



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

TESIS

**“ASOCIACIÓN DE LA VARIABILIDAD GÉNICA DE
Helicobacter pylori CON LA EXPRESIÓN DE GENES
DE RESPUESTA INMUNE EN PACIENTES CON
CÁNCER GÁSTRICO”**

PRESENTA

Jesús Guillermo Espinoza Contreras

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTOR

Dr. Rodolfo
González Segovia

COTUTOR

Dr. Javier
Ventura Juárez

ASESOR

Dr. Javier
Torres López

Aguascalientes, Ags., Junio de 2019.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M en C JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante JESÚS GUILLERMO ESPINOZA CONTRERAS con ID 182340 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **ASOCIACIÓN DE LA VARIABILIDAD GÉNICA DE *Helicobacter pylori* CON LA EXPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA INMUNE EN PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO**, con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 27 de agosto de 2020.

DR RODOLFO GONZÁLEZ SEGOVIA
Co-tutor de tesis

DR JAVIER VENTURA JUÁREZ
Co-tutor de tesis

DR JAVIER TORRES LÓPEZ
Asesor de tesis

- c.c.p.- Interesado
- c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
- c.c.p.- Jefatura del Depto. de Microbiología
- c.c.p.- Consejero Académico
- c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 08/09/20

NOMBRE: JESÚS GUILLERMO ESPINOZA CONTRERAS ID 182340

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS LGAC (del posgrado): PROTEÍNAS EN LA RESPUESTA INMUNE, EN LA PLASTICIDAD Y SECRECIÓN NEURAL
TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo práctico

TITULO: ASOCIACION DE LA VARIABILIDAD GÉNICA DE Helicobacter pylori CON LA EXPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA EN PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): EL PROYECTO TIENE IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA DEL ESTADO, LA REGIÓN Y DEL PAÍS

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
SI Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
NA Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI Coincide con el título y objetivo registrado
SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
SI El estudiante es el primer autor
SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Sí SI

No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DR. RODOLFO GONZÁLEZ SEGOVIA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DRA. HAYDÉE MARTÍNEZ RUVÁLCABA

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Immunological markers and *Helicobacter pylori* in patients with stomach cancer: Expression and correlation

JESÚS GUILLERMO ESPINOZA-CONTRERAS¹, MIRIAM IDALIA TORRES-RUIZ²,
LUIS ARIEL WALLER-GONZÁLEZ², JOSÉ DE JESÚS RAMÍREZ-GARCÍA², JAVIER TORRES-LÓPEZ³,
JAVIER VENTURA-JUÁREZ⁴, ELIZABETH VERÓNICA MORENO-CÓRDOVA¹, JUAN ERNESTO LÓPEZ-RAMOS¹,
MARTIN HUMBERTO MUÑOZ-ORTEGA⁵, MARÍA EUGENIA VARGAS-CAMAÑO⁶
and RODOLFO GONZÁLEZ-SEGOVIA¹

¹Departamento de Microbiología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes Ags, CP 20131;

²Departamento de Endoscopia, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre ISSSTE, Ciudad de México, CP 03229;

³Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias UMAE, Hospital de Pediatría,

IMSS, Ciudad de México, CP 06720; ⁴Departamento de Morfología; ⁵Departamento de Química,

Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes Ags, CP 20131;

⁶Servicio de Inmunología Clínica y Alergía, Centro Médico Nacional

20 Noviembre ISSSTE, Ciudad de México, CP 03229, México

Received June 7, 2019; Accepted January 17, 2020

DOI: 10.3892/br.2020.1285

Abstract. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) and ICOS-L (also referred to as B7 homolog 1 and 2, respectively) modulate the immune inflammatory response. The aim of the present study was to examine the expression levels of these inflammatory mediators in two groups of patients with an *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection; patients with and without gastric cancer. The association between bacterial virulence factors, CagA and VacA, was also examined, as well as their correlation with the inflammatory profile. Endoscopy analysis indicated that 18 patients suffered from cancer and 28 patients suffered from other gastric pathologies. PCR and reverse transcription-quantitative PCR were used to analyze gastric biopsies and determine the expression levels of the inflammatory modulators PD-L1 and ICOS-L, transcription factors, cytokines and other genes associated with inflammation and pathogenicity. All 46 patients were determined positive for markers of *H. pylori*. Patients with stomach cancer had lower levels of ICOS-L ($P<0.05$) and GATA3 ($P<0.01$), a negative correlation between CagA and IL-17 ($P<0.05$), a positive correlation between CagA and IL-10 ($P<0.05$), a negative correlation between *vacA-m1* and retinoid orphan receptor γ (ROR γ t) ($P<0.001$), and a positive correlation between ROR γ t


and ICOS-L ($P<0.001$). The reduced levels of ICOS-L and GATA3 along with the negative correlation between CagA and IL-17, and between *vacA-m1* and ROR γ t were all associated with an increased risk of gastric cancer in the present cohort.

Introduction

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is present in the stomach of ~50% of the population worldwide (1) and is considered to be the primary cause of chronic gastritis, gastric cancer and peptic ulcers (2). Around 89% of non-cardia gastric cancer cases, representing 78% of all gastric cancer case, are now estimated to be attributable to chronic *H. pylori* infection (3). Gastric cancer is among the five most common types of malignant tumors, and has the second highest cause of cancer-associated death worldwide (4). However, only 1-3% of the individuals with an *H. pylori* infection develop gastric cancer (5), as this pathology is dependent on the virulence of the bacteria, the environment and genetic factors of the host (6,7). For instance, common variable immunodeficiency (CVID) syndrome is associated with a 45-fold increase in the risk of gastric cancer and a 30-fold increase in the risk of gastric lymphoma (8). Although the etiology of CVID is not completely understood, in adults it is associated with deletion of a gene which encodes the inducible T-cell co-stimulator ICOS (9), which is expressed by T-cells when activated by their antigen. The only known ligand of ICOS (ICOS-L) is expressed constitutively by B lymphocytes (10). The interaction between ICOS:ICOS-L serves an important role in mediating the cooperation between T and B cells, as well as promoting the terminal differentiation of B cells to plasma B cells. ICOS activation induces the secretion of IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-21, tumor necrosis factor- α and interferon gamma (IFN- γ). In doing so, ICOS co-induces the secretion of interleukins and activates the function of Th1,

Correspondence to: Dr Rodolfo González Segovia, Departamento de Microbiología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, Cd Universitaria, Aguascalientes Ags, CP 20131, Mexico
E-mail: rgonzals@correo.uaa.mx

Key words: programmed death-ligand 1, ICOS-L, gastric cancer, *Helicobacter pylori*, retinoid orphan receptor γ , IL-17, *vacA-m1*



Jesús Guillermo Espinoza Contreras contó con el apoyo de La Universidad Autónoma de Aguascalientes (Número de registro institucional: PIBB17-3).

AGRADECIMIENTOS

Primero agradezco a **Dios** que me ha dado la oportunidad de tener una familia hermosa que acuñaron mis bases para entender que esta vida es de un constante aprender y disfrutar en compañía de personas que amamos y nos aman.

A mi Adorable y Amada compañera **Ildéliza**, que con amor, paciencia, cariño y comprensión ha sido la inspiración en la culminación de este proyecto tan importante en mi vida y que a su lado comprendí, que hay cosas de mayor importancia... La compañía del ser que te ama por sobre todas las cosas.

Agradecer a mi Familia, **mis Padres** y **Hermanos** y a mis pequeños hijos **Zahid** y **Darek** que han sido el motor para que yo iniciara esta bella aventura del conocimiento en busca de encontrar respuestas que tal vez un día nos den pistas para cuidar uno de los tesoros más preciados, la salud.

A mis Amigos y Compañeros por el apoyo incondicional en todo momento, en las buenas en las malas, en las alegrías y en las tristezas, siempre tratando de establecer mediante la comunicación y


el respeto para que nuestro trabajo fuera más ligero y agradable.

Gracias Mi **Ernesto** por tu incondicional apoyo en todo momento.

Agradecer a mis tutores y asesores, que sin su apoyo esto no hubiera sido posible, **Dr. Torres**, gracias por el apoyo y asesorar el rumbo del proyecto, **Dr. Javier Ventura** gracias, por cada enseñanza, por brindarnos su tiempo, conocimientos y su experiencia. **Dr. Rodolfo**, gracias por ser el pilar del protocolo, un compañero en este viaje y el amigo en situaciones difíciles, que en estos 4 años me ha tocado vivir, su paciencia, su prudencia, su confianza han llevado todo esto al buen término de esta historia. A todos mis compañeros de laboratorio, gracias. A ti **Verito** que día a día estuviste ahí a nuestro lado.

Gracias a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por abrirme sus puertas para poder realizar este protocolo de investigación en sus instalaciones durante toda mi estancia.

DEDICATORIA



A mi Amada: Ildéliza, mi Luz.

A mis Hijos Zahid y Darek, mi Motivación.

A mis Padres, Raúl y Leticia, mis Guías.

A mis Hermanos, Rulis y Ana, mis Fortalezas.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ACRÓNIMOS	8
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
INTRODUCCION	14
EPIDEMIOLOGIA	14
LA GASTRITIS Y EL CÁNCER GÁSTRICO	15
GASTRITIS CRÓNICA Y FENOTIPOS	17
La gastritis crónica	17
La gastritis crónica no atrófica	18
Pangastritis no atrófica	19
Gastritis crónica atrófica	19
Gastritis crónica con restricción a antro	20
Gastritis atrófica con restricción a cuerpo	21
Gastritis autoinmune	21
Gastritis atrófica multifocal (MAG)	22

Pangastritis atrófica _____	23
Úlcera gástrica _____	24
Úlcera duodenal _____	25
MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS _____	26
<i>Helicobacter pylori</i> _____	28
Supervivencia _____	28
Sistema de secreción tipo IV de <i>H. pylori</i> _____	31
Movilidad de <i>H. pylori</i> _____	33
Adherencia a células epiteliales gástricas por <i>H. pylori</i> _____	34
Evasión y daño a células del huésped por <i>H. pylori</i> _____	36
VacA _____	37
Variabilidad genética de <i>vacA</i> y <i>cagA</i> _____	40
CagA _____	42
Interacción entre VacA y CagA _____	44
INTERACCIÓN LINFOCITOS T Y CÉLULA PRESENTADORA DE ANTÍGENO _____	45
Modulación del sistema inmune (B7-H1/ células Treg, B7-H2/Th17) _____	48
B7-H1/Treg _____	48
B7-H2/Th17 _____	54

JUSTIFICACIÓN	_____	56
HIPÓTESIS	_____	57
OBJETIVOS	_____	58
Generales	_____	58
Particulares	_____	59
MATERIALES Y MÉTODOS	_____	60
Extracción de biopsias gástricas	_____	61
Purificación de ADN a partir de tejido gástrico	_____	62
Identificación de <i>H. pylori</i> en mucosa gástrica		63
Status <i>cagA</i> y tipificación de <i>vacA</i> en biopsias gástricas	_____	65
Extracción de ARN total y retrotranscripción	_____	68
Análisis de la expresión de ARN en biopsias gástricas	_____	69
Análisis estadístico	_____	72
RESULTADOS	_____	74
Prevalencia del genotipo <i>cagA</i> y <i>vacA</i> en biopsias gástricas		75
Análisis de expresión de ARNm en biopsias gástricas	_____	77
Coeficiente de correlación de rango de Spearman (ρ)	_____	79
DISCUSIÓN	_____	87
CONCLUSIONES	_____	95

BIBLIOGRAFÍA _____ 96

ANEXOS _____ 105

TABLAS _____ 106



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características epidemiológicas del grupo de pacientes con cáncer y sin cáncer.	74
Tabla 2. Oligonucleótidos para la identificación de <i>H. pylori</i> , positividad <i>cagA</i> y análisis de variantes polimórficas de <i>vacA</i> mediante PCR.	106
Tabla 3. Oligonucleótidos para analizar la expresión de genes de factores de transcripción, citocinas y moléculas inmunomoduladoras mediante PCR en Tiempo Real.	107
Tabla 4. Frecuencia de expresión de polimorfismos para <i>vacA</i> , positividad <i>cagA</i> y <i>ureC</i> en biopsias gástricas, para los grupo de pacientes con y sin cáncer gástrico.	76
Tabla 5. Resumen de las correlaciones.	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia de tejido gástrico _____17

Figura 2. Mucosa antral, gastritis crónica no atrófica _____18

Figura 3. Gastritis crónica atrófica limitada a antro _____ 20

Figura 4. Gastritis crónica atrófica severa _____ 23

Figura 5. Úlcera gástrica _____ 24

Figura 6. B7-H1 y *Helicobacter pylori* _____ 27

Figura 7. CagA Factor de virulencia _____ 30

Figura 8. Sistema de secreción tipo IV _____ 32

Figura 9. VacA Factor de virulencia _____38

Figura 10. VacA Mecanismos fisiopatológicos _____ 39

Figura 11. Polimorfismos de *vacA* _____ 41

Figura 12. Polimorfismos de *cagA* _____ 43

Figura 13. Interacciones entre VacA y CagA _____ 44

Figura 14. Activación transcripcional de B7-H1 _____ 53

Figura 15. B7-H2 y *Helicobacter pylori* _____55

Figura 16. Extracción ADN *H. pylori* _____ 63

Figura 17. Genes caracterización *H. pylori* (Hsp60 y UreC) _____ 64

Figura 18. PCR anidada _____ 66

Figura 19. PCR de los polimorfismos de CagA _____ 67

Figura 20. PCR de los polimorfismos de VacA _____ 67

Figura 21. Extracción de ARN en gel de agarosa _____ 68

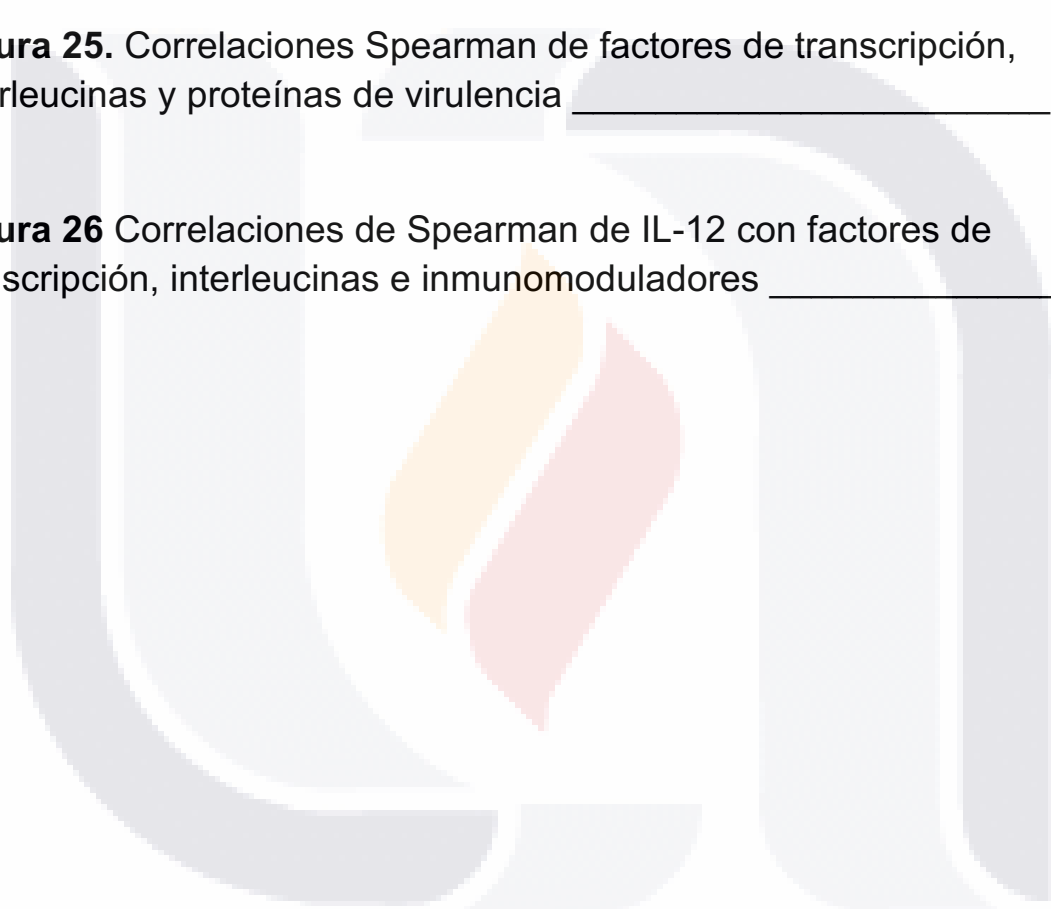
Figura 22. RT PCR en tiempo real de genes B7-H2 y GAPDH ____ 71

Figura 23. Expresión relativa de inmunomoduladores, interleucinas y factores de transcripción _____78

Figura 24. Correlaciones Spearman B7-H1 y B7-H2 con interleucinas, factores de transcripción y proteína de virulencia _____80

Figura 25. Correlaciones Spearman de factores de transcripción, interleucinas y proteínas de virulencia _____82

Figura 26 Correlaciones de Spearman de IL-12 con factores de transcripción, interleucinas e inmunomoduladores _____84



ACRÓNIMOS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
mARN	ARN mensajero
APC	Célula Presentadora de Antígenos
CagA	Gen A Asociado a Citotoxicidad
CG	Cáncer Gástrico
DC	Célula Dendrítica
T CD8	Células T Citotóxicas
Th	Células T Cooperadoras
TGF-β	Factor Transformador de Crecimiento Beta
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
H-E	Hematoxilina-Eosina
IgG	Inmunoglobulina G
IFN-γ	Interferón Gamma

IL	Interleucina
LPS	Lipopolisacárido
PM	Peso Molecular
FOXP3	Caja en Horquilla P3
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa
ROR-γt	Receptor gamma huérfano relacionado a RAR
VacA	Citotoxina A Vacuolizante
PD-L1	Ligando 1 PD
PD-1	Proteína 1 de muerte celular programada
ICOS-L	Ligando de ICOS
ICOS	Coestimulador inducible de células T

RESUMEN

Las moléculas B7-H1 (PDL-1, CD274) y B7-H2 (ICOS-L, CD275) modulan la respuesta inmune en procesos inflamatorios, nosotros investigamos sus niveles de expresión en pacientes con y sin cáncer gástrico infectados con *Helicobacter pylori*, la asociación de sus factores de patogenicidad, (CagA y VacA) y correlación con perfil inflamatorio, sus factores de transcripción maestros y citocinas.

Materiales y Método: Se incluyeron 46 pacientes en este estudio, 18 pacientes con cáncer y 28 pacientes sin cáncer. Se les determino niveles de expresión de moléculas moduladoras, factores de transcripción, citocinas y genes de patogenicidad mediante RT-PCR y PCR respectivamente. **Resultados:** En pacientes con cáncer los niveles de B7-H2 fueron más bajos ($p < 0.05$), así como los niveles de GATA3 ($p < 0.01$). Además de la correlación negativa entre la IL-17 con CagA ($p < 0.05$) y positiva con IL-10 ($p < 0.05$) y la relación negativa de ROR- γ t y m1 ($p < 0.001$) y positiva con B7-H2 ($p < 0.001$).

Conclusión: La disminución de B7-H2 y GATA3 asociado a la correlación inversa del factor de transcripción ROR- γ t e IL-17 con m1 y CagA respectivamente incrementan el riesgo de CG en nuestros pacientes.



ABSTRACT

B7-H1 and B7-H2 modulate the immune inflammatory response. The aim of this study was to examine the expression levels of these inflammatory mediators in two groups of patients infected with *Helicobacter pylori*, those with and without stomach cancer. The association between bacterial virulence factors (CagA and VacA) was also explored, as well as their correlation to the inflammatory profile.

Materials and Methods. Endoscopy indicated that 18 participants suffered from cancer and 28 from other gastric pathologies. PCR and RT-PCR were used to analyze gastric biopsies and determine the expression levels of the inflammatory modulators B7-H1 and B7-H2, transcription factors, cytokines and genes related to inflammation and pathogenicity. **Results.** All 46 patients were positive to markers of *H. pylori*. In the patients with stomach cancer, there were lower levels of B7-H2 ($p < 0.05$) and GATA3 ($p < 0.01$), a negative correlation of CagA with IL-17 ($p < 0.05$), a positive correlation of CagA with IL-10 ($p < 0.05$), a negative correlation of *vacA-m1* with RORYt ($p < 0.001$), and a positive correlation of *vacA-m1* with B7-H2 ($p < 0.001$).

Conclusions. The reduced level of B7-H2 and GATA3 along with the negative correlation of CagA with IL-17 and of *vacA-m1* with ROR γ t increased the risk of stomach cancer in the current population.



INTRODUCCIÓN

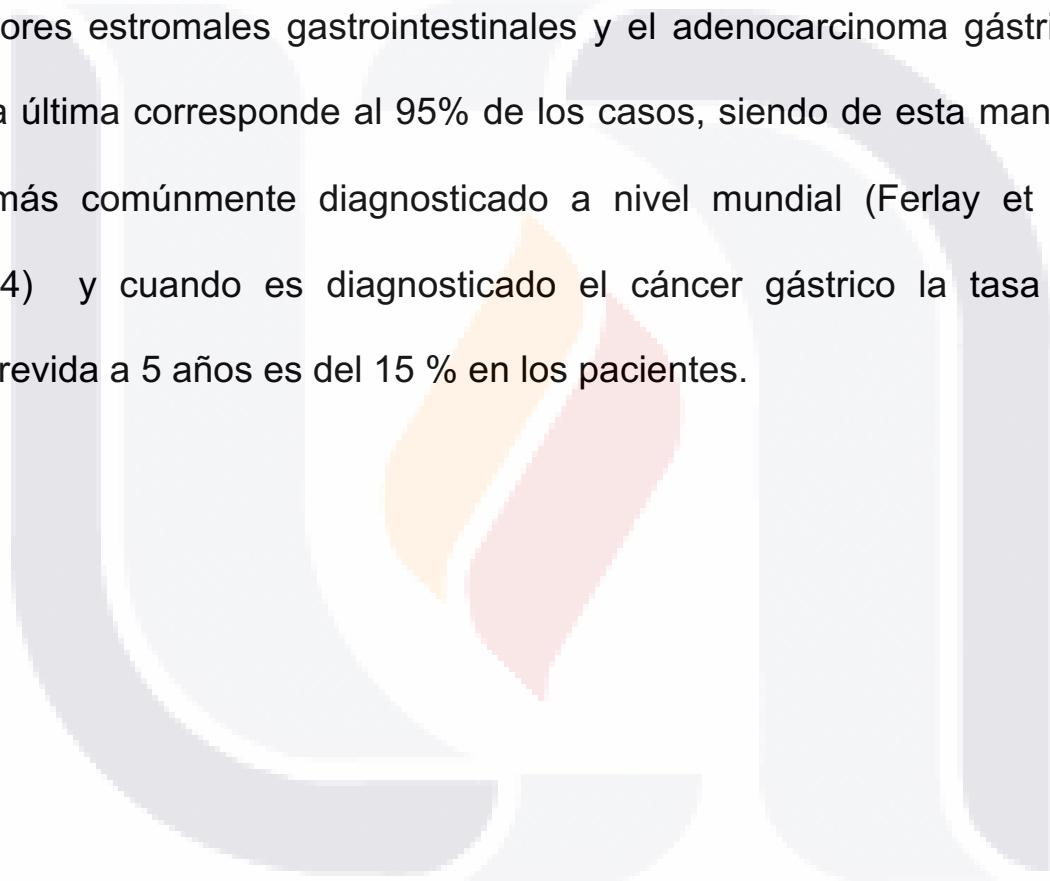
EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) tiene importantes variaciones a nivel mundial, desde Norte América 8%, hasta 90% en Siberia (Goh, Chan, Shiota, & Yamaoka, 2011). En Europa, el país con más alta prevalencia es Portugal, con 84.2% (Bastos, Peleteiro, & Barros, 2013). En Asia, los estudios publicados muestran gran prevalencia de infección de *H. pylori* desde 54 % a 76% (Eusebi, Zagari, & Bazzoli, 2014). En África se la prevalencia en algunos países es muy alta se tienen reportes en Nigeria con reporte de prevalencia del 80% por histología, pero cuando se hace la prueba con serología se incrementa hasta 93.6% (Olokoba, Gashau, Bwala, Adamu, & Salawu, 2013). En América latina se observan niveles de recurrencia en 11.5% (Morgan, Torres, & Sexton, 2013). En México se reportó una prevalencia de 52.2% en 343 mujeres embarazadas de las zonas rurales (Alvarado, 2013)

LA GASTRITIS Y EL CÁNCER GÁSTRICO

La gastritis es la inflamación de las células que revisten el estómago, esta inflamación puede ser tan importante que destruya el tejido y este sea remplazado por otro tipo de epitelio no propio al del estómago (metaplasia) o por cicatrización (atrofia), se presenta sobre todo cuando la inflamación no se resuelve en un corto tiempo (crónica) porque las causas que la originan permanecen, como son las infecciones (*H. pylori* principalmente) o en individuos con susceptibilidad a enfermedades donde su propio sistema inmunológico reconoce como extraño a algo propio (autoinmunidad), estos elementos (H^+/K^+ -ATPasa) se encuentran en células del estómago (células parietales). Cuando estos mecanismos se perpetúan y la atrofia es más importante, se incrementa el riesgo de presentar cáncer gástrico, asociado también a factores de susceptibilidad del hospedero como en sujetos con polimorfismos en genes para citocinas, como en el caso del gen de la interleucina 1b (IL-1b-511*T) que incrementa el riesgo de gastritis crónica y progresión a cáncer gástrico 25 veces más (Figueiredo et al., 2002) y la asociación con el genotipo del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) -308 G/G que media la aparición de ulcera gástrica que

también se ha descrito como factor de riesgo para cáncer gástrico (El-Omar et al., 2003). El cáncer gástrico está asociado a la infección de *H. pylori* en más del 75%, otro 10% puede ser causado por virus del Epstein-Barr (Herrera & Parsonnet, 2009). De entre las principales neoplasias de estómago en donde se incluye linfoma no Hodgkin, tumores estromales gastrointestinales y el adenocarcinoma gástrico, esta última corresponde al 95% de los casos, siendo de esta manera el más comúnmente diagnosticado a nivel mundial (Ferlay et al., 2014) y cuando es diagnosticado el cáncer gástrico la tasa de sobrevivida a 5 años es del 15 % en los pacientes.



GASTRITIS CRÓNICA Y FENOTIPOS

La gastritis crónica

Condición inflamatoria de la mucosa gástrica caracterizada por lesiones primarias que se distribuyen y se extienden en relación con su etiología y respuesta del hospedero, donde *H. pylori* es la causa más común a nivel mundial de gastritis crónica, esta, puede ser atrófica o no atrófica y cada una de estas dos principales categorías engloban varias entidades clínico patológicas con diferentes patrones de inflamación y alteraciones epiteliales (Rugge & Genta, 2005)

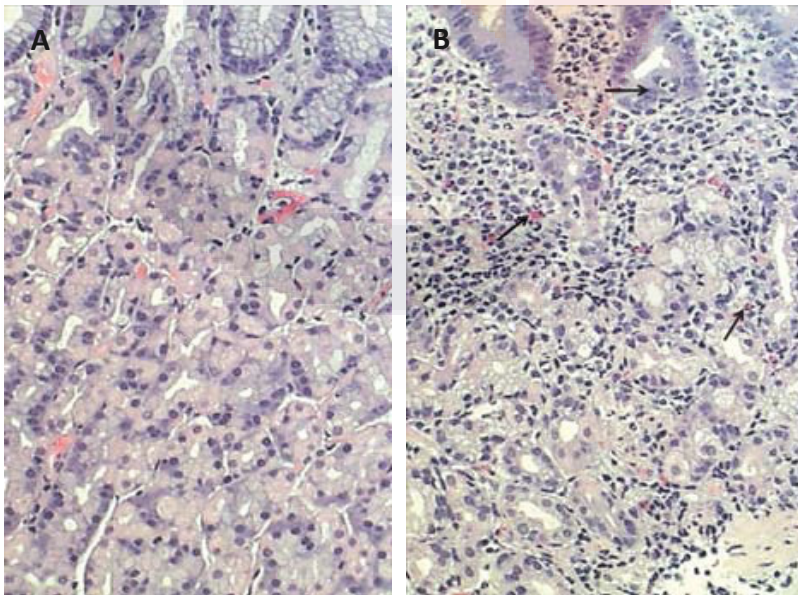


Figura 1. Microscopía de tejido gástrico 500x tinción de HE en donde se observa A) mucosa de cuerpo gástrico normal sin infiltrado inflamatorio B) Mucosa de cuerpo gástrico con infiltrado inflamatorio, neutrófilos y eosinófilos (flechas) Fuente de figura (Sipponen & Maaros, 2015).

La gastritis crónica no atrófica

Predominio en antro gástrico, este patrón es sinónimo de hipersecreción o gastritis en antro superficial (Correa, 1988a) ésta es la expresión más común de gastritis por *H. pylori* en occidente, caracterizado por ausencia de atrofia y de moderada a severa inflamación de antro y cuerpo gástrico normal o con moderada inflamación, tiene un riesgo de ulcera gástrica del 20% y con posibilidades mínimas de adenocarcinoma (D. Y. Graham, 1997).

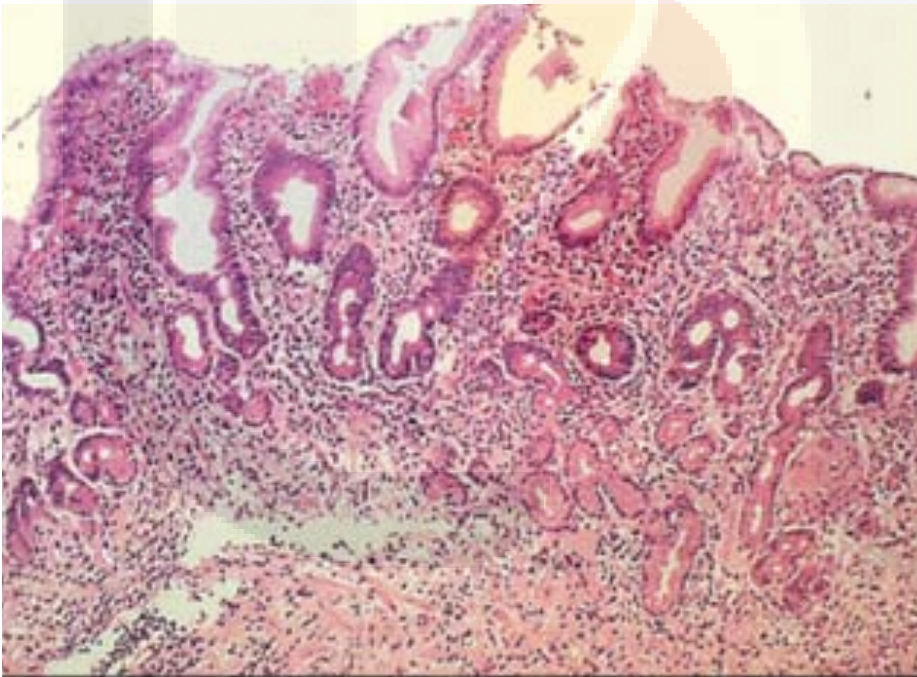


Figura 2. Mucosa antral, gastritis crónica no atrófica, infiltrado de mononucleares, tinción de H&E Alcian Blue-PAS 300x. Fuente de figura (Sipponen & Maaros, 2015).

Pangastritis no atrófica

En algunos individuos con infección por *H. pylori*, tienen marcada inflamación en todo el estómago con poca o ninguna diferencia entre el antro y el cuerpo. Predomina en zonas de endemia de *H. pylori* y la hipótesis es que la pangastritis evolucione a gastritis atrófica (Miehlke et al., 1998)

Gastritis crónica atrófica

Es una condición histopatológica que se define por la atrofia de las glándulas gástricas como resultado de la inflamación crónica, la infección con *H. pylori* juega un papel crucial en esta patología así como en el desarrollo de cáncer gástrico (Correa, 1988b). La gastritis crónica atrófica actualmente tiene dos sub clasificaciones la atrofia metaplásica y no metaplásica (Rugge et al., 2002; Sipponen & Price, 2011). Los criterios histológicos para la puntuación de los cambios de atrofia y metaplasia en antro y mucosa del fondo gástrico han sido extensamente descritos (Rugge et al., 2002) y las escalas visuales análogas han sido propuestas como estándar de referencia (Genta, 1996).

Gastritis atrófica con restricción a antro

En occidente la gastritis atrófica es comúnmente encontrada en biopsias de antro, en tales pacientes, los cambios de atrofia metaplásica son consecuencia de infecciones por *H. pylori*. En la biopsia se encuentran atrofia metaplásica incompleta con restricción a mucosa distal que secreta mucina (incluida la *incisura angularis*) en coexistencia de cuerpo gástrico normal o leve inflamación sin cambios de atrofia (Rugge & Genta, 2005).

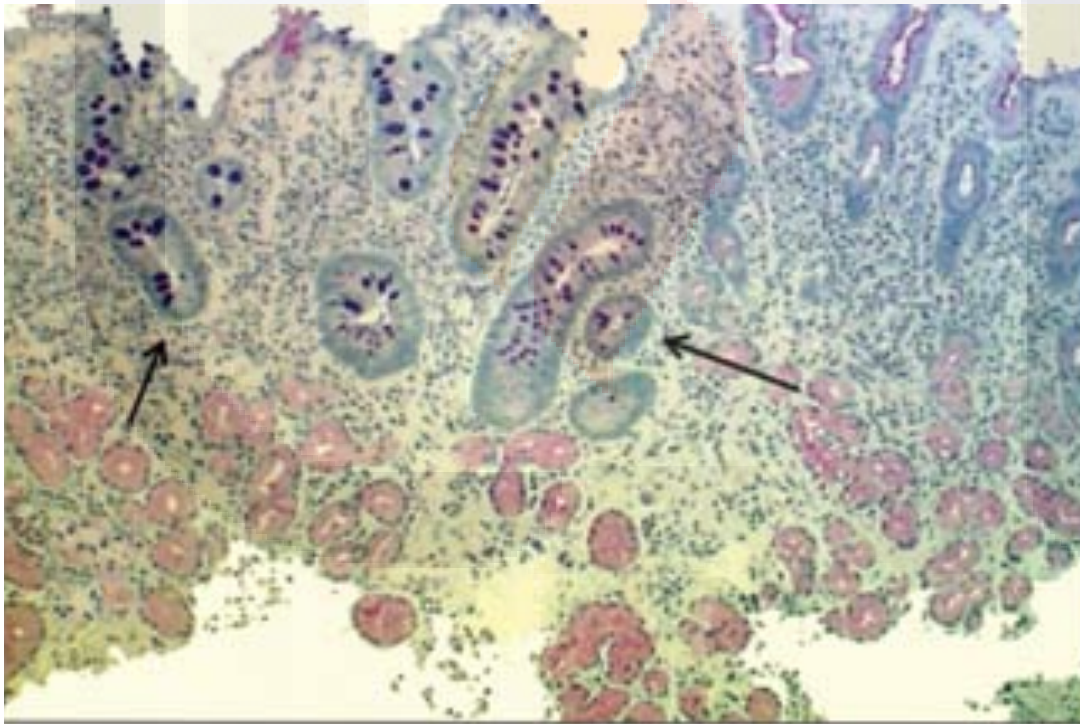


Figura 3. Gastritis crónica atrófica limitada a antro, tinción de H&E Alcian Blue-PAS 300x. Fuente de figura (Sipponen & Maarros, 2015).

Gastritis atrófica con restricción a cuerpo

La atrofia metaplásica de mucosa parietal sin compromiso de antro o distal es un tipo de atrofia considerado como un dato patognomónico de etiología autoinmune y se asocia a alto riesgo de cáncer (Strickland & Mackay, 1973).

Gastritis autoinmune

La prevalencia de gastritis autoinmune en la población general esta probablemente subestimada, en un estudio en Alemania de 9684 individuos, se determinaron anticuerpos anti células parietales positivos en aproximadamente 20% junto con una fuerte asociación con gastritis atrófica determinada por niveles bajos de pepsinógeno (Zhang, Weck, Schottker, Rothenbacher, & Brenner, 2013).

Otro aspecto epidemiológico importante, es la asociación frecuente de gastritis autoinmune con otras enfermedades autoinmunes, como diabetes mellitus tipo 1 y enfermedades autoinmunes tiroideas, que son de 5 a 10 veces mayor que en población general (De Block, De Leeuw, & Van Gaal, 2008; Tozzoli et al., 2010). Un estudio reciente se enfoca en pacientes con gastritis atrófica clasificados como *H. pylori*

negativos por serología e histología, pero con el uso de anticuerpos por inmunoblotting contra las proteínas asociadas a virulencia de la bacteria, CagA y/o VacA fueron revelados en casi todos los pacientes (Annibale et al., 2007), por lo que la hipótesis es que el daño importante previo a la mucosa gástrica por la infección de *H. pylori* y exposición de antígeno ($H^+ /K^+ -ATPasa$) inicie la autoinmunidad en pacientes de riesgo para enfermedad autoinmune.

Gastritis atrófica multifocal (MAG)

Este fenotipo de gastritis se encuentra en regiones con condiciones subóptimas de salud. En las biopsias con MAG se muestran focos con cambio de atrofia metaplásica en mucosa de cuerpos y antro, la secreción ácida esta reducida y sugiere enfermedad avanzada, a esta etapa de gastritis es posible que la preceda la gastritis atrófica restringida a antro.

Pangastritis atrófica

Esta gastritis presenta una magnitud de atrofia e inflamación en antro y cuerpos, representaría un grado avanzado de MAG, es la forma de mayor prevalencia para neoplasia gástrica invasiva y no invasiva (Cassaro et al., 2000)

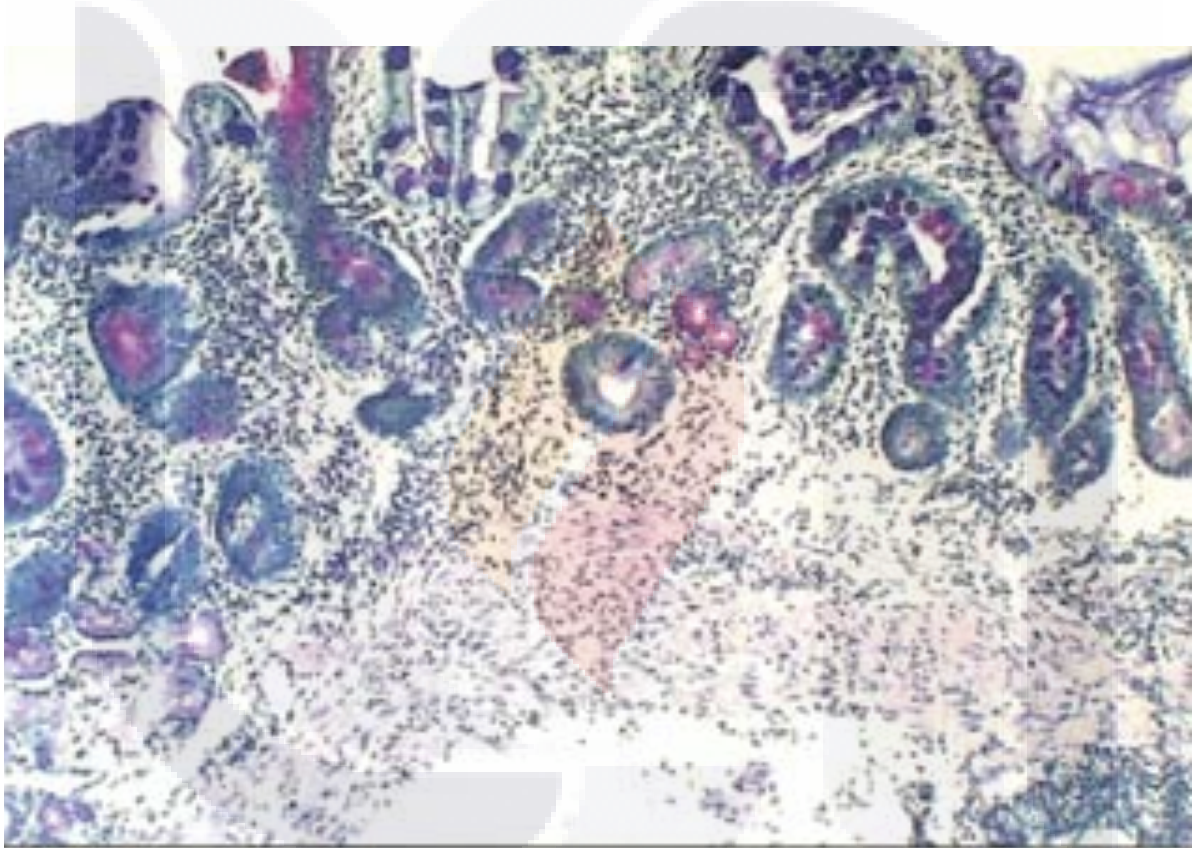


Figura 4. Gastritis crónica atrófica severa, tinción de H&E Alcian Blue-PAS 300x. Fuente de figura (Sipponen & Maaros, 2015)

Úlcera gástrica

La úlcera gástrica ocurre en el contexto de la pangastritis, además ocurren cambios en las hormonas, en donde al aumentar la inflamación, más frecuentemente entre el antro y el cuerpo, en la curvatura menor del estómago, lleva a la reducción de somatostatina, siendo esta hormona encargada de la retroalimentación negativa para producción de gastrina, lleva a la hipergastrinemia y con ello a la producción excesiva de ácido para posteriormente llevar a la inflamación y úlcera gástrica (Figura 5B).

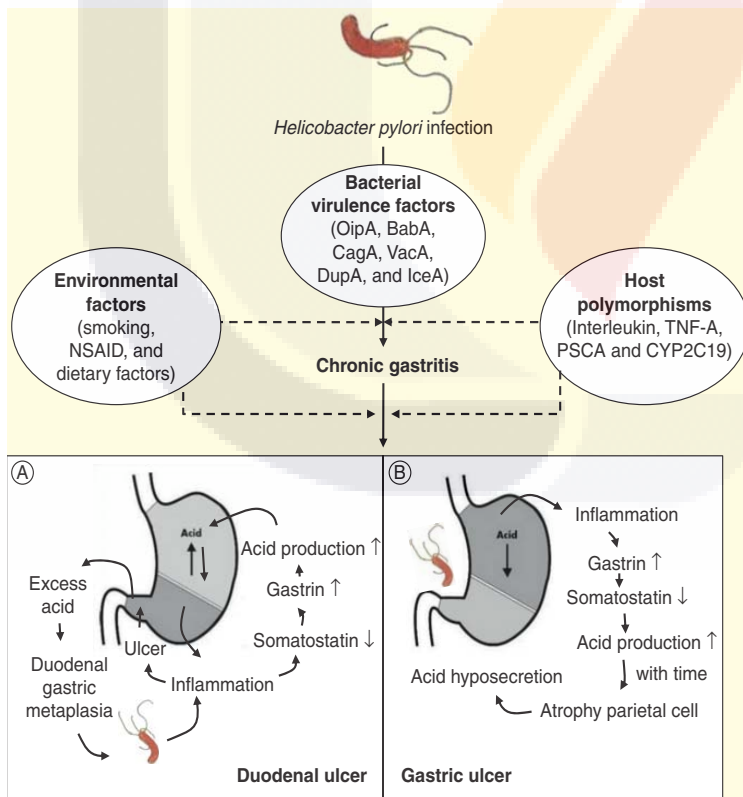


Figura 5.

La inflamación antral conduce a la producción reducida de somatostatina y su efecto de retroalimentación negativa en producción de gastrina se pierde y lleva a la hipergastrinemia, gastritis, atrofia y finalmente úlcera gástrica (B) también la producción alta de ácido y mayor carga de acidez en duodeno da la metaplasia gástrica, ahí es donde *H. pylori* coloniza el duodeno, causando inflamación y úlcera duodenal (A)

Fuente figura (Miftahussurur & Yamaoka, 2015)

Úlcera duodenal

Se identificó un nuevo factor de virulencia homólogo a VirB4 llamado DupA (gen promotor de úlcera duodenal), asociado a riesgo de incrementar úlcera duodenal y reducir el riesgo de atrofia gástrica y cáncer en Asia y occidente (H. Lu, Hsu, Graham, & Yamaoka, 2005). Los pacientes que presentan infección crónica por *H. pylori* tiene inflamación predominantemente de antro, estos pacientes producen incremento en la cantidad de ácido como resultado de disminución de somatostatina y niveles basales elevados de secreción de gastrina (El-Omar et al., 1997) La gastrina provoca la liberación de histamina que actúa en células parietales, resulta en la estimulación de producción de ácido, esta carga de ácido aumenta en duodeno y da la formación de metaplasia gástrica en duodeno, *H. pylori* puede colonizar estas células, causando inflamación y úlcera duodenal. (Oppong, Majumdar, Atherton, & Bebb, 2015). Es importante comentar que la úlcera duodenal y el cáncer gástrico representan diferentes estadios en un mismo proceso (David Y. Graham, 2014) (Figura 5A)

MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS

El espectro de la enfermedad gástrica, va desde la gastritis no atrófica, hasta el cáncer gástrico y existen muchos mecanismos fisiopatológicos descritos que intervienen. Es importante tener en cuenta que estos se pueden originar desde la susceptibilidad genética del hospedero o la virulencia del *H. pylori*, pasando por la exposición del patógeno, la interacción de éste con las células epiteliales gástricas y el sistema inmune innato y adoptivo, dando como resultado la expulsión de *H. pylori* con la remisión de la infección o la tolerancia al microorganismo por sus mecanismos de evasión y modulación al sistema inmune, resultando en cambios del tejido gástrico con riesgo a desarrollar atrofia, metaplasia, displasia o propiamente cáncer gástrico.

Los mecanismos involucrados en la permanencia de *H. pylori* ya bien establecidos como son mecanismo de supervivencia (Ej. ureasa, sistema Tat, CagA), movilidad (Ej. FlaA, TlpD), la adherencia (Ej. BabA, SabA, AlpA, AlpB, HopZ, OipA y HtrA), y la evasión y daño a células del huésped (Ej. LPS, antígeno O y VacA). Y por último se describen nuevos mecanismo que están involucrados en la tolerancia y modulación del sistema inmune, mediante proteínas de la familia B7

(B7-H1 y B7-H2) relacionadas con la modulación de la respuesta efectora de células del sistema inmune, progresión y desarrollo de células cancerosas y la participación de linfocitos T con capacidad supresora (Treg), así como las citocinas (Interleucinas y quimiocinas) de este proceso.

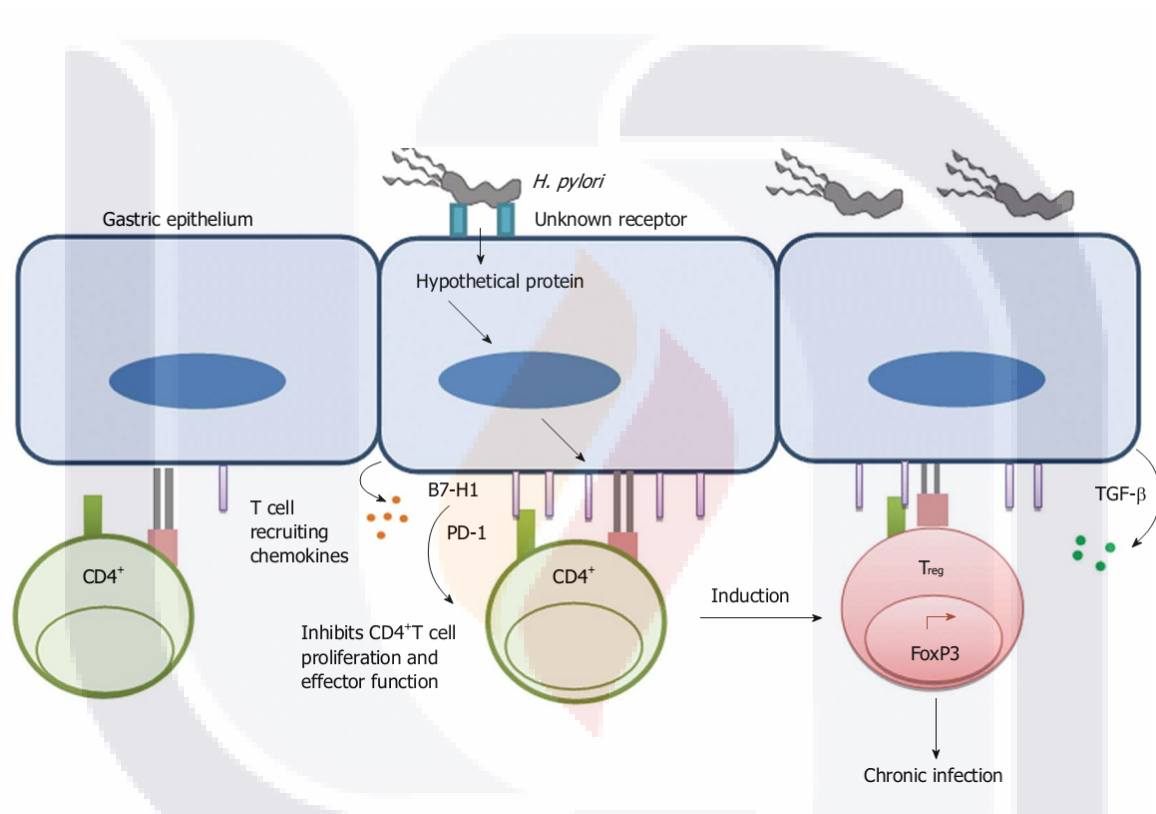


Figura 6. La infección por *H. pylori* promueve la expresión de moléculas inmunomoduladoras en los linfocitos T cooperadores (CD4) que llevan a la inducción de células T reguladoras que propician la cronicidad de la infección. Fuente de figura (T. T. Lina et al., 2014).

Helicobacter pylori

Supervivencia

Para que *H. pylori* pueda permanecer en mucosa gástrica y no ser eliminado por los mecanismos innatos en cavidad gástrica, como son la acidez y la motilidad gástrica, *H. pylori* produce ureasa, esta es la proteína que principalmente se expresa en *H. pylori*, representa un 10% del total del peso de proteínas, consta de dos subunidades, A y B de 29.5 y 66 kDa respectivamente, esta enzima media la hidrólisis de la urea en amonio y bicarbonato, ayudando a mantener amortiguado el pH en el microambiente local de la bacteria (Bauerfeind, Garner, Dunn, & Mobley, 1997; Hu, Foxall, Russell, & Mobley, 1992). Otro mecanismo recientemente descrito es el sistema Tat, translocación de doble arginina por sus siglas en inglés, se encuentra en estudio, se compone por 3 proteínas, TatA, TatB y TatC. Permite la translocación de cuatro sustratos, proteína accesoria de catalasa, KapA, la proteína de subunidad pequeña de hidrogenasa, HydA; la sulfoxidoreductasa de biotina, BisC y la subunidad proteica Rieske citocromo oxidasa, FbcF. Este último se encuentra relacionado a supervivencia de *H. pylori* así como la delección del gen *tatB*. El gen

tesis tesis tesis tesis tesis

tatC mutado se asocia a disminución de habilidad de colonizar, por lo que el sistema Tat contribuye a estadio inicial de infección (Benoit & Maier, 2014) Y por último uno de los mecanismos más importantes y estudiados de *H. pylori* es CagA, una oncoproteína, puede atenuar apoptosis *in vivo* e *in vitro* de células epiteliales gástricas. En ratones lleva al desarrollo de proliferación epitelial gástrica aberrante y carcinoma gástrico (Mimuro H et al., 2007; Ohnishi et al., 2008). También se ha investigado que CagA puede activar la vía de la calcineurina, que promueve la movilización del factor nuclear de células T activadas (NFAT) desde el citoplasma hacia el núcleo de las células epiteliales gástricas. Este factor nuclear (NFAT), activa un número de genes, como son p21Cip1, inhibidor kinasa dependiente de ciclina, involucradas en el ciclo celular, CagA es responsable también de la translocación de B-catenin, proto-oncogen involucrado en múltiples roles de funciones celulares (Franco et al., 2005; Yokoyama et al., 2005). CagA promueve la pérdida de la polaridad de la célula mediante la unión e inhibición de Par1, una kinasa central en la regulación de la polaridad celular, esto desregula la formación del huso mitótico (Saadat et al., 2007) Figura 7

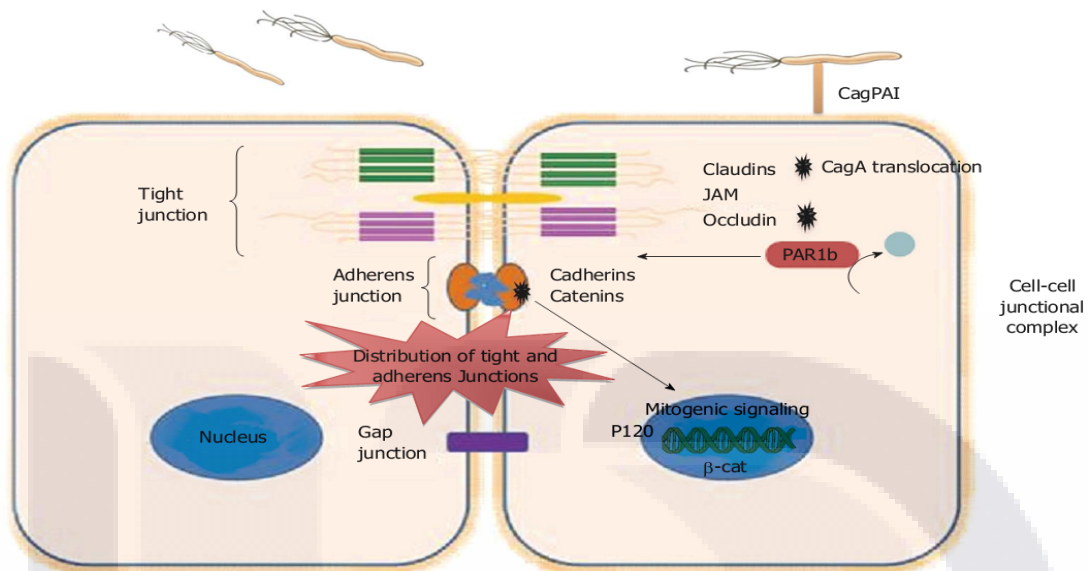


Figura 7. *H. pylori* incide mediante su oncoproteína CagA sobre las moléculas de unión intracelular así como en la polaridad celular, lo que lleva a la desorganización del epitelio de la mucosa gástrica y su alteración en el ciclo celular, ocasionando su predisposición a desarrollo de cáncer gástrico. Fuente de figura (Alzahrani et al., 2014)

Sistema de secreción tipo IV (T4SS) de *H. pylori*

Para el transporte de CagA a las células parietales gástricas *H. pylori* se basa en un sistema de transporte de estas proteínas denominado T4SS, el cual es en esencia una estructura tipo inyector que penetra la membrana de las células epiteliales gástricas para la translocación de proteínas de *H. pylori* en las células epiteliales (Odenbreit et al., 2000). En el sistema T4SS participan otras proteínas como CagL una proteína de genes de isla de patogenicidad (cagPAI), también considerada componente de T4SS ya que es necesaria para la translocación de CagA. Participa en la unión del T4SS con receptor de integrina $\alpha 5\beta 1$ en las células epiteliales gástricas (Cover, 2012; shaffer et al., 2011). La translocación de productos de cagPAI lleva a la activación secuencial del complejo I κ B Kinasa (IKK), JNK, p38 kinasa, Factor nuclear Kappa B (NF- κ B) y AP-1 en células gástricas. El T4SS también envía el peptidoglicano (PG) de la membrana celular de *H. pylori* hacia la célula epitelial gástrica, esta es reconocida por receptor de reconocimiento de patrones (PRR), en este caso a NOD1, activando NF κ B y a las proteínas de quinasas activadoras de

mitógenos (MAPKs) esto para la producción de IL-8 involucrada en la patogénesis (Allison, Kufer, Kremmer, Kaparaskis, & Ferrero, 2009; Viala et al., 2004; Watanabe et al., 2010).

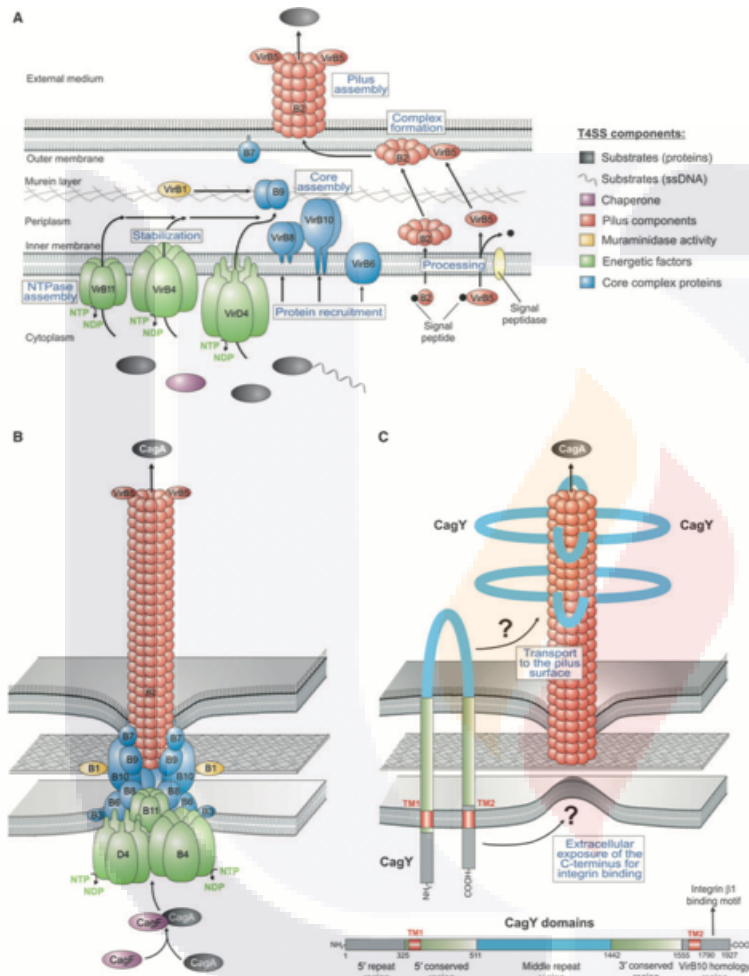


Figura 8. Esquema prototipo que nos muestra el montaje propuesto de la maquinaria prototipo, un complejo de múltiples moléculas que se muestran de manera simplificada, que abarcan las membranas internas y externas de bacterias Gram negativas. El T4SS ensamblado desencadena la secreción de sustratos del citoplasma bacteriano directamente al citoplasma de las células huésped infectadas o en el medio extracelular. Los sustratos son CagA y el peptidoglicano. Fuente de figura (Tegtmeyer, Wessler, & Backert, 2011).

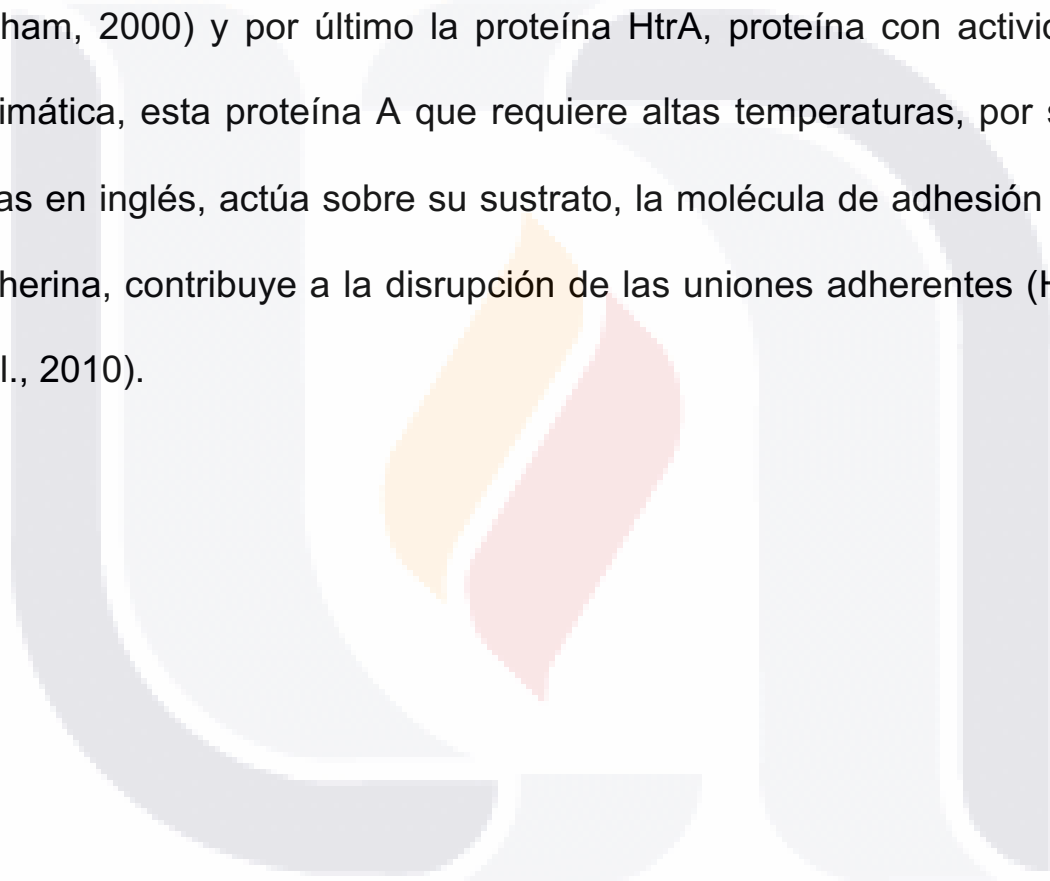
Movilidad de *H. pylori*

La persistencia de *H. pylori* se debe en parte a que la molécula FlaA (principal proteína del flagelo) a diferencia de FlaA de otras Gram-negativas, no es una molécula inflamatoria, esto proporciona la habilidad de infectar al humano por décadas (Lee et al., 2003; Peek, Fiske, & Wilson, 2010). El flagelo de *H. pylori* además está asociado a FaaA, el autotrasportador A asociado a Flagelo (por sus siglas en inglés) es una de las tres proteínas tipo VacA, el cual se encuentra asociado a la localización del flagelo en *H. pylori*, y da estabilidad a FlaA. La mutación de la proteína FaaA presenta reducción de movilidad así como disminución en la habilidad de colonizar (Radin et al., 2013), *H. pylori* tiene un sensor de energía acoplados a genes que regulan la movilidad el TlpD. Este sensor es esencial para la infección inicial y persistencia de *H. pylori* principalmente en cuerpo del estómago, así como también en antro gástrico. Es importante también para mantener estable el genoma en *H. pylori* durante su adaptación (Behrens et al., 2013).

Adherencia a células epiteliales gástricas por *H. pylori*

Existen proteínas que facilitan la adhesión de *H. pylori* y participan también para la translocación en sistema T4SS. La adhesión mediante BabA en la superficie epitelial, aumenta la habilidad de contacto del sistema de secreción tipo IV (T4SS) incrementando la patogenicidad mediada por activación de producción de citocinas inflamatorias (Ishijima et al., 2011), SabA, adhesina que se une a ácido siálico, (antígeno ácido siálico-Lewis^x) que se expresa de forma importante posterior de la unión de BabA a superficie epitelial y aumento de la inflamación, esta molécula está asociada con el desarrollo de metaplasia intestinal, gastritis atrófica y cáncer gástrico en Estados Unidos (Mahdavi et al., 2002; Yamaoka, 2008). Otras proteínas como son AlpA y AlpB proteínas de adhesión y modulación de cascadas intracelulares proinflamatorias (H Lu et al., 2007). HopZ es una proteína de adhesión localizada en la superficie de *H. pylori*. El gen *hopZ* mutado, lleva a la reducción de la adhesión de *H. pylori* a células epiteliales, este gen está en una fase variable como resultado de repeticiones de dinucleótidos CT en la región que codifica para la secuencia de señal (Peck, Ortkamp, Diehl, Hundt, & Knapp, 1999).

OipA (proteína A inflamatoria externa por siglas en ingles), fue inicialmente descrita como promotora de producción de IL-8 e incremento de inflamación de manera independiente del T4SS, además la mutación de gen *oipA* se observa reducción de adhesión de estas cepas en células neoplásicas gástricas (Yomaoka, Kwon, & Graham, 2000) y por último la proteína HtrA, proteína con actividad enzimática, esta proteína A que requiere altas temperaturas, por sus siglas en inglés, actúa sobre su sustrato, la molécula de adhesión E-cadherina, contribuye a la disrupción de las uniones adherentes (Hoy et al., 2010).



Evasión y daño a células del huésped por *H. pylori*

El lipopolisacárido (LPS) de *H. pylori* es aproximadamente 1000 veces menos inmunogénico que el LPS de *Escherichia coli* (Muotiala, Helander, Pyhala, Kosunen, & Moran, 1992; Perez, Shepherd, Morrow, & Blaser, 1995). Los niveles de LPS se aumentan con factores estresantes para la bacteria como son; fagocitosis, ataque mediado por complemento, antibioticoterapia y se mantienen cantidades bajas en condiciones de homeostasis como es la replicación bacteriana, este LPS le proporciona protección contra ataque mediante complemento y evasión del sistema inmune (Cullen et al., 2011; Matsuura, 2013; Needham & Trent, 2013). El LPS está compuesto por una membrana hidrofóbica con un ancla terminal lipídica A un centro de oligosacárido y una cadena distal de polisacáridos, el antígeno "O" que se extiende al medio extracelular. (Raetz, Reynolds, Trent, & Bishop, 2007). *H. pylori* puede evadir la respuesta inmune con la producción de antígeno "O" que mimetiza los glicofosfolípidos humanos (Moran, Prendergast, & Appelmelk, 1996). *H. pylori* modifica su antígeno O, mediante la síntesis del antígeno de Lewis X (Le^x) el cual es generado mediante la adición de una

segunda fucosa al N-acetil-b-galactosamina, además de generar el factor Lewis Y (Le^y) mediante la adición de otro residuo de fucosa al antígeno Le^x (Matsuura, 2013).

VacA

Molécula involucrada en daño directo a células epiteliales gástricas y al sistema inmune, es una toxina que es inducida por vacuolas, inicialmente una protoxina de 140 kDa, con una porción terminal N de señalización, una región central, que es propiamente la toxina y una región C terminal que le sirve como transportador, la toxina pesa 88 kDa y está formada por dos subunidades, de 33 kDa (A) y 55 kDa (B) (Reyrat et al., 1999). Estas subunidades están implicadas en la unión y formación de vacuolas (Torres, Ivie, McClain, & Cover, 2005).

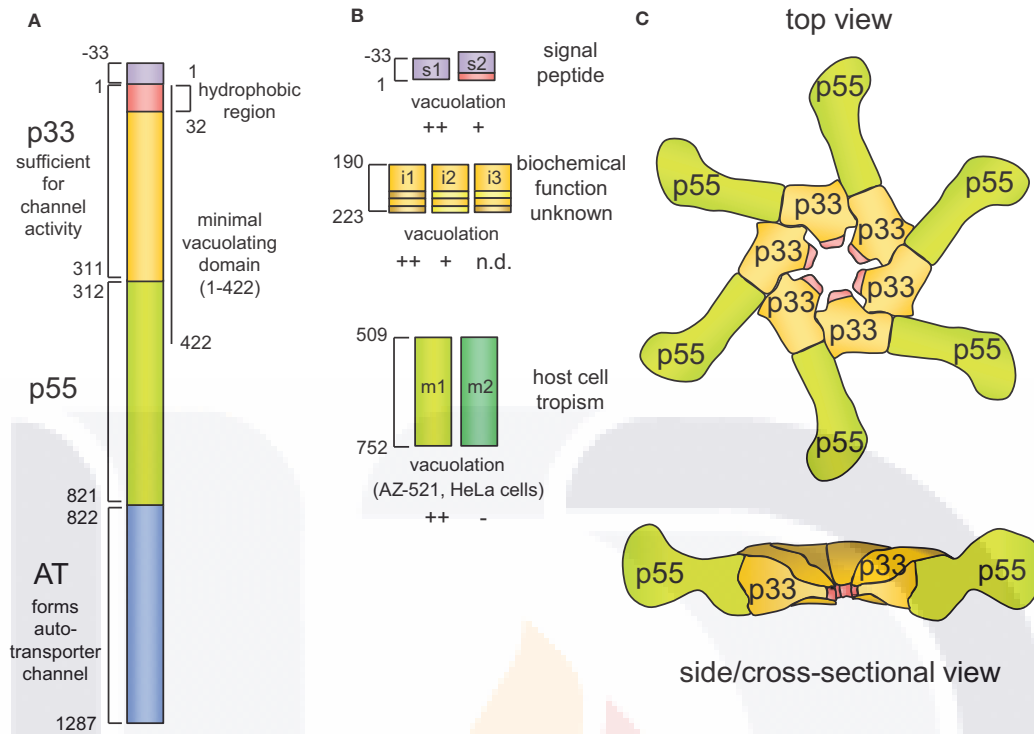


Figura 9. Estructura de VacA en donde se observa una proteína de 33 aminoácidos (p33) que forman el centro de la estructura y otra mayor de 55 aminoácidos (p55) estas le dan la función de vacuolización y es donde veremos los polimorfismos del gen *vacA* como son las regiones s, i y m que se asocian a virulencia de *H. pylori*. Fuente de figura (Kim & Blanke, 2012).

Uno de los mecanismos que se atribuyen a VacA, es que interfiere con la función de los linfocitos T disminuyendo la producción de IL-2, así como la expresión del receptor de IL-2 (IL-2R), disminuyendo la proliferación de linfocitos T (Cover & Blanke, 2005). Se ha observado que VacA purificada causa erosiones en células epiteliales gástricas en ratones e in vitro induce apoptosis usando como blanco la mitocondria, mediante la liberación de citocromo C y liberación de caspasa 3 (Galmiche et al., 2000).

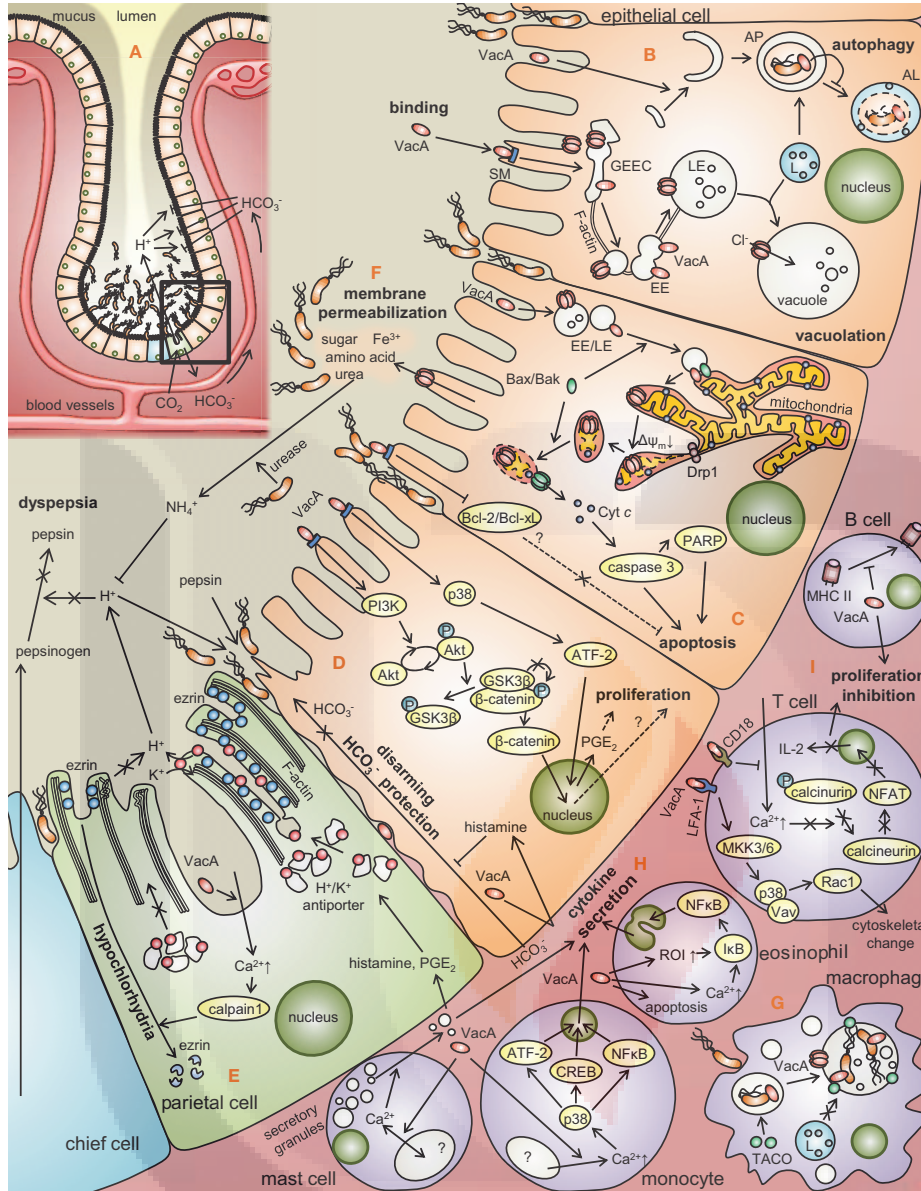


Figura 10. Se observa los diferentes mecanismos de daño que ocasiona la proteína VacA como son la vacuolización, incremento de la permeabilidad de la membrana epitelial, activación de vías de la caspasa 3 y apoptosis celular, hipocloridria en células parietales, así como incremento de secreción de productos de la inflamación en células cebadas y otras células de la respuesta inmunológica. Fuente de figura (Kim & Blanke, 2012).

Variabilidad genética VacA y CagA

H. pylori alberga una diversidad genética la cual es evidenciada por la presencia de fragmentos de ADN no conservados, que varían entre sus cepas (Blaser & Berg, 2001). Los determinantes de patogenicidad principales incluyen los genes *cagA*, localizados en la isla de patogenicidad y la citotoxina vacuolizante (VacA), esta última presente en todas las cepas, a diferencia de CagA, en donde podemos encontrar cepas CagA (+) ó CagA (-). VacA es una estructura en mosaico y en las cepas de Estados Unidos cada alelo tiene 1 a 3 tipos posibles de regiones (s1a, s1b y s2) y 1 a 2 tipos de regiones centrales (m1 y m2) y la región intermedia, (i1 e i2) (Rhead et al., 2007) que tienen lugar en combinación.

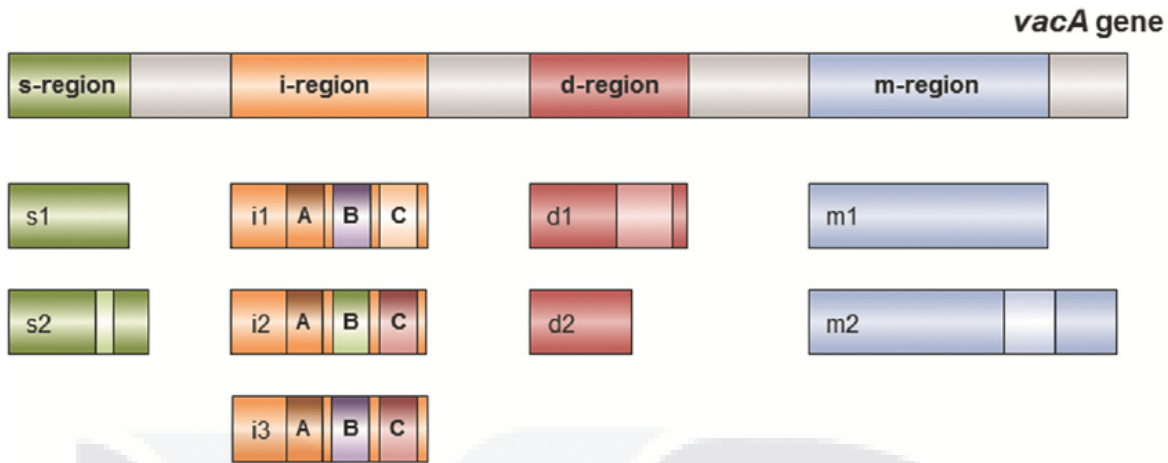


Figura 11. Estructura del gen *vacA* en donde se observan sus polimorfismo (región s, i, d y m) con los cuales *H. pylori* dependiendo de sus combinaciones se presenta incremento de virulencia y por lo tanto mayor riesgo a cancer gástrico. Fuente de figura (Ferreira, Machado, & Figueiredo, 2014).

En estudios de Estados Unidos, la cepa de *H. pylori vacA s1* fue más comúnmente asociada con ulcera péptica que la cepa *vacA s2* (Atherton et al., 1995). En estudios con población mexicana el alelo *s1b* fue el más frecuentemente asociado a ulcera duodenal, tanto en niños como adultos (Gonzalez-Valencia et al., 2000). Estudios de meta-análisis han mostrado diferencia entre la patogenicidad de los diferentes alelos, encontrando mayor riesgo de ulcera péptica en los alelos *s1m1* contra *s2m2* [OR 2.04 (IC 95% 1.01-4.13), P< 0.0001] (Matos, de Sousa, Marcos-Pinto, & Dinis-Ribeiro, 2013).

CagA

En el estudio de *H. pylori* y sus diferentes cepas es importante el análisis de los polimorfismos en el gen *cagA*, en donde secuencias repetidas de aminoácidos (regiones EPIYA) hacen esta diferencia entre cepas y regiones a nivel mundial. En las regiones EPIYA se encuentran los motivos de fosforilación de tirosina (TPMs) que son los que llevan a cabo la fosforilación de CagA. Las regiones adyacentes a EPIYA tienen variaciones en aminoácidos y se denominan regiones A, B y C. La fosforilación de CagA se hace en la región C y podemos encontrar entre cepas que presenten diferentes polimorfismos (ABC, ABCC ó ABCCC) dependiendo el número de repeticiones de esta secuencias adyacente a EPIYA. Un meta-análisis reporta una diferencia significativa entre las cepas *cagA* (+) y *cagA* (-) como riesgo de presentar gastritis o ulcera péptica [OR 1.69 (95% IC 1.12-2.55), $P < 0.00001$.] y para presentar cáncer gástrico, *cagA* (+) presenta mayor riesgo que *cagA*(-) [OR 2.44 (IC 95% 1.27-4.70), $P < 0.00001$] (Matos et al., 2013)

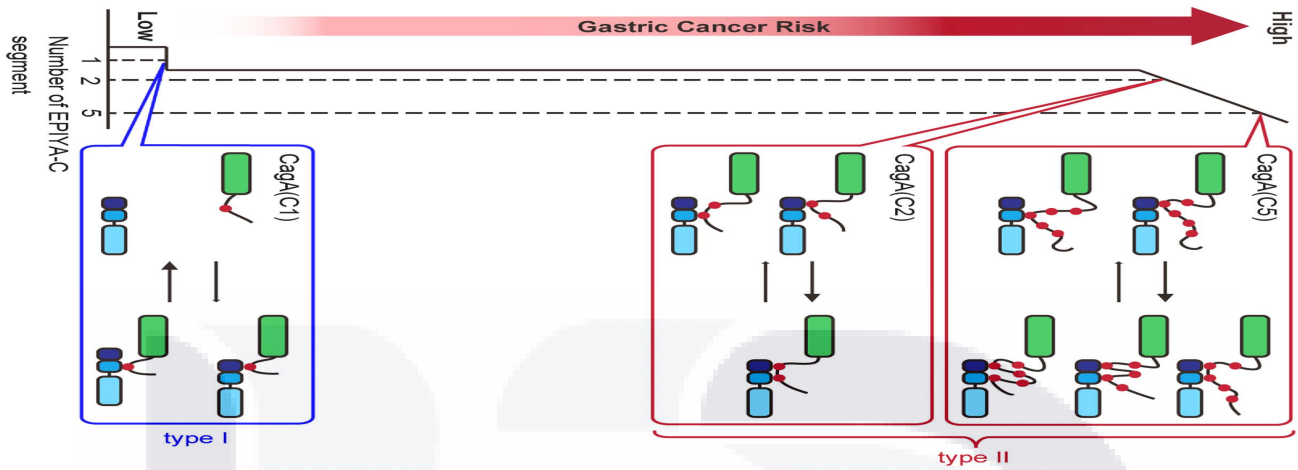


Figura 12. Regiones EPIYA de la proteína CagA, en donde se observa que a mayor número de este segmento (EPIYA) se incrementa el riesgo de cáncer gástrico ya que estos segmentos interrumpen vías de señalización celular. Fuente de figura (Nagase, Hayashi, Senda, & Hatakeyama, 2015)

Estudios en Irak muestran que otro factor independiente como riesgo de cáncer gástrico es presentar la molécula de adhesión de BabA, localizada en el gen *babA2* (Abdullah et al., 2012) además, cuando esta molécula cuando se encuentra junto con *cagA+* y *vacA s1+* (cepa triple positiva), esta significativamente asociada a ulcera duodenal en estudios de varios países (Alemania, Finlandia, Portugal y Turquía) (Olfat et al., 2005) (Erzin et al., 2006).

Interacciones entre VacA y CagA

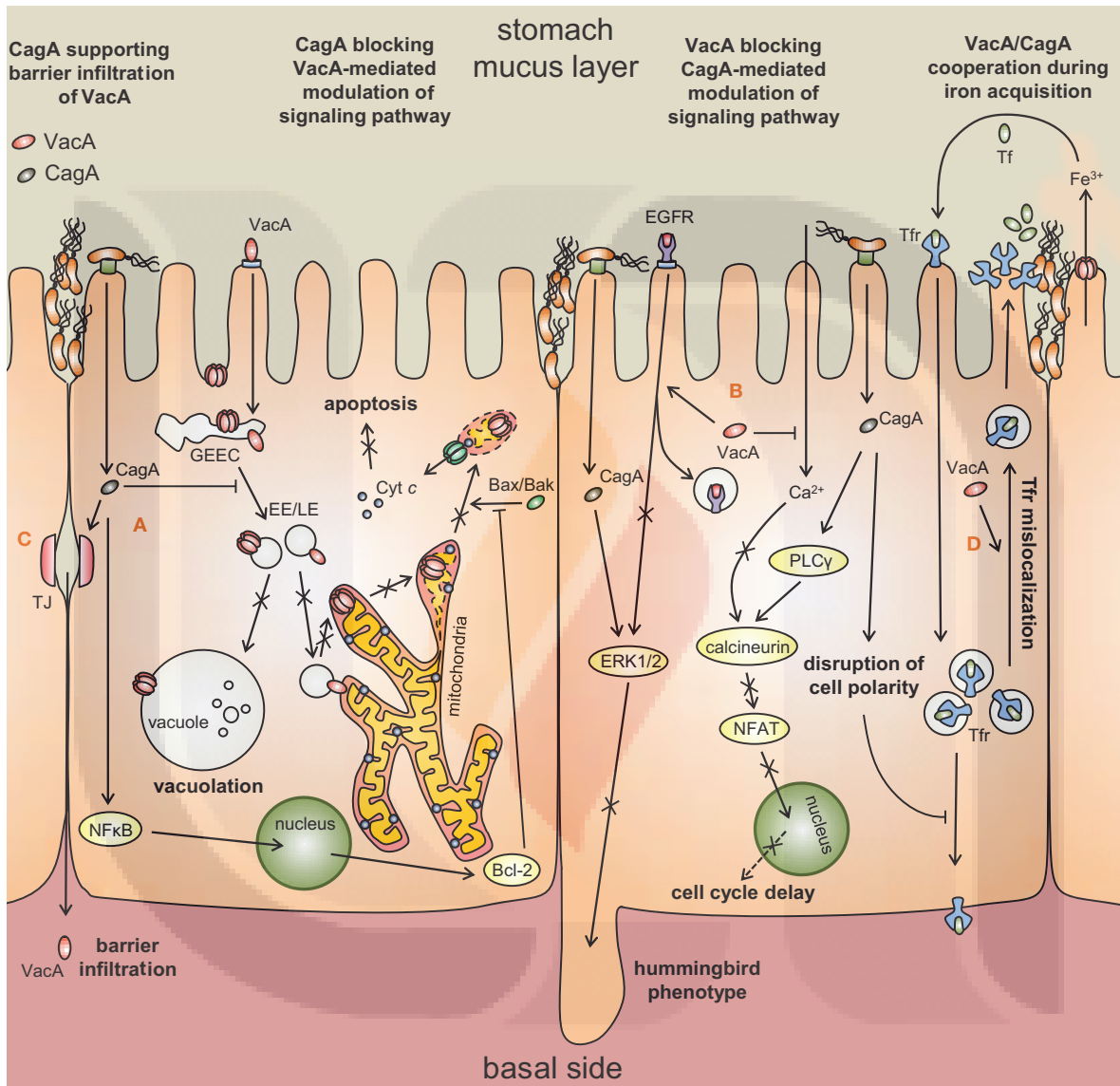


Figura 13. Interacciones entre VacA y CagA en donde se observan principalmente acciones antagónicas entre ambas moléculas mediante el bloqueo en la modulación de las vías de señalización y solo se describe cooperación en la captación de hierro. Fuente de figura: (Kim & Blanke, 2012).

Interacción linfocitos T y célula presentadora de antígeno

La respuesta inmune es tradicionalmente clasificada en adoptiva e innata, la respuesta adoptiva está presente únicamente en vertebrados, especializada en el desarrollo de la respuesta inflamatoria que se basa en el reconocimiento específico de moléculas extrañas (antígenos). Dentro de los actores principales en este tipo de respuesta se encuentran los linfocitos T, los cuales están divididos en subgrupos, uno de ellos, el de los linfocitos T cooperadores (Th) tiene a la vez subgrupos que mediante la activación específica de factores de transcripción maestros (T-bet, GATA-3, ROR γ t y FoxP3) van a desarrollar un fenotipo de las citocinas que los caracterizan. En estos subgrupos, encontramos los Th1, Th2, Th17 y Treg, que como veremos, están implicados en el control de patógenos, como es el caso de *H. pylori*. Para este control es clave la colaboración con células del sistema innato y células que median la interacción entre sistema innato y el sistema adoptivo. Esta función mediadora es realizada por las llamadas células presentadoras de antígenos (CPA), la función de este tipo de células es permitir que las moléculas de los patógenos sean reconocidas,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

procesadas y presentadas a estos linfocitos T cooperadores para montar una respuesta efectora o generar tolerancia. La interacción entre CPA y linfocito T se lleva a cabo mediante señales, la primera de ellas es la presentación del antígeno mediante moléculas del sistema MHC por parte de la célula presentadora y el reconocimiento por el receptor de células T (TCR) del linfocito cooperador (primera señal), posteriormente se expresan moléculas en el exterior de ambas células que interaccionan, unas de ellas por parte de la célula presentadora son B7-1 (CD80) ó B7-2 (CD86) que se une a CD28 de la célula cooperadora (segunda señal de activación). Estas señales son de activación de la respuesta efectora, pero tenemos también que la respuesta efectora debe limitarse o no presentarse y para esto se cuenta con moléculas que inhiben la respuesta, como son: CTLA-4, B7-H1, B7-CD, B7-H4, B7-H6, Dominio -V de supresión de activación de células T (VISTA), atenuador de respuesta de linfocitos B y T (BTLA)(Ceeraz, Nowak, & Noelle, 2013). La señalización mediante estas moléculas inhibitoras lleva a la tolerancia del sistema inmune al antígeno que se le presenta y estos mecanismos son utilizados por los patógenos para evadir la respuesta inmune. *H. pylori* se ha visto relacionado con dos moléculas que median la modulación,

activación o inhibición del sistema inmune (B7-H2 y B7-H1 respectivamente)(T. Lina et al., 2015; Taslima T. Lina et al., 2013) y con los subgrupos de linfocitos T, como son Th1, Th2, Th17 y Treg (Bagheri et al., 2015) sin embargo, aún no podemos precisar que mecanismo de evasión por parte de *H. pylori* es el más importante como factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico.



MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE (B7-H1/CÉLULAS TREG, B7-H2/TH17)

B7-H1/Treg

En los últimos años se han descubierto nuevas moléculas que tienen impacto en las enfermedades inflamatorias gástricas como es B7-H1 (PD-L1, CD274) un miembro de la familia B7 descrito inicialmente por Dong (Dong, Zhu, Tamada, & Chen, 1999). Una proteína transmembrana compuesta por dominio extracelular de tipo IgC e IgV, que se une a la proteína de muerte programada (PD-1), las cuales en unión transmiten señales mediadas por residuos de tirosina del tipo ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif) esenciales para su función inhibidora (Chemnitz, Parry, Nichols, June, & Riley, 2004; Ghiotto et al., 2010). Esta molécula es responsable de cronicidad de infecciones por virus y bacterias así como la evasión inmune de cáncer (Dong & Chen, 2006).

Se observó mediante células dendríticas disfuncionales con alta expresión de B7-H1 la inducción de Treg y el bloqueo de B7-H1 abolió

la señal en modelos de conversión de Treg en tumores (L. Wang et al., 2008). La asociación con cáncer y las moléculas B7-H1, también se ha podido estudiar en células de cáncer de colon donde el tejido con cáncer presento alta expresión de B7-H1 intratumoral con un elevado número de células Treg, pero con menor número de células T convencionales, no así en el tejido sano adyacente a las lesiones donde la expresión de B7-H1 era baja, las células Treg no fueron significativamente mayor a nivel de sangre periférica, por lo que se describe un efecto de supresión de la inmunidad antitumoral de T específicas mediante la vía PD-1/B7-H1 que contribuye al crecimiento tumoral (Dong et al., 2012) estos investigadores ya habían descrito la participación de B7-H1 en 102 pacientes con carcinoma gástrico, también observaron una correlación estadísticamente significativa de B7-H1 (PD-L1) en metástasis a nódulos linfáticos, tamaño de tumor y profundidad de la invasión, también observaron que las líneas tumorales después de exposición a interferón gamma (IFN- γ) incrementaron la expresión de B7-H1, pero los mecanismos de la regulación de esta molécula en células tumorales aún eran desconocidos (Sun et al., 2007). Esta evasión al sistema inmune se ha descrito en otros trabajos, en donde se observa que las células

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tumorales que expresan B7-H1+ tienen un incremento de la resistencia a la destrucción por los linfocitos citotóxicos CD8+ comparados con los B7-H1 (L. Wang, Qian, & Lu, 2013). En estudios reciente mediante en modelos con ratones B7-H1 KO, se documenta que la deficiencia de esta proteína disminuye el porcentaje de NK y NKT, así como disminución del número de células mieloides con los marcadores Gr1+CD11b+ así como las subpoblaciones de linfocitos B, en donde se observa un incremento en las células transicionales y una disminución en los linfocitos B foliculares, también en las células Treg hubo diferencias entre los ratones B7-H1KO y los ratones WT, observando un incremento de Treg en los B7-H1 KO con un decremento en las células T convencionales, por lo que las citocinas, es importante señalar que B7-H2 también forma parte del eje con PD-1 por lo que pudo compensar en parte la deficiencia de B7-H1 (Bazhin et al., 2014). *H. pylori* también manipula la función de las células T induciendo a Treg que se asocian frecuentemente al sitio de infección (Cheng et al., 2012)

La fuerte asociación de Treg a *H. pylori* y los mecanismos involucrados han sido motivo de estudio, viéndose también involucradas los co-moduladores de la familia de las proteínas B7, así

como mecanismos y vías que se utilizan por *H. pylori*. Se observó mediante células dendríticas disfuncionales con alta expresión de B7-H1 la inducción de Treg. Y el bloqueo de B7-H1 abolió la señal en modelos conversión de Treg en tumores (L. Wang et al., 2008).

Recientemente se documentó que la translocación mediante el T4SS de *CagA* y PG juegan un papel importante en la regulación positiva de B7-H1, así como la inducción al perfil Treg, mediante la unión de PG a receptor NOD1 y utilizando principalmente la vía p38 MAPK se induce mayor expresión de B7-H1, así como expresión de citocinas proinflamatorias como IL-8, manteniendo un microambiente proinflamatorio, pero al mismo tiempo induciendo mecanismos antiinflamatorio locales por Treg y producción de citocinas antiinflamatorias IL-10 e TGF- β (T. Lina et al., 2015).

Otro estudio investiga la función de B7-H1 como receptor de células cancerosas para transmitir señales de proliferación, en donde se observó incremento significativo en la expresión de Ki67 (antígeno asociado a la proliferación celular) en las células cancerosas B7-H1⁺ no así en las células B7-H1⁻ (Y. Yang et al., 2015)

También se han descrito polimorfismo del gen de B7-H1 asociados a adenocarcinoma gástrico (Weipeng et al., 2013), pero aún es insuficiente la información de variaciones génicas de las moléculas de patogenicidad y su relación con las molécula co-estimuladora B7-H1 en la patología inflamatoria crónica gástrica. La activación transcripcional de B7-H1 se lleva a cabo por múltiples vías, la hipoxia en cáncer es una de las principales vías de activación mediante HIF-1a este se une al promotor de B7-H1 para incrementar su expresión, en la hipoxia la producción enriquecida de lactato hace que B7-H1 se active y contribuye a la evasión de células tumorales. STAT3 es otro factor de transcripción que regula de manera positiva la expresión de B7-H1, así como NF-kB se asocia a la tumorigénesis de la inflamación (Fig. 14).

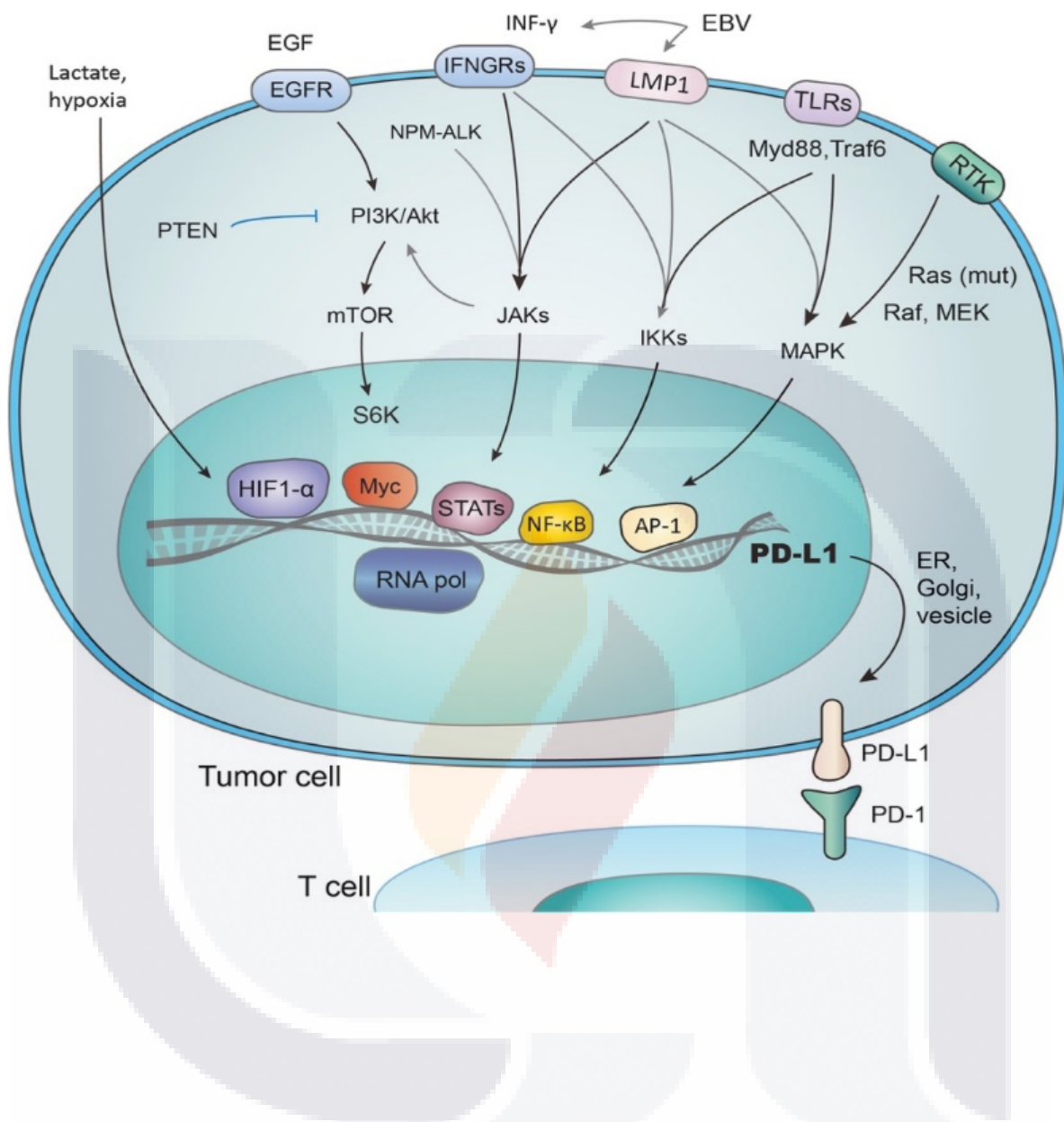


Figura 14. Mecanismos de activación de B7-H1 (PD-L1) mediante la hipoxia, lactato, citocinas (interferón gamma), microorganismos (virus del Epstein-Barr) y receptores tipo Toll. Fuente de figura (Y. Wang et al., 2018).

B7-H2/Th17

Otros miembros de la familia de B7 es B7-H2. El ligando del co-estimulador inducible de ICOS (ICOS-L) (B7-H2, B7h, B7RP-1, GL50 y CD275) En humanos, B7-H2 puede unirse también a CD28 y CTLA-4 (Yao et al., 2011). La unión con ICOS promueve la transcripción de Bcl6 crítica para la formación de centros germinales, además la producción de IL-17 (Park et al., 2005), las células Th17 en donde la producción de citocina 17A es la característica principal son cruciales para el aclaramiento de bacterias extracelulares (Kabir, 2011).

H. pylori disminuye la expresión de B7-H2 en células epiteliales gástricas, esta disminución de la expresión depende de CagA y esta baja expresión se sinergiza en presencia de INF- γ , lo que lleva a la activación de la quinasa mTOR/p70 S6, la vía que lleva a la baja de expresión de B7-H2, esta vía se ha corroborado con un inhibidor de la quinasa, rapamycina, en presencia de esta se bloquea la disminución de expresión de B7-H2. También se observó la disminución de factor de transcripción nuclear maestro para el desarrollo de las Th17, el

factor ROR γ t en presencia de *H. pylori* que expresaban CagA⁺, pero no en la presencia de *H. pylori* las mutantes CagA⁻ (Taslina T. Lina et al., 2013).

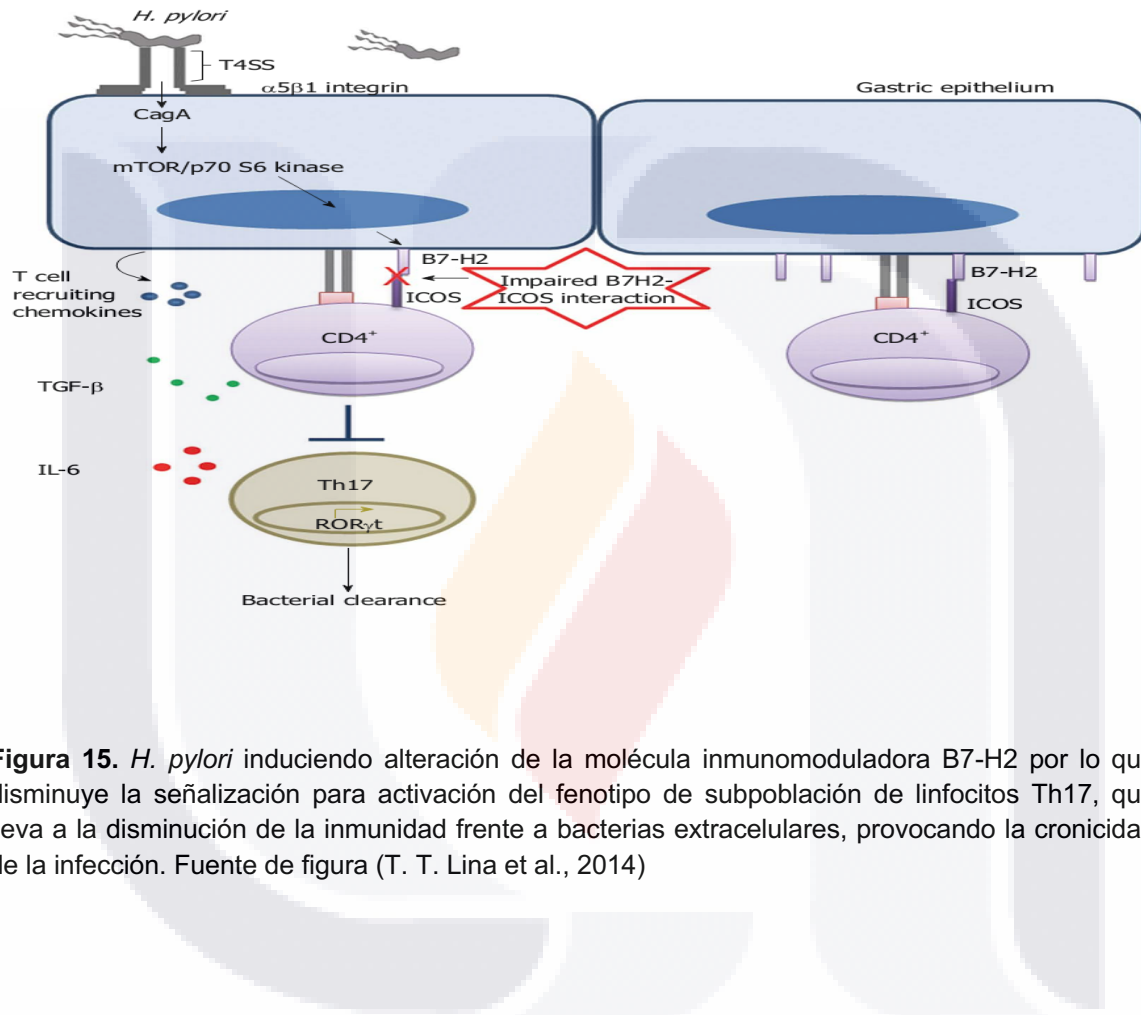


Figura 15. *H. pylori* induciendo alteración de la molécula inmunomoduladora B7-H2 por lo que disminuye la señalización para activación del fenotipo de subpoblación de linfocitos Th17, que lleva a la disminución de la inmunidad frente a bacterias extracelulares, provocando la cronicidad de la infección. Fuente de figura (T. T. Lina et al., 2014)

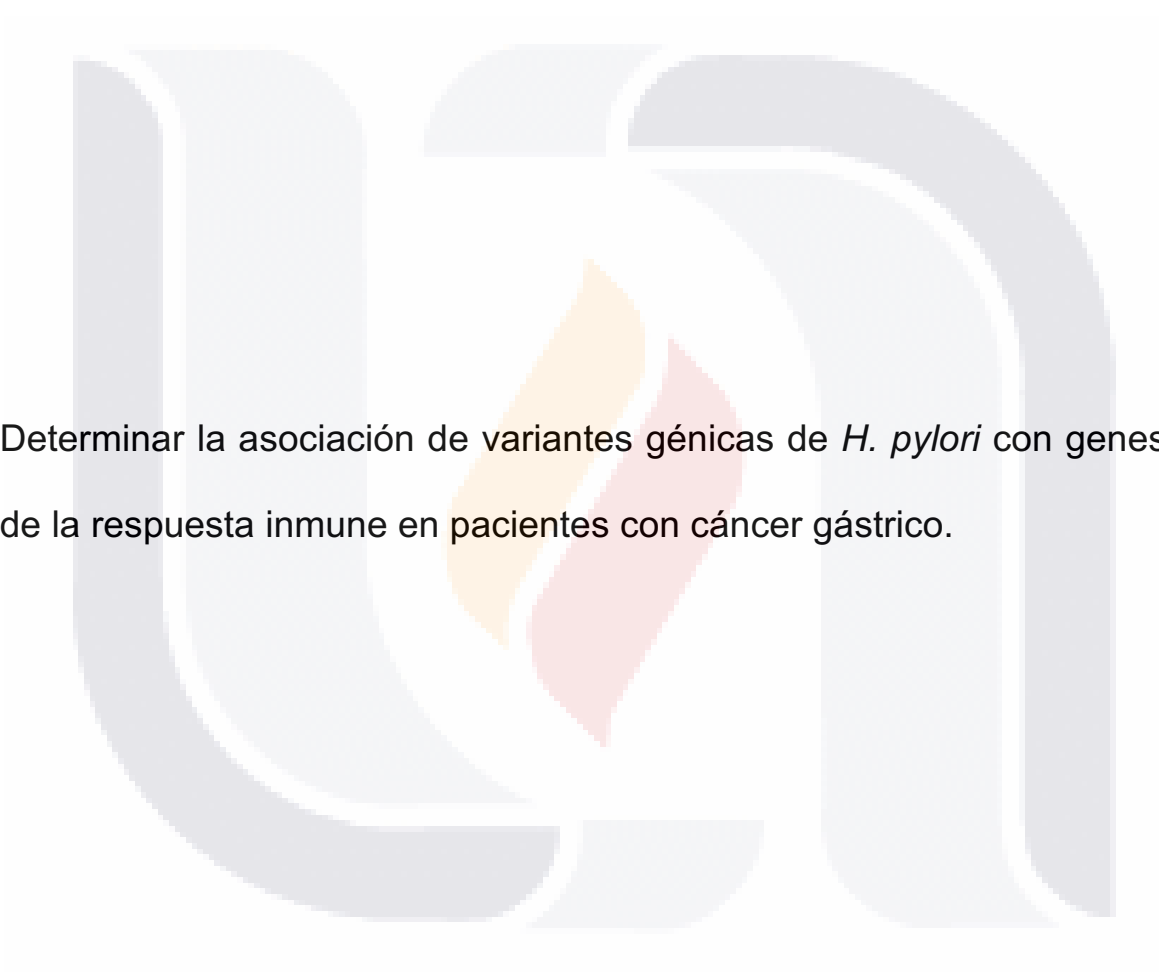
JUSTIFICACIÓN

Existe una alta prevalencia de la infección con *H. pylori* a nivel mundial. Además de ser esta infección la principal causa de riesgo asociado a adenocarcinoma gástrico, el cáncer gástrico es la segunda causa de muerte asociada a cáncer a nivel mundial (Yuasa, 2003) por lo que es conveniente detectar la interacción entre los factores de susceptibilidad del hospedero a la infección por *H. pylori* y sus factores de virulencia, por medio de los cuales lleva a cabo distintos mecanismos fisiopatológicos que desencadenan la patología gástrica. Existen mecanismos bien establecidos de patogenicidad de *H. pylori* y su interacción con el sistema inmune, pero aún faltan estudios que involucren la variabilidad genética de las moléculas de patogenicidad del microorganismo, con entidades clínicas específicas y las moléculas que modulan esta interacción (B7-H1 y B7-H2). Parte de nuestro trabajo es investigar la participación de estas moléculas y su asociación con las variantes génicas de factores de virulencia de *H. pylori* (*cagA*, *vacA*) en diferentes grupos de pacientes con patología gástrica asociada a *H. pylori*.

HIPÓTESIS

Variantes génicas de *Helicobacter pylori* generan alteraciones en la expresión de las moléculas B7-H1 y B7-H2 en las células epiteliales gástricas y se asocian a modificaciones de la respuesta inmune y con esto a incrementar riesgo de desarrollo de cáncer gástrico.

OBJETIVO GENERAL



Determinar la asociación de variantes génicas de *H. pylori* con genes de la respuesta inmune en pacientes con cáncer gástrico.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar en biopsias gástricas la expresión de las moléculas inmunomoduladoras B7-H1 y B7-H2 en pacientes con infección por *H. pylori* con y sin cáncer gástrico.
2. Medir los niveles de expresión de los genes de INF- γ , IL-4 , IL-17 y FoxP3 en la mucosa gástrica de pacientes infectados con *H. pylori* con y sin cáncer gástrico.
3. Estudiar en biopsias gástricas de pacientes con y sin cáncer gástrico las variantes polimórficas de los genes *vacA* y *cagA* de *H. pylori*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio actual se realizó en cooperación con el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE desde junio de 2016 hasta agosto de 2017. De un total de 1462 endoscopias realizadas durante este período en adultos (>18 años de edad), 46 proporcionaron evidencia de una patología gástrica y los pacientes fueron remitidos a nuestro grupo. Estos pacientes recibieron una descripción detallada del estudio y todos dieron su consentimiento informado por escrito, de acuerdo con la Declaración de Helsinki y el Comité de Ética de la institución. Se formaron dos grupos a partir de los 46 pacientes, aquellos con (n = 18) y sin (n = 28) cáncer con las siguientes características clinicopatológicas que se muestran en **tabla 1**.

Extracción de biopsias gástricas

Las biopsias fueron obtenidas bajo consentimiento informado en conformidad con la declaración de Helsinki y aprobación del Comité de Ética del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE. Los procedimientos endoscópicos fueron realizados por endoscopistas experimentados, se utilizaron los equipos: Endoscopio Radial Jaw 160 cm 2.4 mm con apertura de 6 mm de Boston Scientific y el Fujinon inc. 590 EG ZW con procesador EPX 4400 con diámetro de canal de trabajo de 2.8mm. Se realizó endoscopia convencional de luz blanca con observación cuidadosa de la mucosa para localizar cambios o anomalías visibles como gastropatía, UG o UD y en pacientes con sospecha clínica de CG se buscó la neoplasia para describir sus características y localización. Se tomaron biopsias gástricas de antro pilórico para los protocolos de extracción de ARN y ADN colocándolas en frascos con Trizol (Invitrogene) y etanol respectivamente. Las muestras se almacenaron a -40 °C hasta su procesamiento. Adicionalmente se tomaron biopsias de antro pilórico en formol al 4%, para confirmación histopatológica con protocolo Sydney, (Sipponen & Price, 2011). En caso de neoplasia gástrica se tomaron biopsias de la lesión para su estudio histopatológico mediante tinción H&E.

Purificación de ADN a partir de tejido gástrico.

El ADN se obtuvo mediante extracción orgánica con fenol-cloroformo. El tejido gástrico se homogenizó con 500 µl de solución amortiguadora de lisis (2 mM de Tris HCl, dodecil sulfato de sodio al 10%, 1 mM de ácido etilendiaminotetracético y 1.5 µg/µl de proteinasa K), la muestra se incubó a 65°C por 24 h, posteriormente se agregaron 500 µl de la solución fenol:alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó 15 min a 15,800 xg. La fase acuosa se separó y se realizó una segunda extracción con 500 µl de solución cloroformo-alcohol isoamílico. La muestra fue centrifugada (15 min, a 15,800 xg) y se realizó la separación de la fase acuosa. El ADN contenido en la fase acuosa fue precipitado con 500 µl de isopropanol y centrifugando por 5 min a 15,800 xg. La pastilla se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O libre de agentes quelantes. El ADN fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm. La integridad del ADN fue analizada con electroforesis en gel de agarosa al 1.25%, como se observa en la siguiente figura (Fig. 16):

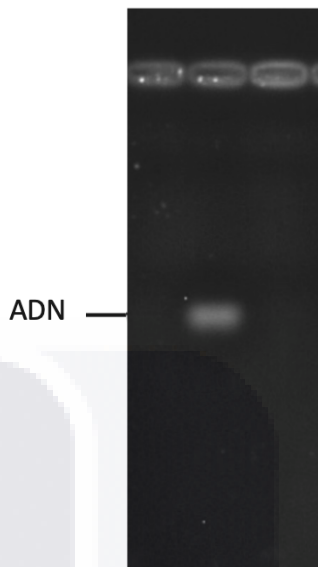


Figura 16.
Banda compacta de ADN de extracción de *H. pylori*, por el método fenol-cloroformo. Gel de agarosa al 1.25%

Identificación de *H. pylori* en mucosa gástrica

La identificación de *H. pylori* se realizó mediante PCR con el kit Platino PCR Supermix, invitrogen de Thermo Fisher Scientific, USA. Con el termociclador TECHNE 3 PRIME BASE/02 SERIE 32309 bajo las siguientes condiciones termodinámicas: Desnaturalización 95° 1'; alineación 58° 30''; extensión 72° 30'' 40 ciclos. Las parejas de oligonucleótidos específicos (Tabla 2) a una concentración de 200 pmol/ μ L. Los pares de oligos para gen Hsp60 (F 5'AAGGCA TGCAATTTGATAGAGGCT; R5' CTTTTTCTCTTTCATTTCCACTT) (Singh et al.: 2008) y

UreC (F 5'AAGCTTTTAGGG GTGTTAG GGGTTT; R5' AAGCTTACTTT CTAACACTAAACGC) (Luna, 1968) se corrobora en gel de agarosa al 2.5% y se obtienen las siguientes bandas como se observa en la siguiente figura (Fig. 17).

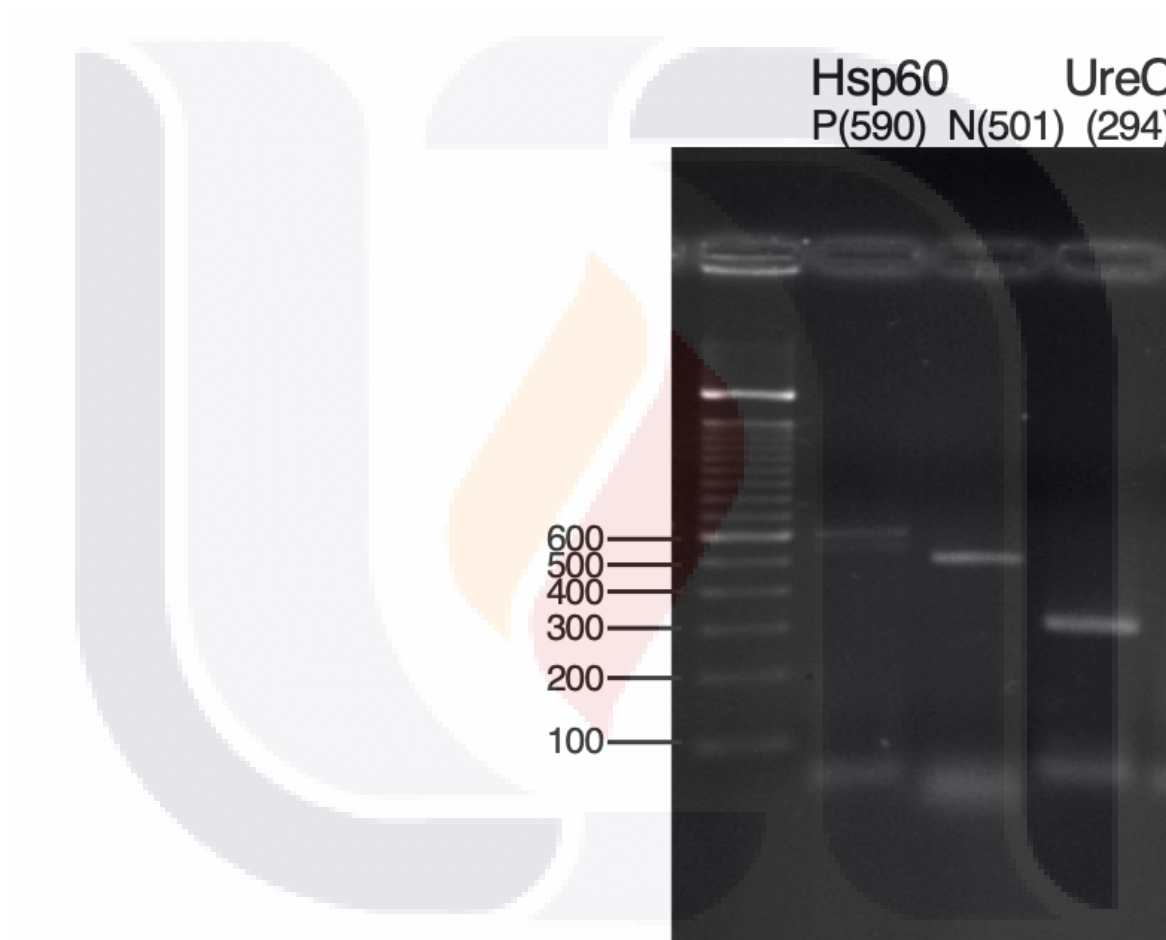


Figura 17. Gel de agarosa al 2.5% en donde se corrieron los genes de Hsp60 (PM 590) y UreC PM (294) para caracterizar *H. pylori* con primers concentrados (200 pmol/μL) observándose bandas en los carriles 1, 2 y 3

Status *cagA* y Tipificación de *vacA* en biopsias gástricas

Para identificar las cepas de *H. pylori cagA+* se utilizaron los oligos *cag2-4* (F 5'-GGAACCCTAGTCGGTAATG; R 5' ATCTTTGAGCTTGTCTATCG), en donde se obtuvo banda de 450pb como se observa en la figura 18 y sus polimorfismos en las regiones EPIYA (C1, C2, C3, C4 o C5) (Fig. 19) y las regiones polimórficas de *vacA* (*s1s2 / m1m2*)(Fig. 20 A, B y C), fueron analizadas por PCR en punto final a partir de ADN de tejido gástrico usando el kit Platino PCR Supermix, invitrogen de Thermo Fisher Scientific, USA. Con el termociclador TECHNE 3 PRIME BASE/02 SERIE 32309 bajo las siguientes condiciones termodinámicas: Desnaturalización 95° 1'; alineación 58° 30''; extensión 72° 30''. Los pares de oligonucleótidos utilizados se muestran en la **Tabla 2**.

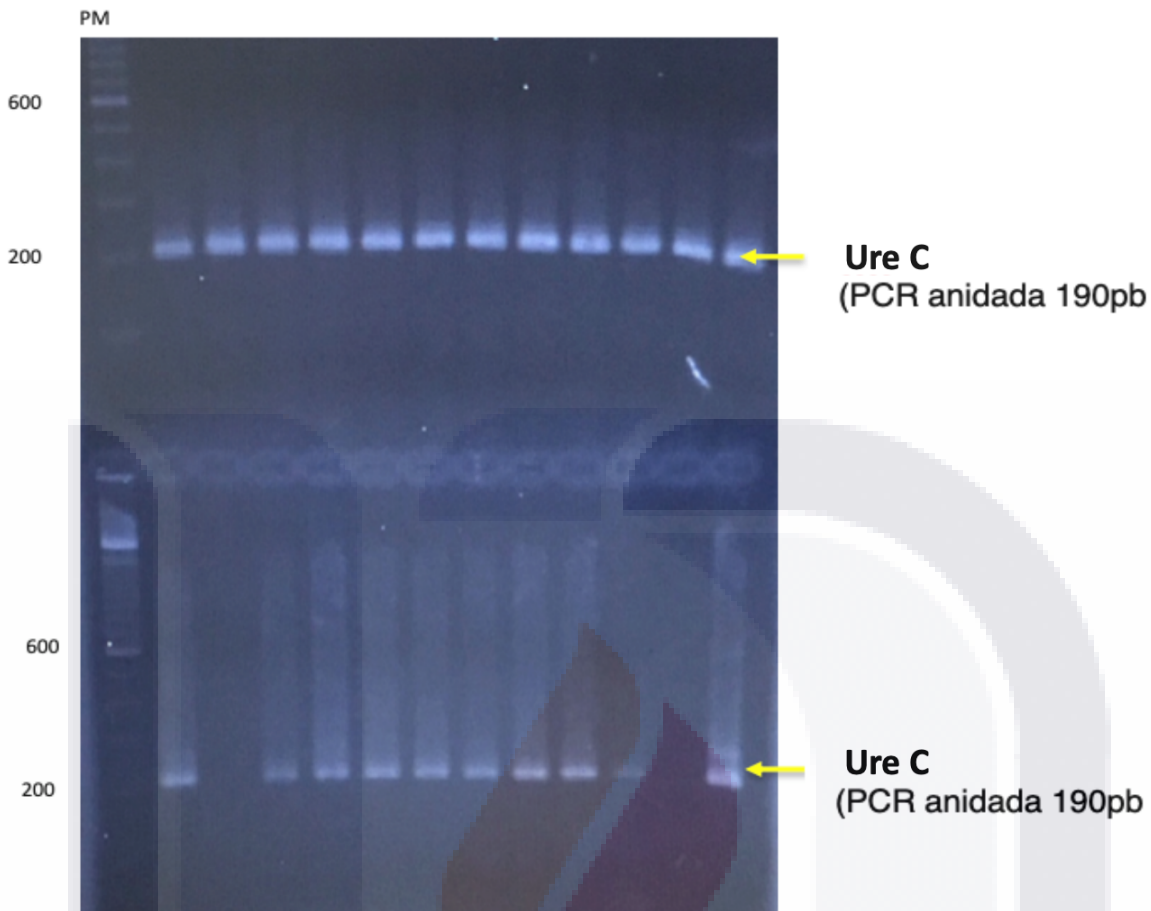


Figura 18. Gel de agarosa al 2.5% en donde se observa producto de amplificación de PCR anidada para UreC de pacientes 1 a 22, con NTC y Control positivo (HP103).

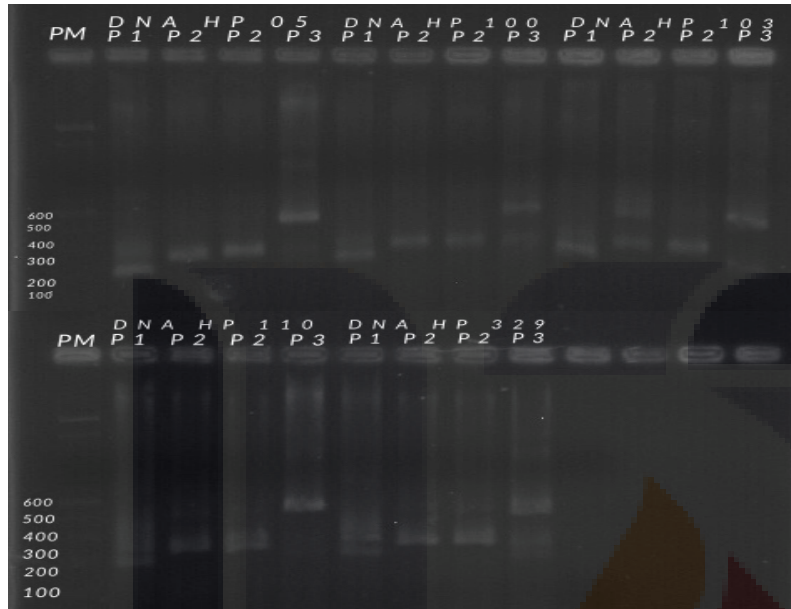


Figura 19. Gel de agarosa al 2.5 % en donde se observan las bandas de los productos de amplificación de PCR de los polimorfismos de *cagA* P1 (264pb), P2(309pb), y P3 (468, 579 y 672 pb) en las diferentes cepas de control positivo que contamos (HP05, HP100, HP103, HP110 y HP329).



Figura 20. Geles de agarosa al 2.5% en donde se observan bandas de producto de amplificación de PCR para los polimorfismos de región s de *vacA* a nivel de las 286pb para todos los pacientes, así como control positivo, esta banda corresponde a **s2** por su PM (A). En gel con banda de PM de las 425pb corresponde a i1 no así para la región i2. (B) y el PM de 290pb que corresponde al esperado en región m1 en los pacientes 3, 4 y 5 así como para control positivo y banda que corresponde a los 352pb de región m2 del paciente 1 (C)

Extracción de ARN total y retrotranscripción

El ARN total se extrajo mediante el protocolo orgánico con Trizol, Invitrogen (CHOMCZYNSKI PIOTR & SACCHI NICOLETA, 1987) Para eliminar la contaminación del ADN genómico, la digestión se logró con 2 unidades de ADNasa I (grado de amplificación de ADNasa, Invitrogen, EE. UU.) Por μg de ARN. La muestra se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente, la enzima se inactivó con 1 μl de EDTA (25 mM) y 10 min de calentamiento a 65 ° C. El ARN total se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 nm y la integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% (Fig. 21).

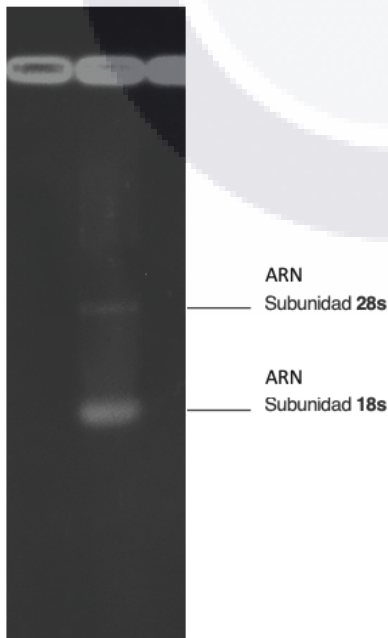


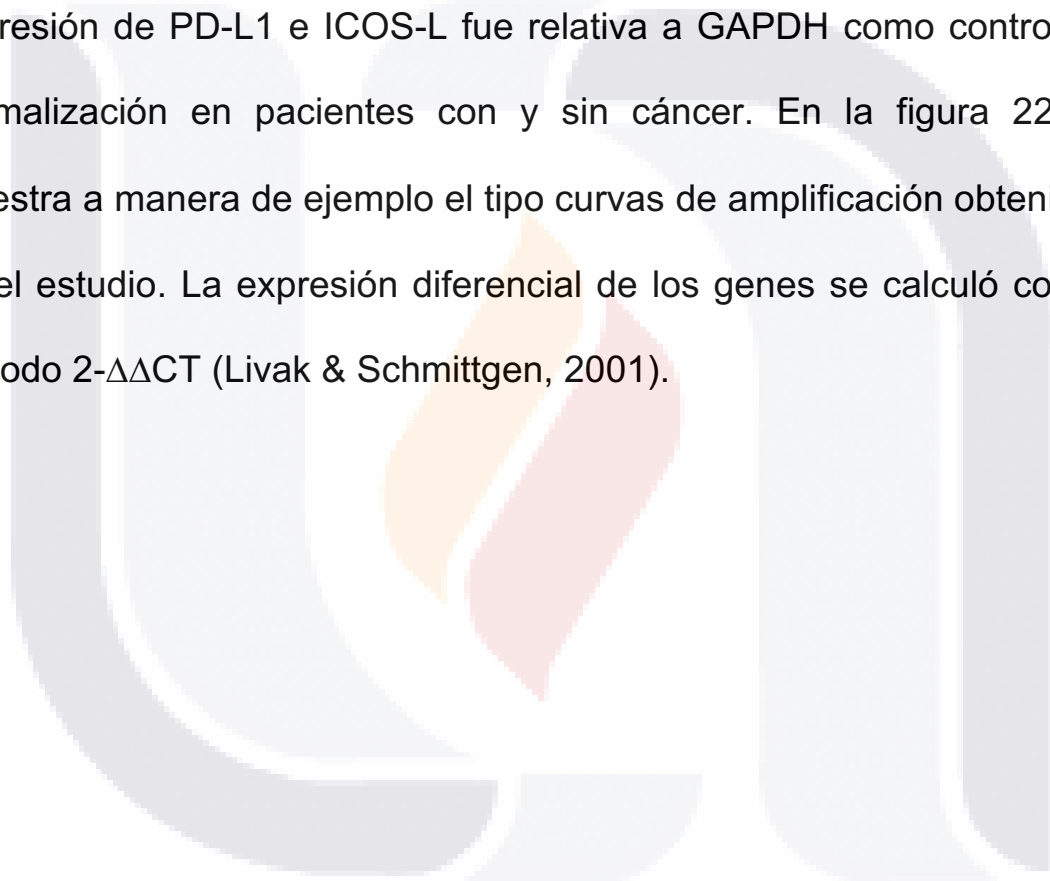
Figura 21. Bandas de ARN de extracción, gel de agarosa al 1.2% Se observan las subunidades 28s y 18s. esperadas. Mediante RT se obtuvo [] cDNA adecuada.

La retrotranscripción del ARN total se realizó con el kit Superscript VILO (Invitrogen, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc resultante se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y las muestras se ajustaron a una concentración de 400 ng/ μ l. Las muestras se almacenaron a -20 ° C hasta su uso posterior.

Análisis de la expresión de ARN en biopsias gástricas.

El ARN obtenido a partir de tejido gástrico se evaluó mediante RT-qPCR con un kit de PCR (Express SYBR qPCR SuperMix Universal, Invitrogen, EE. UU). El nivel de expresión se determinó para las citocinas (IL-4, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ y TGF- β), las moléculas de modulación del sistema inmunológico (PD-L1 e ICOS-L), y los factores de transcripción principales, que incluyen la caja del diapasón P3 (Foxp3), GATA3 y el receptor retinoide huérfano gamma t (ROR γ t). El análisis se realizó en un sistema de PCR en tiempo real StepOne TM (4376374, Applied Biosystems TM, EE. UU). Las condiciones fueron un paso inicial de desnaturalización a 50 ° C durante 2 min y luego a 95 ° C durante 10 min, seguido de 50 ciclos de desnaturalización a 95 ° C

durante 15 segundos, y recocado y una extensión a 60 ° C durante 60 segundos. Todos los cebadores se adquirieron de T4OLIGO (Irapuato, Guanajuato, México). Las secuencias de los oligos se muestran en la **Tabla 3**. (Bao et al., 2011; Christina Schnopp et al., 2007; Moraes-Vieira et al., 2012; L. Wang et al., 2013; Yilmaz et al., 2015) La expresión de PD-L1 e ICOS-L fue relativa a GAPDH como control de normalización en pacientes con y sin cáncer. En la figura 22 se muestra a manera de ejemplo el tipo curvas de amplificación obtenidas en el estudio. La expresión diferencial de los genes se calculó con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001).



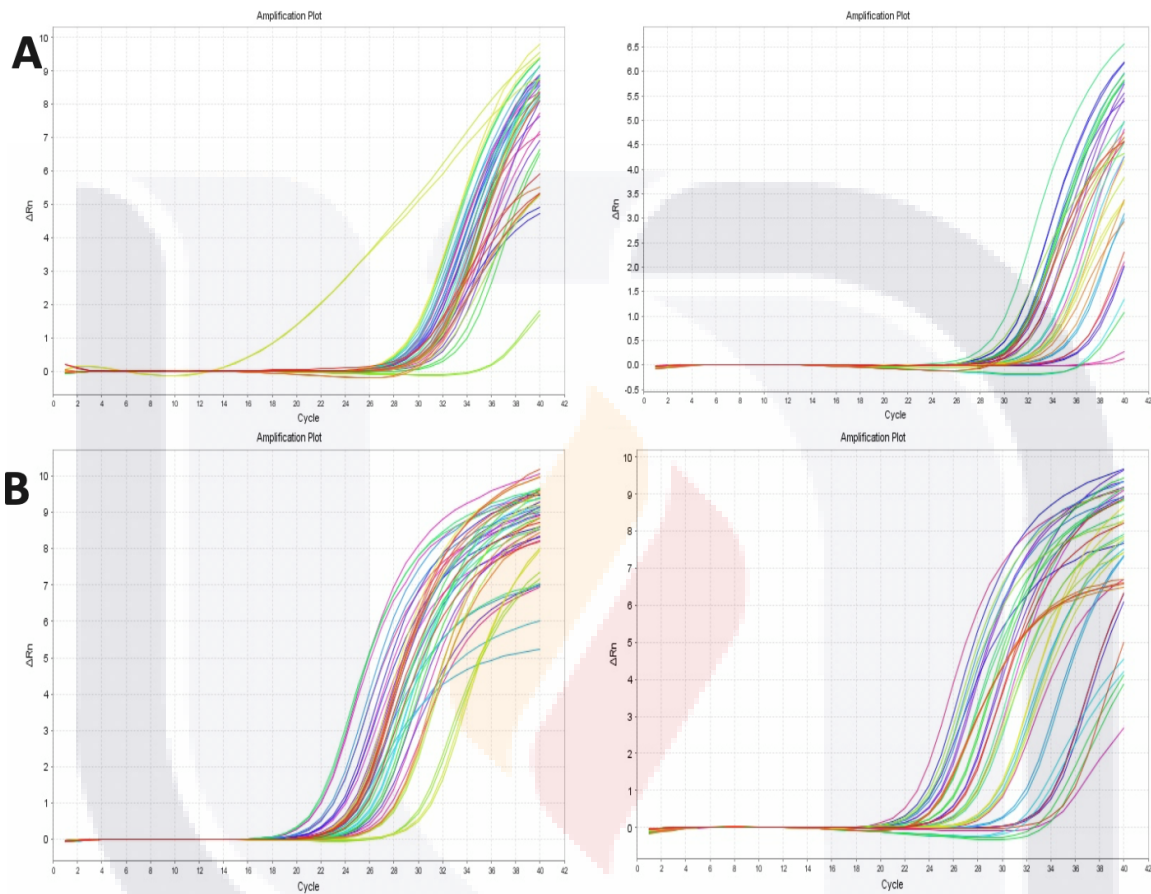


Figura 22. (A) Análisis de RT PCR en tiempo real del gen B7-H2 (ICOS-L) de los pacientes 1 a 46, pacientes con y sin cáncer gástrico (Gráficos superiores). (B) RT-PCR en tiempo real de gen GAPDH de los pacientes 1 a 46, pacientes con y sin cáncer gástrico (gráficos inferiores).

Análisis estadístico

Los resultados de qPCR se examinaron en el software DataAssist™ v3.01 (Applied Biosystems, 2012) según el valor de CT para la expresión relativa. La expresión relativa de ARNm se comparó entre pacientes con y sin cáncer para determinar la importancia de las diferencias mediante el uso del test U de Mann-Whitney y SPSS Statistics v20. Esta prueba es adecuada para la comparación de dos grupos no pareados de variables continuas que no siguen una distribución normal. Para analizar si existe una relación entre la expresión del ARNm de los diversos genes dentro de cada grupo (los pacientes con cáncer y los participantes sin cáncer), se calculó el Rho de Spearman, este coeficiente es una medida de asociación lineal que utiliza los rangos, números de orden de cada grupo y compara dichos rangos. Esta medida no paramétrica, nos ayuda en variables aleatorias (tanto continuas como discretas) donde los valores de este coeficiente próximos a 1; indican una correlación fuerte y positiva. Los próximos a -1 indican una correlación fuerte y negativa. Los próximos a 0 indican que no hay una correlación lineal. Se consideró la

importancia en $p < 0,05$. La correlación se asignó como positiva / negativa y alta / media / baja según la escala descrita por Mukaka (M.M Mukaka, 2012).



RESULTADOS

Las características epidemiológicas de los pacientes en este estudio incluyen la edad, sexo, tabaquismo, diabetes mellitus, hipertensión arterial sistémica, gastritis atrófica y úlcera duodenal en pacientes con cáncer y sin cáncer, como se observa en la tabla 1.

Tabla 1) Características clinicopatológicas de los pacientes

Características clinicopatológicas	Con cáncer, n=18	Sin cáncer, n=28	Valor-P
Edad, media ± Desv. Estándar (Rango de edad)	64.72±2.547 (48-82)	55.68±2.594 (33-77)	0.0227 ^a
Hombre, n (%)	10 (55.56)	6 (21.42)	0.0172 ^a
Mujeres, n (%)	8 (44.44)	22 (78.58)	0.0271 ^a
Tabaquismo, n (%)	8 (44.45)	9 (32.14)	0.4102
Atrofia, n (%)	5 (27.78)	6 (21.42)	0.6314
No atrófica, n (%)	13 (72.22)	22 (78.58)	0.6314
Diabetes T2, n (%)	3 (16.66)	7 (25)	0.7172
Presión arterial sistémica, n (%)	3 (16.66)	10 (35.71)	0.1968
Úlcera duodenal, n (%)	2 (11.11)	12 (42.85)	0.0465 ^a

^aP<0.05.

Prevalencia del genotipo *cagA* y *vacA* en biopsias gástricas.

Las 46 biopsias fueron positivas para ureC (un marcador para *H. pylori*) y *vacA*. Sólo 18 fueron positivos para *cagA* (39,1%), los polimorfismos solo se determinaron en el DNA de las muestras control CagA⁺ y se observó al correr el producto de PCR en el gel de agarosa que se podía identificar en algunas muestras hasta con 3 bandas que corresponderían a regiones EPIYA C3, pero lo más frecuente encontrado en las muestras fue una sola banda de menor peso molecular, lo que correspondería a EPIYA C1 que es el polimorfismo con menos riesgo para desarrollo de cáncer gástrico. Con respecto a *vacA* (**Tabla 4**), del total de pacientes la mayoría presentaban los polimorfismos de *s1* y *m1*. Se ha informado que los polimorfismos en estas subregiones aumentan el riesgo de presentar cáncer gástrico (Abdi, Latifi-Navid, Latifi-Navid, & Safarnejad, 2016). Por lo tanto, se realizó un análisis de la posible asociación de tales polimorfismos con la expresión del ARNm de citoquinas, factores de transcripción nuclear y moléculas co-moduladoras relacionadas con la patología gástrica

causada por *H. pylori*. El polimorfismo s2 se presentó con mayor frecuencia en el grupo sin cáncer, con un riesgo relativo de 0.53 para cáncer gástrico indicándonos una asociación negativa, sin poder por el número bajo de muestras aseverar que pudiera ser un mecanismo protector contra cáncer gástrico ($RR < 0.5$). En relación a la proteína CagA el RR para desarrollar cáncer casi fue el doble (1.94), así como para el polimorfismo de VacA s1 con un RR en 1.86

GRUPOS	Región s de vacA				Región m de vacA	
	ureC	cagA	s1	s2	m1	m2
Cáncer	18 (100)	10 (55.6)	14 (77.8)	1 (5.6)	9 (50)	4 (22.3)
Sin cáncer	28 (100)	8 (28.6)	16 (57.1)	2 (7.1)	14 (50)	12 (42.8)
RR	1.00	1.94	1.86	0.84	1.00	0.53
Total	46	18	30	3	23	16

Tabla 4) Frecuencia de expresión de polimorfismos para vacA, positividad cagA y ureC en biopsias gástricas, para los grupos de pacientes con y sin cáncer gástrico; n(%). Se indica el riesgo relativo (RR) de cada uno de los parámetros valorados para el desarrollo de cáncer gástrico.

Análisis de la expresión del ARNm en biopsias gástricas.

La expresión de citocinas, factores de transcripción y moléculas de modulación del sistema inmunológico se determinó mediante RT-PCR. El co-modulador ICOS-L (B7-H2) mostró una expresión significativamente reducida en el grupo de pacientes que tenían cáncer (Fig. 23A). En el mismo grupo, hubo un nivel más bajo de ICOS-L (B7-H2) en relación con PD-L1 (B7-H1) representado por la relación PD-L1 (B7-H1) / ICOS-L (B7-H2) aunque esta disminución no tuvo una diferencia significativa (Fig. 23B).

La expresión relativa fue mayor para los factores de transcripción maestros con el fenotipo de Treg, Th17 y GATA3 en el grupo de participantes sin cáncer. Si bien esta diferencia no fue significativa para los dos primeros fenotipos ($p = 0.063$ para Foxp3 y $p = 0.060$ para ROR γ t, respectivamente), sí fue significativa para el último ($p < 0.01$) (Fig. 23C). Al comparar los grupos de pacientes con y sin cáncer, existían niveles de expresión similares para las IL (IL-4, IL-10, IL-12 e IL-17), IFN- γ y TGF- β . Solo hubo una tendencia no significativa a un nivel disminuido en el grupo con cáncer gástrico, principalmente

para IL-4 en el perfil Th2 ($p = 0.07$; Fig. 23D).

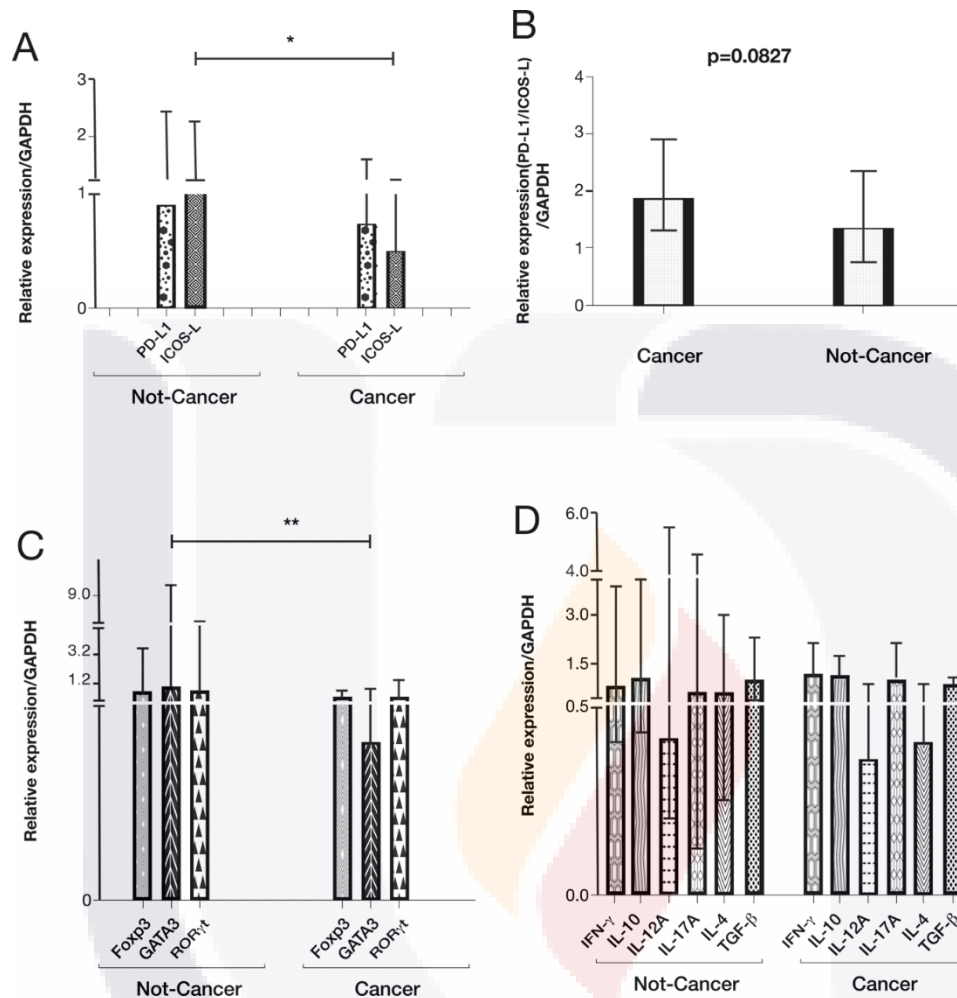


Figura 23. (A) La expresión relativa de B7-H1 y B7-H2 respeta la GAPDH como control de normalización en pacientes con cáncer y grupo de control. La expresión relativa se obtuvo usando qPCR y $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Las comparaciones múltiples se evaluaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y los datos post hoc de Dunn se presentan como mediana \pm rango intercuartil. (B) Relación B7-H1 / B7-H2 de los niveles de expresión de ambos genes, entre los pacientes con y sin CG. No se demuestra diferencia significativa entre grupos. (C) La comparación de la expresión relativa de FOXP-3, GATA3 y ROR γ t respeta a GAPDH como gen constitutivo, pacientes con cáncer y sin sujetos con cáncer. Se obtuvo expresión relativa usando qPCR y $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se evaluaron comparaciones múltiples mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba post-hoc de Dunn. Los datos se presentan como mediana \pm rango intercuartil. (D) La expresión relativa de IL-4, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ y TGF- β respeta la GAPDH como gen constitutivo, pacientes con cáncer y sujetos de control. Se obtuvo expresión relativa usando qPCR y $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se evaluaron comparaciones múltiples mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba post-hoc de Dunn. Los datos se presentan como mediana \pm rango intercuartil. * $p < 0.05$ se consideró significativamente diferente. ** $p < 0.01$.

Coeficiente de correlación de rango de Spearman (*rho*)

El grupo sin cáncer mostró una alta correlación positiva de ICOS-L con PD-L1 ($\rho = 0.707$) (Fig. 24B), IL-4 ($\rho = 0.719$) e IL-12A ($\rho = 0.712$) (Fig. 24A), moderado con ROR γ t ($\rho = 0.687$), GATA-3 ($\rho = 0.561$) y Foxp3 ($\rho = 0.530$) (Fig. 24B), y bajo con TGF- β ($\rho = 0.481$) e IL-17 ($\rho = 0.411$) (Fig. 24A). Los pacientes con cáncer mostraron una alta correlación positiva de ICOS-L con IL-12 ($\rho = 0.772$) (Fig. 24A), ROR γ t ($\rho = 0.760$) (Fig. 24B) e IL-10 ($\rho = 0.708$) (Fig. 24A), moderado con GATA3 ($\rho = 0.689$), IFN- γ ($\rho = 0.637$), PD-L1 ($\rho = 0.610$), m2 ($\rho = 0.567$) e IL-4 ($\rho = 0.566$), y bajo con Foxp3 ($\rho = 0.490$) (Figs. 24A y 24B).

El grupo sin cáncer mostró una alta correlación positiva de PD-L1 con ICOS-L ($\rho = 0.707$) (Fig. 24D), moderada con IL-4 ($\rho = 0.668$), IL-17A ($\rho = 0.570$) (Fig. 2C), Foxp3 ($\rho = 0.551$) (Fig. 24D) y TGF- β ($\rho = 0.525$), y bajo con IFN- γ ($\rho = 0.454$) e IL-10 ($\rho = 0.428$) (Fig. 24C). Para los pacientes con cáncer, hubo una alta correlación positiva de PD-L1 con IL-10 ($\rho = 0.789$), IL-12A ($\rho = 0.789$) (Fig. 24C) y GATA3 ($\rho = 0.757$), moderada con ICOS-L ($\rho = 0.610$) (Fig. 24D), y bajo con

IFN- γ ($\rho = 0.485$) y Foxp3 ($\rho = 0.483$) (Figs. 24C y 24D).

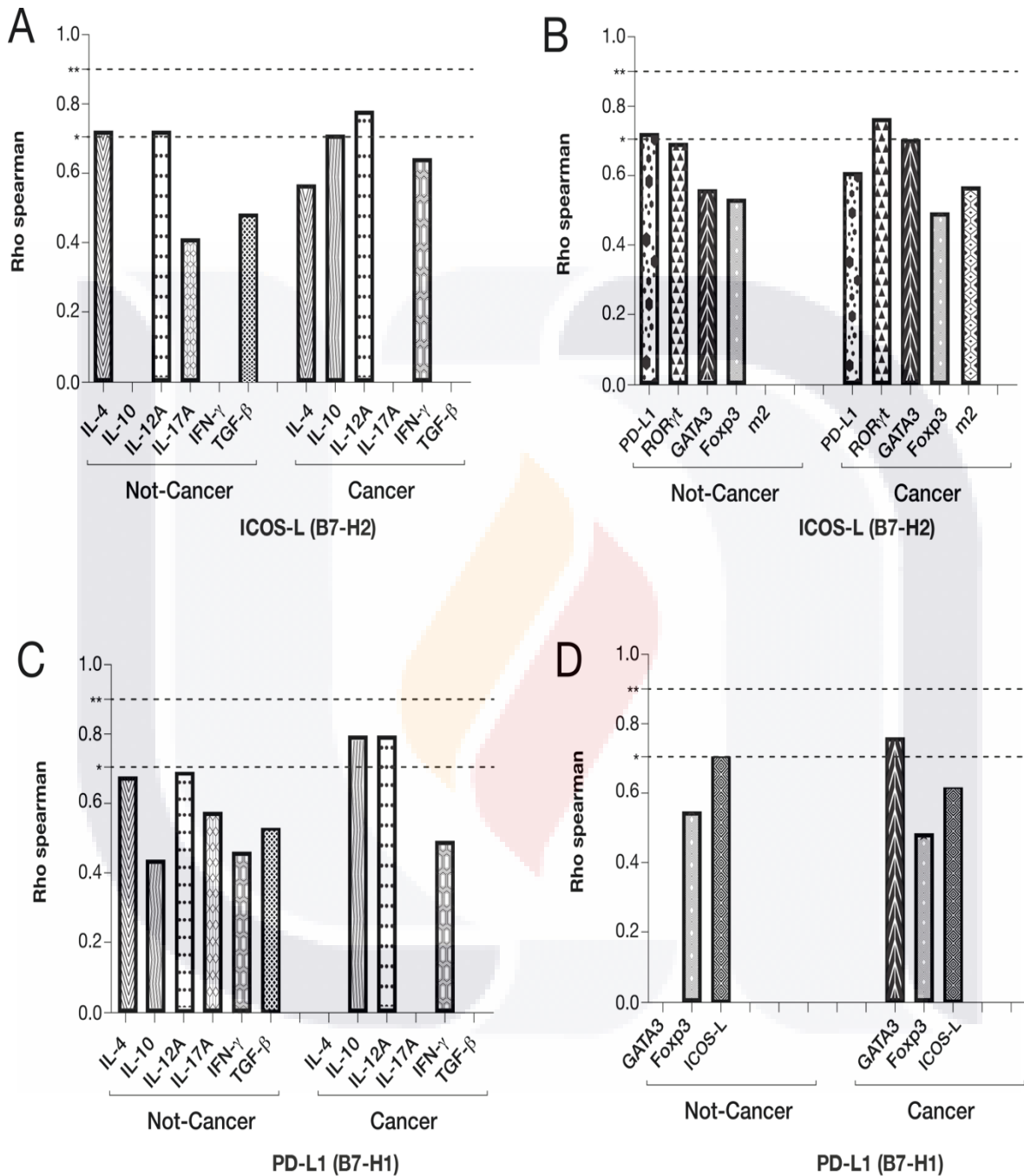


Figura 24. (A, B) Correlación de Spearman de B7-H2 con las interleucinas, moléculas co-moduladoras, factores de transcripción y polimorfismos de *vacA* en los grupos con cáncer y sin cáncer, las correlaciones altas ($\rho =$ entre 0.7 y 0.9) medias ($\rho =$ entre 0.5 y 0.7) y baja ($\rho =$ entre 0.5 y 0.7). (C, D). Correlación de Spearman de B7-H1 con las interleucinas y factores de transcripción, en los grupos con cáncer y sin cáncer, las correlaciones altas ($\rho =$ entre 0.7 y 0.9), medias ($\rho =$ entre 0.5 y 0.7) y baja ($\rho =$ entre 0.5 y 0.7). * ($p < 0.05$) se consideró significativamente diferente ** ($p < 0.001$).

Los individuos sin cáncer demostraron una alta correlación positiva de ROR γ t con IL-12A ($\rho = 0.772$) (Fig. 3A), IL-4 ($\rho = 0.737$) y Foxp3 ($\rho = 0.708$), moderada con ICOS-L ($\rho = 0.687$), IL-17A ($\rho = 0.603$) (Fig. 25A) y PD-L1 ($\rho = 0.549$), y bajo con TGF- β ($\rho = 0.408$). Los pacientes con cáncer mostraron una alta relación positiva de ROR γ t con ICOS-L ($\rho = 0.760$), moderada con IL-12A ($\rho = 0.623$) (Fig. 25A), m2 ($\rho = 0.598$) (Fig. 25C) y GATA3 ($\rho = 0.522$), y bajo con IL-10 ($\rho = 0.488$). Se encontró una alta correlación negativa entre ROR γ t y m1 ($\rho = -0.756$) (Fig. 25A).

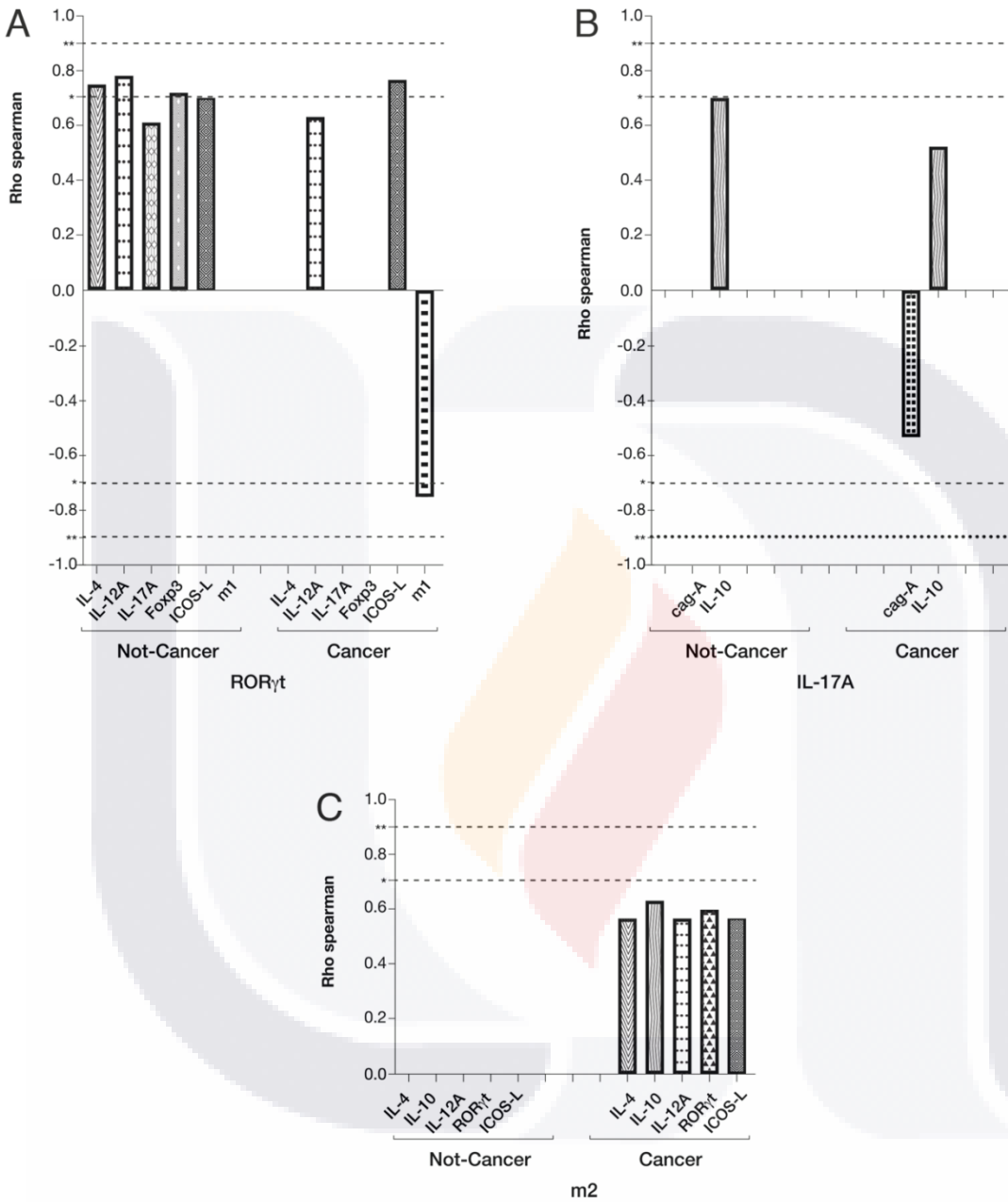


Figura 25. (A, B y C) Correlación de Spearman de ROR γ t, IL-17A y el polimorfismo de *vacA* m2, con las interleucinas y factores de transcripción, en los grupos con cáncer y sin cáncer, las correlaciones fueron altas (ρ = entre 0.7 y 0.9), medias (ρ = entre 0.5 y 0.7) y baja (ρ = entre 0.5 y 0.7), en la figura 26 se observa una correlación negativa alta entre ROR γ t y m1 así como negativa moderada entre IL-17A y cagA. (A y B) * ($p < 05$) se consideró significativamente diferente ** ($p < 001$).

En el grupo sin cáncer, se observó una alta correlación positiva para Foxp3 con IL-12A ($\rho = 0.784$) (Fig. 26C), IL-4 ($\rho = 0.715$) y ROR γ t ($\rho = 0.708$), moderada con IL -17A ($\rho = 0.609$), IFN- γ ($\rho = 0.585$), IL-10 ($\rho = 0.579$), PD-L1 ($\rho = 0.551$) e ICOS-L ($\rho = 0.530$), y bajo con TGF- β ($\rho = 0.457$). En participantes con cáncer, se detectó una correlación moderada para Foxp3 con IL-12 ($\rho = 0.659$) (Fig. 26C) e IL-10 ($\rho = 0.569$), y baja con GATA3 ($\rho = 0.493$), ICOS-L ($\rho = 0.490$) (Fig. 24B) y PD-L1 ($\rho = 0.483$) (Fig. 24D).

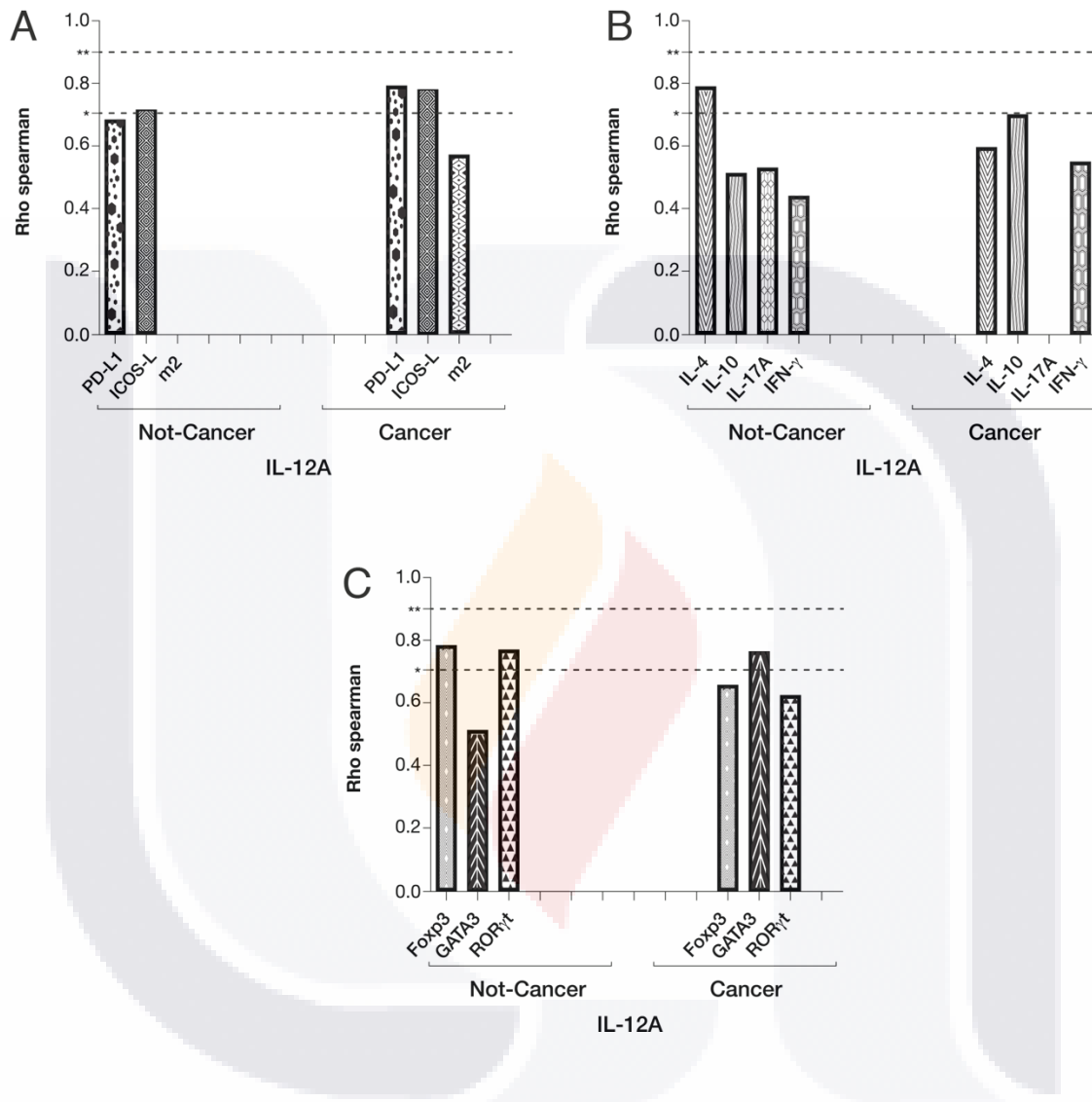


Figura 26. Correlación de Spearman de IL-12 con las moléculas co-moduladoras, polimorfismos de *vacA*, interleucinas y factores de transcripción, en los grupos con cáncer y sin cáncer, las correlaciones fueron altas ($\rho=$ entre 0.7 y 0.9), medias ($\rho=$ entre 0.5 y 0.7) y bajas ($\rho=$ entre 0.5 y 0.7). * ($p < 05$) se consideró significativamente diferente ** ($p < 001$).

Los individuos sin cáncer tuvieron una correlación positiva moderada de IL-17A con IL-10 ($\rho = 0.690$) (Fig. 25B), TGF- β ($\rho = 0.637$), Foxp3 ($\rho = 0.609$), ROR γ t ($\rho = 0.603$) (Fig. 25A), IFN- γ ($\rho = 0.572$), PD-L1 ($\rho = 0.570$) (Fig. 24C), IL-4 ($\rho = 0.565$) e IL-12A ($\rho = 0.530$) (Fig. 26B), y bajo con ICOS-L ($\rho = 0.411$) (Fig. 24A). En pacientes con cáncer, la única correlación para IL-17A fue baja y positiva con IL-10 ($\rho = 0.493$) y moderada y negativa con CagA ($\rho = -0.537$) (Fig. 25B).

El grupo sin cáncer mostró una correlación positiva moderada de TGF- β con IFN- γ ($\rho = 0.676$), IL-17A ($\rho = 0.637$), IL-10 ($\rho = 0.621$) y PD-L1 ($\rho = 0.525$) (Fig. 24C), y bajo con ICOS-L ($\rho = 0.481$) (Fig. 24A), Foxp3 ($\rho = 0.457$), IL-4 ($\rho = 0.413$) y ROR γ t ($\rho = 0.408$). Los participantes afectados de cáncer solo mostraron una correlación positiva moderada de TGF- β con IFN- γ ($\rho = 0.581$).

Los individuos sin cáncer mostraron una alta correlación positiva de IL-10 con IFN- γ ($\rho = 0.775$), moderada con IL-17A ($\rho = 0.690$) (Fig. 24B), TGF- β ($\rho = 0.621$), Foxp3 ($\rho = 0.579$) y bajo con PD-L1 ($\rho = 0.428$) (Fig. 24C). Los pacientes con cáncer demostraron una alta correlación positiva de IL-10 con PD-L1 ($\rho = 0.789$) (Fig. 24C) e ICOS-L ($\rho = 0.708$) (Fig. 24A), moderada con IL-12A ($\rho = 0.696$)) (Fig. 26B),

GATA3 ($\rho = 0.672$), m2 ($\rho = 0.630$) (Fig. 25C) y Foxp3 ($\rho = 0.569$), y baja con IL-17A ($\rho = 0.493$) (Fig. 25B) y ROR γ t ($\rho = 0.488$). Se muestra un resumen de correlaciones (**Tabla 5**).

A, Sin Cancer														
Factor	IL-4	IL-10	IL-12	IL-17	IFN- γ	TGF- β	ICOS-L	PD-L1	ROR γ t	GATA3	FoxP3	vacA-m1	vacA-m2	CagA
ICOS-L	0.719	<0.4	0.712	0.411	<0.4	0.481	-	0.707	0.687	0.561	0.53	-	<0.4	-
PD-L1	0.668	0.428	0.675	0.570	0.454	0.525	0.707	-	-	<0.4	0.551	-	-	-
IL-12	0.785	0.509	-	0.530	0.437	-	0.712	0.675	0.772	0.509	0.784	-	<0.4	-
IL-17	-	0.690	0.530	-	-	-	0.411	0.570	0.603	-	-	-	-	<0.4
ROR γ t	0.737	-	0.772	-	-	-	0.687	-	-	-	0.708	<0.4	<0.4	-
vacA-m2	<0.4	<0.4	<0.4	-	-	-	<0.4	-	<0.4	-	-	-	-	-

B, Cancer														
Factor	IL-4	IL-10	IL-12	IL-17	IFN- γ	TGF- β	ICOS-L	PD-L1	ROR γ t	GATA3	FoxP3	vacA-m1	vacA-m2	CagA
ICOS-L	0.566	0.708	0.772	<0.4	0.637	<0.4	-	0.610	0.760	0.689	0.490	-	0.567	-
PD-L1	<0.4	0.789	0.789	<0.4	0.485	<0.4	0.610	-	-	0.757	0.483	-	-	-
IL-12	0.593	0.696	-	<0.4	0.547	-	-	0.789	0.623	0.762	0.659	-	0.567	-
IL-17	-	0.493	-	-	-	-	-	-	<0.4	-	-	-	-	-0.537
ROR γ t	0.426	-	0.623	<0.4	-	-	0.760	-	-	-	<0.4	-0.756	-	-
vacA-m2	0.567	0.630	0.567	-	-	-	0.567	-	0.598	-	-	-	-	-

Tabla 5. Resumen de correlaciones, se indica el valor de ρ del análisis de correlaciones entre las variables inmunológicas y de virulencia de *H. pylori* en los pacientes con cáncer y sin cáncer.

DISCUSIÓN

Se examinó la existencia de *H. pylori* en las biopsias gástricas de pacientes con y sin cáncer gástrico, así como la correlación entre el desarrollo de este trastorno y la presencia de factores de virulencia (CagA y VacA)(Amieva & Peek, 2016), incluidos los Polimorfismos de *vacA* (*s1*, *s2*, *m1* y *m2*)(Sugimoto, Zali, & Yamaoka, 2009). El polimorfismo *s1m1* de *vacA* se encontró aquí como el más frecuente en los participantes, como se informó anteriormente para la población adulta en México (G. Gonzalez-Valencia et al., 2000).

También se analizaron en el estudio actual los factores del hospedador que pueden afectar la eliminación o proliferación de *H. pylori* (Liu, Zhang, & Zhu, 2016). En consecuencia, se tomaron biopsias gástricas para determinar la expresión del ARNm de las interleucinas, los factores de transcripción principales y los co-moduladores de la respuesta inmune. La RT-PCR mostró una expresión relativa significativamente más baja del ARNm de la molécula coactivadora ICOS-L en pacientes con cáncer. Esta molécula

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

es el único ligando conocido para ICOS, un receptor que activa varias vías inflamatorias implicadas en la eliminación de *H. pylori* (Burugu, Dancsok, & Nielsen, 2017).

En los pacientes con cáncer, detectamos una expresión relativa de ARNm disminuida significativamente del factor de transcripción maestro GATA3, que promueve la diferenciación de las células T al fenotipo Th2. La asociación negativa informada entre las alergias y la infección por *H. pylori* podría explicarse, al menos en parte, por la teoría de la higiene (Brooks, Pearce, & Douwes, 2013). La inflamación causada por *H. pylori* puede inducir un desequilibrio en las células T auxiliares entre los tipos Th1 y Th2 en la mucosa gástrica (Kayhan et al., 2008). Cuando se estimulan ex vivo con *H. pylori*, las células dendríticas de la sangre periférica (derivadas de células mononucleares) tienen una mayor producción de IL-12 (Guiney, Hasegawa, & Cole, 2003).

La diferenciación al fenotipo Th1 se analizó mediante la expresión de IL-12A e IFN- γ , que constituye las citocinas más importantes del fenotipo Th1 y la supresión de GATA-3 en las células T, que de hecho se detectó en el estudio actual en el grupo de pacientes con cáncer

(Hafsi et al., 2004). La supresión de GATA-3 puede explicarse por el hecho de que la proteína neutrofílica de *H. pylori* es un antagonista de TLR2 y estimula a los neutrófilos y monocitos a producir citocinas inflamatorias del perfil de los linfocitos Th1 (Amedei et al., 2006).

Para obtener una mayor comprensión de las interacciones en el microambiente del tejido, se calculó el coeficiente de correlación de rango de Spearman (ρ) entre varios elementos de la respuesta inmune: las moléculas de modulación, las citocinas, los factores de transcripción y las variantes de los factores virulentos de *H. pylori*. En los participantes sin cáncer, hubo una correlación positiva entre ICOS-L e IL-17A. La IL-17A que representa el grupo Th17 y que está relacionada con la eliminación de *H. pylori* (D'Elis & Czinn, 2014). Esta correlación no existía en los pacientes con cáncer, tal vez debido al fenómeno descrito ya previamente por Downs (Downs-Canner et al., 2017). Es decir, el microentorno del tumor tiene un mecanismo para evadir el sistema inmunológico a través de la transdiferenciación de los linfocitos Th17⁺ / Foxp3⁻ al fenotipo Th17⁻ / Foxp3⁺, lo que provoca un aumento en la población de células Treg y citocinas antiinflamatorias.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A diferencia de los pacientes sin cáncer, aquellos con cáncer mostraron una correlación positiva de ICOS-L con IL-10 (Treg) e IFN- γ (Th1).

La expresión del factor de transcripción GATA3 mostró una diferencia significativa entre los dos grupos, siendo la correlación positiva más notable con IL-4 (la citocina principal del fenotipo inflamatorio Th2) en el grupo sin cáncer. Para los otros factores de transcripción analizados por RT-PCR (ROR γ t y Foxp3), se detectó una expresión relativa inferior no significativa de su ARNm en los pacientes con cáncer ($p = 0,06$ y $0,063$, respectivamente; Una interacción clave, aquí reportada por primera vez, es la alta correlación negativa (-0.756) entre el factor de transcripción ROR γ t y el polimorfismo *m1* de *vacA*. Esto es importante porque en estudios anteriores solo la asociación documentada dentro de la patogenia de *H. pylori* está entre sus proteínas de virulencia (VacA y CagA) y el daño a las células gástricas que facilitan la adquisición de hierro (Tan, Noto, Romero-Gallo, Peek, & Amieva, 2011).

Además, hubo una correlación negativa moderada entre la IL-17A y la oncoproteína CagA en los pacientes con (pero no sin) cáncer. La

misma asociación inversa se ha explicado como una reducción en la expresión de ICOS-L en células epiteliales gástricas a través de la activación inducida por CagA de la vía de señalización mTOR quinasa p70 S6, asociada con una reducción en las células Th17 (Taslina T. Lina et al., 2013). Sugerimos que el mecanismo de evasión utilizado por *H. pylori* puede estar coordinado por el polimorfismo de la región media de *vacA* (*m1*) y la presencia de la proteína CagA para disminuir el fenotipo Th17 y así permitir que las bacterias sobrevivan y proliferen en el huésped.

Los genotipos de *H. pylori* con estas características constituyen un mayor riesgo de cáncer gástrico. De hecho, un metanálisis reveló que *m1* de *vacA* es el mayor factor de riesgo para el cáncer gástrico (Abdi et al., 2016).

En los participantes sin cáncer, IL-17A mostró una alta correlación con IL-10 ($\rho = 0.690$), TGF- β ($\rho = 0.637$), Foxp3 ($\rho = 0.609$) y ROR γ t ($\rho = 0.603$). Los linfocitos Th17 dependen de TGF- β para su diferenciación. Además, se ha descrito la plasticidad para la transdiferenciación de células Th17 a células Th17-IL-17neg-Foxp3⁺, que es inducida por el microentorno del tejido tumoral y muestra una correlación significativa

entre IL-17A y Foxp3 en tejido sano (Downs-Canner et al., 2017). Del mismo modo, en los participantes actuales sin (pero no con) cáncer, se observó una alta correlación positiva entre ROR γ t y Foxp3. Por lo tanto, existe un antagonismo entre el tejido tumoral y las células T Foxp3, que se ha informado para ratones ROR γ t (X. O. Yang et al., 2008). Recientemente se documentó que, en el microentorno del tejido tumoral, un número reducido de células T Foxp3 + resultó de una alteración en el fenotipo de estas células por el gen del factor de transcripción maestro ROR γ t (Downs-Canner et al., 2017).

Hubo una correlación muy alta de TGF- β con IFN- γ y secundariamente con IL-17A en el grupo sin cáncer de estómago. El co-cultivo de células T CD4 + y macrófagos se describió anteriormente para elevar la secreción de IFN- γ e IL-17A. Cuando se infectaron con *H. pylori*, estas células mostraron una regulación positiva en la expresión de ROR γ t y un aumento en el número de células Th17 (Zhuang et al., 2011). La correlación de TGF- β con ROR γ t, IL-17A, Foxp3 e IL-10 se encontró aquí solo en el grupo sin cáncer. También se observó una correlación entre el TGF- β y las dos moléculas co-moduladoras de la respuesta inflamatoria (ICOS-L y PD-L1).

ROR γ t es el factor de transcripción principal para la diferenciación de células T a Th17. Del mismo modo, la IL-6 y el TGF- β desempeñan un papel importante en la activación de la diferenciación (X. O. Yang et al., 2008). Se puede inferir que, si una infección crónica causa una transformación en células tumorales, se perderá la correlación de TGF- β con citocinas, incluidos los factores de transcripción. En los pacientes con cáncer en el presente estudio, la única correlación de TGF- β con citocinas fue la moderada con IFN- γ .

De los polimorfismos de *vacA*, solo el de m2 mostró correlaciones positivas, y solo en los pacientes con cáncer. Estas correlaciones existieron para *vacA*-m2 con ROR γ t ($\rho = 0.598$), IL-12A ($\rho = 0.567$), IL-4 ($\rho = 0.567$) y la molécula coestimuladora ICOS-L ($\rho = 0.567$). En particular, un metanálisis reveló una correlación inversa entre el *vacA*-m2 y el riesgo de cáncer gástrico (Abdi et al., 2016).

En pacientes con cáncer gástrico, la IL-10 fue la citoquina antiinflamatoria que mostró la mayor correlación con la molécula coinhibitoria PD-L1 ($\rho = 0.789$; Fig. 2C) y con IL-12A ($\rho = 0.696$; Fig. 4B). En el grupo sin cáncer con IFN- γ ($\rho = 0.775$) e IL-17A ($\rho = 0.690$).

Según un informe anterior, una infección por *H. pylori* desregula la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

expresión de PD-L1, y la principal citocina secretada durante la infección (principalmente por las células dendríticas) es IL-10. Los niveles de IL-12A e IFN- γ se mejoran solo si las células dendríticas se tratan con CD40L (Soumita Das et al., 2006) Por otro lado, *H. pylori* es capaz de estimular la IL-23, que pertenece a la familia de la IL-12A, y estimula la ruta de los linfocitos (el fenotipo Th17) que produce la IL-17. Sin embargo, con la estimulación prolongada, la capacidad de las células dendríticas para producir IL-12A se reduce (Mitchell et al., 2007).

Los resultados actuales evidencian la evasión del sistema inmunológico por *H. pylori*, predominantemente a través de la regulación negativa de la expresión de ICOS-L en individuos con cáncer gástrico. Nuestros hallazgos sugieren una coordinación de los factores de virulencia CagA y VacA de *H. pylori* (en este último caso, el polimorfismo *m1*) para la inhibición de la vía del fenotipo inflamatorio Th17.

CONCLUSIONES

La expresión relativa de ARNm de las moléculas de coactivación ICOS-L y GATA3 (el factor de transcripción maestro para el fenotipo Th2) fue significativamente menor en pacientes con cáncer gástrico versus sin cáncer. Una alta correlación inversa entre el polimorfismo *m1* de *vacA* y el factor de transcripción maestro ROR γ t fue demostrada por primera vez en nuestro estudio. Al mismo tiempo, se confirmó la correlación negativa previamente descrita de *cagA* con IL-17A. Por lo tanto, proponemos que *vacA-m1* y CagA coordinan la inhibición de la respuesta inflamatoria del fenotipo Th17. No hubo correlación de TGF- β con otras citocinas o factores de transcripción en los pacientes con cáncer. Esta citocina es esencial, junto con la IL-6, para la diferenciación del fenotipo Th17.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdi, E., Latifi-Navid, S., Latifi-Navid, H., & Safarnejad, B. (2016). Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin genotypes and preneoplastic lesions or gastric cancer risk: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*, *31*(4), 734-744. doi:10.1111/jgh.13256
- Abdullah, S. M., Hussein, N. R., Salih, A. M., Merza, M. A., Goreal, A. A., Odeesh, O. Y., . . . Hawrami, K. (2012). Infection with Helicobacter pylori strains carrying babA2 and cagA is associated with an increased risk of peptic ulcer disease development in Iraq. *Arab J Gastroenterol*, *13*(4), 166-169. doi:10.1016/j.ajg.2012.12.001
- Allison, C., Kufer, T., Kremmer, E., Kaparaskis, M., & Ferrero, R. (2009). Helicobacter pylori induces MAPK phosphorylation and AP-1 activation via NOD-1 dependent mechanism. *J. Immunol*, *183*, 8099-8109.
- Alvarado, C. (2013). Seroepidemiology of Helicobacter pylori infection in pregnant women in rural Durango. *Mexico Int J Bio Med Sci*(9), 224-229.
- Alzahrani, S., Lina, T. T., Gonzalez, J., Pinchuk, I. V., Beswick, E. J., & Reyes, V. E. (2014). Effect of Helicobacter pylori on gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol*, *20*(36), 12767-12780. doi:10.3748/wjg.v20.i36.12767
- Amedei, A., Cappon, A., Codolo, G., Cabrelle, A., Polenghi, A., Benagiano, M., . . . de Bernard, M. (2006). The neutrophil-activating protein of Helicobacter pylori promotes Th1 immune responses. *J Clin Invest*, *116*(4), 1092-1101. doi:10.1172/JCI27177
- Amieva, M., & Peek, R. M., Jr. (2016). Pathobiology of Helicobacter pylori-Induced Gastric Cancer. *Gastroenterology*, *150*(1), 64-78. doi:10.1053/j.gastro.2015.09.004
- Annibale, B., Lahner, E., Santucci, A., Vaira, D., Pasquali, A., Severi, C., . . . Delle Fave, G. (2007). CagA and VacA are immunoblot markers of past Helicobacter pylori infection in atrophic body gastritis. *Helicobacter*, *12*(1), 23-30. doi:10.1111/j.1523-5378.2007.00467.x
- Atherton, J. C., Cao, P., Peek, R. M., Jr., Tummuru, M. K., Blaser, M. J., & Cover, T. L. (1995). Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*, *270*(30), 17771-17777.
- Bagheri, N., Azadegan-Dehkordi, F., Shirzad, H., Rafieian-Kopaei, M., Rahimian, G., & Razavi, A. (2015). The biological functions of IL-17 in different clinical expressions of Helicobacter pylori-infection. *Microb Pathog*, *81*, 33-38. doi:10.1016/j.micpath.2015.03.010
- Bao, H., Lu, P., Li, Y., Wang, L., Li, H., He, D., . . . Cai, Z. (2011). Triggering of toll-like receptor-4 in human multiple myeloma cells promotes proliferation and alters cell responses to immune and chemotherapy drug attack. *Cancer Biol Ther*, *11*(1), 58-67. doi:10.4161/cbt.11.1.13878

- Bastos, J., Peleteiro, B., & Barros, R. (2013). Sociodemographic determinants of prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* infection in Portuguese adults. *Helicobacter*, *18*(6), 413-422.
- Bauerfeind, P., Garner, R., Dunn, B., & Mobley, H. (1997). Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut*(40), 25-30.
- Bazhin, A., Von Ahn, K., Maier, C., Soltek, S., Serba, S., Diehl, L., . . . Karakhanova. (2014). Immunological in vivo effects of B7-H1 deficiency. *Immunology Letters*, *162*, 273-286.
- Behrens, W., Schweinitzer, T., Bal, J., Dorsch, M., Bleich, A., Kops, F, Brenneke, B., . . . Josenhans, C. (2013). Role of energy sensor TlpD of *Helicobacter pylori* in gerbil colonization and genome analyses after adaptation in the gerbil. *Infect Immun*(81), 3534-3551.
- Benoit, S., & Maier, R. (2014). Twin-arginine translocation system in *Helicobacter pylori*: TatC, but not TatB, is essential for viability. *MBio*(5), e01016-01013.
- Blaser, M. J., & Berg, D. E. (2001). *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest*, *107*(7), 767-773. doi:10.1172/jci12672
- Brooks, C., Pearce, N., & Douwes, J. (2013). The hygiene hypothesis in allergy and asthma: an update. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, *13*(1), 70-77. doi:10.1097/ACI.0b013e32835ad0d2
- Burugu, S., Dancsok, A. R., & Nielsen, T. O. (2017). Emerging targets in cancer immunotherapy. *Semin Cancer Biol*. doi:10.1016/j.semcancer.2017.10.001
- Cassaro, M., Rugge, M., Gutierrez, O., Leandro, G., Graham, D. Y., & Genta, R. M. (2000). Topographic patterns of intestinal metaplasia and gastric cancer. *Am J Gastroenterol*, *95*(6), 1431-1438. doi:10.1111/j.1572-0241.2000.02074.x
- Ceeraz, S., Nowak, E. C., & Noelle, R. J. (2013). B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends Immunol*, *34*(11), 556-563. doi:10.1016/j.it.2013.07.003
- Chemnitz, J., Parry, R., Nichols, K., June, C., & Riley, J. (2004). SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J. Immunology*, 945-954.
- Cheng, H., Tseng, G., Yang, H., Wang, H., Lin, H., & Wang, W. (2012). Increased numbers of Foxp3-positive regulatory T cells in gastritis, peptic ulcer and gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*, *18*, 34-43.
- CHOMCZYNSKI PIOTR, & SACCHI NICOLETA. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, *162*, 156-159. doi:10.1016/0003-2697
- Christina Schnopp, Roland Rad, Anke Weidinger, Stefan Weidinger, Johannes Ring, Bernadette Eberlein, . . . Martin Mempel. (2007). Fox-P3-positive regulatory T cells are present in the skin of generalized atopic eczema patients and are not particularly affected by medium-dose UVA1 therapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, *23*, 81-85. doi:10.1111/j.1600-0781.2007.00284.x
- Correa. (1988a). Chronic gastritis: a clinico-pathological classification. *Am J Gastroenterol*, *83*(5), 504-509.

- Correa. (1988b). A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res*, 48(13), 3554-3560.
- Cover, T. (2012). Role of Helicobacter pylori CagL in modulating gastrin expression. *Gut*, 965-966.
- Cover, T., & Blanke, S. (2005). Helicobacter pylori VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol*, 3, 320-332.
- Cullen, T. W., Giles, D. K., Wolf, L. N., Ecobichon, C., Boneca, I. G., & Trent, M. S. (2011). Helicobacter pylori versus the host: remodeling of the bacterial outer membrane is required for survival in the gastric mucosa. *PLoS Pathog*, e1002454.
- D'Elcios, M. M., & Czinn, S. J. (2014). Immunity, inflammation, and vaccines for Helicobacter pylori. *Helicobacter*, 19 Suppl 1, 19-26. doi:10.1111/hel.12156
- De Block, C. E., De Leeuw, I. H., & Van Gaal, L. F. (2008). Autoimmune gastritis in type 1 diabetes: a clinically oriented review. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(2), 363-371. doi:10.1210/jc.2007-2134
- Dong, H., & Chen, X. (2006). Immunoregulatory role of B7-H1 in chronicity of inflammatory response. *Cell Mol Immunol*, 3, 179-187.
- Dong, H., Jing, S., Yong, M., Lu-Jun, C., Yu-Yu, W., & Xue-Guang, Z. (2012). B7-H1 expression is associated with expansion of regulatory T cells in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol*, 18(9), 971-978.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., & Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*, 1365-1359.
- Downs-Canner, S., Berkey, S., Delgoffe, G. M., Edwards, R. P., Curiel, T., Odunsi, K., . . . Obermajer, N. (2017). Suppressive IL-17A(+)Foxp3(+) and ex-Th17 IL-17A(neg)Foxp3(+) Treg cells are a source of tumour-associated Treg cells. *Nat Commun*, 8, 14649. doi:10.1038/ncomms14649
- El-Omar, E. M., Oien, K., El-Nujumi, A., Gillen, D., Wirz, A., Dahill, S., . . . McColl, K. E. (1997). Helicobacter pylori infection and chronic gastric acid hyposecretion. *Gastroenterology*, 113(1), 15-24.
- El-Omar, E. M., Rabkin, C. S., Gammon, M. D., Vaughan, T. L., Risch, H. A., Schoenberg, J. B., . . . Chow, W. H. (2003). Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*, 124(5), 1193-1201.
- Erzin, Y., Koksall, V., Altun, S., Dobrucali, A., Aslan, M., Erdamar, S., . . . Kocazeybek, B. (2006). Prevalence of Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA, babA2 genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter*, 11(6), 574-580. doi:10.1111/j.1523-5378.2006.00461.x
- Eusebi, L., Zagari, R., & Bazzoli, F. (2014). Epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter*(19), 1-5.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., . . . F, B. (2014). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 359-386.
- Ferreira, R. M., Machado, J. C., & Figueiredo, C. (2014). Clinical relevance of Helicobacter pylori vacA and cagA genotypes in gastric carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 28(6), 1003-1015. doi:10.1016/j.bpg.2014.09.004

- Figueiredo, C., Machado, J. C., Pharoah, P., Seruca, R., Sousa, S., Carvalho, R., . . . Sobrinho-Simões, M. (2002). Helicobacter pylori and Interleukin 1 Genotyping: An Opportunity to Identify High-Risk Individuals for Gastric Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(22), 1680-1687. doi:10.1093/jnci/94.22.1680
- Franco, A., Israel, D., Washington, M., Krishna, U., Fox, J., Rogers, A., . . . Peek, R. (2005). Activation of beta-catenin by carcinogenic Helicobacter pylori. *Proc Natl Acad Sci USA*(102), 10646-10651.
- G. Gonzalez-Valencia, J. C. Atherton, O. Munoz, M. Dehesa, A. Madrazo de la Garza, & Torres, J. (2000). Helicobacter pylori vacA and cagA Genotypes in Mexican Adults and Childre. *J Infect Dis*, 184, 1450-1454. doi:10.1086/315864
- Galmiche, A., Rassow, J., Doye, A., Cagnol, S., Chambard, J. C., Contamin, S., . . . Boquet, P. (2000). The N-terminal 34 kDa fragment of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *Embo j*, 19(23), 6361-6370. doi:10.1093/emboj/19.23.6361
- Genta, R. M. (1996). Recognizing atrophy: another step toward a classification of gastritis. *Am J Surg Pathol*, 20 Suppl 1, S23-30.
- Ghiotto, M., Gauthier, L., Serriari, N., Pastor, S., Truneh, A., Nunes, J., & Olive, D. (2010). PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1. *Int. Immunol*, 22, 651-660.
- Goh, K. L., Chan, W. K., Shiota, S., & Yamaoka, Y. (2011). Epidemiology of Helicobacter pylori infection and public health implications. *Helicobacter*, 16 Suppl 1, 1-9. doi:10.1111/j.1523-5378.2011.00874.x
- Gonzalez-Valencia, G., Atherton, J. C., Munoz, O., Dehesa, M., la Garza, A. M., & Torres, J. (2000). Helicobacter pylori vacA and cagA genotypes in Mexican adults and children. *J Infect Dis*, 182(5), 1450-1454. doi:10.1086/315864
- Graham, D. Y. (1997). Helicobacter pylori infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: a model. *Gastroenterology*, 113(6), 1983-1991.
- Graham, D. Y. (2014). History of Helicobacter pylori, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(18), 5191-5204. doi:10.3748/wjg.v20.i18.5191
- Guiney, D. G., Hasegawa, P., & Cole, S. P. (2003). Helicobacter pylori Preferentially Induces Interleukin 12 (IL-12) Rather than IL-6 or IL-10 in Human Dendritic Cells. *Infection and Immunity*, 71(7), 4163-4166. doi:10.1128/iai.71.7.4163-4166.2003
- Hafsi, N., Volland, P., Schwendy, S., Rad, R., Reindl, W., Gerhard, M., & Prinz, C. (2004). Human Dendritic Cells Respond to Helicobacter pylori, Promoting NK Cell and Th1-Effector Responses In Vitro. *The Journal of Immunology*, 173(2), 1249-1257. doi:10.4049/jimmunol.173.2.1249
- Herrera, V., & Parsonnet, J. (2009). Helicobacter pylori and gastric adenocarcinoma. *Clin Microbiol Infec*(15), 971-976.
- Hoy, B., Lower, M., Weydig, C., Carra, G., Tegtmeyer, N., Geppert, T., . . . Wessler, S. (2010). Helicobacter pylori HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion. *EMBRO Rep*(11), 798-804.
- Hu, L., Foxall, P., Russell, R., & Mobley, H. (1992). Purification of recombinant Helicobacter pylori urease apoenzyme encoded by ureA and ureB. *Infect Immun*(60), 2657-2666.

- Ishijima, N., Suzuki, M., Ashida, H., Ichikawa, Y., Kanegae, Y., Saito, I., . . . Mimuro, H. (2011). BabA mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. *J Biol Chem*(286), 25256-25264.
- Kabir, S. (2011). The role of interleukin-17 in the *Helicobacter pylori* induced infection and immunity. *Helicobacter*, 16(1), 1-8. doi:10.1111/j.1523-5378.2010.00812.x
- Kayhan, B., Arasli, M., Eren, H., Aydemir, S., Kayhan, B., Aktas, E., & Tekin, I. (2008). Analysis of peripheral blood lymphocyte phenotypes and Th1/Th2 cytokines profile in the systemic immune responses of *Helicobacter pylori* infected individuals. *Microbiol Immunol*, 52(11), 531-538. doi:10.1111/j.1348-0421.2008.00066.x
- Kim, I.-J., & Blanke, S. (2012). Remodeling the host environment: modulation of the gastric epithelium by the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(37). doi:10.3389/fcimb.2012.00037
- Lee, S. K., Stack, A., Katzowitsch, E., Aizawa, S. I., Suerbaum, S., & Josenhans, C. (2003). *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cell via TLR5. *Microbes Infect*, 1345-1356.
- Lina, T., Alzahrani, S., House, J., Yamaoka, Y., Sharpe, A., Rampy, B., . . . Reyes, V. (2015). *Helicobacter pylori* cag Pathogenicity Island's Role in B7-H1 Induction and Immune Evasion. *PLoS One*, 10(3), e0121841.
- Lina, T. T., Alzahrani, S., Gonzalez, J., Pinchuk, I. V., Beswick, E. J., & Reyes, V. E. (2014). Immune evasion strategies used by *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*, 20(36), 12753-12766. doi:10.3748/wjg.v20.i36.12753
- Lina, T. T., Pinchuk, I. V., House, J., Yamaoka, Y., Graham, D. Y., Beswick, E. J., & Reyes, V. E. (2013). CagA-dependent downregulation of B7-H2 expression on gastric mucosa and inhibition of Th17 responses during *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(7), 3838-3846. doi:10.4049/jimmunol.1300524
- Liu, C., Zhang, Z., & Zhu, M. (2016). Immune Responses Mediated by Th17 Cells in *Helicobacter pylori* Infection. *Integrative Medicine International*, 3(1-2), 57-63. doi:10.1159/000446317
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lu, H., Hsu, P. I., Graham, D. Y., & Yamaoka, Y. (2005). Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 128(4), 833-848.
- Lu, H., Wu, J., Beswick, E., Ohno, T., Odenbreit, S., Haas, R., . . . Yamaoka, Y. (2007). Functional and intracellular signaling differences associated with the *Helicobacter pylori* AlpAB adhesin from Western and East Asian strains. *J Biol Chem*(282), 6242-6254.
- M.M Mukaka. (2012). Statistics Corner: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal*, 24(3), 69-71.
- Mahdavi, J., Sondén, B., Hurtig, M., Olfat, F., Forsberg, L., Roche, N., . . . Lundskog, B. (2002). *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*(297), 573-578.

- Matos, J. I., de Sousa, H. A., Marcos-Pinto, R., & Dinis-Ribeiro, M. (2013). Helicobacter pylori CagA and VacA genotypes and gastric phenotype: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 25(12), 1431-1441. doi:10.1097/MEG.0b013e328364b53e
- Matsuura, M. (2013). Structural modifications of bacterial lipopolysaccharide that facilitate Gram-negative bacteria evasion of host innate immunity. *Front Immunol*, 109.
- Miehlke, S., Hackelsberger, A., Meining, A., Hatz, R., Lehn, N., Malfertheiner, P., . . . Bayerdorffer, E. (1998). Severe expression of corpus gastritis is characteristic in gastric cancer patients infected with Helicobacter pylori. *Br J Cancer*, 78(2), 263-266.
- Miftahussurur, M., & Yamaoka, Y. (2015). Helicobacter pylori virulence genes and host genetic polymorphisms as risk factors for peptic ulcer disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 9(12), 1535-1547. doi:10.1586/17474124.2015.1095089
- Mimuro H, S. T., Nagai S, Rieder, G, Suzuki, M., Nagai, T., Fujita, Y., Nagamatsu, K., Ishijima, N., . . . Sasakawa, C. (2007). Helicobacter pyloridampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach. *Cell Host Microbe*, 250–263.
- Mitchell, P., Germain, C., Fiori, P. L., Khamri, W., Foster, G. R., Ghosh, S., . . . Lombardi, G. (2007). Chronic exposure to Helicobacter pylori impairs dendritic cell function and inhibits Th1 development. *Infect Immun*, 75(2), 810-819. doi:10.1128/IAI.00228-06
- Moraes-Vieira, P. M., Takenaka, M. C., Silva, H. M., Monteiro, S. M., Avena, F., Lemos, F., . . . Coelho, V. (2012). GATA3 and a dominant regulatory gene expression profile discriminate operational tolerance in human transplantation. *Clin Immunol*, 142(2), 117-126. doi:10.1016/j.clim.2011.08.015
- Moran, A. P., Prendergast, M. M., & Appelmek, B. J. (1996). Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 105-115.
- Morgan, D., Torres, J., & Sexton, R. (2013). Risk of recurrent Helicobacter pylori infection 1 year after initial eradication therapy in 7 Latin American communities. *JAMA*(309), 578-586.
- Muotiala, A., Helander, I. M., Pyhala, L., Kosunen, T. U., & Moran, A. P. (1992). Low biological activity of Helicobacter pylori lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 1714-1716.
- Nagase, L., Hayashi, T., Senda, T., & Hatakeyama, M. (2015). Dramatic increase in SHP2 binding activity of Helicobacter pylori Western CagA by EPIYA-C duplication: its implications in gastric carcinogenesis. *Sci Rep*, 5, 15749. doi:10.1038/srep15749
- Needham, B. D., & Trent, M. S. (2013). Fortifying the barrier: The impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 467-481.
- Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W., & Haas, R. (2000). Translocation of Helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*(287), 1497-1500.
- Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., . . . Hatakeyama, M. (2008). Transgenic expression of Helicobacter pyloriCagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 1003–1008.

- Olfat, F. O., Zheng, Q., Oleastro, M., Volland, P., Boren, T., Karttunen, R., . . . Gerhard, M. (2005). Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 44(2), 151-156. doi:10.1016/j.femsim.2004.10.010
- Olokoba, A., Gashau, W., Bwala, S., Adamu, A., & Salawu, F. (2013). *Helicobacter pylori* infection in nigerians with dyspepsia. *Ghana Med J*(47), 79-81.
- Oppong, P., Majumdar, D., Atherton, J., & Bebb, J. (2015). *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcers. *Medicine*, 43(4), 215-222. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2015.01.008>
- Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., . . . Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, 6(11), 1133-1141. doi:10.1038/ni1261
- Peck, B., Ortkamp, M., Diehl, K., Hundt, E., & Knapp, B. (1999). Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res*, 3325-3333.
- Peek, R. M., Fiske, C., & Wilson, K. T. (2010). Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. *Physiol Rev*, 831-858.
- Perez, G. I., Shepherd, V. L., Morrow, J. D., & Blaser, M. J. (1995). Activation of human THP-1 cells and rat bone marrow-derived macrophages by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 1183-1187.
- Radin, J., Gaddy, J., Gonzalez, C., Loh, J., Algood, H., & Cover, T. (2013). Flagellar localization of a *Helicobacter pylori* autotransporter protein. *MBio*(4), e00613-00612.
- Raetz, C. R., Reynolds, C. M., Trent, M. S., & Bishop, R. E. (2007). Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem*, 295-329.
- Reyrat, J., Lanzavecchia, S., Lupetti, P., de Bernard, M., Pagliaccia, C., Pelicic, V., . . . Telford, J. (1999). 3D imaging of the 58 kDa cell binding subunit of *Helicobacter pylori* cytotoxin. *J Mol Biol*(290), 459-470.
- Rhead, J. L., Letley, D. P., Mohammadi, M., Hussein, N., Mohagheghi, M. A., Eshagh Hosseini, M., & Atherton, J. C. (2007). A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*, 133(3), 926-936. doi:10.1053/j.gastro.2007.06.056
- Rugge, M., Correa, P., Dixon, M. F., Fiocca, R., Hattori, T., Lechago, J., . . . Genta, R. M. (2002). Gastric mucosal atrophy: interobserver consistency using new criteria for classification and grading. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16(7), 1249-1259. doi:10.1046/j.1365-2036.2002.01301.x
- Rugge, M., & Genta, R. M. (2005). Staging and grading of chronic gastritis. *Hum Pathol*, 36(3), 228-233. doi:10.1016/j.humpath.2004.12.008
- Saadat, I., Higashi, H., Obuse, C., Umeda, M., Murata-Kamiya, N., Saito, Y., . . . Hatakeyama, M. (2007). *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature*, 447, 330-333.
- shaffer, C., Gaddy, J., Loh, J., Johnson, E., Hill, S., Hennig, E., . . . Cover, T. (2011). *Helicobacter pylori* exploits a unique repertoire of type IV secretion system

- components for pilus assembly at the bacteria-host cell interface. *PLoS Pathog*(7), e1002237.
- Sipponen, P., & Maarros, H. I. (2015). Chronic gastritis. *Scand J Gastroenterol*, 50(6), 657-667. doi:10.3109/00365521.2015.1019918
- Sipponen, P., & Price, A. B. (2011). The Sydney System for classification of gastritis 20 years ago. *J Gastroenterol Hepatol*, 26 Suppl 1, 31-34. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06536.x
- Soumita Das, Giovanni Suarez, Ellen J. Beswick, Johanna C. Sierra, David Y. Graham, & Victor E. Reyes. (2006). Expression of B7-H1 on Gastric Epithelial Cells: Its Potential Role in Regulating T Cells during Helicobacter pylori Infection. *The Journal of Immunology*, 176, 3000-3009. doi:10.4049/jimmunol.176.5.3000
- Strickland, R. G., & Mackay, I. R. (1973). A reappraisal of the nature and significance of chronic atrophic gastritis. *Am J Dig Dis*, 18(5), 426-440.
- Sugimoto, M., Zali, M. R., & Yamaoka, Y. (2009). The association of vacA genotypes and Helicobacter pylori-related gastroduodenal diseases in the Middle East. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 28(10), 1227-1236. doi:10.1007/s10096-009-0772-y
- Sun, J., Xu, K., Wu, C., Wang, Y., Hu, Y., Zhu, Y., . . . Zhang, X. (2007). PD-L1 expression analysis in gastric carcinoma tissue and blocking of tumor-associated PD-L1 signaling by two functional monoclonal antibodies. *Tissue Antigens*, 69, 19-27.
- Tan, S., Noto, J. M., Romero-Gallo, J., Peek, R. M., Jr., & Amieva, M. R. (2011). Helicobacter pylori perturbs iron trafficking in the epithelium to grow on the cell surface. *PLoS Pathog*, 7(5), e1002050. doi:10.1371/journal.ppat.1002050
- Tegtmeier, N., Wessler, S., & Backert, S. (2011). Role of the cag-pathogenicity island encoded type IV secretion system in Helicobacter pylori pathogenesis. *FEBS J*, 278(8), 1190-1202. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08035.x
- Torres, V., Ivie, S., McClain, M., & Cover, T. (2005). Functional properties of the p33 and p55 domains of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin. *J Biol Chem*(280), 21107-21114.
- Tozzoli, R., Kodermaz, G., Perosa, A. R., Tampoia, M., Zucano, A., Antico, A., & Bizzaro, N. (2010). Autoantibodies to parietal cells as predictors of atrophic body gastritis: a five-year prospective study in patients with autoimmune thyroid diseases. *Autoimmun Rev*, 10(2), 80-83. doi:10.1016/j.autrev.2010.08.006
- Viala, J., Chaput, C., Boneca, I., Cardona, A., Girardin, S., & Moran, A. (2004). Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island. *Nat Immunol*, 5, 1166-1174.
- Wang, L., Pino-Lagos, K., de Vries, V., Guleria, I., Sayegh, M., & Noelle, R. (2008). Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 9331-9336.
- Wang, L., Qian, J., & Lu, Y. (2013). Immune evasion of mantle cell lymphoma: expression of B7-H1 leads to inhibited T-cell response to and killing of tumor cells. *Haematologica*, 98, 1458-1466.
- Wang, Y., Wang, H., Yao, H., Li, C., Fang, J.-Y., & Xu, J. (2018). Regulation of PD-L1: Emerging Routes for Targeting Tumor Immune Evasion. *Frontiers in Pharmacology*, 9. doi:10.3389/fphar.2018.00536

- Watanabe, T., Asano, N., Kitani, A., Fuss, I., Chiba, T., & Strober, W. (2010). NOD1-mediated Mucosal Host Defense against *Helicobacter pylori*. *Int Inflam*, 476482.
- Weipeng, W., Fang, L., Yong, M., Huan, Z., Jing, S., Rui, L., . . . Xueguang, Z. (2013). A miR-570 binding site polymorphism in the B7-H1 gene is associated with the risk of gastric adenocarcinoma. *Hum Genet*, 132, 641-648.
- Yamaoka, Y. (2008). Increasing evidence of the role of *Helicobacter pylori* SabA in the pathogenesis of gastroduodenal disease. *J Infect Dev ctries*(2), 174-181.
- Yang, X. O., Nurieva, R., Martinez, G. J., Kang, H. S., Chung, Y., Pappu, B. P., . . . Dong, C. (2008). Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*, 29(1), 44-56. doi:10.1016/j.immuni.2008.05.007
- Yang, Y., Wu, K., Zhao, E., Li, W., Shi, L., Xie, G., . . . Tao, K. (2015). B7-H1 enhances proliferation ability of gastric cancer stem-like cells as a receptor. *Oncology Letters*, 9, 1833-1838.
- Yao, S., Zhu, Y., Zhu, G., Augustine, M., Zheng, L., Goode, D. J., . . . Chen, L. (2011). B7-h2 is a costimulatory ligand for CD28 in human. *Immunity*, 34(5), 729-740. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.014
- Yilmaz, V., Oflazer, P., Aysal, F., Durmus, H., Poulas, K., Yentur, S. P., . . . Saruhan-Direskeneli, G. (2015). Differential Cytokine Changes in Patients with Myasthenia Gravis with Antibodies against AChR and MuSK. *PloS One*, 10(4), e0123546. doi:10.1371/journal.pone.0123546
- Yokoyama, K., Higashi, H., Ishikawa, S., Fujii, Y., Kondo, S., Kato, H., . . . Hatakeyama, M. (2005). Functional antagonism between *Helicobacter pylori* CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*(102), 9661-9666.
- Yomaoka, Y., Kwon, D., & Graham, D. (2000). A proinflammatory outer membrane protein oipA of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA*(97), 7533-7538.
- Yuasa, Y. (2003). Control of gut differentiation and intestinal-type gastric carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 3(8), 592-600. doi:10.1038/nrc1141
- Zhang, Y., Weck, M. N., Schottker, B., Rothenbacher, D., & Brenner, H. (2013). Gastric parietal cell antibodies, *Helicobacter pylori* infection, and chronic atrophic gastritis: evidence from a large population-based study in Germany. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 22(5), 821-826. doi:10.1158/1055-9965.epi-12-1343
- Zhuang, Y., Shi, Y., Liu, X. F., Zhang, J. Y., Liu, T., Fan, X., . . . Zou, Q. M. (2011). *Helicobacter pylori*-infected macrophages induce Th17 cell differentiation. *Immunobiology*, 216(1-2), 200-207. doi:10.1016/j.imbio.2010.05.005



TABLAS

Tabla 2) Oligonucleotidos para la identificación de *H. pylori*, positividad *cagA* y análisis de variantes polimórficas de *vacA* mediante PCR.

GEN	NOMBRE	OLIGO F	OLIGO R	BP
<i>cagA</i>	cag2-4	GGAACCCCTAGTCGGTAATG	ATCTTTGAGCTTGTCTATCG	450/558
<i>cagA</i> nested PCR	CagA1-F R	TGGCAGTGGGTTAGTCATAGCAG	AGGACTCTTGCAGGCGTTGGTG	481
	CagA2-F R	ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA	TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT	298
<i>ureC</i> (GlmM) nested PCR	G-Hp1/ G-Hp2	AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT	AAGCTTACTTTCTAACACTAAACGC	294
	G-Hp3/ G-Hp4	CTTTCTTCTCAAGCGGTTGTC	CAAGCCATCGCCGGTTTTAGC	252
<i>vacA</i>	s1 vac1F-R	GAAATACAACAAACACACCCGC	GGCTTGTTTGAGCCCCCAG	201
	s2 vac1F-R	GAAATACAACAAACACACCCGC	GGCTTGTTTGAGCCCCCAG	228
	m1 Vac3F-R	GGTCAAAATGCGGTCATGG	CATCAGTATTTGCAACCACA	388
	m2 Vac4F-R	CCAGGAAACATTGCCGGCAAA	CATACTAGCGCCTTGAC	346

Tabla 3) Oligonucleótidos para analizar la expresión de genes de factores de transcripción, citocinas y moléculas inmunomoduladoras mediante PCR en Tiempo Real.

Nombre	Oligo F	Oligo R	bp	Referencia
GATA3 F-R	GGAGGTGGATGTGCTTTTAAACA	ACCTGGCTCCCGTGGTG	116	
RORG F-R	AGGAAGTGACTGGCTACCAGAGG	GAAGTCCACCACGACTGAATG	94	(31)
IL10 F-R	TTCCTGTGAAAACAAGAGC	TCACTCATGGCTTTGTAGATGC	90	
IL17A F-R	CTCATTGGTGTCACTGCTACTG	CCTGGATTTCTGGGATTGTG	77	
IFN- γ F-R	GTGTGGAGACCATCAAGGAAGACA	TTGGACATTCAAGTCAGTTACC	112	
TGF- β 1 F-R	GGTGGAACCCACAACGAAAT	TCTCGGAGCTCTGATGTGTGA	86	(32)
GAPDH F-R	TGGTCTCCTCTGACTTCAACA	AGCCAAATTCGTTGTCATACC	116	
FOXP3 F-R	GAGAAGGGCAGGGCACAAT	GTGGCCTGCATGGCAC	101	
IL-4 F-R	CACAGGCACAAGCAGCTGAT	CCTTCACAGGACAGGAATTCAAG	87	(33)
IL-12p40 F-R	CATCTCTTGGTTTTCCCTGGTT	CATAAACATCTTCTCAGTTCCCATAT	73	
B7-H1 F-R	ACAGAGGGCCCGCTGTTGA	AGCGGTACACCCCTGCATCCT	94	(34)
B7-H2 F-R	GCAAACCAAGTGAAGTCGAAAACC	GGTGACATCAGGGCTCGGT	101	(35)