori* es un impulsor clave de la carcinogénesis gástrica, no se conoce cómo la infección modifica la expresión del gen de TNFRSF9 (un regulador clave en células T) en la mucosa gástrica de un modelo murino infectado. Del mismo modo, en humanos con adenocarcinoma gástrico tampoco se ha determinado si existe un cambio en la expresión de este punto de control inmunológico entre tejido tumoral y no tumoral. Esta falta de evidencia limita la comprensión del papel de TNFRSF9 en la inflamación, la metaplasia y la progresión tumoral, así como su potencial utilidad como biomarcador o diana terapéutica.

PREGUNTA

¿Cómo varía la expresión del punto de control inmunológico TNFRSF9 en tejido gástrico de un modelo murino infectado con *Helicobacter pylori* y en pacientes con adenocarcinoma gástrico?

OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión del punto de control inmunológico TNFRSF9 en un modelo de ratones infectados por *H. pylori* y en muestras gástricas humanas de tejido tumoral para comprender su posible participación en los procesos inflamatorios y de transformación tisular asociados a la patogénesis del cáncer gástrico.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar histológicamente los tejidos murinos mediante tinción hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica para detectar *H. pylori*.
2. Evaluar la expresión de *Tnfrsf9* en tejido gástrico de modelos murinos infectados con *H. pylori*, mediante la cuantificación relativa de su transcripción (ARNm).
3. Determinar la expresión proteica de TNFRSF9 mediante inmunohistoquímica en modelos murinos infectados con *H. pylori*.
4. Determinar la expresión relativa de ARNm de *TNFRSF9* en muestras gástricas de pacientes con adenocarcinoma gástrico.

MARCO METODOLÓGICO

A. Materiales

Muestras de ratones para estandarización de inmunohistoquímica

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 Alpizar (Alpizar-Alpizar et al., 2020), en el cual se obtuvo aprobación para el manejo y uso experimental de los animales del “Animal Experiments Inspectorate” del Instituto Finsen del Hospital Universitario de Copenhague (número de permiso: 2010/561-1394 y proyecto P12-165, **Anexo 3**). Los ratones C57BL/6 fueron obtenidos de Taconic (Silkeborg, Dinamarca).

Se utilizaron hembras con edades de entre 6 a 8 semanas que, mediante monitoreo por PCR, se determinó que no estaban infectadas con especies del género *Helicobacter* que colonizan rutinariamente los ratones de bioterios. Para lograr lo anterior, se alimentó a los ratones con comida estéril autoclavada, se mantuvieron en condiciones controladas y se monitorearon por patógenos.

Se utilizó la cepa SS1 de *H. pylori* para inocular a los ratones, la cual está adaptada para la infección en ratones y es *cagA+*, *vacA+*, pero sin funcionalidad de la isla de patogenicidad de *cag* (*cag* PAI) (Crabtree et al., 2002). Esta cepa se cultivó en placas de agar chocolate a 37 °C en condiciones microaerofílicas (5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂). Luego de 48 horas, se recolectó y resuspendió la cepa en 0.85% (m/v) de NaCl y se ajustó a un McFarland de 3 (~10⁸ UFC/mL). Los ratones fueron inoculados con una dosis única de 10⁸ bacterias (UFC) en 0.2 mL de 0.85% NaCl vía oral con una jeringa. Por otro lado, los ratones controles que no iban a ser infectados recibieron 0.2 mL de salina.

Cumplido el tiempo y las condiciones que se definieron (3, 6, 10, 14, 20, 25, 30 semanas post-inoculación con *H. pylori* o salina), se les aplicó eutanasia a los ratones para extraer el tejido gástrico. Los estómagos resecados fueron abiertos y cortados longitudinalmente, para luego ser fijados durante la noche en una solución de 4% de paraformaldehído y posteriormente fueron parafinados. Por último, el tejido fue cortado en secciones de 3 µm

para la determinación de la expresión de la proteína TNFRSF9 mediante inmunohistoquímica.

Muestras de ratones para detección de TNFRSF9 con PCR tiempo real

Para la realización de los experimentos con el modelo murino, se utilizó la cepa de ratones C57BL/6, adquirida en el año 2014 a través de Harlan Laboratories (actualmente Envigo), en el marco de los proyectos de investigación B3-205 y B3-766. Esta cepa se mantuvo en racks ventilados (Techniplast) dentro de las instalaciones del Laboratorio de Ensayos Biológicos (LEBi-UCR), bajo condiciones estándar de iluminación, temperatura y humedad. Se realizó un monitoreo periódico para determinar el estatus de infección por *Helicobacter* spp., y al momento de los experimentos, los animales estaban libres de bacterias del género *Helicobacter*. Las jaulas, el material de cama y el alimento fueron esterilizados, y se proporcionó agua esterilizada de manera ilimitada. Todo el manejo de los animales se llevó a cabo conforme a las normas establecidas por la CICUA de la Universidad de Costa Rica, bajo los permisos CICUA-23-2018 (**Anexo 4**) y CICUA-56-2018 (**Anexo 5**).

La cepa bacteriana utilizada para la inoculación fue *Helicobacter pylori* SS1, adaptada a la fisiología gástrica del ratón, la cual fue donada por el Dr. James Fox del Massachusetts Institute of Technology (MIT). La inoculación se realizó por vía oral (gavage), administrando 0.2 mL de una suspensión bacteriana en solución salina de NaCl al 0.85%, con una concentración aproximada de 10^9 unidades formadoras de colonias (CFU). Los ratones del grupo control recibieron el mismo volumen de solución salina sin bacterias.

Las cepas de *H. pylori* se incubaron a 37 °C en atmósfera microaerofílica (5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂) en Agar Anaerobio de Wilkins-Chalgren (Oxoid) suplementado con eritrocitos humanos, vancomicina, trimetoprima, cefsulodina y anfotericina B. 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.

Para la preparación de la suspensión bacteriana y la inoculación de los animales, se siguieron protocolos estándar previamente descritos en la sección anterior. Los ratones fueron distribuidos en los grupos experimentales correspondientes y se llevaron a cabo estudios de cinética de infección, para lo cual se practicó eutanasia en distintos puntos

temporales, entre las 10 y 50 semanas posteriores a la inoculación (**un segmento** longitudinal del estómago resecado fue colocado en la solución RNAlater y almacenado a 4 °C. Esto con el objetivo de estabilizar el ARN hasta la extracción de ARN.

Cuadro 2). Seguidamente, se extrajo el tejido gástrico, en donde un segmento longitudinal del estómago resecado fue colocado en la solución RNAlater y almacenado a 4 °C. Esto con el objetivo de estabilizar el ARN hasta la extracción de ARN.

Cuadro 2. Condiciones experimentales de los ratones C57BL/6 empleados para estudio con PCR

<i>Grupo</i>	N ratones	<i>H. pylori</i>	Eutanasia
<i>1</i>	4	+	10 semanas post inoculación
<i>2</i>	5	+	20 semanas post inoculación
<i>3</i>	5	+	30 semanas post inoculación
<i>4</i>	4	+	40 semanas post inoculación
<i>Control</i>	5	-	50 semanas

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 postoperatoria a partir del tejido resecado de 38 pacientes mayores de 18 años con adenocarcinoma gástrico. Esto se realizó en el marco de un proyecto registrado ante la Vicerrectoría de Investigación con el número 810-B9-473. 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 6**), el Comité Ético Científico Central de la Caja Costarricense del Seguro Social (**Anexo 7**) y el Consejo Nacional de Investigación en Salud (**Anexo 8**).

Las muestras de tejido fresco de aproximadamente 0.5 cm³ se colocaron en un microvial con 800 µL de la solución de RNAlater (Thermo Scientific), se mantuvieron frías (4°C) durante el transporte y se almacenaron a -80 °C hasta su extracción.

La caracterización histopatológica según su clasificación Lauren y estadio fue realizada por médicos especialistas del Servicio de Cirugía del Hospital Max Peralta.

B. Metodología

En el **Anexo 1** y **Anexo 2** se incluyen los materiales y reactivos necesarios para ejecutar la metodología.

1. Procedimiento

a. Estandarización de protocolo de inmunohistoquímica para detección de TNFRSF9 en mucosa gástrica

Desparafinación del tejido

Las láminas con tejido parafinado fueron sumergidas en xileno durante un período de 30 a 40 minutos. Luego, se procedió a la hidratación mediante una serie de inmersiones sucesivas en alcohol, de la siguiente forma: dos veces en etanol al 99%, dos veces en etanol al 96% y, finalmente, una vez en etanol al 70%. Después, las láminas se enjuagaron con agua de grifo durante 5 minutos.

Recuperación del antígeno

Para la recuperación del antígeno, se ensayaron dos métodos con el fin de determinar con cuál se obtenían mejores resultados. El primero fue un método enzimático, en el cual las láminas se sumergieron en 50 mL de buffer para proteinasa K (precalentado a 37 °C durante al menos 2 horas), al que se le añadieron 12.5 µL de proteinasa K (20 mg/mL). Las muestras se incubaron a 37 °C durante 15 minutos. El segundo método consistió en una recuperación inducida por calor, mediante la inmersión de las láminas en un buffer de pH 9.0 (TEG 10 mM con 0.5 mM EDTA) o pH 6.0 (citrato 10 mM), seguido de una incubación de 15 minutos a 98 °C en el procesador de tejidos. Posteriormente, se dejaron enfriar durante 20 minutos.

Bloqueo de peroxidasa endógena

Tras la recuperación antigénica, las láminas se enjuagaron con agua de grifo durante 5 minutos. Para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena, se sumergieron en una solución de peróxido de hidrógeno al 1% durante 15 minutos. Luego, se realizó un nuevo enjuague con agua de grifo por 5 minutos.

Las láminas se trasladaron a una solución atemperada de TBS-T al 0.5%. Posteriormente, se montaron sobre placas de cubierta Shandon y se colocaron en el soporte correspondiente (soporte Shandon). Se realizaron dos enjuagues adicionales con TBS-T al 0.5%.

Bloqueo con albúmina sérica bovina

Para algunas tinciones se realizó bloqueo con albúmina sérica bovina al 5% durante 30 minutos. Luego se realizaron dos enjuagues con TBS-T al 0.5%.

Adición de anticuerpo primario y secundario

El anticuerpo primario anti-TNFRSF9 (PA5-116949 de Thermofisher) se diluyó en Antibody Diluent (S3022, Dako) en diferentes concentraciones (1:100, 1:200, 1:400, 1:600, 1:800, 1:1000, 1:1200, 1:1500, 1:2000 y 1:2500) para determinar la dilución óptima. A cada lámina se le aplicaron 100 μ L de la dilución correspondiente del anticuerpo primario. Luego, se colocó la tapa del soporte Shandon y se fijó con cinta adhesiva. Las láminas se incubaron durante la noche a 4 °C en el refrigerador.

Finalizada la incubación, se retiró el soporte Shandon del refrigerador y se dejó a temperatura ambiente durante 30 a 40 minutos. Posteriormente, se realizaron dos enjuagues con TBS-T al 0.5% a temperatura ambiente. A continuación, se aplicaron 100 μ L (equivalente a 2 gotas) del anticuerpo secundario anti-conejo (EnVisionRabbit, K4003 de Dako) a cada lámina, seguido de una incubación de 45 minutos. Luego, se repitieron dos enjuagues con TBS-T al 0.5%.

Adición de sustrato cromogénico y contraste de tinción

Para la detección, se preparó el sustrato cromogénico DAB siguiendo las indicaciones del fabricante. A cada lámina se le aplicaron 150 μ L de esta solución y se incubaron durante 9 minutos. Posteriormente, se enjuagaron dos veces con agua Milli-Q.

Para el contraste de la tinción, se añadieron 2 gotas de hematoxilina a cada lámina, con una incubación de 30 segundos, seguida de un enjuague con agua de grifo. Las láminas se desmontaron del soporte Shandon y se transfirieron a un frasco con agua de grifo, donde se enjuagaron durante 5 a 10 minutos.

Deshidratación de tejidos

El proceso de deshidratación se llevó a cabo mediante una serie de inmersiones en alcohol: una vez en etanol al 70%, dos veces en etanol al 96% y, finalmente, dos veces en etanol al 99%. Luego, se añadió el medio de montaje y se colocaron los cubreobjetos. Las láminas se dejaron secando al aire durante un día y, posteriormente, se almacenaron a temperatura ambiente.

Finalmente, se evaluaron los parámetros experimentales para determinar cuáles ofrecían los mejores resultados en la tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-TNFRSF9.

b. Detección de TNFRSF9 en mucosa gástrica murina y humana mediante PCR tiempo real

Extracción de ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez obtenidos, los ARN fueron cuantificados mediante espectrofotometría, evaluando su absorbancia a 260 nm con el equipo Nanodrop. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su utilización.

Retrotranscripción

Para eliminar restos de ADN genómico, el ARN extraído se trató con el kit DNase treatment and removal (Ambion) siguiendo las indicaciones del fabricante. La síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN extraído se realizó utilizando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Este paso permitió obtener el material genético necesario para los análisis de expresión génica.

PCR cuantitativa

Las reacciones de PCR cuantitativa (qPCR) se llevaron a cabo con el reactivo PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) junto con cebadores (primers, **Cuadro 3** y **Cuadro 4**) específicos para los genes de interés de HPRT1, TBP, RPS20 y TNFRSF9. Para la normalización de los datos, se utilizó HRPT1 como gen

de referencia (constitutivo o “housekeeping”), al ser el que tiene mayor estabilidad tanto en humanos como en ratones, asegurando la confiabilidad de los resultados obtenidos. La expresión relativa de los genes se calculó en comparación con la condición control, utilizando el método comparativo $\Delta\Delta C_t$.

Cuadro 3. Secuencias de cebadores empleadas en la PCR cuantitativa en humanos

Gen	Proteína	Cebador hacia adelante	Cebador reverso
<i>HPRT1</i>	HPRT1	TGACACTGGCAAAC AATGCA	GGTCCTTTTCACCAGC AAGCT
<i>TNFRSF9</i>	TNFRSF9	TCTTCCTCACGCTCCG TTTCTC	TGGAAATCGGCAGCT ACAGCCA
<i>TBP</i>	TBP	GGGCATTATTTGTGCA CTGAGA	GCCCAGATAGCAGCA CGGT
<i>RPS20</i>	RPS20	AGGACCAGTTCGAAT GCCTACC	CTCATCTGGAAACGAT CCCACG

Cuadro 4. Secuencias de cebadores empleadas en la PCR cuantitativa en ratones

Gen	Proteína	Cebador hacia adelante	Cebador reverso
<i>Hprt1</i>	HPRT1	CTGGTGAAAAGGACCTCTC GAAG	CCAGTTTCACTAATGACACA AACG
<i>Tnfrsf9</i>	TNFRSF9	CCAAGTACCTTCTCCAGCAT AGG	GCGTTGTGGGTAGAGGAGC AAA
<i>Tbp</i>	TBP	CTACCGTGAATCTTGGCTGT AAAC	AATCAACGCAGTTGTCCGTG GC
<i>Rps20</i>	RPS20	GCAACGTGAAGTCGCTGGA GAA	CCTTCACCACAAGGTGTTTT TCTG

Cuadro 5. Índices de estabilidad para diferentes genes housekeeping

Gen	Índice de estabilidad en humanos	Índice de estabilidad en ratones
<i>HPRT1/Hprt1</i>	0.008	0.005
<i>TBP/Tbp</i>	0.025	0.006
<i>RPS20/Rps20</i>	0.037	0.008

c. Tinción de hematoxilina eosina para determinación de morfología de tejidos murinos analizados por PCR

Las láminas con tejido inmerso en parafina fueron desparafinadas mediante la inmersión en xileno durante un período de 30 a 40 minutos. Posteriormente, se realizó el proceso de hidratación a través de una serie de inmersiones sucesivas en las siguientes soluciones: dos veces en etanol al 99%, dos veces en etanol al 96% y una vez en etanol al 70%. Luego, las láminas se enjuagaron con agua de grifo durante 5 minutos.

A continuación, se tiñeron con hematoxilina de Mayer mediante una inmersión de 5 minutos, seguida de un nuevo enjuague con agua de grifo por el mismo período. Posteriormente, se sumergieron en eosina amarilla al 1% durante 3 minutos y se enjuagaron nuevamente con agua de grifo por 1 minuto. El proceso de deshidratación se llevó a cabo en orden inverso: una vez en etanol al 70%, dos veces en etanol al 96% y dos veces en etanol al 99%. Las láminas se dejaron secar durante 10 minutos y se montaron con medio de montaje y cubreobjetos. Finalmente, se dejaron secando al aire durante un día y se almacenaron a temperatura ambiente.

Estas láminas se emplearon para analizar la morfología e inflamación (**Cuadro 6**) del tejido murino.

Cuadro 6. Criterio para determinar puntaje de inflamación en láminas de tejido murino gástrico (Rogers, 2012).

Puntaje	Característica observada
0	Ausencia de inflamación
1+	Pequeñas islas irregulares o multifocales de células inflamatorias en la mucosa y/o submucosa
2+	Los infiltrados comienzan a fusionarse en múltiples campos microscópicos de alta potencia (objetivo 40x)
3+	Láminas expansivas y/o folículos linfoides en la capa mucosa o submucosa
4+	Extensión de la inflamación a la capa muscular propia y/o adventicia

*d. Tinción de inmunohistoquímica para la detección de *H. pylori* en los tejidos murinos analizados por PCR*

La tinción inmunohistoquímica para la detección de *H. pylori* se realizó siguiendo un protocolo similar al utilizado para la estandarización de la inmunohistoquímica dirigida a TNFRSF9. La principal diferencia radicó en el uso del anticuerpo primario, empleándose un anticuerpo policlonal de conejo anti-*H. pylori* (B0471, Dako) diluido a una concentración de 1:250 (Cn stock: 0.24 g/L). Adicionalmente, la recuperación de antígeno se realizó con proteinasa K por 15 min a 37 °C

Estas láminas se emplearon para determinar el puntaje de infección de *H. pylori* de acuerdo con el **Cuadro 7**.

Cuadro 7. Criterio para determinar puntaje de infección en láminas de tejido murino gástrico

Puntaje	Característica observada
0	Ausencia de bacterias
1+	Pocas bacterias en pocas glándulas
2+	Poca densidad en muchas glándulas
3+	Muchas bacterias en pocas glándulas
4+	Muchas bacterias en muchas glándulas

e. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism versión 7.02 (GraphPad Software, EE. UU.). Se llevaron a cabo comparaciones entre los distintos grupos experimentales mediante pruebas estadísticas como Mann Whitney, Kruskal-Wallis, Wilcoxon y pruebas post-hoc como la de Dunn, según la naturaleza de los datos. Se consideró que existía una diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de p fue menor a 0.05.

RESULTADOS

A) Caracterización histológica de los tejidos murinos mediante tinción hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica para detectar *H. pylori*

En el **Cuadro 8** se muestra un resumen de la caracterización histológica, estado de infección, puntajes de inflamación (según **Cuadro 6**) e infección (según **Cuadro 7**) por *H. pylori* de los ratones analizados.

Cuadro 8. Resumen de hallazgos histológicos en tejidos gástricos murinos según infección por *H. pylori*, puntaje inflamatorio y caracterización microscópica.

<i>Código</i>	<i>Semanas</i>	<i>Cultivo H. pylori</i>	<i>Puntaje de H. pylori</i>	<i>Puntaje de inflamación</i>	<i>Caracterización histológica</i>
<i>ITCG0079</i>	10	Positivo	4+	4+	Metaplasia mucosa focalizada en el cuerpo distal con infiltración severa generalizada en la mucosa y submucosa
<i>ITCG0081</i>	10	Positivo	4+	0	Mucosa gástrica normal
<i>ITCG0082</i>	10	Positivo	2+	0	Mucosa gástrica normal
<i>ITCG0083</i>	10	Positivo	1+	3+	Focos de metaplasia mucosa con infiltración entre moderada y robusta multifocal
<i>ITCG0063</i>	20	Negativo	4+	3+	Metaplasia mucosa con un foco grande cerca de la región de transición escamocolumnar con infiltración robusta en la mucosa generalizada
<i>ITCG0066</i>	20	Negativo	4+	0	Mucosa gástrica normal
<i>ITCG0067</i>	20	Negativo	4+	0	Mucosa gástrica normal
<i>ITCG0069</i>	20	Negativo	0	0	Mucosa gástrica normal
<i>ITCG0070</i>	20	Positivo	0	0	Mucosa gástrica normal
<i>ITCG0058</i>	30	Positivo	1+	1+	Metaplasia mucosa focalizada cerca de la región de transición escamocolumnar con leve infiltración a nivel basal de la mucosa
<i>ITCG0059</i>	30	Positivo	4+	0	Mucosa gástrica normal
<i>ITCG0060</i>	30	Positivo	1+	4+	Metaplasia mucosa e hiperplasia multifocal con infiltración severa en mucosa y en submucosa de manera multifocal
<i>ITCG0061</i>	30	Negativo	4+	0	Mucosa gástrica normal
<i>ITCG0062</i>	30	Positivo	0	0	Mucosa gástrica normal
<i>ITCG0071</i>	40	Positivo	4+	0	Mucosa gástrica normal
<i>ITCG0072</i>	40	Positivo	4+	1+	Mucosa gástrica normal con leve infiltración en mucosa en focos específicos
<i>ITCG0073</i>	40	Positivo	3+	2+	Mucosa gástrica normal con infiltración moderada en mucosa en la parte distal del cuerpo
<i>ITCG0075</i>	40	Positivo	4+	2+	Mucosa gástrica normal con infiltración moderada en mucosa focalizada

Código	Semanas	Cultivo <i>H. pylori</i>	Puntaje de <i>H. pylori</i>	Puntaje de inflamación	Caracterización histológica
ITCG0046	Control	Negativo	0	0	Mucosa gástrica normal
ITCG0047	Control	Negativo	0	0	Mucosa gástrica normal
ITCG0048	Control	Negativo	0	0	Mucosa gástrica normal
ITCG0049	Control	Negativo	0	0	Mucosa gástrica normal
ITCG0050	Control	Negativo	0	0	Mucosa gástrica normal

B) Evaluación de la expresión de *Tnfrsf9* en tejido gástrico de modelos murinos infectados con *H. pylori*

i. Expresión de ARNm de *Tnfrsf9* en tejidos gástricos de ratones infectados con *H. pylori* en función del tiempo de infección

La expresión relativa del ARNm de *Tnfrsf9* se comparó con la del gen constitutivo *Hrpt1* con el fin de determinar la variabilidad en la expresión de *Tnfrsf9*, considerando la expresión de *Hrpt1* como un punto de referencia estable.

Se midió la expresión génica de *Tnfrsf9* en los tejidos de ratones no infectados e infectados con *H. pylori* por 10, 20, 30 y 40 semanas (**Figura 4**, Kruskal-Wallis con $p = 0.1789$). Se determinó que no hay diferencia significativa en la expresión de ARNm de la molécula inmunoreguladora entre los 5 grupos evaluados ($p > 0.05$).

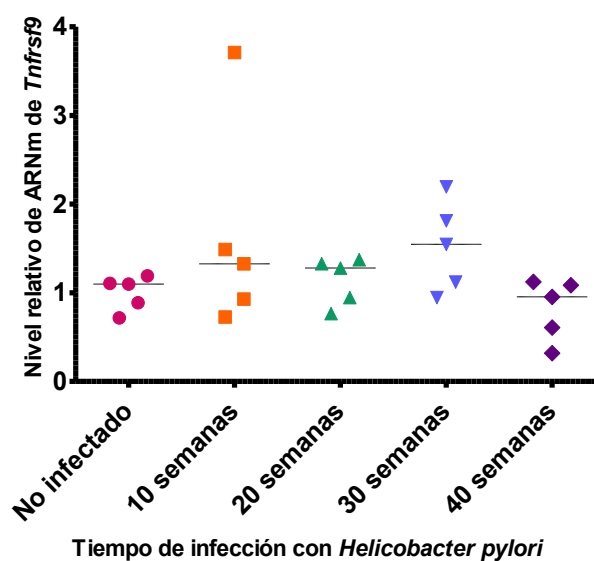


Figura 4. Expresión relativa de ARNm de *Tnfrsf9* en tejido gástrico de ratones no infectados y ratones infectados con *Helicobacter pylori* en distintos tiempos post-infección. Se muestran

valores individuales y la mediana de cada grupo (n = 25; prueba de Kruskal-Wallis, p = 0.1789).

ii. Expresión de ARNm de *Tnfrsf9* en función de la inflamación en tejidos gástricos de ratones

Una vez clasificadas las láminas según su puntaje de inflamación, se procedió a comparar contra la expresión relativa ARNm de *Tnfrsf9* (**Figura 5**, Kruskal-Wallis con p = 0.0288). Los datos a nivel global fueron significativos (p <0.05).

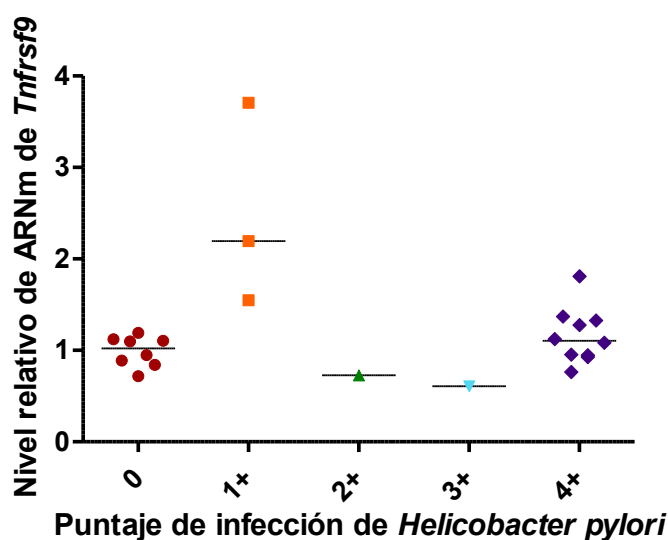


Figura 5. Expresión relativa de ARNm de *Tnfrsf9* en tejido gástrico de ratones según el puntaje de inflamación histológica. Se muestran valores individuales y la mediana de cada grupo (n = 23; Kruskal-Wallis, p = 0.0288).

Sin embargo, al realizar la prueba post-hoc de Dunn, se determinó que no hay diferencia significativa entre ninguno de los grupos.

iii. Expresión de ARNm de *Tnfrsf9* en función de la morfología de tejidos gástricos de ratones

Luego de realizar una caracterización morfológica de los tejidos, se compararon los resultados de ARNm entre los tejidos con morfología gástrica normal y aquellos que presentaron metaplasia (**Figura 6**, Mann Whitney 1-cola, p = 0.0010). La diferencia entre ambos grupos resultó ser significativa.

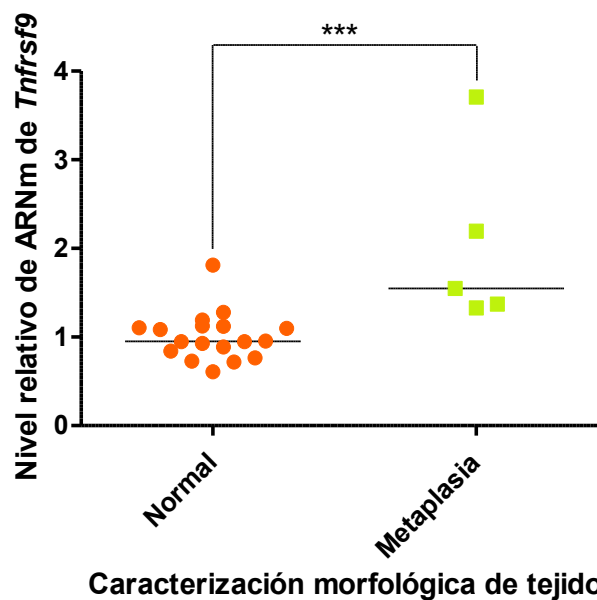


Figura 6. Expresión relativa de ARNm de *Tnfrsf9* en tejido gástrico de ratones según la morfología histológica observada. Se muestran valores individuales y la mediana de cada grupo (n = 23; prueba de Mann-Whitney unilateral, p = 0.0010).

iv. Expresión de ARNm de *Tnfrsf9* en función de la infección por *H. pylori* en tejidos gástricos de ratones

Una vez clasificadas las láminas según se puntaje de infección, se procedió a comparar contra la expresión relativa ARNm de *Tnfrsf9* (**Figura 7**, Kruskal-Wallis con p = 0.0199). Los datos a nivel global fueron significativos (p < 0.05).

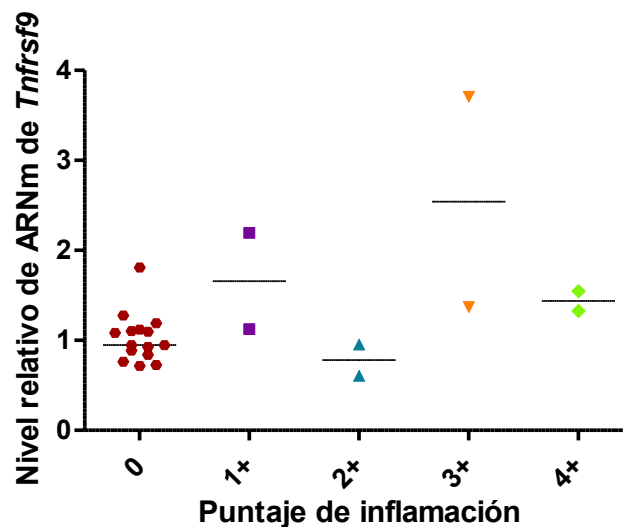


Figura 7. Expresión relativa de ARNm de *Tnfrsf9* en tejido gástrico de ratones según el puntaje de inflamación por *Helicobacter pylori*. Se muestran valores individuales y la mediana de cada grupo (n = 23; prueba de Kruskal-Wallis, p = 0.0199).

Sin, embargo, luego de realizar la prueba post-hoc de Dunn, se determinó que no hay diferencia significativa entre ninguno de los grupos.

C) Determinación de la expresión proteica de TNFRSF9 mediante inmunohistoquímica en modelos murinos infectados con *H. pylori*.

i. Estandarización de la tinción inmunohistoquímica contra TNFRSF9 en tejido gástrico murino

Se realizó una optimización de la tinción inmunohistoquímica contra TNFRSF9 para luego caracterizar la expresión de la proteína TNFRSF9 en tejido gástrico murino infectado con *H. pylori*. Inicialmente se probaron los métodos enzimáticos e inducidos por calor para la recuperación antigénica con el fin de determinar con cuál se obtenían mejores resultados. Para ambos métodos, la incubación se llevó a cabo durante 15 minutos; en el caso del método enzimático (con proteinasa K), se añadieron 2 minutos adicionales para permitir la estabilización de la temperatura dentro de la incubadora. Debido a que se obtuvieron

resultados similares con ambas metodologías, se optó por utilizar el método enzimático con proteinasa K (20 mg/mL) debido a su mayor practicidad.

Seguidamente, se procedió a evaluar la dilución más apta de anticuerpo primario anti-TNFRSF9. Se ensayaron variaciones de la técnica de inmunohistoquímica según el **Cuadro 9**.

Cuadro 9. Condiciones evaluadas para la optimización de la tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo primario PA5-116949 (S = Semanas)

Dilución del anticuerpo	Técnica de recuperación de antígeno y tiempo de incubación	Descripción y origen de los tejidos utilizados
1/100	Buffer TEG 15 min y Proteinasa K 15 min	Ratones infectados por 14 S y no infectados de la misma edad.
1/400	Buffer TEG 15 min	Ratón de 14 S infectado
1/800	Buffer TEG 15 min	Ratón de 30 S infectado
1/200	Buffer Citrato 15 min	Ratón de 14 S infectado Ratón de 30 S infectado
1/400	Proteinasa K 15 min	Ratón de 14 S infectado Ratón de 30 S infectado
1/600	Proteinasa K 15 min	Ratón no infectado Ratón de 14 S infectado Ratón de 30 S infectado
1/800	Proteinasa K 15 min	Ratón no infectado Ratón de 14 S infectado Ratón de 30 S infectado
1/1200	Proteinasa K 15 min	Ratón infectado Ratón no infectado
1/1500	Proteinasa K 15 min	Ratón infectado Ratón no infectado
1/2000	Proteinasa K 15 min	Ratón infectado Ratón no infectado
1/2500	Proteinasa K 15 min	Ratón infectado Ratón no infectado

A partir de los resultados obtenidos, se concluyó que el anticuerpo primario anti-TNFRSF9 elegido no presentó la especificidad necesaria para realizar estudios destinados a describir la cinética de expresión proteica y el patrón de expresión de esta molécula inmunoreguladora en tejido gástrico de ratones. Se observó que este no teñía específicamente

células inmunológicas, sino a otras estructuras como fibroblastos y otras células o estructuras del tejido que no corresponden con lo que se espera en cuando la función de dicha molécula. Por lo tanto, no se realizó la caracterización de la expresión proteica de TNFRSF9 mediante inmunohistoquímica y se enfocó la investigación al análisis de la expresión del gen que codifica por TNFRSF9 a través de PCR en tejido murino y humano.

D) Expresión de ARNm de *TNFRSF9* en muestras gástricas de pacientes con adenocarcinoma gástrico

Se analizaron los niveles de expresión de ARNm de *TNFRSF9* en muestras gástricas emparejadas (tejido tumoral y no tumoral) de pacientes con cáncer gástrico, estratificadas según el tipo histológico y el estadio clínico de la enfermedad.

i. Expresión de ARNm de *TNFRSF9* en tejido tumoral y no tumoral de humanos con cáncer de estómago

A pacientes con cáncer de estómago se le extrajo tejido tumoral y no tumoral adyacente al tumor para realizar la medición de la expresión relativa de ARNm de *TNFRSF9*. Estos datos se analizaron estadísticamente mediante la prueba de Wilcoxon pareada de una cola y se determinó una diferencia significativa entre la expresión de esta molécula entre el tejido tumoral y no tumoral (**Figura 8**, $p = 0.0353$).

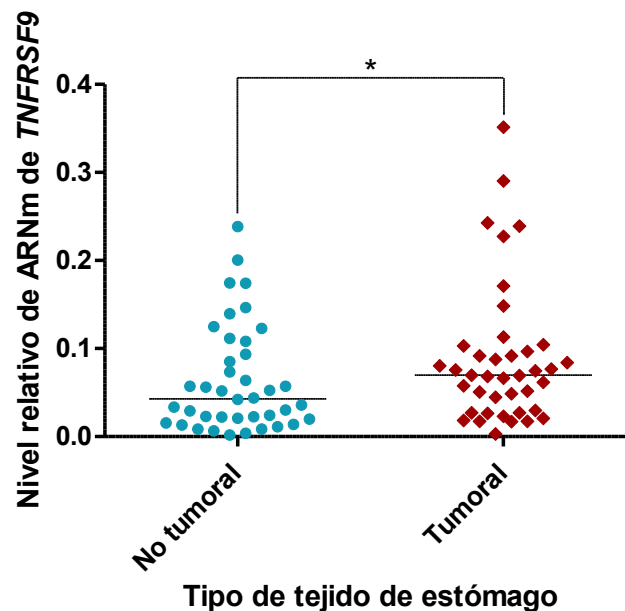


Figura 8. Expresión relativa de ARNm de *TNFRSF9* en tejido gástrico tumoral y no tumoral de pacientes humanos. Se muestran valores individuales y la mediana de cada grupo (n = 80; prueba de Wilcoxon pareada unilateral, $p = 0.0353$).

ii. Expresión de ARNm de *TNFRSF9* en diferentes tipos histológicos de cáncer gástrico en humanos

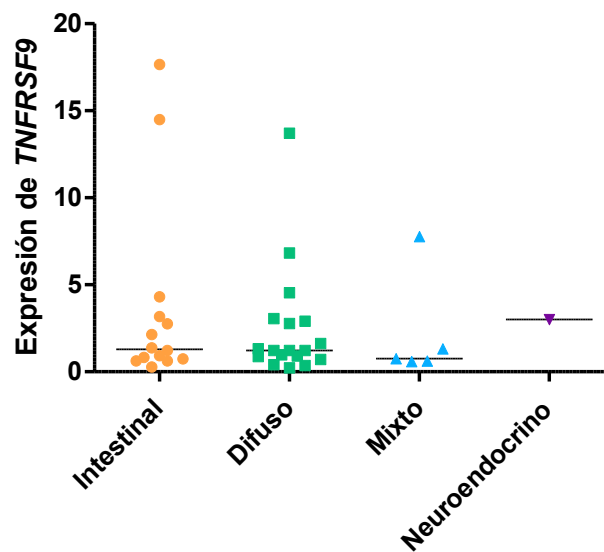
Los pacientes incluidos en este estudio fueron catalogados anteriormente según su estadio y de acuerdo con la clasificación de Lauren de cáncer gástrico por médicos patólogos del Hospital Max Peralta (

Cuadro 10). La expresión relativa de ARNm de *TNFRSF9* se comparó entre estas categorías y no se halló una diferencia significativa entre los diferentes tipos histológicos (**Figura 9**, Kruskal-Wallis, $p = 0.7508$).

Cuadro 10. Resumen de hallazgos histológicos en los pacientes de cáncer gástrico del Hospital Max Peralta.

<i>Código ITCG</i>	<i>Clasificación Lauren</i>	<i>Estadio</i>	<i>Comentarios</i>
<i>ITCG-002 T</i>	Mixto	IB	N/A
<i>ITCG-003 T</i>	Difuso	IB	N/A
<i>ITCG-004 T</i>	Difuso	IIB	N/A
<i>ITCG-005 T</i>	Intestinal	IIIA	N/A
<i>ITCG-006 T</i>	Intestinal	IIA	N/A
<i>ITCG-007 T</i>	Difuso	IIB	N/A
<i>ITCG-008 T</i>	Difuso	IA	N/A
<i>ITCG-009 T</i>	Neuroendocrino	IIIB	N/A
<i>ITCG-010 T</i>	Intestinal	IIIA	N/A
<i>ITCG-011 T</i>	Difuso	IIA	N/A
<i>ITCG-012 T</i>	Intestinal	IIIB	N/A
<i>ITCG-013 T</i>	Difuso	IIIC	Carcinoma de células en anillo de sello
<i>ITCG-014 T</i>	Difuso	IIB	Linitis plástica
<i>ITCG-015 T</i>	Difuso	IIA	N/A
<i>ITCG-016 T</i>	Intestinal	IIIA	N/A
<i>ITCG-017 T</i>	Intestinal	IA	N/A
<i>ITCG-018 T</i>	Mixto	IIA	Carcinoma mucinoso
<i>ITCG-020 T</i>	Difuso	IA	N/A
<i>ITCG-021 T</i>	Difuso	IIA	N/A
<i>ITCG-022 T</i>	Difuso	IA	N/A
<i>ITCG-023 T</i>	Intestinal	IIIA	N/A
<i>ITCG-026 T</i>	Mixto	IIIA	N/A
<i>ITCG-027 T</i>	Mixto	IIIA	N/A
<i>ITCG-028 T</i>	Sin neoplasia	N/A	N/A
<i>ITCG-029 T</i>	Difuso	IB	N/A
<i>ITCG-030 T</i>	Difuso	IIA	N/A
<i>ITCG-031 T</i>	Intestinal	IIIA	N/A
<i>ITCG-032 T</i>	Intestinal	IA	N/A
<i>ITCG-035 T</i>	Intestinal	IIB	N/A
<i>ITCG-036 T</i>	Difuso	IA	N/A
<i>ITCG-037 T</i>	Difuso	IA	Carcinoma de células en anillo de sello
<i>ITCG-038 T</i>	Intestinal	IB	N/A
<i>ITCG-039 T</i>	Intestinal	IIA	N/A
<i>ITCG-040 T</i>	Difuso	IIIA	N/A

<i>Código ITCG</i>	<i>Clasificación Lauren</i>	<i>Estadio</i>	<i>Comentarios</i>
<i>ITCG-041 T</i>	Mixto	IIIB	N/A
<i>ITCG-043 T</i>	Intestinal	IA	N/A
<i>ITCG-046 T</i>	Intestinal	IIIA	N/A
<i>ITCG-047 T</i>	Difuso	IA	N/A
<i>ITCG-051 T</i>	Difuso	IB	N/A



Tipos histológicos según clasificación Lauren

Figura 9. Distribución de la expresión relativa de ARNm de *TNFRSF9* en tejido gástrico humano según el tipo histológico de cáncer. Se muestran valores individuales y la mediana de cada grupo (n = 38; prueba de Kruskal-Wallis, p = 0.7508).

iii. Expresión de ARNm de *TNFRSF9* en diferentes etapas de cáncer gástrico en humanos

Se realizó una comparación de la expresión relativa del ARNm de *TNFRSF9* mediante una prueba de Mann Whitney bilateral entre pacientes con cáncer gástrico en etapas tempranas (I y II) y avanzadas (III) (

Cuadro 10) y se determinó que no había diferencias significativas (Figura 10, $p = 0.5588$).

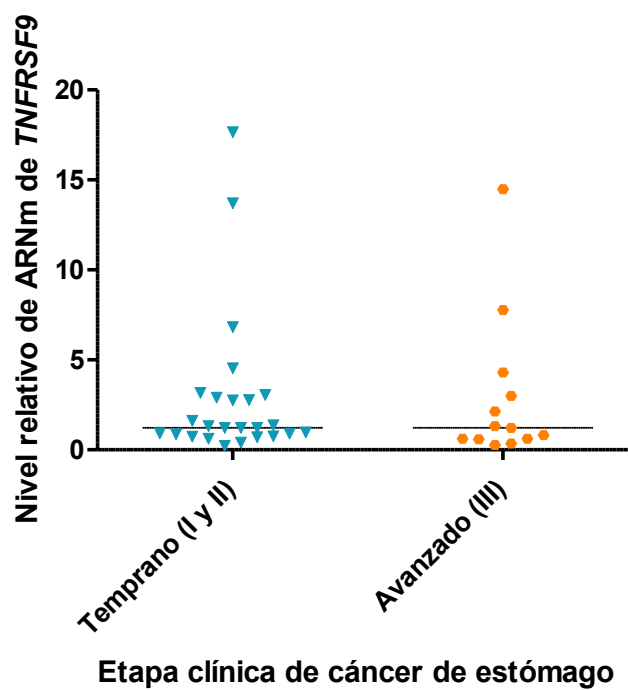


Figura 10. Expresión relativa de ARNm de TNFRSF9 en tejido gástrico humano según la etapa clínica del cáncer. Se muestran valores individuales y la mediana de cada grupo ($n = 38$; prueba de Mann-Whitney bilateral, $p = 0.5588$).

DISCUSIÓN

En esta sección se discuten los hallazgos obtenidos en el modelo murino infectado con *H. pylori* y en las muestras humanas de adenocarcinoma gástrico, con el objetivo de interpretar la expresión del gen de TNFRSF9 en estos contextos. Dado que este receptor coestimulador participa en la activación y modulación de distintas poblaciones inmunológicas, resulta relevante analizar cómo su expresión se comporta en cada una de las condiciones evaluadas y contrastar estos resultados con lo descrito en la literatura. Asimismo, se consideran las limitaciones metodológicas y biológicas del estudio, con el fin de comprender de manera integral los factores que pudieron influir en los patrones observados.

En el trabajo se realizó un análisis de ARNm de *Tnfrsf9* en tejidos gástricos murinos infectados con *H. pylori*. Se observó que los niveles relativos de expresión de ARNm de *Tnfrsf9* fueron muy similares entre los ratones no infectados y los infectados con *H. pylori*, lo que sugiere que la infección crónica no indujo una regulación diferencial de este marcador inmunológico en las condiciones evaluadas. Una posible causa raíz de esta ausencia de variación podría estar relacionada con la selección del gen de referencia utilizado para la normalización. Para determinar los niveles relativos de expresión del gen de TNFRSF9, se comparó su expresión con la del gen constitutivo de HPRT1. Este enfoque es fundamental principalmente en técnicas moleculares que evalúan pequeñas discrepancias en el contenido de ARNm y proteínas, ya que el uso de controles endógenos precisos para estandarizar la expresión de estas es esencial para representar correctamente los datos (Townsend et al., 2019).

La enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT) desempeña un papel esencial en la generación de nucleótidos de purina a través de la vía de rescate. Esta enzima convierte la hipoxantina en inosina monofosfato (IMP) y la guanina en guanosina monofosfato (GMP). Una deficiencia de HPRT se asocia a la acumulación de ácido úrico en exceso, lo que puede provocar enfermedades como artritis, formación de depósitos y cálculos renales. Además, la falta de esta enzima está vinculada a trastornos neurológicos graves (incluyendo deficiencia cognitiva, parálisis cerebral espástica, movimientos involuntarios) y a comportamientos autolesivos. También puede ocasionar alteraciones sanguíneas como la anemia megaloblástica (Vinokurov et al., 2023).

La enzima HPRT, por lo tanto, es una proteína fundamental debido a la demanda constante de nucleótidos esenciales para la síntesis de ADN y derivados de nucleótidos como fuente de energía celular. Por esta razón, la enzima HPRT se produce de manera estable como un gen constitutivo, y consecuentemente, se encuentra en bajos niveles en todos los tejidos somáticos. Gracias a su función de mantenimiento celular, el gen de HPRT suele emplearse como un control endógeno estándar en análisis de expresión génica y de niveles proteicos (Townsend et al., 2019).

Aunque tradicionalmente se ha considerado al *HPRT1* como un gen constitutivo o de mantenimiento, investigaciones recientes han revelado que sus niveles de expresión pueden variar significativamente entre tejidos malignos y normales (Sedano et al., 2020). Como consecuencia, se plantea que *HPRT1* podría no ser un gen de referencia adecuado para investigaciones oncológicas, debido a la inconsistencia en su expresión entre tejidos tumorales y normales.

Según los estudios realizado por Sedano et al. (2020) y Townsend et al. (2019), los niveles de expresión de *HPRT1* fueron más elevados en tipos específicos de cáncer originados en distintos órganos, en comparación con su expresión agregada en tejidos normales. Este aumento fue significativo en varios tipos de cáncer, incluyendo riñón, pulmón, colon, esófago, próstata, carcinoma endometrial del cuerpo uterino, vejiga y mama, entre otros. En particular, se observó una sobrerregulación de *HPRT1* en muestras de cáncer de mama.

Los niveles elevados del gen de HPRT1 en los tumores pueden contribuir a la evasión inmunológica y promoviendo un microambiente tumoral inmunosupresor. Esta sobreexpresión se debe a que HPRT1 participa en la vía de rescate de purinas, esencial para la síntesis de ADN en células con alta tasa de proliferación, como las cancerosas. Además, su actividad favorece la producción de adenosina, una molécula que suprime la respuesta inmune antitumoral, al reducir la infiltración de linfocitos B y T CD4+ y CD8+, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (Sedano et al., 2020).

HPRT1 ha demostrado regular genes inmunomoduladores como PD-1, lo que refuerza su papel en la evasión inmunológica. Su expresión elevada en regiones de proliferación activa dentro de los tumores sugiere una implicación directa en el crecimiento celular, mientras que

su interacción con redes de ARN no codificante alteradas en cáncer fortalece su vínculo con la progresión tumoral (Sedano et al., 2020). Además, se ha asociado con la activación de vías oncogénicas como MMP1/PI3K/AKT, promoviendo la progresión tumoral a través de mecanismos moleculares activos (T. Wu et al., 2022).

Rho et al. (2010) llevaron a cabo un estudio con el objetivo de identificar los genes de referencia más estables para la normalización en estudios de expresión génica mediante RT-qPCR en investigaciones sobre cáncer gástrico humano. Para ello, se evaluaron seis genes candidatos: *ACTB*, *GAPDH*, *RPL29*, *B2M*, *HPRT1* y *18S ARNr*, en tejidos tumorales, tejidos gástricos normales y líneas celulares de cáncer gástrico. Los resultados mostraron que *RPL29* y *B2M* fueron los más estables en tejidos, *B2M* y *GAPDH* fueron óptimos en líneas celulares, y *ACTB* junto con *18S ARNr* resultaron adecuados para estudios que combinan tejidos y líneas celulares. En contraste, el gen *HPRT1* presentó una expresión variable, por lo que no se recomienda como único gen de referencia.

Para la normalización de los datos en este estudio, los genes de referencia fueron seleccionados previamente mediante el software NormFinder (disponible en <https://www.moma.dk/software/normfinder>). El gen con el mejor índice de estabilidad fue el de *HRPT1* tanto para el tejido gástrico humano como para el murino (0.008 y 0.005, respectivamente; refiérase al **Cuadro 5**). Si bien en este estudio se empleó el gen más adecuado entre los analizados, existe la posibilidad de que existan otros genes más adecuados para evaluar la expresión de *Tnfrsf9* en tejidos gástricos. Por ello, se sugiere considerar el uso de *Rpl29* y *B2m* en futuros estudios, tal como recomiendan Rho et al. (2010) con el fin de garantizar una normalización precisa y confiable en los análisis de expresión génica.

Una limitación importante del estudio es que las muestras analizadas provienen de animales distintos, dado que había que sacrificar a los ratones para obtener las muestras de estómago, lo que puede introducir variabilidad en los resultados. Aunque se procuró mantener condiciones experimentales constantes entre los grupos y se utilizaron ratones singénicos de la misma cepa (C57BL/6), cada individuo tiene características biológicas propias que podrían influir en la expresión de *Tnfrsf9*. La variabilidad interindividual ha sido documentada anteriormente en modelos genéticamente homogéneos como los ratones C57BL/6J, donde se han observado diferencias significativas en la producción de anticuerpos

frente a un mismo antígeno (Vidal, 2017). Esto sumado al reducido tamaño de la muestra, dificulta la comparación directa entre los grupos de ratones, por lo que es posible que algunos resultados reflejen variaciones individuales más que efectos de la infección.

Por otra parte, también es posible que no se haya observado una diferencia en la expresión de ARNm de *Tnfrsf9* en los tejidos gástricos de ratones por la naturaleza de este gen. De acuerdo con Fröhlich et al. (2020) y Dawicki & Watts (2004), tanto en estudios *in vitro* e *in vivo* (incluyendo modelos murinos en los que se aislaron linfocitos de ganglios linfáticos y bazo) se ha demostrado que la expresión de este punto de control inmunológico está estrictamente regulada y aumenta a partir de las 12 horas tras la estimulación de los linfocitos T, alcanzando un nivel máximo alrededor de las 24 horas. Esta expresión puede mantenerse hasta por 5 días, dependiendo del tipo específico de estímulo recibido. Tomando en cuenta lo anterior, es probable que estos intervalos hayan sido demasiado amplios para capturar las fluctuaciones transitorias en la expresión de *Tnfrsf9*, que las mediciones se realizaron en intervalos aproximados de 10 semanas (desde la semana 10 hasta la semana 40 post-infección con *H. pylori*), lo que podría explicar la ausencia de diferencias detectables.

Singh et al. (2024) describen que la expresión del gen de TNFRSF9 es inducible y se restringe principalmente a células T activadas, tanto CD8⁺ como CD4⁺. También puede inducirse en células NK, células B, monocitos y células dendríticas tras su activación. Como molécula coestimuladora inducible, TNFRSF9 potencia la respuesta de las células T frente a los antígenos. Una vez expresado y trimerizado por su ligando (TNFSF9), TNFRSF9 recluta proteínas adaptadoras TRAF a sus motivos citosólicos, iniciando la señalización coestimuladora.

Dado que *Tnfrsf9* se expresa principalmente en células inmunes activadas y su expresión en células epiteliales gástricas normales es muy baja o ausente, es posible que la señal específica provenga mayoritariamente del infiltrado inmune y haya quedado diluida al realizar el análisis por PCR sobre muestras de tejido gástrico total sin separar previamente el infiltrado inmune. Esto podría contribuir a que no se observaron diferencias significativas entre los grupos con diferentes tiempos de infección con *H. pylori*, ya que la proporción de células inmunes activadas pudo haber sido baja en las muestras, limitando la capacidad de detectar cambios en la expresión de este gen inducible.

Otro factor que puede explicar que no se hayan observado diferencias en la expresión de ARNm, es que en infecciones persistentes por *H. pylori* se puede inducir un estado de tolerancia inmunológica o agotamiento funcional de las células T. Zhang et al. (2024) observa que en su experimento con gerbos hay una desensibilización de receptores tipo Toll (TLR), particularmente de TLR6, en células epiteliales gástricas causada por *H. pylori*, reduciendo la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-8 y favoreciendo la tolerancia inmunológica.

Estudios han demostrado que la estimulación de TLR1–TLR2 en células T CD8⁺ aumenta la expresión de *Tnfrsf9* en ratones, y que esta regulación depende de la vía de señalización MyD88. La ausencia de TLR2 o MyD88 reduce significativamente la expresión de la *Tnfrsf9* y su efecto coestimulador (Joseph et al., 2016). Consecuentemente, tomando en cuenta el estudio realizado por Zhang et al. (2024), existe la posibilidad de que *H. pylori*, como mecanismo de evasión en infecciones persistentes, pueda inducir desensibilización de TLR, lo que afectaría negativamente la expresión de moléculas coestimuladoras como TNFRSF9.

Por otro lado, la investigación realizada por Fröhlich et al. (2020) determina que el *TNFRSF9* puede estar regulado por metilación del ADN en su región promotora, lo que afecta su transcripción. Por ejemplo, en melanoma, se ha demostrado que la hipermetilación del promotor de *TNFRSF9* se asocia con menor expresión génica en el infiltrado inmunológico, lo que correlaciona con menor densidad de linfocitos T, menor actividad inmunitaria y peor respuesta a inmunoterapia anti-PD-1. Este hallazgo posiciona a la metilación de *TNFRSF9* como un posible biomarcador epigenético predictivo de la respuesta inmunológica hacia la terapia con anti-PD-1.

La hipermetilación del ADN puede ser inducida por la infección crónica por *H. pylori*, la cual ha sido asociada con alteraciones epigenéticas en genes supresores de tumores. Las regiones promotoras de estos genes, así como de genes de reparación del ADN, suelen contener secuencias ricas en citosina y guanina conocidas como islas CpG (CGI). Cuando estas regiones se hipermetilan, se bloquea la unión de factores de transcripción, lo que conduce al silenciamiento génico o a la pérdida de expresión (Muhammad et al., 2019).

La infección por *H. pylori* genera una intensa respuesta inflamatoria en la mucosa gástrica, caracterizada por la sobreexpresión de citocinas como IL-1 β , las cuales han sido implicadas en la inducción de niveles aberrantes de metilación del ADN (Muhammad et al., 2019). En este escenario, existe la posibilidad de que el gen de *Tnfrsf9* estaba sujeto a una regulación epigenética similar, en la cual su expresión se vea inhibida como consecuencia de la hipermetilación inducida por la infección crónica por *H. pylori* o por los mecanismos activados durante la intensa respuesta inflamatoria.

Adicionalmente, mecanismos postranscripcionales también pueden influir en la expresión de *Tnfrsf9*. Factores como los microARNs (miARNs) pueden modular la estabilidad y eficiencia de traducción de los ARNm al unirse a la región 3'-UTR del ARNm de genes blanco, lo cual puede provocar la supresión de la traducción o la degradación de estos (Ali Syeda et al., 2020). En el contexto de la infección por *H. pylori*, se ha demostrado que esta bacteria puede alterar la expresión de miARNs mediante la modificación epigenética de sus promotores y la interferencia en su procesamiento (Libânio et al., 2015).

Estas etapas adicionales de regulación podrían contribuir a la ausencia de diferencias observadas en los niveles de ARNm de *Tnfrsf9*, a pesar de posibles variaciones funcionales inducidas por la infección. Es posible que, inicialmente la infección estimule la transcripción de ARNm de *Tnfrsf9*; sin embargo, en fases crónicas de la infección, podría activarse la expresión de ciertos miARNs que promuevan la degradación del ARNm. Este mecanismo post-transcripcional limitaría la acumulación de ARNm detectable, dificultando la observación de cambios significativos mediante técnicas como la PCR.

Los resultados obtenidos sugieren que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, la expresión de *Tnfrsf9* a nivel de ARNm en tejido gástrico murino no presenta variaciones detectables durante la infección por *H. pylori*. Asimismo, el análisis se realizó sobre tejido total, sin separación de poblaciones celulares inmunes activadas, lo que probablemente diluyó la señal específica de *Tnfrsf9*. Además, se debe considerar que *Tnfrsf9* es un gen inducible y de expresión transitoria, cuya regulación dinámica podría no haber sido captada debido a los intervalos de muestreo amplios utilizados. A esto se suma la posibilidad de que su expresión esté modulada por mecanismos epigenéticos, como la metilación de la región promotora del ADN, y post-transcripcionales, como la acción de microARNs que afectan la

estabilidad o traducción del ARNm, sin necesariamente modificar sus niveles detectables por PCR.

Para mejorar la sensibilidad y precisión en estudios futuros, se recomienda considerar varias estrategias metodológicas. Además, se pueden realizar muestreos más frecuentes, especialmente en las etapas tempranas de la infección, con el fin de capturar mejor la dinámica de expresión de *Tnfrsf9*. También, sería beneficioso aplicar técnicas de aislamiento de células inmunes, como citometría de flujo, para evitar la dilución de señales específicas en el análisis de tejido total. Finalmente, de manera complementaria, se recomienda evaluar directamente la metilación del promotor de *Tnfrsf9*, determinar la presencia de marcadores de agotamiento, la presencia de microARNs reguladores y la estabilidad del ARNm de *Tnfrsf9*, ya que estos factores podrían estar modulando la expresión de *Tnfrsf9*, por lo que no se reflejan variaciones en los niveles de transcripción detectados por PCR.

Por otro lado, los resultados obtenidos muestran que la expresión de *Tnfrsf9* en tejidos gástricos murinos infectados con *H. pylori* varió significativamente de forma global tanto en función del puntaje de inflamación como del puntaje de infección, según lo determinado por la prueba de Kruskal-Wallis. Esta es una prueba no paramétrica que compara 3 o más grupos independientes y se basa en los rangos de los datos, en lugar de sus valores originales, para hacer esta comparación. Esta prueba evalúa si las medianas de los grupos son iguales (hipótesis nula), luego de ordenar los datos y asignarles rangos (Rizk, 2023). Esta variación sugiere que la expresión de *Tnfrsf9* está influenciada por el grado de inflamación tisular y la carga bacteriana, ya que la prueba de Kruskal-Wallis indica que al menos uno de los grupos en cada análisis difiere en su distribución respecto a los demás.

Sin embargo, al aplicar la prueba post hoc de Dunn para comparaciones múltiples entre pares de grupos, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre combinaciones específicas de los puntajes, tanto para el de infección, como para el de inflamación. Lo anterior puede explicarse por la corrección aplicada en la prueba de Dunn (como el ajuste de Bonferroni), la cual reduce errores tipo I (falsos positivos), pero reduce la potencia estadística para detectar diferencias puntuales. Esta prueba post hoc es apropiada cuando los tamaños de muestra de los grupos son iguales (Juarros-Basterretxea et al., 2024). Para este estudio se tiene la limitante de que los tamaños de muestra para ciertos grupos son

pequeños y también que la cantidad de muestras por grupo no es igual para todos los análisis debido a la naturaleza variable de la respuesta inmune y colonización de la bacteria.

A pesar de que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, se identificaron ciertas tendencias relevantes. En el análisis de infección por *H. pylori*, el grupo con puntaje de 1+ de infección mostró niveles más altos de expresión de *Tnfrsf9*, siendo la muestra correspondiente a las 10 semanas de post-inoculación la que demostró un mayor incremento en los niveles de ARNm. De manera preliminar, este hallazgo podría reflejar parte de la fase de activación inmunológica temprana discutida anteriormente. Sin embargo, debido a que este comportamiento se observó en solo un grupo experimental, de 10 semanas post inoculación, es posible que se trate de una excepción en la que la respuesta inmunológica inicial persistió más allá de lo esperado. Este planteamiento se ve reforzado por la presencia de infiltrado inflamatorio importante (3+) en la misma muestra. Posiblemente, si se hubiesen obtenido muestras en etapas más tempranas de la infección, se hubiese podido observar cuando inicialmente se da la exacerbación de la respuesta inmune, lo que podría haber permitido detectar diferencias significativas entre los grupos evaluados.

En el análisis realizado respecto al puntaje de inflamación, se observó así mismo una tendencia, aunque no haya significancia estadística, que sugiere que a medida que aumenta la inflamación, también lo hacen los valores detectados por PCR de *Tnfrsf9*. Esto podría indicar una mayor expresión génica asociada con procesos inflamatorios. Como se mencionó anteriormente, *TNFRSF9* se expresa principalmente en células inmunológicas tras su activación (Singh et al., 2024), por lo que resulta coherente que, a mayor infiltración inmunológica, reflejada con el puntaje de inflamación, mayor sea la cantidad de ARNm detectado. No obstante, en los casos en donde hay un puntaje de inflamación de 4+, esta relación no se mantiene, lo que podría deberse posiblemente a un fenómeno de tolerancia inmunológica o agotamiento funcional inducido por *H. pylori* (X. Zhang et al., 2024). En estos escenarios, aunque haya una presencia considerable de células inmunológicas capaces de expresar *Tnfrsf9*, estas podrían estar en un estado disfuncional, limitando la expresión de TNFRSF9.

Cabe destacar que, en el análisis de expresión génica realizado mediante PCR en tejidos gástricos murinos, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.0010$) entre

los tejidos con morfología normal y aquellos que presentaban metaplasia, según la prueba de Mann-Whitney de una cola. Los tejidos con metaplasia mostraron una mayor expresión relativa de ARNm de *Tnfrsf9*, lo que sugiere una posible asociación entre la transformación tisular y la activación inmunológica. En la metaplasia hay reemplazo de células diferenciadas por otro tipo de células maduras diferenciada que no está presente en el tejido. Es importante mencionar que en modelos murinos como C57BL/6, la infección por *H. pylori* genera tipo específico de metaplasia conocida como metaplasia mucosa en la que se da el reemplazo de células parietales por células productoras de mucinas similares a las producidas en el epitelio intestinal (Rogers, 2012). La infección crónica por *H. pylori* desempeña un papel central en este proceso, ya que la bacteria causa inflamación persistente en la mucosa gástrica, puede inducir cambios epigenéticos en las células epiteliales gástricas y genera un desbalance en el microambiente gástrico que favorece la transición (Machlowska et al., 2020).

Otro aspecto relevante de mencionar es que los modelos de infección por *H. pylori* con ratones de la cepa C57BL/6 no generan lesiones cancerosas, sino se limitan a displasia epitelial no maligna (Rogers, 2012). No obstante, aunque este modelo no culmina con cáncer, permite estudiar mecanismos tempranos de carcinogénesis gástrica. En este microambiente alterado, representado por la metaplasia mucosa en ratones, la expresión de *Tnfrsf9* podría reflejar la activación de células inmunológicas infiltrantes, como linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺, células NK y células dendríticas, que responden a la presencia del antígeno. TNFRSF9 es un receptor coestimulador que potencia la proliferación, supervivencia y función efectora de estas células, y su expresión se ha observado en tumores con infiltración inmunológica activa en humanos (Hashimoto, 2021). Además, se ha reportado que la expresión de *TNFRSF9* puede estar inducida por vías oncogénicas como K-Ras, lo que sugiere una posible participación en etapas tempranas de transformación neoplásica (Glorieux & Huang, 2019).

Por otro lado, aunque algunos tejidos con morfología normal también estaban colonizados por *H. pylori*, no se observó un aumento significativo en la expresión de *Tnfrsf9*. Esto puede explicarse por el hecho de que *Tnfrsf9* es un marcador inducible, cuya expresión depende de la activación inmunológica efectiva, más que de la presencia del patógeno (Singh et al., 2024). En tejidos con morfología normal, es posible que la infección haya sido subclínica o controlada, sin generar una respuesta inflamatoria robusta. Esto se ve reflejado

en los puntajes bajos de inflamación en la mayoría de los tejidos con morfología gástrica normal, lo que sugiere que la activación de células inmunes fue limitada o transitoria.

Además, *H. pylori* es conocido por inducir tolerancia inmunológica en infecciones crónicas, mediante mecanismos como la desensibilización de TLR y el agotamiento funcional de células T (X. Zhang et al., 2024). En este contexto, aunque haya colonización bacteriana, las células inmunes pueden encontrarse en un estado disfuncional o anérgico, lo que impide la expresión de *Tnfrsf9*.

Por el contrario, en los tejidos con metaplasia, se observó una mayor expresión de *Tnfrsf9*, lo que sugiere que estos tejidos presentan un microambiente inflamatorio más activo, con mayor infiltración de células inmunes funcionales. Esto refuerza la idea de que *Tnfrsf9* podría ser un biomarcador útil de activación inmunológica en regiones de tejidos gástricos alterados, más que un marcador de infección per se.

Para la detección de la proteína TNFRSF9 en tejido murino mediante inmunohistoquímica, se llevó a cabo la estandarización de un protocolo empleando el anticuerpo PA5-116949. La inmunohistoquímica es una técnica altamente eficaz que utiliza la unión específica entre un anticuerpo y un antígeno para identificar y localizar moléculas específicas en tejidos, generalmente observadas a través de un microscopio óptico. Su uso se ha ampliado para evaluar biomarcadores predictivos y pronósticos en diversos tipos de cáncer. Las etapas básicas de la inmunohistoquímica consisten en: 1) la recuperación de antígenos, 2) la adición de anticuerpo primario, 3) la aplicación del anticuerpo secundario y 4) la adición de un reactivo que revela el anticuerpo secundario (Magaki et al., 2019).

La recuperación de antígenos se utiliza para desenmascarar los antígenos que pueden estar ocultos debido al tratamiento que se le hizo al tejido fijado. El uso de agentes que forman enlaces cruzados durante la fijación puede alterar significativamente la forma tridimensional y la organización de los antígenos, enmascarando o dañando los epítomos, impidiendo que los anticuerpos los reconozcan o se unan a ellos (Kabiraj et al., 2015). Por lo tanto, estos métodos de recuperación de antígenos son cruciales para retornar las proteínas a un estado conformacional similar al nativo, que la proteína tenía antes de la fijación, y así optimizar las inmunoreacciones.

Para el presente estudio se varió la técnica de recuperación de antígenos entre el enzimático y la inducida por el calor. Para el método enzimático, se utilizó la enzima proteinasa K a una concentración de 20 mg/mL y se incubó 15 min a 37 °C. La digestión enzimática de los tejidos para el desenmascaramiento de epítomos puede realizarse con varios tipos de enzimas como la tripsina, proteinasa K, pronasa E, ficina y pepsina. Aunque estos métodos son ampliamente utilizados, no todos funcionan de igual manera para cualquier proteína, con lo cual se puede generar una mayor tinción no específica o no teñir del todo. Por lo general, el uso de enzimas da lugar a una coloración más débil en comparación con el calentamiento. Estos procesos no actúan de forma selectiva, por lo que algunos antígenos pueden dañarse. En algunos casos, la digestión con enzimas proteolíticas puede interferir con la correcta identificación de los antígenos, llevando a interpretaciones erróneas como falsos positivos o negativos (Kabiraj et al., 2015).

Por otro lado, también se realizó la técnica de recuperación de antígeno mediante calor con un buffer de pH 9.0 (buffer TEG con EDTA o EGTA) o pH 6.0 (buffer citrato) y se incubó 15 min a 98 °C en el procesador de tejido. Este método es el más comúnmente utilizado y puede realizarse con microondas, placa de calentamiento, ollas de presión, autoclaves y baños maría con pH desde los 6 hasta los 10 (S.-W. Kim et al., 2016). El mecanismo mediante el cual funciona el calentamiento es incierto, el calor puede revelar epítomos al romper los enlaces de metileno, pero también parece influir a través de otros mecanismos menos conocidos; entre las teorías alternativas está la eliminación de proteínas que interfieren con la unión del anticuerpo, la formación de agregados proteicos, la rehidratación del tejido que facilita el acceso de los anticuerpos, y la posible liberación de residuos de parafina inducida por el calor (Kabiraj et al., 2015).

Asimismo, la dilución utilizada del anticuerpo primario constituye otro factor determinante en los resultados obtenidos. Se busca optimizar el contraste entre el tejido que presenta tinción positiva y la tinción de fondo inespecífica, así como optimizar el reactivo, empleando la mayor dilución posible del anticuerpo que aún permita una detección efectiva (Magaki et al., 2019). En el presente estudio se evaluaron diluciones del anticuerpo primario en proporciones de 1:100, 1:200, 1:400, 1:600, 1:800, 1:1200, 1:1500, 1:2000 y 1:2500. Según la ficha técnica del fabricante, para aplicaciones de inmunohistoquímica se

recomienda se recomienda una dilución entre 1:50 y 1:200. Sin embargo, en diluciones menores a 1:200 se observó mucha inespecificidad, independientemente del tipo de recuperación antigénica empleada. Adicionalmente, en diluciones mayores no se logró obtener el contraste deseado. Como resultado, se concluye que ninguna de las diluciones ensayadas permitió una detección adecuada de la proteína TNFRSF9, lo que impide el conteo confiable de células o estructuras que la expresen. Estos hallazgos sugieren que el anticuerpo PA5-116949, bajo las condiciones evaluadas, no es adecuado para estudios de inmunohistoquímica dirigidos a esta proteína.

Es importante considerar que la detección del antígeno también podría verse comprometida debido a la falta de reactividad cruzada del anticuerpo primario con la especie animal utilizada, así como a la ausencia o baja concentración del epítipo reconocido por dicho anticuerpo (Ramos-Vara, 2017). La tinción se llevó a cabo utilizando tejido gástrico proveniente de ratón. Según lo indicado en la ficha técnica del anticuerpo primario, este presenta reactividad frente a antígenos de origen humano, ratón y rata, por lo que se descarta la especie como un factor que haya condicionado los resultados.

Dentro de las medidas aplicadas para reducir la tinción de fondo inespecífica, se empleó el uso de peróxido antes de la incubación con el anticuerpo primario para bloquear la peroxidasa endógena. Lo anterior con el fin de evitar que las enzimas endógenas del tejido catalicen la transformación de los sustratos cromogénicos en productos precipitados de color, lo que puede generar señales similares a las que producen las enzimas conjugadas añadidas de forma exógena durante el proceso de inmunohistoquímica (Kalyuzhny, 2016). Esta medida es de gran importancia porque el anticuerpo secundario empleado (EnVision HRP Rabbit K4003) está conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP por sus siglas en inglés), por lo que, si no se bloquea la peroxidasa endógena, se obtienen tinciones inespecíficas.

Por último, con el fin de reducir la tinción de fondo provocada por la unión de anticuerpos primarios a sitios inespecíficos del tejido, se implementó en el protocolo el bloqueo con albúmina sérica, aplicado previo a la incubación con los anticuerpos primarios. Kalyuzhny (2016) menciona que se pueden utilizar diversos tampones de bloqueo con suero animal (como de cabra, burro, cerdo o caballo) para lograr el objetivo de unirse a los sitios

inespecíficos en el tejido para bloquear su accesibilidad a los anticuerpos primarios. No obstante, pese a su utilización como estrategia final, no se logró obtener una mejora en los resultados de tinción.

Como conclusión del presente análisis, tras realizar ensayos con diversas diluciones del anticuerpo primario y modificar aspectos de la técnica de inmunohistoquímica, se estableció que los resultados obtenidos no pueden atribuirse a una unión específica del anticuerpo primario con la proteína TNFRSF9.

Por otra parte, la expresión de ARNm de *TNFRSF9* en muestras de cáncer gástrico humano no presentó diferencias significativas entre tipos histológicos ni entre estadios clínicos. Investigaciones como la realizada por Gutiérrez et al. (2006) han demostrado que ciertas proteínas de control del ciclo celular implicadas en cáncer, como p53, C-erb-B-2, PCNA y EGFR no presentan variaciones significativas entre etapas clínicas tempranas como avanzadas, y distintos subtipos histológicos según la clasificación de Lauren (intestinal, difuso, mixto). Este resultado sugiere que la expresión de algunos genes inmunorreguladores también puede mantenerse constante independientemente del tipo histológico o la etapa clínica del tumor, y puede más bien estar más relacionada con la infiltración inmunitaria del tumor. Por lo tanto, su expresión podría no variar significativamente entre estadios clínicos, pero sí entre estados inmunológicos (por ejemplo, tumores con alto vs. bajo infiltrado de células T).

La progresión tumoral no siempre correlaciona linealmente con la activación del sistema inmune. Reyes et al. (2020) destaca que el microambiente tumoral puede modular la respuesta inmunológica de tal manera que se favorezca la tolerancia inmunológica y el agotamiento de células T, afectando directamente la eficacia de la respuesta inmune. Estas condiciones se desarrollan como consecuencia de la exposición crónica a antígenos tumorales, la presencia de citocinas inmunosupresoras y la expresión de moléculas inhibitorias como PD-1 y CTLA-4, que limitan la activación de células T efectoras. En este contexto, la expresión de genes coestimuladores como *TNFRSF9* puede verse reducida, no necesariamente por la etapa clínica del tumor, sino por el estado funcional de las células inmunes.

Además, la expresión de ARNm de *TNFRSF9* puede estar sujeta a variabilidad interindividual, en donde hay diferencias biológicas entre pacientes que incluyen factores genéticos y ambientales. Esta heterogeneidad puede generar una dispersión amplia en los niveles de expresión observados, lo que dificulta la identificación de patrones consistentes entre grupos clínicos o histológicos. En este sentido, Rosero et al. (2017) destacan que variantes genéticas individuales pueden modular la respuesta inmunológica y la progresión tumoral, lo que contribuye a la variabilidad en la expresión génica entre pacientes, incluso dentro de un mismo tipo de cáncer gástrico.

El desarrollo tumoral implica la acumulación de múltiples mutaciones somáticas, alteraciones epigenéticas y la alteración de mecanismos reguladores complejos, aún no completamente dilucidados, lo que puede hacer que la expresión génica no se correlacione directamente con los subtipos clínicos tradicionales, especialmente cuando se analizan genes inmunorreguladores como lo es el *TNFRSF9* (Bermúdez Garcell et al., 2019). En este contexto, es posible que en cada paciente se activen o desactiven mecanismos que pueden conllevar a variabilidad en la expresión de *TNFRSF9*, enmascarando si se activa más según el tipo histológico o estadio de cáncer gástrico.

Dentro de estos mecanismos reguladores de la expresión génica en cáncer, se ha descrito la acción de los miARNs, cuya misma expresión se ve alterada por cambios genéticos en sus loci, modificaciones epigenéticas y regulación por factores de transcripción o enzimas, lo cual puede conllevar a la subexpresión o sobreexpresión de los mismos. Estas disfunciones de miARNs están estrechamente relacionadas con la progresión tumoral y la evasión inmune (Ali Syeda et al., 2020).

Por otro lado, se ha descrito que en procesos tumorales ocurre una desregulación en la síntesis de proteínas. Esta alteración puede deberse a la expresión anómala de diversos factores de iniciación eucarióticos (e.g. eIFs) involucrados en distintas etapas de la traducción, así como a cambios en la expresión de ARN ribosómicos (ARNr) y ARN de transferencia (ARNt). En cáncer, la alteración de dichos mecanismos transcripción favorecen principalmente traducción de genes involucrados en proliferación, migración y evasión inmunitaria (Añazco-Guenkova et al., 2024). Como consecuencia, las vías desreguladas en el cáncer podrían modular indirectamente la expresión de *TNFRSF9*, por ejemplo, a través

de mecanismos de traducción dependientes de modificaciones en tRNA, como se describen en el estudio de Añazco-Guenkova et al. Adicionalmente, si el gen *TNFRSF9* desempeña un papel como supresor tumoral, es razonable considerar que los mecanismos moleculares asociados al cáncer (mediante miARNs específicos, modificaciones epigenéticas o interferencia en su transcripción) tiendan a favorecer su silenciamiento transcripcional, lo cual podría contribuir a una menor activación inmunológica en el microambiente tumoral y con ello promover la supervivencia y expansión de las células tumorales.

Lo anterior, sumado al tamaño muestral limitado, puede contribuir a la dilución de diferencias reales entre los grupos histológicos analizados, especialmente en aquellos con menor representación, como el tipo mixto (5 muestras) y el neuroendocrino (solo 1 muestra). La diferencia en la distribución de muestras genera un desequilibrio entre grupos, ya que los tipos intestinal (14 muestras) y difuso (18 muestras) están considerablemente más representados. Tal desbalance puede introducir sesgos en el análisis estadístico y dificultar la interpretación de los resultados, al reducir la capacidad comparativa y la potencia del estudio para detectar diferencias significativas entre subtipos histológicos.

Para este estudio, el tejido tumoral de humanos fue obtenido mediante resección quirúrgica, separándose una porción para análisis histopatológico y otra para la evaluación por PCR realizada en este trabajo. A nivel macroscópico, no es posible diferenciar regiones tumorales con distinta infiltración inmune ni identificar subclonas, en donde existan variaciones en la expresión de *TNFRSF9*. En consecuencia, debido a la heterogeneidad intratumoral, es posible que la expresión de ARNm de *TNFRSF9* observada en este estudio no refleje de manera precisa el panorama global del tumor, ya que no se basa en la totalidad del tejido tumoral.

Adicionalmente, luego de realizar la prueba de Wilcoxon pareada de una cola y se determinó una diferencia significativa entre la expresión de *TNFRSF9* entre el tejido tumoral y no tumoral del mismo paciente, con un $p = 0.0353$. Este hallazgo sugiere una posible implicación funcional de este gen en el contexto tumoral. *TNFRSF9* es un receptor coestimulador expresado principalmente en células T activadas, y su señalización está asociada con la amplificación de respuestas inmunes antitumorales, incluyendo la

proliferación de células T CD8⁺, la producción de citocinas y la supervivencia celular (Glorieux & Huang, 2019; Hashimoto, 2021).

La comparación directa entre tejido tumoral y no tumoral dentro del mismo paciente permitió fortalecer el análisis estadístico, ya que al tratarse de dos condiciones biológicas del mismo individuo se logró controlar la variabilidad interindividual. Esta estrategia resulta especialmente útil en estudios con número limitado de muestras, ya que reduce el ruido biológico y facilita la detección de diferencias que, aunque puedan ser sutiles, son estadísticamente significativas. En este caso, el enfoque pareado permitió observar con mayor claridad el impacto del entorno tumoral sobre la expresión génica, sin que factores externos como la edad, sexo o comorbilidades afectaran la comparación, ofreciendo una perspectiva más precisa sobre los posibles mecanismos de evasión inmunológica que podrían estar presentes en el adenocarcinoma gástrico.

Al comparar estos hallazgos con los resultados obtenidos en el modelo murino, se observó un patrón similar: el tejido gástrico con metaplasia intestinal presentó una mayor expresión de *Tnfrsf9* en comparación con el tejido gástrico normal. Esto podría sugerir que, tanto en humanos como en ratones, la expresión del gen de TNFRSF9 podría estar asociada a una respuesta inmunológica frente a procesos de transformación celular. Preliminarmente, en etapas tempranas como la metaplasia, esta activación podría representar un intento del sistema inmune por contener el cambio tisular, mientras que, en el tejido tumoral humano, su sobreexpresión podría reflejar una presencia activa de infiltrado inmunológico, posiblemente como parte de una respuesta antitumoral persistente o inducida por el microambiente. Sin embargo, esta interpretación no puede confirmarse sin identificar qué poblaciones celulares expresan el gen.

Una limitante clave de este estudio es la ausencia de caracterización de la polarización celular en tejido metaplásico murino y tumoral humano, dado que la función biológica de TNFRSF9 depende estrictamente del tipo celular que lo expresa. Por ejemplo, en células Tregs o macrófagos M2 (anti-inflamatorios), su activación puede favorecer un microambiente inmunosupresor, lo que contribuye a la persistencia de *H. pylori* y a la progresión tumoral. En contraste, en células T CD8⁺ efectoras, células NK y macrófagos M1 (pro-inflamatorios), la sobreexpresión del gen de TNFRSF9 se asocia con actividad

citotóxica y respuestas antitumorales, lo que evidencia su papel dual en la inmunidad tumoral (Li et al., 2022).

Esta dualidad implica que la señalización de TNFRSF9 puede tener efectos opuestos: potenciar la función supresora de Tregs (peor pronóstico) o reactivar CD8⁺ agotadas (mejor respuesta antitumoral). En estudio desarrollado por Zheng et al. (2021) se identificaron poblaciones enriquecidas en tumores que expresan TNFRSF9, particularmente TI-Tregs *TNFRSF9*⁺ activadas y subgrupos de linfocitos T CD8⁺ agotados, lo que confirma su papel relevante en la inmunidad tumoral. Además, la frecuencia de Tregs *TNFRSF9*⁺ varía entre tipos de cáncer y se correlaciona con factores del microambiente tumoral, como TGF- β , interferones y mutaciones específicas (por ejemplo, del gen *FAT1*), lo que indica que la modulación de *TNFRSF9* debe considerarse en un contexto altamente personalizado.

En este sentido, estrategias terapéuticas dirigidas a TNFRSF9, como agonistas anti-TNFRSF9, podrían mejorar la eficacia de la inmunoterapia al potenciar la actividad de CD8⁺ tumor-reativas, siempre que se controle el riesgo de amplificar la inmunosupresión mediada por Tregs. Para lograrlo, es indispensable estratificar pacientes según la composición celular y el perfil de TNFRSF9 en el tumor, incorporando inmunofenotipificación con marcadores específicos (CD4, CD8, FoxP3) y análisis de célula única (*single-cell*). Este enfoque permitirá diseñar terapias más precisas y efectivas, capaces de recapitular la complejidad del infiltrado tumoral y maximizar el beneficio clínico (Zheng et al., 2021).

La consistencia entre los resultados obtenidos en humanos y en el modelo murino sugiere que la expresión aumentada del gen de TNFRSF9 en tejido metaplásico y tumoral podría estar vinculada con la presencia de actividad inmunológica en diferentes estadios de la carcinogénesis gástrica. Aunque estos hallazgos no permiten confirmar que TNFRSF9 refleje de manera directa las etapas transformación, sí sugieren que esta molécula podría tener potencial como biomarcador inmunológico para monitorear cambios en el microambiente durante la progresión tumoral. Además, su expresión elevada en tejido tumoral podría indicar una ventana de oportunidad para intervenciones que potencien la respuesta inmune, especialmente en el contexto del adenocarcinoma gástrico, lo que refuerza la necesidad de estudios funcionales y de caracterización celular para validar su papel en inmunomodulación.

CONCLUSIÓN

En esta investigación se evidenció que el anticuerpo anti-TNFRSF9 empleado en la técnica de inmunohistoquímica no presentó la especificidad necesaria para detectar la proteína en tejido gástrico murino, lo que limitó su utilidad para caracterizar la expresión proteica. Ante esta limitación, se redirigió el análisis hacia la expresión de ARNm mediante PCR, sin observar diferencias significativas en función del tiempo de infección, grado de inflamación ni carga bacteriana. No obstante, se identificó una mayor expresión de *Tnfrsf9* en tejidos con metaplasia, lo que sugiere una posible asociación con procesos de transformación tisular y modulación inmunológica.

En muestras humanas, se encontró una expresión significativamente mayor de *TNFRSF9* en tejido tumoral respecto al no tumoral, reforzando su importancia en el microambiente tumoral. Sin embargo, no se observaron diferencias entre tipos histológicos ni etapas clínicas, posiblemente debido a la heterogeneidad tumoral, la variabilidad interindividual y mecanismos de regulación epigenética o post-transcripcional.

Como puntos de mejora, se recomienda en futuros estudios con modelos murinos incluir grupos experimentales en etapas tempranas de infección menores a las 10 semanas para capturar mejor la dinámica de expresión del gen de TNFRSF9, y aplicar técnicas de aislamiento celular como citometría de flujo o secuenciación de ARN de célula única para evitar la dilución de señales específicas en el análisis de tejido total.

Además, sería valioso complementar el análisis con estudios de metilación del promotor del gen de TNFRSF9, evaluación de microARNs reguladores y marcadores de agotamiento inmunológico, para comprender mejor los mecanismos que podrían estar modulando su expresión. Estas estrategias permitirían una caracterización más precisa del papel de TNFRSF9 en la carcinogénesis gástrica y su potencial aplicación como blanco terapéutico o marcador pronóstico.

BIBLIOGRAFÍA

- Ali Syeda, Z., Langden, S. S. S., Munkhzul, C., Lee, M., & Song, S. J. (2020). Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5). <https://doi.org/10.3390/ijms21051723>
- Almashhadany, D. A., Zainel, M. A., & AbdulRahman, T. T. (2024). Review of foodborne helicobacteriosis. *Italian Journal of Food Safety*, 13(3), 12176. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2024.12176>
- Alpizar-Alpizar, W., Skindersoe, M. E., Rasmussen, L., Kriegbaum, M. C., Christensen, I. J., Lund, I. K., Illemann, M., Laerum, O. D., Krogfelt, K. A., Andersen, L. P., & Ploug, M. (2020). Helicobacter pylori Colonization Drives Urokinase Receptor (uPAR) Expression in Murine Gastric Epithelium During Early Pathogenesis. *Microorganisms*, 8(7), 1019. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071019>
- Alsaafeen, B. H., Ali, B. R., & Elkord, E. (2025). Resistance mechanisms to immune checkpoint inhibitors: updated insights. *Molecular Cancer*, 24(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12943-024-02212-7>
- American Cancer Society. (2021a, January 22). *Stomach Cancer Stages*. Stomach Cancer. <https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>
- American Cancer Society. (2021b, May 7). *Treating Stomach Cancer*. Stomach Cancer. <https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/treating/by-stage.html>
- Añazco-Guenkova, A. M., Miguel-López, B., Monteagudo-García, Ó., García-Vílchez, R., & Blanco, S. (2024). The impact of tRNA modifications on translation in cancer: identifying novel therapeutic avenues. *NAR Cancer*, 6(1), zcae012. <https://doi.org/10.1093/narcan/zcae012>
- Bagchi, S., Yuan, R., & Engleman, E. G. (2021). Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 16, 223–249. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-042020>

- Berlth, F., Bollschweiler, E., Drebber, U., Hoelscher, A. H., & Moenig, S. (2014). Pathohistological classification systems in gastric cancer: Diagnostic relevance and prognostic value. *World Journal of Gastroenterology*, 20(19), 5679. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i19.5679>
- Bermúdez Garcell, A. J., Serrano Gámez, N. B., Teruel Ginés, R., Leyva Montero, M. de los Á., & Naranjo Coronel, A. A. (2019). Biología del cáncer. *Correo Científico Médico*, 23(4), 1394–1416.
- Brasil-Costa, I., Souza, C. de O., Monteiro, L. C. R., Santos, M. E. S., Oliveira, E. H. C. De, & Burbano, R. M. R. (2022). H. pylori Infection and Virulence Factors cagA and vacA (s and m Regions) in Gastric Adenocarcinoma from Pará State, Brazil. *Pathogens*, 11(4), 414. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040414>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Cavatorta, O., Scida, S., Miraglia, C., Barchi, A., Nouvenne, A., Leandro, G., Meschi, T., De' Angelis, G. L., & Mario, F. Di. (2018). Epidemiology of gastric cancer and risk factors. *Acta Biomedica*, 89(8), 82–87. <https://doi.org/10.23750/abm.v89i8-S.7966>
- Chaudhry, S. R., Liman, M. N. P., & Peterson, D. C. (2021, October 14). *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Stomach*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482334/>
- Cheon, D. J., & Orsulic, S. (2011). Mouse models of cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6, 95–119. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.3.121806.154244>
- Chester, C., Sanmamed, M. F., Wang, J., & Melero, I. (2018). Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies. *Blood*, 131(1), 49–57. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-06-741041>
- Cho, J. W., Son, J., Ha, S. J., & Lee, I. (2021). Systems biology analysis identifies TNFRSF9 as a functional marker of tumor-infiltrating regulatory T-cell enabling clinical outcome

- prediction in lung cancer. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 860–868. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.025>
- Cisło, M., Filip, A. A., Arnold Offerhaus, G. J., Ciseł, B., Rawicz-Pruszyński, K., Skierucha, M., & Polkowski, W. P. (2018). Distinct molecular subtypes of gastric cancer: from Laurén to molecular pathology. *Oncotarget*, 9(27), 19427–19442. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24827>
- Colquhoun, A., Arnold, M., Ferlay, J., Goodman, K. J., Forman, D., & Soerjomataram, I. (2015). Global patterns of cardia and non-cardia gastric cancer incidence in 2012. *Gut*, 64(12), 1881–1888. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308915>
- Correa, P., & Houghton, J. (2007). Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 133(2), 659–672. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.06.026>
- Crabtree, J. E., Ferrero, R. L., & Kusters, J. G. (2002). The Mouse Colonizing *Helicobacter pylori* Strain SS1 May Lack a Functional cag Pathogenicity Island. *Helicobacter*, 7(2), 139–140. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1083-4389.2002.00071.x>
- Crowe, S. E. (2019). *Helicobacter pylori* Infection. *New England Journal of Medicine*, 380(12), 1158–1165. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1710945>
- Dadashzadeh, K., Peppelenbosch, M. P., & Adamu, A. I. (2017). *Helicobacter pylori* Pathogenicity Factors Related to Gastric Cancer. *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7942489>
- Dawicki, W., & Watts, T. H. (2004). Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo. *European Journal of Immunology*, 34(3), 743–751. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/eji.200324278>
- Díaz, P., Valderrama, M. V., Bravo, J., & Quest, A. F. G. (2018). *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Adaptive cellular mechanisms involved in disease progression. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Number 5). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00005>

- Dobosz, P., & Dzieciatkowski, T. (2019). The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, p. 2965). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02965>
- Duan, Y., Xu, Y., Dou, Y., & Xu, D. (2025). Helicobacter pylori and gastric cancer: mechanisms and new perspectives. *Journal of Hematology & Oncology*, 18(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13045-024-01654-2>
- Eusebi, L. H., Telese, A., Marasco, G., Bazzoli, F., & Zagari, R. M. (2020). Gastric cancer prevention strategies: A global perspective. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 35(9), 1495–1502. <https://doi.org/10.1111/jgh.15037>
- Franzin, R., Netti, G. S., Spadaccino, F., Porta, C., Gesualdo, L., Stallone, G., Castellano, G., & Ranieri, E. (2020). The Use of Immune Checkpoint Inhibitors in Oncology and the Occurrence of AKI: Where Do We Stand? *Frontiers in Immunology*, 11, 574271. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.574271/BIBTEX>
- Fröhlich, A., Loick, S., Bawden, E. G., Fietz, S., Dietrich, J., Diekmann, E., Saavedra, G., Fröhlich, H., Niebel, D., Sirokay, J., Zarbl, R., Gielen, G. H., Kristiansen, G., Bootz, F., Landsberg, J., & Dietrich, D. (2020). Comprehensive analysis of tumor necrosis factor receptor TNFRSF9 (4-1BB) DNA methylation with regard to molecular and clinicopathological features, immune infiltrates, and response prediction to immunotherapy in melanoma. *EBioMedicine*, 52. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102647>
- Glorieux, C., & Huang, P. (2019). CD137 expression in cancer cells: Regulation and significance. *Cancer Communications*, 39(70), 1–3. <https://doi.org/10.1186/S40880-019-0419-Z/METRICS>
- Gullo, I., & Carneiro, F. (2019). Gastric Cancer: Pathology and Genetics. In *Reference Module in Biomedical Sciences* (3rd ed., pp. 77–98). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65076-6>
- Gutiérrez, Y., Márquez, R., Peraza, S., Becker, J. C., Romero, S., Calderón, M., Vivas, J., & Castro, D. (2006). Análisis inmunohistoquímico de P53, CERB-B2, EGFR y PCNA en cáncer gástrico. *Gen*, 60(3), 183–188.

- Han, Y., Liu, D., & Li, L. (2020). PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. In *Am J Cancer Res* (Vol. 10, Number 3).
- Hashimoto, K. (2021). CD137 as an Attractive T Cell Co-Stimulatory Target in the TNFRSF for Immuno-Oncology Drug Development. *Cancers*, 13(10). <https://doi.org/10.3390/cancers13102288>
- Huang, Y., Huang, H., Wei, T., Zhang, A., Zhang, H., Zhang, Z., Xu, Y., Wang, R., Wan, N., Li, X., Li, J., Li, Y., & Li, F. (2024). Disparities, Trends, and Predictions to 2040 in Gastrointestinal Cancer Incidence, Mortality in the United States. *The American Journal of Gastroenterology*, 120(6), 1367–1380. <https://doi.org/10.14309/ajg.00000000000003198>
- Hussein, R. A., Al-Ouqaili, M. T. S., & Majeed, Y. H. (2021). Detection of Helicobacter Pylori infection by invasive and non-invasive techniques in patients with gastrointestinal diseases from Iraq: A validation study. *PLOS ONE*, 16(8), e0256393. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0256393>
- Ibson, D. H. (2019). Advances in the treatment of gastric cancer. *Current Opinion in Gastroenterology*, 35(6), 551–554. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000577>
- International Agency for Research on Cancer. (2022). *Absolute numbers of cancer for both sexes in 2022*. Globocan 2022 - 08.02.2024. https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=population&group_populations=0
- Ishaq, S., & Nunn, L. (2015). Helicobacter pylori and gastric cancer: a state of the art review. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 8(1).
- Joseph, A. M., Srivastava, R., Zabaleta, J., & Davila, E. (2016). Cross-talk between 4-1BB and TLR1–TLR2 Signaling in CD8+ T Cells Regulates TLR2's Costimulatory Effects. *Cancer Immunology Research*, 4(8), 708–716. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0173>
- Joshi, S. S., & Badgwell, B. D. (2021). Current treatment and recent progress in gastric cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 264–279. <https://doi.org/10.3322/caac.21657>

- Juarros-Basterretxea, J., Aonso-Diego, G., Postigo, Á., Montes-Álvarez, P., Menéndez-Aller, Á., & García-Cueto, E. (2024). Post-Hoc Tests in One-Way ANOVA: The Case for Normal Distribution. *Methodology*, 20(2 SE-Original Article), 84–99. <https://doi.org/10.5964/meth.11721>
- Kabiraj, A., Gupta, J., Khaitan, T., & Bhattacharya, P. T. (2015). Principle and techniques of immunohistochemistry—a review. *Int J Biol Med Res*, 6(3), 5204–5210.
- Kalyuzhny, A. E. (2016). Immunohistochemistry. *Nature*, 10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-30893-7>
- Karimi, P., Islami, F., Anandasabapathy, S., Freedman, N. D., & Kamangar, F. (2014). Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 23(5), 700–713. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-1057>
- Kayali, S., Aloe, R., Bonaguri, C., Gaiani, F., Manfredi, M., Leandro, G., Fornaroli, F., Di Mario, F., & De'angelis, G. L. (2018). Non-invasive tests for the diagnosis of helicobacter pylori: state of the art. *Acta Bio Medica : Atenei Parmensis*, 89(8), 64. <https://doi.org/10.23750/ABM.V89I8-S.7910>
- Kayali, S., Manfredi, M., Gaiani, F., Bianchi, L., Bizzarri, B., Leandro, G., Di Mario, F., & De'angelis, G. L. (2018). Helicobacter pylori, transmission routes and recurrence of infection: State of the art. *Acta Biomedica*, 89(8), 72–76. <https://doi.org/10.23750/abm.v89i8-S.7947>
- Kim, S. T., Cristescu, R., Bass, A. J., Kim, K.-M., Odegaard, J. I., Kim, K., Liu, X. Q., Sher, X., Jung, H., Lee, M., Lee, S., Park, S. H., Park, J. O., Park, Y. S., Lim, H. Y., Lee, H., Choi, M., Talasz, A., Kang, P. S., ... Kang, W. K. (2018). Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer. *Nature Medicine*, 24(9), 1449–1458. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0101-z>
- Kim, S.-W., Roh, J., & Park, C.-S. (2016). Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *Jptm*, 50(6), 411–418. <https://doi.org/10.4132/jptm.2016.08.08>

- Kono, K., Nakajima, S., & Mimura, K. (2020). Current status of immune checkpoint inhibitors for gastric cancer. In *Gastric Cancer* (Vol. 23, Number 4, pp. 565–578). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10120-020-01090-4>
- Lai, J. F., Xu, W. N., Noh, S. H., & Lu, W. Q. (2016). Effect of World Health Organization (WHO) Histological Classification on Predicting Lymph Node Metastasis and Recurrence in Early Gastric Cancer. *Medical Science Monitor*, 22, 3147–3153. <https://doi.org/10.12659/MSM.897311>
- Lamont, T. (2022, August 3). *Patient education: Helicobacter pylori infection and treatment (Beyond the Basics)*. Helicobacter Pylori. <https://www.uptodate.com/contents/helicobacter-pylori-infection-and-treatment-beyond-the-basics>
- Lee, J. Y., & Kim, N. (2015). Diagnosis of Helicobacter pylori by invasive test: histology. *Annals of Translational Medicine*, 3(1), 10. <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2305-5839.2014.11.03>
- Li, Y., Hu, X., Lin, R., Zhou, G., Zhao, L., Zhao, D., Zhang, Y., Li, W., Zhang, Y., Ma, P., Ren, H., Liao, X., Niu, P., Wang, T., Zhang, X., Wang, W., Gao, R., Li, Q., Church, G., ... Chen, Y. (2022). Single-cell landscape reveals active cell subtypes and their interaction in the tumor microenvironment of gastric cancer. *Theranostics*, 12(8), 3818–3833. <https://doi.org/10.7150/thno.71833>
- Libânio, D., Dinis-Ribeiro, M., & Pimentel-Nunes, P. (2015). Helicobacter pylori and microRNAs: Relation with innate immunity and progression of preneoplastic conditions. *World Journal of Clinical Oncology*, 6(5), 111–132. <https://doi.org/10.5306/wjco.v6.i5.111>
- Liu, X., Zhou, Y., Qin, C., & Zhu, X. (2022). TNFRSF9 Suppressed the Progression of Breast Cancer via the p38MAPK/PAX6 Signaling Pathway. *Journal of Oncology*, 2022(1), 8549781. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2022/8549781>
- Luo, D., Liu, Y., Lu, Z., & Huang, L. (2025). Targeted therapy and immunotherapy for gastric cancer: rational strategies, novel advancements, challenges, and future

perspectives. *Molecular Medicine*, 31(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s10020-025-01075-y>

Machlowska, J., Baj, J., Sitarz, M., Maciejewski, R., & Sitarz, R. (2020). Gastric cancer: Epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11). <https://doi.org/10.3390/ijms21114012>

Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. In W. H. Yong (Ed.), *Biobanking: Methods and Protocols* (pp. 289–298). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25

Malfertheiner, P., Camargo, M. C., El-Omar, E., Liou, J.-M., Peek, R., Schulz, C., Smith, S. I., & Suerbaum, S. (2023). Helicobacter pylori infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 9(1), 19. <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00431-8>

Marin-Acevedo, J. A., Kimbrough, E. M. O., & Lou, Y. (2021). Next generation of immune checkpoint inhibitors and beyond. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 14, Number 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01056-8>

Mascarelli, D. E., Rosa, R. S. M., Toscaro, J. M., Semionatto, I. F., Ruas, L. P., Fogagnolo, C. T., Lima, G. C., & Bajgelman, M. C. (2021). Boosting Antitumor Response by Costimulatory Strategies Driven to 4-1BB and OX40 T-cell Receptors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Volume 9-2021.

Ministerio de Salud de Costa Rica. (2023). *Incidencia de tumores malignos 2017-2022*. <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/biblioteca/material-educativo/material-publicado/estadisticas-y-bases-de-datos/estadisticas-y-bases-de-datos-vigilancia-de-la-salud/estadistica-de-cancer-registro-nacional-tumores/incidencia/incidencia-2017-al>

Muhammad, J. S., Eladl, M. A., & Khoder, G. (2019). Helicobacter pylori-induced DNA Methylation as an Epigenetic Modulator of Gastric Cancer: Recent Outcomes and Future Direction. *Pathogens*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens8010023>

- Pan, K.-F., Li, W.-Q., Zhang, L., Liu, W.-D., Ma, J.-L., Zhang, Y., Ulm, K., Wang, J.-X., Zhang, L., Bajbouj, M., Zhang, L.-F., Li, M., Vieth, M., Quante, M., Wang, L.-H., Suchanek, S., Mejías-Luque, R., Xu, H.-M., Fan, X.-H., ... You, W.-C. (2024). Gastric cancer prevention by community eradication of *Helicobacter pylori*: a cluster-randomized controlled trial. *Nature Medicine*, *30*(11), 3250–3260. <https://doi.org/10.1038/s41591-024-03153-w>
- Park, J. Y., Georges, D., Alberts, C. J., Bray, F., Clifford, G., & Baussano, I. (2025). Global lifetime estimates of expected and preventable gastric cancers across 185 countries. *Nature Medicine*, *31*(9), 3020–3027. <https://doi.org/10.1038/s41591-025-03793-6>
- Poh, A. R., O'Donoghue, R. J. J., Ernst, M., & Putoczki, T. L. (2016). Mouse models for gastric cancer: Matching models to biological questions. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *31*(7), 1257–1272. <https://doi.org/10.1111/jgh.13297>
- Ramos-Vara, J. A. (2017). Principles and Methods of Immunohistochemistry. In J.-C. Gautier (Ed.), *Drug Safety Evaluation: Methods and Protocols* (pp. 115–128). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7172-5_5
- Randel, A. (2018). *H. pylori* Infection: ACG Updates Treatment Recommendations. *American Family Physician*, *97*(2), 135–137.
- Rawla, P., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Gastroenterology Review*, *14*(1), 26–38. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.80001>
- Reyes, S. J., González, K. B., Rodríguez, C., Navarrete-Muñoz, C., Salazar, A. P., Villagra, A., Caglevic, C., & Hepp, M. I. (2020). Actualización general de inmunoterapia en cáncer. *Revista Médica de Chile*, *148*(7), 970–982.
- Rho, H.-W., Lee, B.-C., Choi, E.-S., Choi, I.-J., Lee, Y.-S., & Goh, S.-H. (2010). Identification of valid reference genes for gene expression studies of human stomach cancer by reverse transcription-qPCR. *BMC Cancer*, *10*(1), 240. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-240>

- Richa, Sharma, N., & Sageena, G. (2022). Dietary factors associated with gastric cancer - a review. *Translational Medicine Communications*, 7(7). <https://doi.org/10.1186/s41231-022-00111-x>
- Rizk, T. H. (2023). Chapter 31 - Analysis of variance. In A. E. M. Eltorai, T. Liu, R. Chand, & S. P. B. T.-T. I. R. Kalva (Eds.), *Handbook for Designing and Conducting Clinical* (pp. 149–152). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823026-8.00024-9>
- Rodríguez, F. D. A., Solís, R. V. G., López, E. D. M., Pasquel, D. A. C., Legarda, A. I. T., López, J. K. Á., Vásquez, F. A. R., Valle, V. E. A., & Carvajal, L. A. V. (2024). Cáncer gástrico—actualización en diagnóstico y tratamiento: revisión bibliográfica. *Gastroenterol. Latinoam*, 35(3), 151–159.
- Rogers, A. B. (2012a). *Histologic Scoring of Gastritis and Gastric Cancer in Mouse Models* (pp. 189–203). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-005-2_22
- Rogers, A. B. (2012b). *Histologic Scoring of Gastritis and Gastric Cancer in Mouse Models* (pp. 189–203). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-005-2_22
- Rosero, C., Corredor, M., & Mejia, L. (2017). Polimorfismos en genes implicados en el desarrollo de cáncer gástrico: revisión. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 31, 391. <https://doi.org/10.22516/25007440.114>
- Rotte, A., Jin, J. Y., & Lemaire, V. (2018). Mechanistic overview of immune checkpoints to support the rational design of their combinations in cancer immunotherapy. *Annals of Oncology*, 29(1), 71–83. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx686>
- Sankararaman, S., & Moosavi, L. (2021, January). *Urea Breath Test*. Stat Pearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542286/>
- Sedano, M., Ramos, E., Choudhari, R., Harrison, A., Subramani, R., Lakshmanaswamy, R., Zilaie, M., & Gadad, S. S. (2020). Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase 1 Is Upregulated, Predicts Clinical Outcome and Controls Gene Expression in Breast Cancer. In *Cancers* (Vol. 12, Number 6). <https://doi.org/10.3390/cancers12061522>

- Sexton, R. E., Al Hallak, M. N., Diab, M., & Azmi, A. S. (2020). Gastric cancer: a comprehensive review of current and future treatment strategies. *Cancer Metastasis Reviews*, 39(4), 1179–1203. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09925-3>
- Singh, R., Kim, Y.-H., Lee, S.-J., Eom, H.-S., & Choi, B. K. (2024). 4-1BB immunotherapy: advances and hurdles. *Experimental & Molecular Medicine*, 56(1), 32–39. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01136-4>
- Sun, K., Jia, K., Lv, H., Wang, S.-Q., Wu, Y., Lei, H., & Chen, X. (2020). EBV-Positive Gastric Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.583463>
- Sundar, R., Nakayama, I., Markar, S. R., Shitara, K., van Laarhoven, H. W. M., Janjigian, Y. Y., & Smyth, E. C. (2025). Gastric cancer. *The Lancet*, 405(10494), 2087–2102. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(25\)00052-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(25)00052-2)
- Takahashi-Kanemitsu, A., Knight, C. T., & Hatakeyama, M. (2020). Molecular anatomy and pathogenic actions of *Helicobacter pylori* CagA that underpin gastric carcinogenesis. *Cellular & Molecular Immunology*, 17, 50–63. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0339-5>
- Tan, Z. (2019). Recent advances in the surgical treatment of advanced gastric cancer: A review. In *Medical Science Monitor* (Vol. 25, pp. 3537–3541). International Scientific Information, Inc. <https://doi.org/10.12659/MSM.916475>
- Thrift, A. P., & El-Serag, H. B. (2020). Burden of Gastric Cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 18(3), 534–542. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.07.045>
- Thrift, A. P., & Nguyen, T. H. (2021). Gastric Cancer Epidemiology. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 31(3), 425–439. <https://doi.org/10.1016/j.giec.2021.03.001>
- Townsend, M. H., Felsted, A. M., Ence, Z. E., Piccolo, S. R., Robison, R. A., & O'Neill, K. L. (2019). Falling from grace: HPRT is not suitable as an endogenous control for cancer-related studies. *Molecular & Cellular Oncology*, 6(2), 1575691. <https://doi.org/10.1080/23723556.2019.1575691>

- Tran, V. G., Nguyen, N. N. Z., & Kwon, B. (2021). CD137 Signaling Is Critical in Fungal Clearance during Systemic *Candida albicans* Infection. *Journal of Fungi*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/jof7050382>
- Vanegas, J. C., Herrero, R., Barboza-Solís, C., Ocampo, R., Torres, G., Ortiz-Barboza, A., Ramírez, V., Une, C., Calderón, A., Porrás, C., Carvajal, L. J., & Fantin, R. (2025). Descriptive epidemiology of gastric cancer in Costa Rica from 1990 to 2022 and projection of deaths to 2050: a population-based study. *The Lancet Regional Health – Americas*, 49. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2025.101194>
- Ventola, C. L. (2017). Cancer Immunotherapy, Part 1: Current Strategies and Agents. *Pharmacy and Therapeutics*, 42(6), 375–383.
- Vidal, J. (2017). Individual differences in the antibody response of inbred C57Bl/6J mice and their relation to individual differences in open-field behavior. *Anuario de Psicología / The UB Journal of Psychology*, 47(1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.anpsic.2017.05.002>
- Vinokurov, A. Y., Soldatov, V. O., Seregina, E. S., Dolgikh, A. I., Tagunov, P. A., Dunaev, A. V., Skorkina, M. Y., Deykin, A. V., & Abramov, A. Y. (2023). HPRT1 Deficiency Induces Alteration of Mitochondrial Energy Metabolism in the Brain. *Molecular Neurobiology*, 60(6), 3147–3157. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03266-2>
- Ward-Kavanagh, L. K., Lin, W. W., Šedý, J. R., & Ware, C. F. (2016). The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses. *Immunity*, 44(5), 1005–1019. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.019>
- Wei, S. C., Duffy, C. R., & Allison, J. P. (2018). Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. In *Cancer Discovery* (Vol. 8, Number 9, pp. 1069–1086). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0367>
- Wizenty, J., & Sigal, M. (2025). *Helicobacter pylori*, microbiota and gastric cancer — principles of microorganism-driven carcinogenesis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 22(5), 296–313. <https://doi.org/10.1038/s41575-025-01042-2>

- Wu, B., Yang, D., Yang, S., & Zhang, G. (2021). Dietary Salt Intake and Gastric Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Nutrition*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.801228>
- Wu, T., Jiao, Z., Li, Y., Su, X., Yao, F., Peng, J., Chen, W., & Yang, A. (2022). HPRT1 Promotes Chemoresistance in Oral Squamous Cell Carcinoma via Activating MMP1/PI3K/Akt Signaling Pathway. *Cancers*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/cancers14040855>
- Xu, J. (2025). The role of tumor necrosis factor receptor superfamily in cancer: insights into oncogenesis, progression, and therapeutic strategies. *Npj Precision Oncology*, 9(1), 275. <https://doi.org/10.1038/s41698-025-00990-x>
- Zamani, M., Vahedi, A., Maghdouri, Z., & Shokri-Shirvani, J. (2017). Role of food in environmental transmission of *Helicobacter pylori*. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 8(3), 146–152. <https://doi.org/10.22088/CJIM.8.3.146>
- Zhang, H., He, D., Zhang, M., Feng, X., An, A., Ju, C., Li, H., & Ouyang, D. (2020). Evaluation of efficacy and toxicity of CD137 immunotherapy with urelumab-mIgG1 chimeric antibody in CD137 HuGEMMTM. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8(Suppl 3), A388. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-SITC2020.0647>
- Zhang, K., Cui, M., Zhu, Y., Li, S., Su, G., & Du, L. (2025). Research advances of the establishment and characterization of *Helicobacter pylori* infection animal models. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1683366.
- Zhang, M., Ding, C., Xu, L., Ou, B., Feng, S., Wang, G., Wang, W., Liang, Y., Chen, Y., Zhou, Z., & Qiu, H. (2021). Comparison of a Tumor-Ratio–Metastasis Staging System and the 8th AJCC TNM Staging System for Gastric Cancer. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.595421>
- Zhang, Q., Yang, S., Zhou, J., Li, Z., Wang, L., & Dong, Q. (2023). Diagnostic accuracy of stool sample-based PCR in detecting *Helicobacter pylori* infection: a meta-analysis. *Journal of Laboratory Medicine, Journal of Laboratory Medicine*, 47(5), 187–197. <https://doi.org/doi:10.1515/labmed-2023-0004>

- Zhang, X., Arnold, I. C., & Müller, A. (2020). Mechanisms of persistence, innate immune activation and immunomodulation by the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Current Opinion in Microbiology*, 54, 1–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.01.003>
- Zhang, X., He, Y., Zhang, X., Fu, B., Song, Z., Wang, L., Fu, R., Lu, X., Xing, J., Lv, J., Guo, M., Huo, X., Liu, X., Lu, J., Du, X., Ge, Z., Chen, Z., & Li, C. (2024). Sustained exposure to *Helicobacter pylori* induces immune tolerance by desensitizing TLR6. *Gastric Cancer*, 27(2), 324–342. <https://doi.org/10.1007/s10120-023-01461-7>
- Zheng, L., Qin, S., Si, W., Wang, A., Xing, B., Gao, R., Ren, X., Wang, L., Wu, X., Zhang, J., Wu, N., Zhang, N., Zheng, H., Ouyang, H., Chen, K., Bu, Z., Hu, X., Ji, J., & Zhang, Z. (2021). Pan-cancer single-cell landscape of tumor-infiltrating T cells. *Science*, 374(6574), abe6474. <https://doi.org/10.1126/science.abe6474>

ANEXOS

Anexo 1. Materiales y reactivos para inmunohistoquímica y tinción de hematoxilina eosina de Mayers

- Frascos Coplin + porta-láminas en vidrio
- Frascos Coplin en plástico
- Parrilla corrediza (rack) ShandonSequenza
- Placas de cubierta Shandon
- Portaobjetos de vidrio Superfrost Plus
- Cubreobjetos 50 x 24mm
- Xilol
- Etanol de 70%, 96% y 99%
- 30% de H₂O₂
- TBS-T: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.5% de Triton X-100, pH 7.6 (10X TBS: 60.55g Tris, 87.66g NaCl in 1L)
- TEG-buffer: 10 mM Tris, 0.5 mM EDTA, pH 9.0
- Citrato-buffer: 10 mM Citrato de sodio, pH 6.0
- Proteinasa K buffer: 50 mM Tris, 0.5 M EDTA, pH 8.0
- Stock de Proteinasa-K 10 mg/ml
- Albúmina sérica bovina al 5%
- Anticuerpo primario para estandarización de inmunohistoquímica: anticuerpo policlonal de conejo anti-CD137, que contiene 0.02% de azida sódica, PA5-116949, Thermofisher
- Anticuerpo primario para detección de *H. pylori*: anticuerpo policlonal anti-*H. pylori*, B0471, Dako (concentración de stock 0.24 g/L)
- Diluyente de anticuerpo, S3022, Dako
- Anticuerpo secundario: EnVisionRabbit, K4003, Dako
- Kit de cromógeno DAB, K3468, Dako
- Hematoxilina de Mayer
- Pertex medio de montaje
- Tejido parafinado
- Hematoxilina de Mayers, 20190, Sakura Finetek
- Eosina amarilla al 1%

Anexo 2. Materiales y reactivos para extracción de ARN y PCR cuantitativa

- Reactivo TRIzol Invitrogen (Número de catálogo **15596026 o 15596018**)
- Centrífuga capaz de llegar a 12000 x g y a 4 °C
- Tubos de microcentrífuga de polipropileno
- Cloroformo
- Baño maría con temperatura de 55 – 60 °C
- Isopropanol
- Etanol al 75%
- Agua libre de ARNasas al 0.5% dodecil sulfato de sodio
- PowerUp SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems)
- Vortex
- Termociclador para PCR
- Inhibidor de ARNasas
- Primers

Anexo 3. Aprobación del “Animal Experiments Inspectorate” del Instituto Finsen del Hospital Universitario de Copenhagen

DET SUNDHEDSVIDENSKABELIGE FAKULTET
KØBENHAVNS UNIVERSITET

AFDELING FOR EKSPERIMENTEL MEDICIN

BLEGDAMSVEJ 3B

2200 KØBENHAVN N

TLF +45 35 32 73 73

FAX +45 35 32 73 99

E-MAIL: EMED-PROJEKTPLANER@SUND.KU.DK



Projektplan – Forsøg 2012

Dette skema skal udfyldes for et nyt forsøg som igangsættes. Skemaet skal afleveres elektronisk til postkassen EMED-Projektplaner@sund.ku.dk. Skemaet returneres fra AEM til forsker forsynet med et projektnummer P 10-xxx, som forsker anfører på dyrebestilling, og som skal anføres på burkort for dyr, som anvendes i forsøget. NB alle felter skal udfyldes.

This form must be filled in before a new experiment can start. The form must be sent to the mailbox EMED-Projektplaner@sund.ku.dk. The form will be returned to the scientist with a project number P 10-xxx, which the scientist must put on the animal order form, and which must be written on the cage card for animals used in the project. NB all fields must be filled in.

Udfyldes af AEM/For AEM use

AEMs projektnummer: <i>AEM project number:</i>	Dato: <i>Date:</i>	Dyrlægens navn: <i>Name of veterinarian:</i>
P 12-165	19-04-12	CSCP

Teststoffer og øvrige kemikalier - AEMs arbejdsmiljøorganisation vil med udgangspunkt i Kemibrugs kemikaliedatablad (www.kemibrug.dk) beslutte eventuelle beskyttelsesforanstaltninger. Eventuelle merudgifter hertil oppebæres af forsker.

Test substances and other chemicals used - The occupational health organisation of AEM will, based on datasheets in Kemibrug (www.kemibrug.dk) decide upon possible safety measures. Any costs will be charged to the scientist.

Stofnavn(e):

(Anfør samtlige teststoffer)

Name of substance(s):

(State all substances)

Helicobacter pylori (strains SS1 and B128). Der er ingen risiko forbundet med arbejdet med *H. pylori*.



Helicobacter pylori er et klasse 2 mikrobiologisk agens, hvorfor label med symbol for mikrobiologisk agens, skal påsætte bure

For at beskytte dyrene mest muligt fra infektion med andre *Helicobacter* stammer, som findes i visse dyr på Biocenter/AEM, skal nedenstående forholdsregler følges, se evt. vedlagt SOP

- Opstaldning skal ske i IVC bure som kører på overtryk
- IVC bure må kun åbnes under LAF tag
- De bure som skal bruges skal fyldes med foder, flaske, strøelse,

	<p>bideklodser, redemateriale og skjul og autoklaveres inden brug, hvilket vil sige ugen før.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inden burene åbnes vaskes LAF-bænken med sæbevand og sprøjtes med Vircon S • Burene skiftes som de første om mandagen af en person som ikke har været på weekendvagt. Den dyrepasser der skifter dyrene ifører sig en ren overtræksdragt, hårnnet og rene handsker. Hvis det bliver nødvendigt at åbne burene yderligere skal dyrepasseren tage en ren overtræksdragt, hårnnet og rene handsker på og ikke berøre indersiden af buret. • Musene håndteres med pincet som står nedsænket i Vircon S mellem skift. • Det er kun ydersiden af burene der berøres ved skift og ved brud på dette skiftes der handsker. <p>Dyrene skal i dette forsøg også behandles med forskellige antibiotika PO, men der er ingen særlige forholdsregler i den forbindelse. /CSCP</p>
--	---

Dyreforsøgstilladelsens indehaver:**Holder of animal experimental licence:**

Tilladelsens sagsnummer <i>Licence file number</i> (yyyy/561-xxxx):	2007/561-1394 Udvidelser til tilladelsen dækker alle nedenfor stående forsøg. Seneste udvidelse godkendt april 2012.	Tilladelsens udløbsdato: <i>Licence expiration date:</i>	21-12-2012
Navn: <i>Name:</i>	Ming Chen		
Adresse/Institutt: <i>Address/Institute:</i>	Tagensvej afsnit 7602 Klinisk mikrobiologisk afdeling		
Telefon: <i>Telephone:</i>	3545 7738	Mobiltelefon: <i>Mobile phone:</i>	20886299
E-mail: <i>E-mail:</i>	ming.chen@rh.regionh.dk		

Kontaktoplysninger i AEM:**Contact information in AEM:**

Kontaktdyretekniker: [*] <i>Contact technician:</i>	Line	Staldafsnit: <i>Animal unit:</i>	Biocenter
---	------	-------------------------------------	-----------

"Hvis du ikke allerede har en kontaktdyretekniker vil du blive kontaktet af en fra det afsnit hvor du ønsker dine dyr skal opstaldes.

If you do not already have a contact technician, you will be contacted by a technician from the unit where you want your animals placed.

Ansvarlig for forsøget/kontaktperson:**Responsible person for the project:**

Navn: <i>Name:</i>	Warner Alpizar-Alpizar		
Adresse/Institutt: <i>Address/Institute:</i>	Københavns Biocenter, Ole Maaloes Vej 5, 3, 3, DK-2200 Copenhagen N Finsenlaboratoriet, Rigshospitalet.		
Telefon: <i>Telephone:</i>	3545 6049	Mobiltelefon: <i>Mobile phone:</i>	28224283
E-mail: <i>E-mail:</i>	walpizar@finsenlab.dk		
Bestået forsøgsdyrskursus på (sæt kryds): <i>Level of education in labora- tory animal science (x):</i>	B niveau <i>B level</i>		
	C niveau <i>C level</i>	X	

Andre deltagere i forsøget/medhjælpere (brug tabulatoren for at tilføje rækker):**Other participants in the project/assistants (use the tabulator to add fields):**

Navn: <i>Name:</i>	Telefonnummer: <i>Telephone number:</i>	Bestået forsøgsdyrskursus (sæt kryds) <i>Level of edu- cation in laboratory ani- mal science (x)</i>	
		B niveau <i>B level</i>	C niveau <i>C level</i>
Ida Katrine Lund	3545 6028		X
Lotte Frederiksen	3545 6048	X	

Omkostningerne vedrørende projektet debiteres til:**Project costs to be charged to:**

Kontonummer hos AEM: [*] <i>AEM account number:</i>	20160
Navn <i>Name:</i>	Gunilla Hoyer-Hansen
Adresse/Institutt: <i>Address/Institute:</i>	Finsenlaboratoriet, Rigshospitalet Københavns Biocenter, Ole Maaloes Vej 5, 3, 3, DK-2200 Copenhagen N
Telefon <i>Telephone:</i>	3545 6027

^{*} Kontonummer er bl.a. anført på månedsfakturaen. Ny bruger kan få et kontonummer via AEMs hjemmeside <http://emed.ku.dk/forskerservice/kontooprettelse/>. *The account number is e.g. given on*

the monthly invoice. New users may set up an account via our website
<http://emed.ku.dk/forskertservice/kontooprettelse/>.

Anvendelse af genmodificerede dyr:

Use of genetically modified animals:

Nummer og dato på tilladelse fra Arbejdstilsynet til GMO-forskningsprojekt: <i>Number and date of permission from the Working Environment Authority:</i>	2010/561-1823 (Gunilla Høyer-Hansen) Dato: 14. february 2011 (bilag 1)
---	---

Anvendelse af biologiske agenser:

Use of biological agents:

Kvittering fra Arbejdstilsynet for anmeldelse af projekt med biologiske agenser: <i>Receipt from the Working Environment Authority on registration of project with biological agents:</i>	Bilag 2
--	---------

Anvendelse af biologiske materialer:

Use of biological materials:

Ved brug af biologiske materialer som f.eks. monoklonale antistoffer, celle- eller vævskulturer, transplantable tumorer, blod, serum og parasitter, skal vedlægges kopi af screening for en lang række virus. Hvis denne screening ikke er foretaget, skal henvendelse rettes til AEMs dyrlæger. <i>When biological materials including e.g. monoclonal antibodies, cell or tissue cultures, transplantable tumours, blood, serum, and parasites are used, a copy of screening for a number of viruses must be attached. If this screening has not been done you must contact the AEM veterinarians</i>	
Kopi af screening vedlagt (sæt kryds) <i>Copy of screening attached (x)</i>	Bilag 3 (eftersendes så snart svar fra Taconi's RapidMap27 test foreligger på <i>Helicobacter pylori</i>).

Forsøgsplan:

Project plan:

Kort beskrivelse af forsøget inklusiv tidsplan. Såfremt tidsplanen ikke kendes endnu, anføres at AEM vil modtage en tidsplan på et senere tidspunkt. <i>Short description of the experiments including time schedule. If the time schedule is not yet known, please state that you will let AEM know later.</i>
AIM: The experiments seek to elucidate whether the expression of the components of the urokinase plasminogen activation (uPA) system is induced in gastric mucosa in response to <i>Helicobacter pylori</i> infection. In order to answer this question, we will use mouse models of specific genetic backgrounds and mice deficient for selected components of the uPA system, as follows: 1) STUDIES IN MOUSE MODELS OF SELECTED GENETIC BACKGROUNDS These experiments will be undertaken in C57BL/6 and BALB/C mouse strains. The mice will be infected with <i>Helicobacter pylori</i> (SS1 and B128 strains). The animals will be divided into <i>H. pylori</i> -infected and unchallenged control groups, with 5 to 10 animals per group. Mice will be infected by oral gavage with a single dose of 0.2 ml PBS containing approximately 10 ⁹ colony-forming units of bacteria, while the control mice will receive inoculums of 0.2 ml PBS alone. The groups of mice will be followed for determined intervals of time, ranging from 3 to 30 weeks, and then sacrificed. The mice will be inspected continuously i.e. at least twice a week. At the termination of the experiment, mice will be euthanized, and blood and stomachs from the mice will be collected and processed adequately for the following subsequent analyses:

- Confirmation the *H. pylori* colonization: semi-quantitative culture from fresh gastric tissue, immunohistochemistry, ELISA and PCR for specific bacterial genomic sequences.
- Evaluation of the histopathological state of the gastric mucosa: Microscopic examination of tissue sections stained with Hematoxylin and Eosin.
- Expression of components of the uPA system: immunohistochemistry, *in situ* hybridization and immunofluorescence.

2) STUDIES IN TRANSGENIC MICE WITH GENE ABLATIONS FOR COMPONENTS OF THE uPA SYSTEM

Using these particular transgenic mouse models we seek to address functional aspects of these components of the uPA system in *Helicobacter*-induced pathogenesis. The deficient mice for uPAR, uPA, Plasminogen and NGAL to be used on these experiments are fully backcrossed into the C57BL/6 background and are presently available at the Finsen Laboratory.

First, we will explore the susceptibility of these mice to get infected with the two above-mentioned strains of *H. pylori*. Groups of mice deficient for each of the components and wild-type littermates will be infected, followed up, inspected and sacrificed, as described above. At euthanasia, the blood and stomachs of the mice will be collected and processed adequately for performing the subsequent analyses, following the same methodological approaches as above described.

3) STUDIES OF PHARMACOLOGICAL TREATMENT OF *H. pylori*-INFECTED MICE WITH ANTI-INFLAMMATORY DRUGS

These experiments seek to attenuate the inflammatory response caused by the *H. pylori* in the mouse stomach, without eradicating the bacterial infection. Groups of 5 to 10 mice will be inoculated with *H. pylori* suspended in saline PBS, or PBS alone, as described in part 1. After inoculation, the animals will be treated with a mixture of two synthetic prostaglandin E₂ (PGE₂) analogs, 16, 16-dimethyl PGE₂ and 17-phenyl trinor PGE₂, diluted in PBS (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, Catalog No. 14750 and 141810; see Material Safety Data Sheets enclosed).

First, a stock solution containing 1.00 µg/µL of each of the PGE₂ analogs will be prepared in 100% ethanol. Subsequently, the stock solution will be further diluted in PBS to 0.10 µg/µL. 100 µL of this will then be administered to the mice three times a week, twice injected intraperitoneally (IP) and once combined IP/orogastrically. Thus, the total dose of the mixture of PGE₂ analogs will correspond to 30 µg/week/mouse. Control mice will be injected with PBS alone. The groups of mice will be followed for determined intervals of time, ranging from 3 to 20 weeks, and then sacrificed. The mice will be inspected continuously. As in part 1, at the termination of the experiment, mice will be euthanized, and blood and stomachs of the mice will be collected and processed adequately for subsequent analyses, following the same methodological approaches as above described.

The use of these two PGE₂ analogs as well as the proposed dose is based on the following previous studies:

- Toller I. *et al.* 2010. Prostaglandin E₂ prevents *Helicobacter*-induced gastric preneoplasia and facilitates persistent infection in a mouse model. *Gastroenterology* 138: 1455-1467.
- Tinagawa T. *et al.* 2004. Anti-inflammatory effect of two isoforms of COX in *H. pylori*-induced gastritis in mice: possible involvement of PGE₂. *Am J Gastroenterol Liver Physiol* 286: G148-G156.
- Hansen-Petrik MB. *et al.* 2002. Prostaglandin E₂ protects intestinal tumors from nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced regression in Apc^{Min/+} mice. *Cancer Res* 62: 403-408.

4) ANTIBIOTIC TREATMENT OF MICE INFECTED WITH *H. pylori*.

Studies in mouse models of gastric carcinogenesis have demonstrated that *H. pylori* eradication with antibiotics attenuates inflammation and prevents the further development of gastric preneoplastic lesions. In order to unravel whether the induction of uPAR in gastric mucosa can be reverted after eradication of *H. pylori*, groups of C57BL/6 mice will be inoculated with *H. pylori* as described above and 15 weeks post-inoculation will be subjected to standard human treatment for eradication of *H. pylori* infection. This treatment is composed of the following antibiotics, for

which the dose of each component has been optimized in rodents (references listed below): Omeprazole (400 µmol/Kg/day), Metronidazole (14.2 mg/Kg/day) and Clarithromycin (7.15 mg/Kg/day). As standard for human patients, mice will be treated twice a day for 7 days by oral administration (Antibiotics from Sigma Aldrich, Brøndby, Denmark, Catalog No. 12262, 00901 and 16632; see Material Safety Data Sheets enclosed demonstrating that the antibiotics have no major harm effects on health). The *H. pylori*-infected mice treated with antibiotics will be compared to placebo-treated mice (receiving only PBS) and to non-infected mice under antibiotic treatment (see the scheme of the different experimental groups enclosed). Mice will be observed twice daily by the researches and will be terminated 1, 3 and 5 weeks after the end of the antibiotic treatment.

The dosage and experimental procedures here indicated are the same as those proposed by the following studies:

- Zanten SJO. *et al.* 2003. Gastric transitional zones, areas where *Helicobacter* treatment fails: results of a treatment trial using the Sydney Strain mouse model. *Antimicrob Agent Chemother* 47: 2249-2255.
- Lee CW. *et al.* 2008. *Helicobacter pylori* eradication prevents progression of gastric cancer in hypergastrinemic INS-GAS mice. *Cancer Res* 68: 3540-3548.
- Lee CW. *et al.* 2009. Combination of Sundilac and antimicrobial eradication of *Helicobacter pylori* prevents progression of gastric cancer in hypergastrinemic INS-GAS mice. *Cancer Res* 69: 8166-8174.

TIME SCHEDULE:

-The experiments involving animals of selected genetic backgrounds (C57BL/6 and BALB/c) will be started as soon as this project plan is approved.

- An addendum to the license 2007-561/1394 in order to cover the infection of mice deficient for the components of the uPA system was recently approved by the Dyreforsøgstilsynet (Bilag 4).

The mice will be followed continuously (i.e. inspected at least twice a week). As long as there is general infection with *Helicobacter bilis* and *H. hepaticus* in the stables, the following precautions are taken:

- The cages are not to be open unless in the hood.
- Food is provided from a separate bag, kept in the “procedure room” and exclusively allocated to these mice.
- The mice will be handled and changed from cages by the animal care-takers, following a strict plan for this purpose written by the veterinarians from the Afdeling for Eksperimentel Medicin (AEM).

These special precautions will be implemented in order to minimize as much as possible the risk of co-infection of the experimental animals with *Helicobacter bilis* and/or *Helicobacter hepaticus*.

Dyreart <i>Animal species</i> :	<i>Mus musculus</i>	Antal dyr <i>Number of animals</i> :	App. 300 per år
Humane endepunkter Anfør hvilken grad af forventede skadelige effekter i dyrene der vil medføre at dyret skal tages ud af forsøget/aflives <i>Humane endpoints</i> Describe the degree of expected harmful effects that will lead to the animal being removed from experiment/euthanised	If signs of suffering the animal will be immediately sacrificed. The animal is sacrificed if showing signs of suffering, compromised lung function, food intake, impaired digestion, defecation, urination, or if more than 10% weight loss compared to the control group.		
Starttidspunkt for forsøg (uge/år) <i>Start of experiment (week/year)</i>	As soon as possible		

Forventet sluttidspunkt (uge/år) <i>Expected end of experiment (week/year)</i>	52-2012
Forventede kliniske symptomer hos dyrene Hvis kliniske symptomer opstår hvordan ønskes disse afhjulpet (aflivning, analgesi, væsketerapi mv.) <i>Expected clinical symptoms in the animals</i> <i>In the event of clinical symptoms, which actions do you want (euthanasia, analgesia, fluid therapy etc.)</i>	
Contact persons: Warner Alpizar-Alpizar and Ida K. Lund No clinical symptoms are expected from <i>H. pylori</i> infection. The mice are terminated if showing signs of sickness, inactivity, or if more than 10% weight loss compared to the control group. If the animals show any of these signs, contact person Warner Alpizar-Alpizar should be informed immediately.	
Hvad skal AEM gøre ved aflivede og selvdøde dyr når du ikke selv er tilstede? Opbevaring (køl/frys), obduktion, udtagning af organer, kontaktperson <i>What do you want AEM to do with euthanised or deceased animals when you are not available?</i> <i>Storage (refrigerator/freezer), necropsy, removal of organs, contact person</i>	
Contact person: Warner Alpizar-Alpizar Non-expected dead mice/scarified mice are placed in the freezer and the contact person is informed (preferentially before euthanasia).	
Anæstesi og Analgesi Angivelse af anæstesi (præparat) og analgesi (præparat). For analgesi angives plan: total varighed, interval mellem dosering. <i>Anaesthesia (drug) and analgesia (drug). For analgesia give plan; total duration, interval between doses.</i>	
Anesthesia: standard hypnorm/dormicum alt Zoletil mix-50	

Anexo 4. Aprobación del Comité Institucional del Cuido y Uso de Animales de la Universidad de Costa Rica – CICUA-23-2018



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

CICUA Comité Institucional de
Cuido y Uso de Animales

11 de junio de 2018
CICUA-23-2018

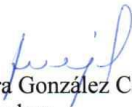
Lucia Figueroa Protti
CIEMic

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 *Helicobacter pylori* en modelos *in vivo* e *in vitro*”.

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

Anexo 5. Aprobación del Comité Institucional del Cuido y Uso de Animales de la Universidad de Costa Rica – CICUA-56-2018



CICUA Comité Institucional de
Cuido y Uso de Animales

28 de noviembre de 2018
CICUA-56-2018

Dr. Warner Alpizar Alpizar
CIEMic

Estimado señor:

El Comité Institucional de Cuido y Uso de Animales (CICUA), en su sesión 183-2018, del 15 de noviembre del 2018, valoró el proyecto "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".

El proyecto se aprueba.

Atentamente,

Dra. Sara González Camacho
Coordinadora



NGS

C. Dr. Fernando García, Vicerrector de Investigación
Archivo



Anexo 6. Aprobación del Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

30 de enero de 2020
CEC-21-2020



Ph.D. Warner Alpizar Alpizar
Investigador
Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas

Estimado Señor:

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 *Helicobacter pylori* sobre marcadores inmunológicos, moleculares y microbianos clínicamente relevantes para la predicción de la respuesta a agentes inmunoterapéuticos en cáncer gástrico".

Después del análisis respectivo, los miembros del CEC-UCR acuerdan:

Acuerdo N°2. Declarar aprobado el proyecto de investigación "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". **Acuerdo Firme**

Quedamos en la entera disposición de colaborar ante cualquier consulta.
Sin más por el momento, se suscribe cordialmente,

Atentamente,

M.Sc. Alfonso Chacón Mata
Presidente Comité Ético Científico



ACHM/dha

C. Lic. José Pablo Mora Jiménez, Gestor de proyectos, Vicerrectoría de Investigación
Archivo

Adjunto: Formulario de consentimiento informado

Anexo 7. Aprobación del Comité Ético Científico de la Caja Costarricense del Seguro Social



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

Dr. Warner Alpízar Alpízar
Investigador

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

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 Alpízar Alpízar
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. Dayé 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	Aprobado. Fecha de resolución de la revisión: 18 de noviembre de 2019. No. de Sesión: 044-11-2019. 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.

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 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 - msanchoero@ccss.sa.cr - jjacobo@ccss.sa.cr y marvajal@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 8. Aprobación del Comité Ético Científico de la Caja Costarricense del Seguro Social



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 del 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