



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**Relación entre genotipos virulentos de *Helicobacter pylori*
con el perfil de miRNAs y citocinas expresados por células
mononucleares humanas**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

JOSEFINA ATRISCO MORALES

DIRECTORA DE TESIS: **DRA. GLORIA FERNÁNDEZ TILAPA**

CHILPANCINGO, GRO., ENERO DE 2017.



Relación entre genotipos virulentos de
Helicobacter pylori con el perfil de miRNAs
y citocinas expresados por células
mononucleares humanas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación Clínica, en el Laboratorio de Investigación en Bacteriología, en el Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, de Chilpancingo, Guerrero, en el Laboratorio de Genómica del Cáncer del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) de la Ciudad de México, y en el Centro Universitario de Ciencias de la Salud, de la Universidad de Guadalajara, en la ciudad de Guadalajara.

Bajo la dirección de:

Dra. Gloria Fernández Tilapa

La asesoría externa de:

Dr. Oscar Peralta Zaragoza

Y la asesoría interna de:

Dr. Adolfo Román Román

Dr. Daniel Hernández Sotelo

Dr. Oscar Del Moral Hernandez

El apoyo de:

Dra. María Elena Moreno Godínez,

M en C. Carlos Alberto Castañón Sánchez,

Dr. José Francisco Muñoz Valle y

Dr. Alfredo Hidalgo Miranda,

a quienes hago una mención especial y expreso mi profundo agradecimiento por sus contribuciones y ayuda para hacer posible la realización de este trabajo.

Fuentes de financiamiento

En el periodo que curso la Maestría en Ciencias Biomédicas, Josefina Atrisco Morales fue beneficiada con la beca CONACYT.

La investigación se realizó con financiamiento otorgado por la Universidad Autónoma de Guerrero, al proyecto **Generación de un modelo experimental para estudiar in vitro el efecto de isoformas EPIYA de CagA de *Helicobacter pylori* sobre la expresión de potenciales biomarcadores de carcinogénesis gástrica**, aprobado en la Convocatoria 2014; con recursos del proyecto Fortalecimiento de la Maestría en Ciencias Biomédicas, *clave FOMIX-CONACyT-GUERRERO/ 249719* y con aportaciones de la Secretaría de Educación Pública, a través del ProDES 2014 y 2015.

En el periodo que curso la Maestría en Ciencias Biomédicas, la QBP. Josefina Atrisco Morales fue beneficiada con la beca CONACYT, folio 628313 y con apoyo del proyecto Fortalecimiento de la Maestría en Ciencias Biomédicas, *clave FOMIX-CONACyT-GUERRERO/ 249719*, para la realización de una Estancia de Investigación.

Agradecimientos

A la Dra. Gloria Fernández Tilapa, por todo el tiempo dedicado a este proyecto, los conocimientos compartidos, por impulsarme a seguir en el camino de la superación y no rendirme nunca.

Al Dr. Adolfo Román Román, Dr. Daniel Hernández Sotelo, Dr. Oscar Del Moral Hernández, Dr. Oscar Peralta Zaragoza, por el tiempo dedicado, por todas sus aportaciones y recomendaciones que permitieron que este trabajo mejorara, lo cual hubiera sido difícil de alcanzar sin su participación.

A mi profesor de Seminario de Investigación, Dr. Daniel, por apoyarme desde que inició este proyecto, y a todos mis maestros, porque cada curso me dejó muchas enseñanzas.

A mi tutor de la maestría, Dr. Oscar Del Moral, por darme consejos, y enseñarme que con mucho esfuerzo podemos salir adelante en la vida.

A la Dra. Hilda y Dra. Dinorah, por ayudarme en todo momento, gracias por el tiempo dedicado y por todos sus consejos, las quiero mucho.

A mi amigo, compañero y amor de mi vida, gracias por permitirme caminar de tu mano en esta etapa de la vida, por brindarme apoyo incondicional, y por estar a mi lado en momentos difíciles, todo te lo debo a ti Juan Miguel. Te amo-Lo sé.

A mis padres, gracias por el apoyo incondicional que me han dado, gracias a ustedes aprendí a valorar las cosas, me enseñaron a luchar por alcanzar mis metas, son los mejores papas que me pudieron haber tocado, los quiero mucho. A mis hermanos Marys, Nancy y Gerardo, por ser parte de importante en mi vida y por apoyarme en los momentos difíciles.

A la Profa. Martha e Ing. Juan, Abdel e Idhair, por darme apoyo incondicional y permitirme ser parte de su familia, nunca acabaré de agradecerles.

A todos mis compañeros, Luis, Mónica, Judit, Alejandro y Gladys (los Came), Lucy, Karla, Giovanni, Jafet, Gaby, Diana, Sara y Jacob, que hicieron ameno el trabajo del laboratorio y por hacerme reír tanto a pesar de mi mal humor, muchas gracias.

A mi amigo Marco, por ayudarme en todo, por sus consejos, por hacerme pasar momentos felices, y sobre todo por tu amistad, espero que sigamos así hasta hacernos viejitos.

“Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano”

Josefina Atrisco Morales



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 11 días del mes de noviembre de dos mil dieciséis, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada “**Relación entre genotipos virulentos de *Helicobacter pylori* con el perfil de miRNAs y citocinas expresados por células mononucleares humanas**”, presentada por la alumna Josefina Atrisco Morales, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dra. Gloria Fernández Tilapa
Dirección de tesis

Dr. Oscar del Moral Hernández
Dr. Adolfo Román Román
Dr. Daniel Hernández Sotelo
Dr. Oscar Peralta Zaragoza

Vo. Bo

Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado de la Facultad de
Ciencias Químico Biológicas

Vo. Bo

Dra. Amalia Vences Velázquez
Directora de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas

Coordinación 2014-2018



Índice

Contenido	Pág.
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Material y métodos	6
Resultados	13
Discusión y conclusiones	24
Referencias	30

Resumen

Antecedentes. *H. pylori* es la principal causa de gastritis, úlcera péptica y cáncer gástrico, y las cepas que expresan las proteínas BabA2, VacA *s1m1* y CagA inducen infiltración de leucocitos al sitio de infección. Se ha demostrado que *H. pylori* induce secreción de citocinas que regulan la respuesta inmune y desregulación de la expresión de miRNAs en mucosa gástrica humana, células epiteliales, células detriticas, y macrófagos, sin especificar el genotipo *vacA s1m1/babA2/cagA*. **Objetivo.** Evaluar el perfil de miRNAs y citocinas expresados por células mononucleares humanas en respuesta a la infección con cepas de *H. pylori* con diferente genotipo *vacA*, estado *babA2* y *cagA*. **Material y métodos.** Se cultivaron y genotipificaron cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes guerrerenses con gastritis crónica. Los genotipos *vacA* y el estado de *babA2* se determinaron por PCR, y el tipo y número de motivos EPIYA de las cepas *cagA*+ se tipificaron por PCR y se confirmaron por secuenciación. Las células mononucleares fueron aisladas de diez sujetos sin antecedentes de infección por *H. pylori*, sin patología gástrica asociada y *H. pylori* negativos. La expresión de 31 miRNAs se determinó por Microarreglo en RNA total y la concentración de 13 citocinas se midió por Inmunoensayo Bio-Plex en sobrenadante. **Resultados.** Se encontraron cambios significativos en la expresión de diez miRNAs, miR-145, miR-142, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-16, miR-223, miR-24, miR-19a y miR-21. El perfil de miRNAs expresados por células mononucleares varía con el genotipo de *H. pylori*. La cepa de *H. pylori vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABCCC no indujo cambios significativos en el nivel de expresión de miRNAs. *H. pylori* induce la secreción de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , IL-12 (p70), IL-2, IL-4, IL-17 e IL-10, pero no la expresión de IL-5 e IL-7 en células mononucleares. La cepa de *H. pylori vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABCCC promovió la reducción en la expresión de IL-13. **Conclusión.** En células mononucleares humanas infectadas con *H. pylori*, la expresión de miRNAs y el nivel de citocinas secretadas varía con el genotipo de la bacteria.

Palabras clave. *Helicobacter pylori*, *cagA*, EPIYA, miRNA, citocinas.

Abstract

Background. *H. pylori* is the main cause of gastritis, peptic ulcer and gastric cancer, and strains expressing the BabA2, VacA *s1m1* and CagA proteins induce leukocyte infiltration at the site of infection. *H. pylori* has been shown to induce secretion of cytokines that regulate the immune response and alteration of miRNA expression in human gastric mucosa, epithelial cells, detrital cells, and macrophages, without specifying the *vacA s1m1/babA2/cagA* genotype. **Objective.** To evaluate the profile of miRNAs and cytokines that are expressed by human mononuclear cells in response to infection with strains of *H. pylori* with different genotype *vacA*, state *babA2* and *cagA*. **Material and methods.** *H. pylori* strains isolated of patients from Guerrero with chronic gastritis were cultured and genotyped. The *vacA* genotypes and the *babA2* status were determined by PCR, and the type and number of EPIYA motifs of the *cagA*+ strains were typed by PCR and confirmed by sequencing. Mononuclear cells were isolated from ten subjects without history of *H. pylori* infection, associated gastric disease and *H. pylori* negative. Expression of 31 miRNAs was determined by Microarray in total RNA and the concentration of 13 cytokines was measured by Bio-Plex Immunoassay in supernatant. **Results.** Significant changes were found in the expression of ten miRNAs: miR-145, miR-142, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-16, miR-223, miR-24, miR-19a and miR-21. The profile of miRNAs expressed by mononuclear cells is different with the *H. pylori* genotype. The *H. pylori* strain *vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABCCC did not induce significant changes in the expression level of miRNAs. *H. pylori* induces secretion of IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , IL-12 (p70), IL-2, IL-4, IL-17 e IL-10, but not the expression of IL-5 and IL-7 in mononuclear cells. The *H. pylori* strain *vacA s1m1/ babA2+/cagA+* EPIYA ABCCC promoted reduction in IL-13 expression. **Conclusion.** In human mononuclear cells infected with *H. pylori*, the expression of miRNAs and the level of secreted cytokines varies with the genotype of the bacterium.

Keywords. *Helicobacter pylori*, *cagA*, EPIYA, miRNA, cytokines.

Introducción

Helicobacter pylori es el principal agente causal de gastritis, úlcera péptica, y adenocarcinoma gástrico (Correa and Piazzuelo, 2011). Diferentes factores bacterianos determinan la capacidad patogénica de *H. pylori*, sin embargo, los dos factores de virulencia asociados a patologías gástricas son la citotoxina vacuolizante (VacA) y la citotoxina asociada al gen A (CagA) (Atherton *et al.*, 1995; Covacci *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 2010).

CagA, es una proteína de 120-145 kDa, con aproximadamente 1173 aa, está codificada por el gen *cagA*, ubicado en la isla de patogenicidad *cagPAI* (Covacci *et al.*, 1993; Tummuru *et al.*, 1993a). CagA se reconoce como oncoproteína, debido a que induce el desarrollo de cáncer gástrico, efecto determinado por su estructura en la región C-terminal, donde se encuentran los sitios de fosforilación en tirosina y los motivos de multimerización (CM), responsables de la dimerización de la proteína (Ohnishi *et al.*, 2008). En el extremo C-terminal, CagA contiene secuencias repetidas de 5 aminoácidos (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala), llamadas motivos EPIYA. La fosforilación de CagA ocurre en los residuos de tirosina de las secuencias EPIYA. Se han caracterizado cuatro tipos de motivos EPIYA, A, B, C y D, definidos con base en las secuencias de aminoácidos que flanquean a cada secuencia EPIYA. Con base en el tipo de motivos EPIYA que poseen, las cepas de *H. pylori* se clasifican en occidentales (ABC) y orientales (ABD) (Yoshio Yamaoka *et al.*, 1998).

cagPAI contiene 32 genes que codifican para un sistema de secreción de tipo IV (T4SS), que funciona como una jeringa molecular a través de la cual, *H. pylori* inyecta a CagA a la célula huésped (Delgado *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2009). La translocación de CagA se ha observado en células epiteliales gástricas, linfocitos B (Lin *et al.*, 2010), células dendríticas humanas (Kaebisch *et al.*, 2014), y células dendríticas (Tanaka *et al.*, 2010), polimorfonucleares y macrófagos de ratón (THP-1 y J774A.1) (Odenbreit *et al.*, 2001). Después de su entrada en la célula, CagA es fosforilada por proteínas tirosin cinasas e interactúa con más de 20 proteínas celulares. Estas interacciones inducen

cambio en el citoesqueleto, activación de vías de transducción de señales al núcleo, secreción de citocinas y aumento en la proliferación celular de manera dependiente de CagA fosforilada. CagA no fosforilada ocasiona alteraciones de la adhesión célula-célula y; de este modo, promueve la transformación celular y cáncer gástrico (Hatakeyama, 2008; Nešić *et al.*, 2014; Sohn and Lee, 2011).

Las cepas de *H. pylori* CagA positivas inducen una respuesta inflamatoria de intensidad variable, a través de la activación del factor de transcripción NF-kB, que modula la expresión de IL-1 β , IL-8 y COX-2. Argent *et al.*, en 2008, demostraron que la producción de IL-8 estimulada por CagA es dependiente del tipo de motivos EPIYA y que las cepas de *H. pylori* orientales con motivos EPIYA ABD, inducen mayores niveles de IL-8, en comparación con las cepas occidentales con motivos EPIYA ABC (Argent *et al.*, 2008). Las cepas de *H. pylori* CagA+ con motivos EPIYA ABCCC, inducen alta expresión de IL-8, en comparación con las cepas EPIYA ABC (Vaziri *et al.*, 2015). Las variaciones en el tipo y número de motivos EPIYA determinan la magnitud del potencial oncogénico de CagA, y las cepas de *H. pylori* cagA+ que expresan CagA de tipo occidental, con mayor número de segmentos EPIYA-C tienen mayor capacidad para unirse a la tirosina fosfatasa 2 con homología a Src (SHP2). Esta interacción activa la vía de señalización ERK/MAPK, que conduce a la activación de NF-k β y AP-1, factores de transcripción que modulan la expresión de genes de citocinas proinflamatorias, así como de *c-jun*, *c-fos* y *c-Met*, entre otros, relacionados con proliferación. Estas interacciones se relacionan con el desarrollo de cáncer gástrico (Wu *et al.*, 2013).

La infección persistente de la mucosa gástrica por *H. pylori* y la inflamación crónica resultante, son un factor de riesgo para carcinogénesis gástrica. *H. pylori* promueve una respuesta inflamatoria caracterizada por infiltración de neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, linfocitos B y linfocitos T al sitio de infección, y por la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α (Hocès de la Guardia *et al.*, 2013; Isomoto *et al.*, 2012). En pacientes con gastritis crónica o cáncer gástrico la expresión

de IFN- γ varía dependiendo del genotipo *vacA* y *cagA* de *H. pylori* (Martínez-Carrillo *et al.*, 2014).

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas de RNA monocatenario de 20-23 nucleótidos, que regulan la expresión génica (Winter *et al.*, 2009). Los miRNAs tienen un papel fundamental en la regulación de la función del sistema inmune, por lo que algunos son llamados inmuno-miRs (Amado *et al.*, 2015; Contreras and Rao, 2012; Tsitsiou and Lindsay, 2009). La diferenciación de LT CD4+ en diferentes subpoblaciones celulares está regulada por miRNAs como miR-155 (Th1), miR-326 (Th17), miR-29 (Th2), miR-146a (Treg). miR-150 participa en la regulación de la maduración de linfocitos preB a LB maduro y mir-424 en la transformación de monocitos a macrófagos (Du *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2007; Steiner *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2007). Algunos miRNAs regulan directamente la expresión de citocinas, entre ellos miR-19a y miR-125b (TNF- α) (M. Liu *et al.*, 2011; Tili *et al.*, 2007), miR-21 (IL-12), miR-98 y let-7c (IL-10), miR-181c (IL-2), miR-340 (IL-4) (Guerau-de-Arellano *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2012; Y. Liu *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2011; Xue *et al.*, 2011).

La infección por *H. pylori* modifica la expresión de miRNAs en la mucosa gástrica humana y este evento puede tener efecto en la intensidad de la respuesta inflamatoria (Matsushima *et al.*, 2011). Algunos estudios han analizado la expresión de miRNAs en células del sistema inmune en presencia de *H. pylori*; se encontró sobreexpresión de miR-155 en macrófagos infectados con la cepa *H. pylori* 26695 e hicieron el mismo hallazgo en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes infectados con *H. pylori* (Yao *et al.*, 2015). En otro estudio analizaron la expresión de seis miRNAs en macrófagos infectados con *H. pylori* 26695, y encontraron la expresión significativamente incrementada de miR-21, miR-155 y miR-223 (Wang *et al.*, 2016). Estos datos sugieren que *H. pylori* induce cambios en la expresión de miRNAs en macrófagos y PBMCs humanas.

Actualmente, se sabe que la infección por *H. pylori* induce una intensa respuesta inflamatoria con participación de células mononucleares, que el perfil de expresión de citocinas varía con el genotipo *vacA*, *cagA* y *babA2*, y que los miRNAs regulan la expresión de citocinas, la proliferación, la diferenciación y la activación de células inmunes. Sin embargo, la relación entre el perfil de expresión de miRNAs con las citocinas expresadas por células mononucleares de sangre periférica en respuesta a la infección con diferentes genotipos de *H. pylori* no ha sido estudiada. El objetivo de este estudio fue evaluar el perfil de 31 miRNAs y de 13 citocinas expresados por células mononucleares humanas en respuesta a la infección con cepas de *H. pylori* *vacA s2m2/babA2-/cagA-*, *vacA s1m1/babA2+/cagA-*, *vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABC y *vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABCCC.

Material y Métodos

Cepas de *Helicobacter pylori*

Se cultivaron cincuenta cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes guerrerenses diagnosticados con gastritis crónica. Se sembraron 100 µL de suspensión bacteriana en placas de Agar Columbia con 10% de sangre de carnero, adicionado con 10 mg/L de vancomicina, 5 mg/L de trimetropima, 5 mg/L de cefsulodina, 5 mg/L de anfotericina B (Oxoid, Hampshire, England) y polienriquecimiento Isovitalex (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA), a pH 6.8 a 7.0. Las placas se incubaron por 72 h a 37°C, en atmósfera microaerófila (5 % de CO₂). Los aislamientos fueron identificados como *H. pylori* con base en su morfología colonial (colonias grisáceas, traslúcidas, de aproximadamente 1 mm de diámetro), en su tinción con Gram (Gram negativa) y en los resultados de pruebas bioquímicas (positivas a ureasa, catalasa y oxidasa).

Genotipificación de cepas de *Helicobacter pylori*

Las colonias de *H. pylori* fueron cosechadas y depositadas en solución de extracción (Tris 10 mM, pH 8, EDTA 10 mM, SDS 0.5%) para su digestión con proteinasa K. El ADN total se obtuvo por la técnica de fenol-cloroformo alcohol-isoamílico (Sambrook and Russell, 2001). Se amplificó un fragmento del gen *rRNA 16S* de *H. pylori*, con los

iniciadores 16S1 y 16S2 (Tabla 1), siguiendo la metodología descrita previamente (Martínez-Carrillo *et al.*, 2010). Las muestras positivas para el *rRNA 16S* se sometieron a PCR múltiple con iniciadores específicos para amplificar las regiones s (VAIF, VAIR) y m (VAGF, VAGR) del gen *vacA*, el gen *cagA* (F1, B1) y *babA2* (bab2F, bab2R) (Tabla 1). Para la reacción de PCR múltiple se utilizaron 250 ng de ADN y las condiciones descritas previamente (Martínez-Carrillo *et al.*, 2014). En cada reacción de PCR se usó como control positivo ADN de la cepa ATCC 43504 (*vacA s1m1/babA2+/cagA+*), y como control negativo el ADN se sustituyó por agua desionizada estéril. Todas las reacciones se hicieron en un termociclador Mastercycler Ep gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para el los amplicones del *rRNA 16S* y al 2.5% para los fragmentos de los genes *vacA*, *cagA* y *babA2*. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron con luz ultravioleta (UV).

Para confirmar la ausencia del gen *cagA* en las cepas, se usó el ensayo de sitio vacío, con los iniciadores ESf y ESr (Tabla 1). La PCR se hizo con 50 ng de ADN, 0.08 mM de dNTPs (Invitrogen, Massachusetts, USA), 1.0 mM MgCl₂, 5 pmol de cada iniciador y 1 U Taq ADN Polimerasa *Platinum*® (Invitrogen, Massachusetts, USA), en un volumen final de 15 µl. Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo a 94 °C por 5 min; 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 61 °C por 30 s y 72 °C por 45 s y un ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 min. En cada PCR, se utilizó el ADN de la cepa ATCC43504 (*cagA+*) como control negativo, la cepa UEGE-644 (*cagA-*) como control positivo, y como segundo control negativo el ADN se sustituyó por agua desionizada estéril. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2 %, se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron con luz UV. Un producto de PCR de 360 pb confirma la pérdida completa de *cagPAI*. Los iniciadores usados en la reacción de PCR flanquean el extremo 5' y 3' del sitio de inserción de *cagPAI*.

Motivos EPIYA de *cagA* de *Helicobacter pylori*

El ADN de las cepas de *H. pylori* *cagA*-positivas se sometió a 4 reacciones de PCR para detectar el tipo y número de motivos EPIYA en *cagA*. El iniciador sentido *cagA28F*

se utilizó en todas las reacciones, y los iniciadores *cagA*-P1C (EPIYA-A), *cagA*-P2TA (EPIYA-B), *cagA*West (EPIYA-C) y *cagA*East (EPIYA-D), se utilizaron como iniciadores antisentido, en mezclas separadas (Tabla 1). Cada reacción se hizo con 300 ng de ADN y en las condiciones descritas previamente (Beltrán-Anaya *et al.*, 2014). En cada PCR se usó como control positivo ADN de la cepa ATCC 43504, con motivo EPIYA ABCCC y como control negativo el ADN se sustituyó por agua desionizada estéril. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2.5 %, seguida por tinción con bromuro de etidio y observación con luz UV.

Secuenciación y análisis *in silico* de la región variable 3' de *cagA*

El ADN de seis cepas con genotipo *s1m1/babA2+/cagA+*, tres con motivos EPIYA ABC, una con ABCC y dos con ABCCC, detectados por PCR, se secuenciaron, para confirmar el tipo y número de motivos EPIYA en *cagA*. Un fragmento de la región variable de *cagA* se amplificó con los oligonucleótidos *cag28F* y *cag4* (Tabla 1), que generaron amplicones de 650 a 850 pb.

La reacción de PCR se hizo con 350 ng de ADN, 15 pmol de cada iniciador, 0.3 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂ y 1 U *Platinun® Taq DNA Polymerase*, en un volumen final de 50 µL (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). Las condiciones de reacción fueron: 94°C por 5 min seguido por 30 ciclos de 94°C por 40 s, 55.5°C por 30 s, 72°C por 50 s y una extensión final a 72°C por 7 min. Los productos de PCR fueron purificados con PureLink™ PCR Purification Kit (*Invitrogen, Massachusetts, USA*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos purificados fueron secuenciados empleando el Kit de secuenciación BigDey terminator v.1.1 Cycle Sequencing kit (*Applied Biosystem, California, USA*) en el analizador *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystem, California, USA*). La secuencia de nucleótidos fue transformada en secuencia de aminoácidos usando el programa MEGA versión 5, y la extensión Clustal W del programa MEGA se usó para generar un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos. La secuencia parcial de *CagA* de la cepa *H. pylori* 43526 (*GenBank: AF001357.1*), con motivos EPIYA ABCCC, fue usada como referencia.

Tabla 1. Iniciadores usados en este estudio.				
Gen	Nombre del iniciador	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Referencia
<i>rRNA 16S</i>	16S1	GCTAAGAGATCAGCCTATGTCC	522	(Chang <i>et al.</i> , 2006)
	16S1	CAATCAGCGTCAGTAATGTTC		(Chang <i>et al.</i> , 2006)
<i>vacA s1</i>	VAIF	ATGGAAATACAACAAACACAC	259	(Atherton <i>et al.</i> , 1995)
	VAIR	CTGCTTGAATGCGCCAAAC		(Atherton <i>et al.</i> , 1995)
<i>vacA s2</i>	VAIF	ATGGAAATACAACAAACACAC	286	(Atherton <i>et al.</i> , 1995)
	VAIR	CTGCTTGAATGCGCCAAAC		(Atherton <i>et al.</i> , 1995)
<i>vacA m1</i>	VAGF	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG	570	(Y. Yamaoka <i>et al.</i> , 1998)
	VAGR	GCGTCTAAATAATTCCAAGG		(Y. Yamaoka <i>et al.</i> , 1998)
<i>vacA m2</i>	VAGF	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG	645	(Yamaoka <i>et al.</i> , 1998)
	VAGR	GCGTCTAAATAATTCCAAGG		(Yamaoka <i>et al.</i> , 1998)
<i>cagA</i>	F1	GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG	349	(Tummuru <i>et al.</i> , 1993b)
	B1	CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA		(Tummuru <i>et al.</i> , 1993b)
<i>babA2</i>	bab2F	AATCCAAAAGGAGAAAAACATGAAA	850	(Gerhard <i>et al.</i> , 1999)
	bab2R	TGTTAGTGATTTCCGGTGTAGGACA		(Gerhard <i>et al.</i> , 1999)
<i>cagA</i> región constante	cagAF D008	ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA	298	(Figura <i>et al.</i> , 1998)
	cagAR R008	TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT		(Figura <i>et al.</i> , 1998)
<i>cagA</i> región variable	cag28F	TTCTCAAAGGAGCAATTGGC	500-850	(Argent <i>et al.</i> , 2005)
	cag4R	ATCTTTGAGCTTGTCTATCG		(Rudi <i>et al.</i> , 1998)
Sentido para todos los motivos EPIYA	cagA28F	TTCTCAAAGGAGCAATTGGC		(Argent <i>et al.</i> , 2005)
<i>EPIYA-A</i>	cagA-P1C	GTCCTGCTTTCTTTTTATTAACCTTAGC	264	(Argent <i>et al.</i> , 2005)
<i>EPIYA-B</i>	cagA-P2TA	TTTAGCAACTTGAGTATAAATGGG	306	(Argent <i>et al.</i> , 2005)
<i>EPIYA-C</i>	CagAWest	TTTCAAAGGGAAAGGTCCGCC	501	(Argent <i>et al.</i> , 2005)
<i>EPIYA-D</i>	CagAEast	AGAGGGAAGCCTGCTTGATT	495	(Argent <i>et al.</i> , 2005)
Sitio vacío	ESf	ACATTTTGGCTAAATAAACGCTG	360	(Peters <i>et al.</i> , 2001)
	ESr	TCATGCGAGCGGCGATGTG		(Peters <i>et al.</i> , 2001)

Selección de donadores de sangre periférica

Para evaluar el efecto de *H. pylori* sobre células mononucleares de sangre periférica, se seleccionaron donadores sanos (hombres y mujeres), de 20 a 30 años de edad con grupo sanguíneo "O", Rh positivo. A todos los voluntarios se les aplicó una encuesta para obtener datos personales, información de salud, de síntomas o antecedentes de patología gástrica y de infección por *H. pylori*. A las personas sin síntomas ni antecedentes de dispepsia y sin indicios de infección por *H. pylori* se les solicitó una muestra de heces, para detección de antígenos de *H. pylori* por inmunoensayo cromatográfico (LumiQuick, California, USA). Sólo se aceptaron como donadores de sangre 10 sujetos *H. pylori* negativos (5 hombres y 5 mujeres). En las mujeres, la sangre venosa se obtuvo una semana previa al inicio de su periodo menstrual o una semana después de concluido el mismo. Se excluyeron los sujetos que tenían alguna

enfermedad crónica (obesidad, diabetes mellitus o artritis reumatoide), infección viral o bacteriana reciente. Se descartaron también los candidatos que habían estado bajo tratamiento con antibióticos, antivirales o antiinflamatorios una semana antes de la toma de muestra. Los sujetos seleccionados como donadores firmaron un consentimiento informado.

Aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre periférica

De cada donador se obtuvieron 12 mL de sangre periférica, en ayuno previo de 8 a 12 horas. Las células mononucleares se obtuvieron mediante centrifugación por gradiente de densidad con Histopaque (1077-Sigma Aldrich, Missouri, USA). Se cultivaron 1×10^6 células mononucleares por pozo en medio RPMI-1640 (R6504-Sigma Aldrich, Missouri, USA) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Carlsbad California, USA) en placas p24. Las placas se incubaron en atmósfera húmeda, con 5% de CO₂ a 37°C por 24 h. Las células de cada paciente se cultivaron por separado.

Ensayo curso temporal de cocultivo de células mononucleares con *H. pylori*

La cepa de *H. pylori* ATCC 26695 (*vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABC), fue resuspendida en medio RPMI-1640 con 10% de FBS y se ajustó a 1×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Después de 24 h de cultivo, 1×10^6 células mononucleares fueron infectadas con la cepa de referencia de *H. pylori* a una multiplicidad de infección (MDI) de 100:1, por 0, 6, 12, 18 y 24 h, e incubadas en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, a 37 °C. En el sistema sin infección se adicionó un volumen igual de medio RPMI-1640 con 10% FBS sin *H. pylori*.

Viabilidad bacteriana

De cada cocultivo del ensayo de curso temporal, se obtuvieron 100 µL de suspensión bacteriana y se sembraron en placas de agar Columbia. Las placas se incubaron en las condiciones descritas previamente, con el propósito de verificar la viabilidad de *H. pylori*. La identidad de *H. pylori* se confirmó con tinción de Gram y pruebas bioquímicas.

Nivel de expresión de miR-21

Con el fin de seleccionar el tiempo en el cual *H. pylori* induce cambios de la expresión en miRNAs, se determinó el nivel de expresión de miR-21 por qPCR. El ARN total fue obtenido con Trizol (Invitrogen, Massachusetts, USA) a partir de las células mononucleares cocultivadas con *H. pylori*. Para la RT-qPCR se usaron 10 ng de ARN, el kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystem, California, USA), y los iniciadores específicos para miR-21 y miR-92, siguiendo las instrucciones de manufactura. Para la qPCR se usaron 2 µL de producto de RT, ensayo individual TaqMan específico para miR-21, Master Mix PCR TaqMan Universal (1X), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las reacciones se hicieron en el equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem, California, USA). Los datos obtenidos fueron normalizados con el control endógeno miR-92 (Applied Biosystems, California, USA). La expresión de miR-21 se calculó con el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen and Livak, 2008).

Cocultivo de células mononucleares y *H. pylori*

Las cepas *H. pylori* UEGE856 (*vacA s2m2/babA2-/cagA-*), HG212 (*vacA s1m1/babA2+/cagA-*), ATCC 26695 (*vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABC), y UEGE751 (*vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABCCC) fueron seleccionadas para los cocultivos. Aislamientos frescos de *H. pylori*, de 72 h de subcultivo en Agar Columbia se diluyeron en medio RPMI-1640 con 10% de FBS y se ajustó al estándar 1.0 de McFarland mediante espectrometría (3×10^8 UFC/mL) (Mello *et al.*, 2008). Después de 24 h de cultivo, las células mononucleares fueron infectadas con las cepas de *H. pylori* a una multiplicidad de infección (MDI) de 100:1. En el sistema sin infección se adicionó un volumen igual de medio RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino sin *H. pylori*. Los cocultivos fueron incubados en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C por 6 h.

Selección de miRNAs

Para seleccionar miRNAs relacionados con la regulación de la respuesta inmune se realizó una revisión de la literatura. Se consideraron artículos originales publicados hasta junio de 2015. Se analizaron artículos que describen experimentos *in vivo* o *in*

vitro para determinar los genes blanco de cada miRNA. Se excluyeron los artículos de revisión. Los criterios para la búsqueda en las bases PubMed, EBSCO, Elsevier, Wiley, Springer, Taylor and Francis, Lippincott, fueron “miRNA in mononuclear cells”, “B lymphocytes miRNA”, “T lymphocytes miRNA”, “miRNA in monocyte”, “miRNA in macrophages”, “miRNA and cytokines” y “miRNAs and *H. pylori*”, “miRNA in mononuclear cells and *H. pylori*”, “miRNA in lymphocytes B and *H. pylori*”, “miRNA in lymphocytes T and *H. pylori*”, “miRNA in monocyte and *H. pylori*”, “miRNA in macrophages and *H. pylori*”, “miRNA cytokines and *H. pylori*”. Se seleccionaron los siguientes 31 miRNAs siguientes: miR-155, miR-424, miR-326, miR-29a, miR-146a, miR-150, miR-19a, miR-223, miR-34a, miR-21, miR-31, miR-98, let-7b, miR-125b, miR-181d, miR-184, miR-301a, miR-24, miR-142, miR-199a, miR-214, miR-15a, miR-16, let-7c, miR-128a, miR-27b, miR-340, miR-145, miR-210, miR-148a. Estos miRNAs regulan directa o indirectamente la expresión de citocinas o la maduración de células que participan en la respuesta inmune innata y adaptativa anti-*H. pylori*.

Microarreglo para miRNAs

El ARN total de los cocultivos fue extraído con el reactivo TRIzol. Para medir el nivel de expresión de los miRNAs seleccionados, se mezclaron los ARNs de los 10 pacientes por grupo de experimental. Se utilizó el Microarreglo TaqMan® Array Plates, previamente diseñado (4398986) (Applied Biosystem, California, USA), para determinar 31 miRNAs y el ARN pequeño nuclear U6 (RNU6), que se usó como control endógeno para normalizar los datos, siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las reacciones se hicieron por triplicado. El análisis individual para cada miRNA se realizó con el método de método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, para determinar la expresión de cada miRNA con respecto al control. Se utilizó el Software estadístico R para realizar el mapa de calor, y se usaron los valores de 2^{-ddCT} para convertirlos a zscore. La expresión de cada miRNA entre los sistemas de estudio se consideró como baja (↓) o alta (↑) si el valor p fue <0.05 , y sin cambios (SC) si p fue >0.05 , comparando con el sistema control, utilizando la prueba t de Student.

Cuantificación de citocinas

El nivel de citocinas secretadas por las células mononucleares cocultivadas con cepas de *H. pylori* se midió en el sobrenadante con el inmunoensayo Bio-Plex Pro Human Cytokine (Bio-Rad, California USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las citocinas incluidas en el ensayo fueron IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17 y TNF- α . Los resultados fueron analizados mediante el software Bio-Plex Manager 6.0. Los resultados fueron normalizados con la concentración de proteína total, cuantificada mediante el método de Bradford (Bio-Rad, California, USA).

Análisis estadístico

Se utilizó el programa STATA v. 12 para el análisis estadístico. Para determinar si existen diferencias entre la expresión de cada miRNA y concentración de cada citocina se usó la prueba t de Student. Los datos fueron graficados como media aritmética y error estándar (EE) utilizando el programa GraphPad Prism® v5. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Se genotipificaron cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con diagnóstico histopatológico de gastritis crónica. Se seleccionaron para el estudio las cepas UEGE856, HG212 y UEGE751, con genotipos *vacA s2m2/babA2-/cagA-*, *vacA s1m1/babA2+/cagA-* y *vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABCCC, respectivamente. En las cepas *cagA-* se confirmó la ausencia del gen *cagA* y de la isla de patogenicidad (*cagPAI*), mediante el ensayo de sitio vacío. En la cepa *vacA s1m1/ babA2+/cagA+* EPIYA ABCCC (UEGE751), el patrón de motivos EPIYA en *cagA* se determinó por PCR y se confirmó por secuenciación. En esta cepa detectó una sustitución del aminoácido alanina (A) por treonina (T), en el motivo EPIYA B, que generó la secuencia EPIYT. La cepa ATCCC 26695, con genotipo *vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABC, se usó para inducir la infección con *H. pylori cagA+* con un motivo EPIYA C.

Células mononucleares humanas fueron aisladas de diez sujetos, cinco hombres y 5 mujeres, con edad entre 20-30 años, sin antecedentes de infección por *H. pylori*, sin patología gástrica asociada a esta bacteria y negativos a la presencia de antígenos de *H. pylori* en heces. Las células fueron distribuidas en cinco sistemas experimentales y cultivadas en ausencia de *H. pylori* o infectadas con una cepa de genotipo *vacA/babA2/cagA* específico.

Un millón de células mononucleares de sangre periférica humana se infectaron con la cepa de *H. pylori* ATCC 26695 *vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABC, en una relación célula bacteria 1:100. Mediante un ensayo de curso temporal, se determinó que a las 6 h de infección la bacteria y las células mononucleares permanecen viables, y que *H. pylori* induce incremento de hasta 2 veces ($p < 0.05$) en la expresión de miR-21, comparado con las células sin infección. La cuenta de células viables, el cultivo de *H. pylori* y la expresión de miR-21 por qPCR después se hizo por triplicado a las 6, 12, 18 y 24 h de infección.

Expresión miRNAs en células mononucleares humanas infectadas con cepas de *H. pylori*

Se evaluó el nivel de expresión de 31 miRNAs usando Microarreglo, y se determinó la expresión relativa de cada miRNA expresado por células mononucleares humanas cocultivadas con cepas de *H. pylori* con diferente genotipo. El mapa de calor muestra el agrupamiento jerárquico de miRNAs de cinco sistemas experimentales y compara el nivel de expresión de 31 miRNAs entre los grupos (Figura 1). En la tabla 1 se muestra los valores de expresión de cada miRNA entre los sistemas de estudio, y se consideró como baja (↓) o alta (↑) si el valor p fue < 0.05 , y sin cambios (SC) si p fue > 0.05 , comparando con el sistema control.

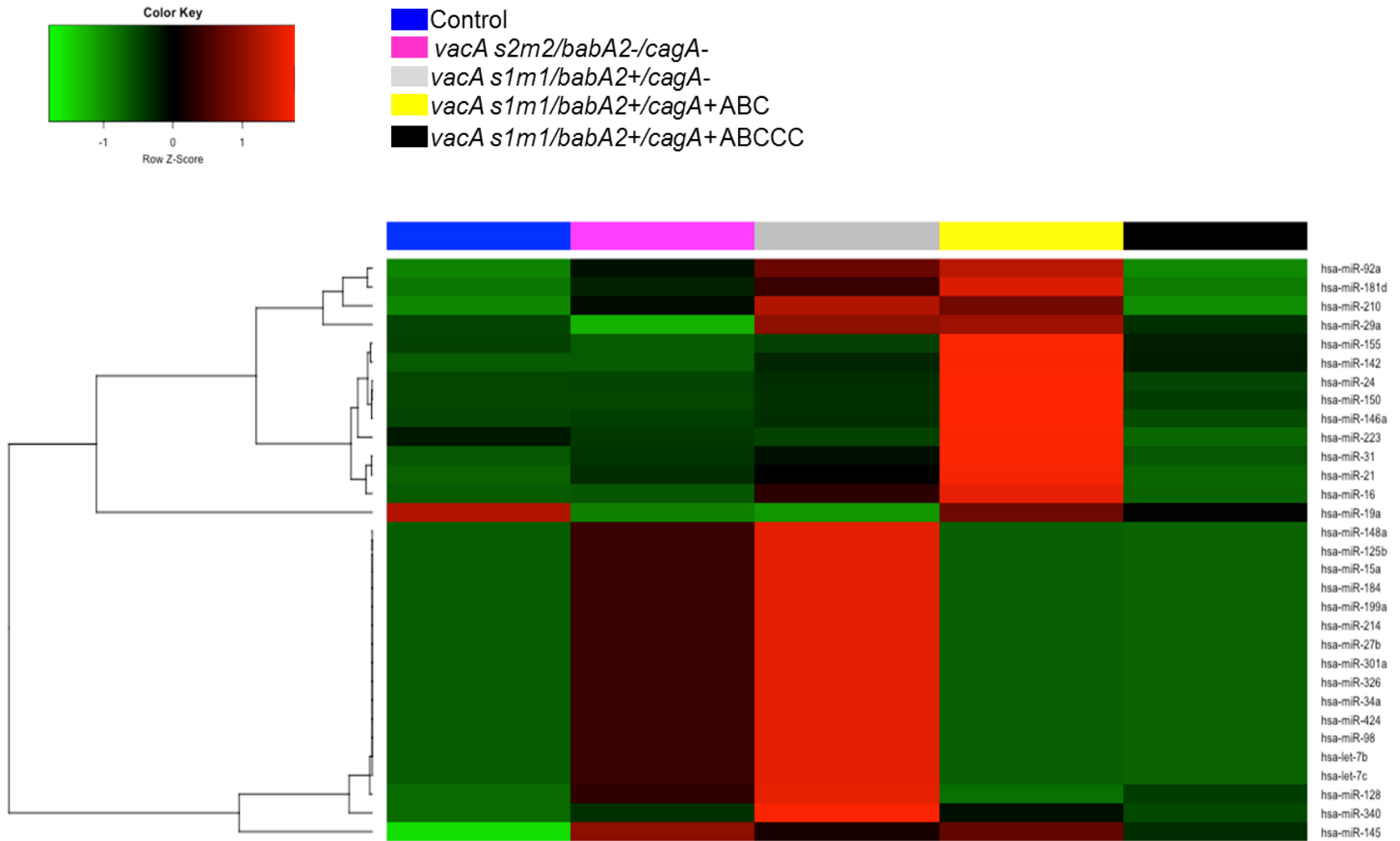


Figura 1. Expresión diferencial de microRNAs en células mononucleares humanas infectadas con diferentes cepas de *H. pylori*. El mapa de calor muestra el promedio de las réplicas técnicas y biológicas de los valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ convertidos a zscore. En cada fila se muestra un miRNA y cada columna una condición experimental (células mononucleares infectadas con cepas de *Helicobacter pylori* con diferente genotipo). La escala de color muestra en verde los miRNAs subexpresados y en rojo los sobreexpresados con respecto a las células mononucleares no infectadas.

Tabla 1. miRNAs expresados por células mononucleares infectadas con cepas de *H. pylori* con diferente genotipo comparado con células no infectadas.

miRNA	<i>H. pylori</i> <i>vacA s2m2/babA2-/cagA-</i>			<i>H. pylori</i> <i>vacA s1m1/babA2+cagA-</i>			<i>H. pylori</i> <i>vacA s1m1babA2+/cagA+</i> <i>EPIYA ABC</i>			<i>H. pylori</i> <i>vacA s1m1/cagA+/babA2+</i> <i>EPIYA ABCCC</i>		
	*Expresión			Expresión			Expresión			Expresión		
	Media ± Error estándar	*p		Media ± Error estándar	*p		Media ± Error estándar	*p		Media ± Error estándar	*p	
hsa-miR-125b	1.441±0.230	0.195	SC	1.937±0.633	0.277	SC	0.992±0.197	0.971	SC	0.982±0.105	0.881	SC
hsa-miR-128	1.441±0.230	0.195	SC	1.937±0.633	0.277	SC	0.992±0.197	0.971	SC	1.132±0.171	0.521	SC
hsa-miR-142	0.996±0.165	0.984	SC	2.415±0.774	0.209	SC	9.950±0.791	0.008	↑	2.631±1.203	0.308	SC
hsa-miR-145	2.353±0.241	0.030	↑	1.937±0.633	0.277	SC	2.204±0.418	0.102	SC	1.659±0.442	0.274	SC
hsa-miR-146a	1.287±0.412	0.559	SC	1.921±0.686	0.312	SC	16.512±2.444	0.024	↑	0.625±0.099	0.064	SC
hsa-miR-148a	1.441±0.230	0.195	SC	1.937±0.633	0.277	SC	0.992±0.197	0.971	SC	0.982±0.105	0.881	SC
hsa-miR-150	1.087±0.222	0.734	SC	4.277±1.826	0.215	SC	49.420±7.531	0.023	↑	2.957±1.664	0.361	SC
hsa-miR-155	0.800±0.317	0.593	SC	1.023±0.270	0.940	SC	3.733±0.622	0.048	↑	1.300±0.289	0.408	SC
hsa-miR-15a	1.441±0.230	0.195	SC	1.937±0.633	0.277	SC	0.992±0.197	0.971	SC	0.982±0.105	0.881	SC
hsa-miR-16	1.083±0.165	0.663	SC	2.981±1.049	0.200	SC	5.734±0.684	0.020	↑	0.881±0.246	0.678	SC
hsa-miR-181d	1.441±0.230	0.195	SC	1.937±0.633	0.277	SC	2.773±1.973	0.464	SC	0.982±0.105	0.881	SC
hsa-miR-184	1.441±0.230	0.195	SC	1.937±0.633	0.277	SC	0.992±0.197	0.971	SC	0.982±0.105	0.881	SC
hsa-miR-199a	1.441±0.230	0.195	SC	1.937±0.633	0.277	SC	0.992±0.197	0.971	SC	0.982±0.105	0.881	SC
hsa-miR-19a	0.174±0.059	0.005	↓	0.110±0.053	0.004	↓	0.818±0.141	0.325	SC	0.500±0.409	0.346	SC
hsa-miR-21	2.115±0.197	0.030	↑	3.125±0.270	0.016	↑	8.641±5.696	0.312	SC	0.901±0.077	0.329	SC
hsa-miR-210	1.441±0.230	0.195	SC	2.146±0.602	0.197	SC	1.928±0.658	0.294	SC	0.982±0.105	0.881	SC
hsa-miR-214	1.441±0.230	0.195	SC	1.937±0.633	0.277	SC	0.992±0.197	0.971	SC	0.982±0.105	0.881	SC
hsa-miR-223	0.704±0.252	0.362	SC	0.648±0.293	0.353	SC	3.277±0.434	0.035	↑	0.329±0.203	0.081	SC
hsa-miR-24	1.079±0.186	0.713	SC	1.683±0.401	0.231	SC	10.183±1.198	0.017	↑	1.081±0.385	0.854	SC
hsa-miR-27b	1.441±0.230	0.195	SC	1.937±0.633	0.277	SC	0.992±0.197	0.971	SC	0.982±0.105	0.881	SC
hsa-miR-29a	0.758±0.640	0.741	SC	1.462±0.734	0.593	SC	1.498±0.366	0.307	SC	1.043±0.760	0.960	SC
hsa-miR-301a	1.441±0.230	0.195	SC	1.937±0.633	0.277	SC	0.992±0.197	0.971	SC	0.982±0.105	0.881	SC

hsa-miR-31	1.441±0.230	0.195	SC	1.937±0.633	0.277	SC	5.533±1.991	0.151	SC	0.982±0.105	0.881	SC
hsa-miR-326	1.441±0.230	0.195	SC	1.937±0.633	0.277	SC	0.992±0.197	0.971	SC	0.982±0.105	0.881	SC
hsa-miR-340	1.096±0.155	0.598	SC	1.591±0.689	0.482	SC	1.150±0.512	0.797	SC	1.054±0.237	0.840	SC
hsa-miR-34a	1.441±0.230	0.195	SC	1.937±0.633	0.277	SC	0.992±0.197	0.971	SC	0.982±0.105	0.881	SC
hsa-miR-424	1.441±0.230	0.195	SC	1.937±0.633	0.277	SC	0.992±0.197	0.971	SC	0.982±0.105	0.881	SC
hsa-miR-92a	1.441±0.230	0.195	SC	1.937±0.633	0.277	SC	2.244±0.584	0.167	SC	0.982±0.105	0.881	SC
hsa-miR-98	1.441±0.230	0.195	SC	1.937±0.633	0.277	SC	0.992±0.197	0.971	SC	0.982±0.105	0.881	SC
hsa-let-7b	1.441±0.230	0.195	SC	1.937±0.633	0.277	SC	0.992±0.197	0.971	SC	0.982±0.105	0.881	SC
hsa-let-7c	1.441±0.230	0.195	SC	1.937±0.633	0.277	SC	0.992±0.197	0.971	SC	0.982±0.105	0.881	SC

*Prueba t de Student. La expresión de cada miRNA entre los sistemas de estudio se consideró como baja (↓) o alta (↑) si el valor p fue <0.05, y sin cambios (SC) si p fue >0.05, comparando con el sistema control, utilizando la prueba t de Student.

Al comparar la expresión de los 31 miRNAs en cada sistema experimental contra el grupo control, 10 miRNAs fueron diferencialmente expresados entre los sistemas de estudio (miR-145, miR-142, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-16, miR-223, miR-24, miR-19a y miR-21) (Figura 2).

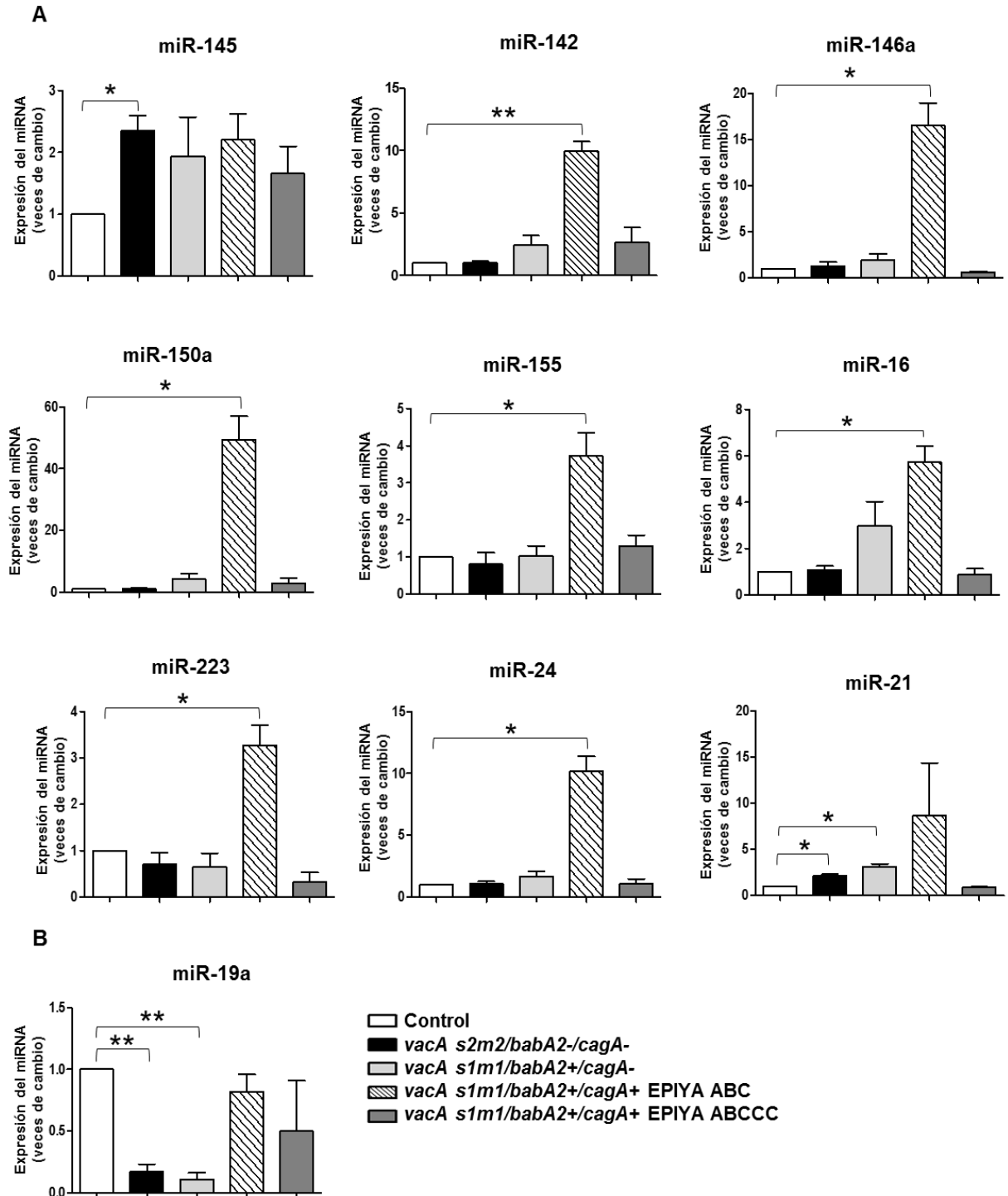


Figura 2. miRNAs expresados por células mononucleares humanas cocultivadas con *H. pylori*. El nivel de expresión de cada miRNA fue medido por Microarreglo. A) miRNAs con alta expresión. B) miRNAs con baja expresión. Los datos representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Prueba t de Student.

El genotipo de *H. pylori* influye sobre el perfil de expresión de miRNAs en células mononucleares humanas

La cepa de *H. pylori* *vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABC induce sobreexpresión de miR-142 ($p < 0.01$), miR-146a ($p < 0.05$), miR-150 ($p < 0.05$), miR-155 ($p < 0.05$), miR-16 ($p < 0.05$), miR-223 ($p < 0.05$) y miR-24 ($p < 0.05$); *vacA s2m2/babA2-/cagA-* promueve baja expresión de miR-19a ($p < 0.01$), sobreexpresión de miR-145 ($p < 0.05$) y miR-21 ($p < 0.05$); *vacA s1m1/babA2+/cagA-* estimula la sobreexpresión de miR-21 ($p < 0.05$) y baja expresión de miR-19a ($p < 0.01$) (Figura 3). No se encontraron cambios significativos en el perfil de expresión de miRNAs en las células infectadas con la cepa *vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABCCC.

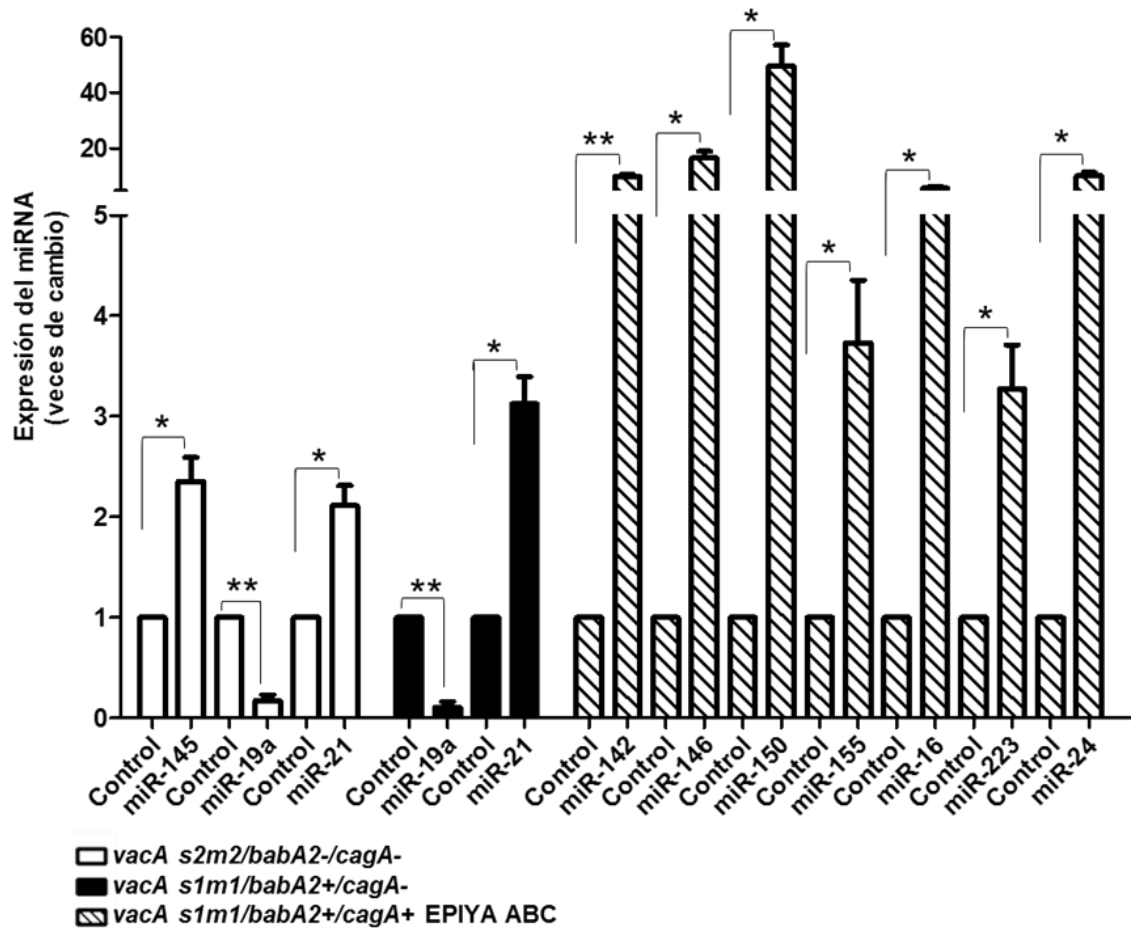


Figura 3. Perfiles de expresión de miRNAs en células mononucleares cocultivadas con cepas de *H. pylori* con diferente genotipo. Cada barra en cada sistema experimental representa un miRNA. Los datos mostrados representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control. Prueba t de Student.

El genotipo de *vacA*, estado de *babA2*, *cagA* y motivos EPIYA de *H. pylori* no se relacionan con el nivel de expresión de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-8

Células mononucleares humanas fueron infectadas con genotipos *vacA s2m2/babA2-/cagA-*, *vacA s1m1/babA2+/cagA-*, *vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABC, y *vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABCCC de *H. pylori*, y se determinó la concentración de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-8 en el sobrenadante. La concentración de la cuatro citocinas aumentó significativamente en respuesta a la infección con *H. pylori*, comparada con el control. Este efecto no se relaciona con el genotipo de *vacA*, ni el estado de *babA2* y *cagA* (Figura 4 A, B y C). Las cepas de *H. pylori vacA s1m1//babA2+/cagA-*, *vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABC, y *vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABCCC inducen mayor secreción de TNF- α , que las cepas de *H. pylori vacA s2m2/babA2-/cagA-* ($p<0.5$) y el sistema control ($p<0.001$) (Figura 4 D). Los resultados indican que el nivel de expresión de TNF- α está relacionado con el estado de *babA2* y *cagA* de *H. pylori* pero no con el número de EPIYA C.

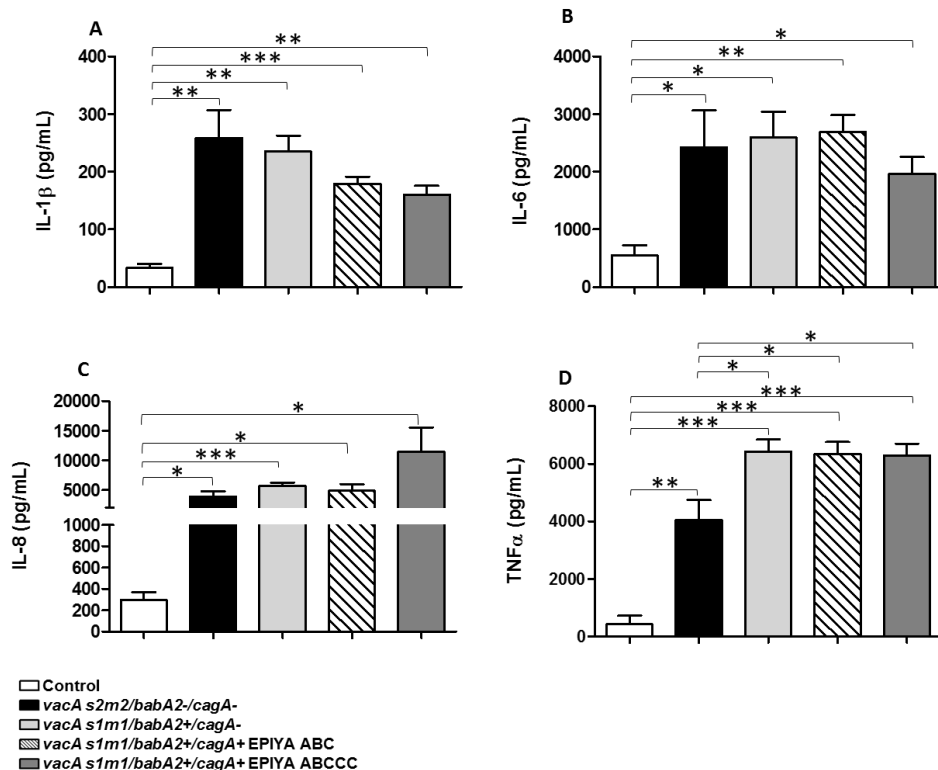


Figura 4. Concentración de citocinas proinflamatorias en sobrenadante de células mononucleares infectadas con cepas de *H. pylori*. A) IL-1 β . B) IL-6. C) IL-8. D) TNF α . La concentración de cada citocina fue normalizada con proteína total. Los datos mostrados representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Prueba t de Student.

***H. pylori* induce mayor expresión de IL-2, IFN- γ e IL-12**

La concentración de IFN- γ fue significativamente mayor en el sobrenadante de células mononucleares infectadas con *H. pylori*, pero no se relaciona con el genotipo de *vacA* ni el estado de *babA2* o de *cagA* (Figura 5 A). La concentración de IL-12 aumentó significativamente en respuesta a la infección con cepas de *H. pylori* *vacA s1m1/babA2+/cagA-* y *vacA s1m1/babA2+/cagA+*, comparadas contra el control, pero no se relaciona con el número de EPIYA C (Figura 5 B). La concentración de IL-2 incrementó con el grado de virulencia de *H. pylori*, y fue significativamente mayor en las células infectadas con la cepa de *H. pylori* *vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABCCC (** $p < 0.01$), que en las células control y las infectadas con la cepa *vacA s2m2/babA2-/cagA-*.

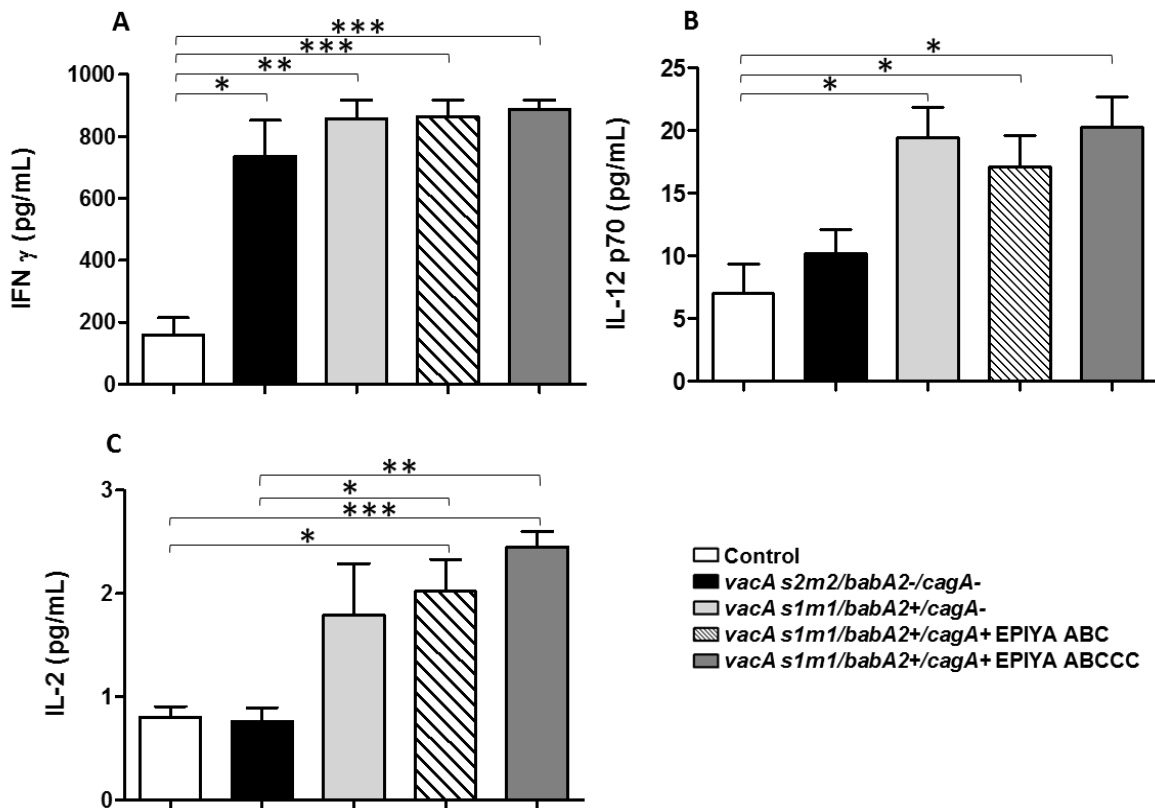


Figura 5. Concentración de citocinas del perfil Th1 en sobrenadante de células mononucleares infectadas con cepas de *H. pylori*. A) IFN γ . B) IL-12. C) IL-2. La concentración de cada citocina fue normalizada con proteína total. Los datos mostrados representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Prueba t de Student.

***H. pylori* incrementa la expresión de IL-4**

La concentración de IL-4 incrementó significativamente en el sobrenadante de las células mononucleares cocultivadas con *H. pylori vacA s2m2/ babA2-/cagA-* y *vacA s1m1/babA2+/cagA-*, en comparación con el control, pero fue significativamente menor en el sobrenadante de células infectadas con genotipos *vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABC, y *vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABCCC (Figura 6 A). La concentración de IL-5 e IL-13 disminuye en las células mononucleares infectadas con *H. pylori*, pero los cambios no son significativos con respecto al sistema control (Figura 6 B y C). El nivel de IL-13 fue significativamente menor en las células cultivadas con *H. pylori vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABCCC, en comparación con las infectadas con la cepa *vacA s1m1/babA2+/cagA-* (Figura 6 C).

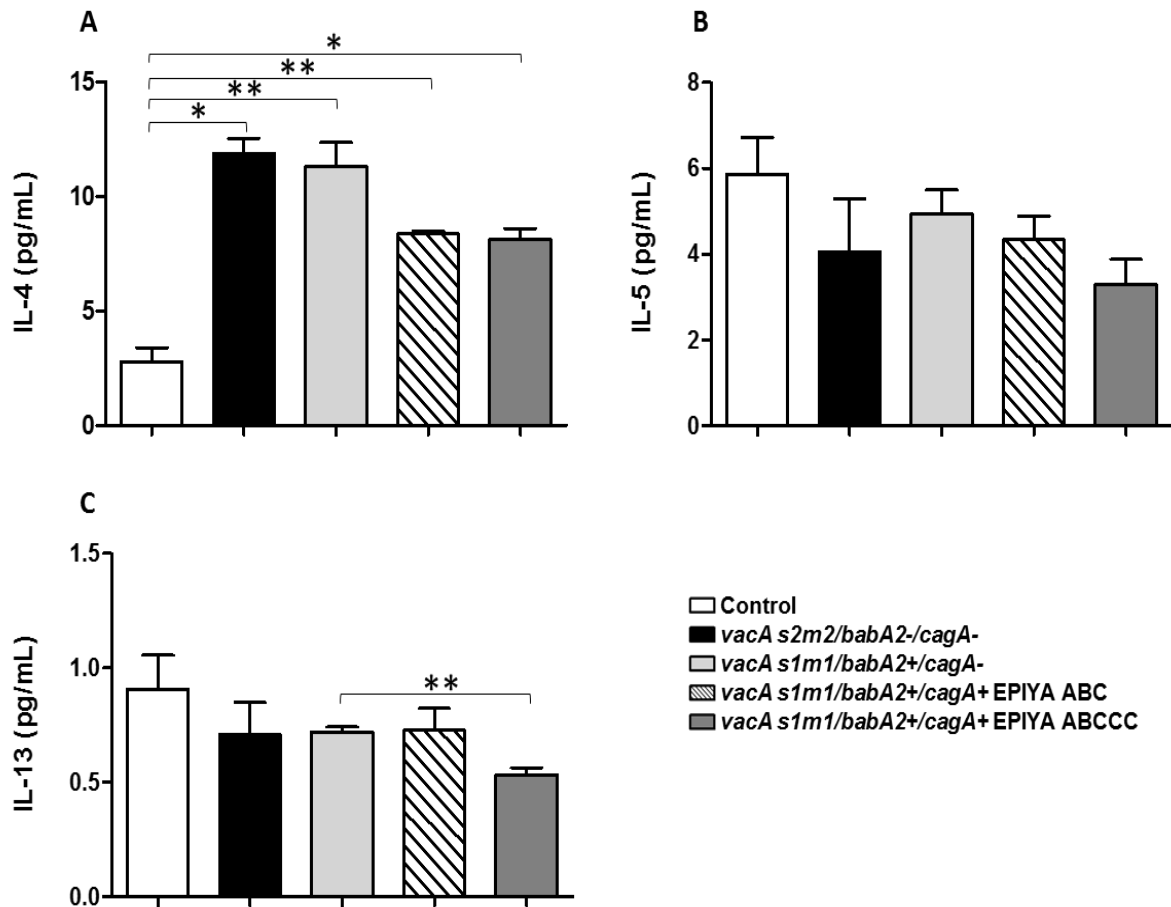


Figura 6. Concentración de citocinas del perfil Th2 en sobrenadante de células mononucleares infectadas con cepas de *H. pylori*. A) IL-4. B) IL-5. C) IL-13. La concentración de cada citocina fue normalizada con proteína total. Los datos mostrados representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Prueba t de Student.

La secreción de IL-17A e IL-10 pero no la de IL-7 aumenta significativamente en respuesta a *H. pylori*

La concentración de IL-17A incrementó significativamente en respuesta a *H. pylori* en comparación con el control, pero el cambio es independiente del genotipo bacteriano (Figura 7 A). La secreción de IL-10 fue significativamente incrementada por *H. pylori*, sin embargo, en las células infectadas con *H. pylori cagA+* la concentración de IL-10 fue significativamente menor que en las *cagA-* y la disminución se relaciona con el número de EPIYA C (Figura 7B). No se encontraron cambios en la concentración de IL-7 (Figura 7 C).

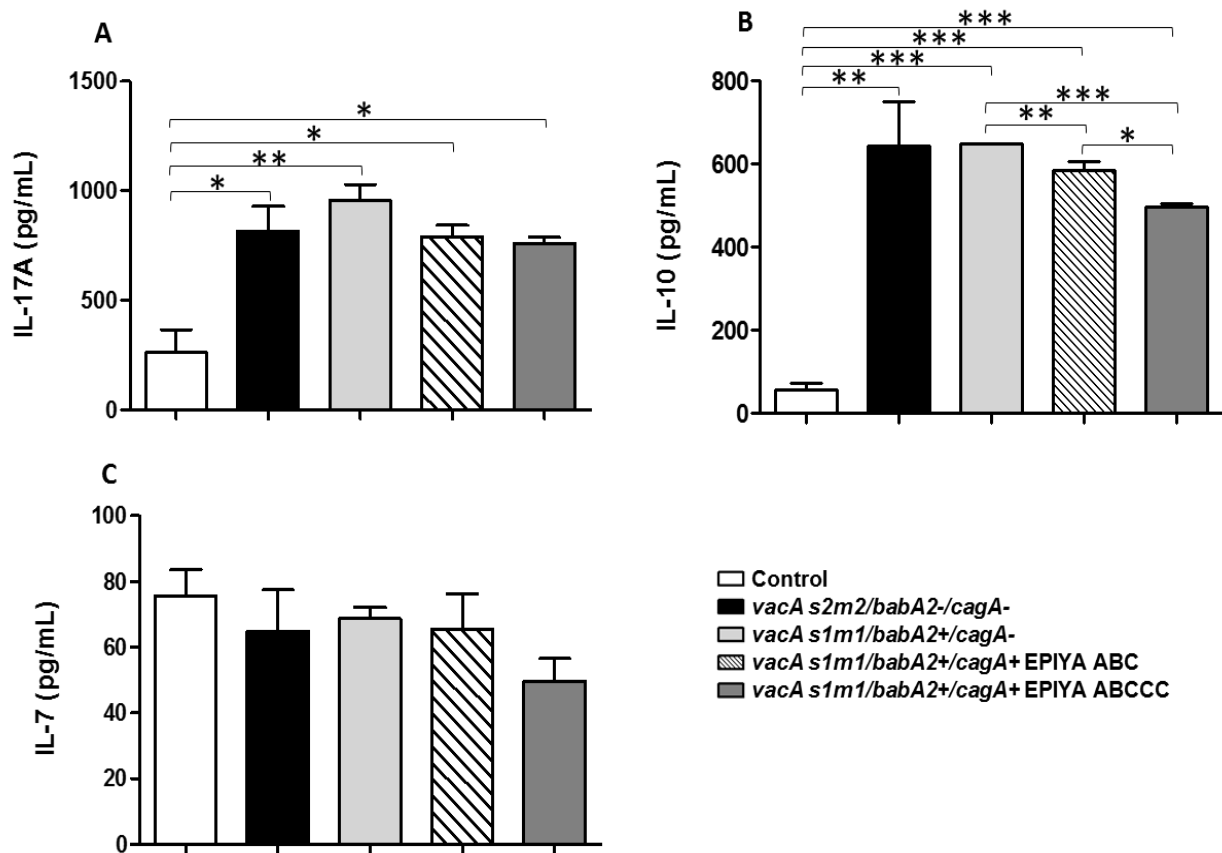


Figura 7. Concentración de IL-17, IL-10 e IL-7 en sobrenadante de células mononucleares infectadas con cepas de *H. pylori*. A) IL-17. B) IL-10. C) IL-7. La concentración de cada citocina fue normalizada con proteína total. Los datos mostrados representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Prueba t de Student.

Discusión

La expresión desregulada de miRNAs se ha reportado en pacientes infectados por *H. pylori*, (Chang *et al.*, 2014; Isomoto *et al.*, 2012; Matsushima *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2016), en células epiteliales infectadas por cepas *vacA s1m1/cagA+* (Cheng *et al.*, 2015; Matsushima *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012a), en células dendríticas infectadas por cepas de *H. pylori vacA s2m2/cagA-* y *vacA s1m1/cagA+* (Hocès de la Guardia *et al.*, 2013), y en macrófagos infectados por cepas *vacA s1m1/cagA+* (Wang *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2015), pero no se ha especificado el genotipo de *H. pylori vacA*, *cagA* y *babA2* (Cheng *et al.*, 2015; Hocès de la Guardia *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2012b). Este es el primer estudio *in vitro* que explora la expresión de 31 miRNAs en células mononucleares infectadas con cepas de *H. pylori* con genotipos *vacA/babA2/cagA* diferentes, que fueron aisladas de pacientes guerrerenses con gastritis crónica. De los 31 miRNAs analizados solo 10 mostraron cambios significativos entre los sistemas de estudio (miR-145, miR-142, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-16, miR-223, miR-24, miR-19a y miR-21), todos involucrados con la regulación de la respuesta inmune.

Tres de los miRNAs que están relacionados con inflamación son miR-146a, miR-155 y miR-16, y su expresión está regulada directamente por el factor de transcripción NF- κ B (Shin *et al.*, 2011; Taganov *et al.*, 2006; Tili *et al.*, 2007). En este estudio se encontró que *H. pylori vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABC induce sobreexpresión de miR-146a, miR-155 y miR-16 en células mononucleares. La alta expresión de miR-146a, miR-155 y miR-16 puede ser debida a que la oncoproteína CagA activa la vía Ras \rightarrow Raf \rightarrow Mek \rightarrow Erk \rightarrow NF- κ B (Brandt *et al.*, 2005), induciendo así la transcripción de los genes de estos miRNAs.

La expresión de miR-146a se ha encontrado de manera abundante en linfocitos T CD4+ humanos, e inhibe la apoptosis, a través de la regulación negativa de la expresión de FADD, proteína adaptadora que se une a Fas. Una vez unida a Fas, FADD recluta a la procaspasa 8 y activa la cascada de proteasas apoptóticas (Curtale *et al.*, 2010). Es probable que miR-146a inhiba a FADD en las células mononucleares

infectadas con la cepa de *H. pylori vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABC, conduciendo a la inhibición de la apoptosis, a la constante secreción de citocinas, y a la inflamación crónica persistente.

Por otra parte, en monocitos estimulados con LPS, miR-16 inhibe la expresión SMRT, un co-represor del factor de transcripción NF- κ B (Zhou *et al.*, 2012). SMRT induce el reclutamiento de las histonas desacetilasas, y reprimen la transcripción de los genes IL-8, IL-6, y IL-1 α , regulados por NF- κ B (Hoberg *et al.*, 2004). Es probable que en células mononucleares infectadas con *H. pylori*, los LPS y CagA activen la expresión de miR-16 y a su vez miR-16 reprima la expresión del co-represor de SMRT, favoreciendo la expresión de citocinas proinflamatorias.

IKK- ϵ fosforila a c-Rel, una subunidad de NF- κ B (Hunter *et al.*, 2016), lo que conduce a la disociación del complejo I κ B-cRel y la translocación de NF- κ B al núcleo (Harris *et al.*, 2006). Este mecanismo se ve inhibido por miR-155, mediante la inhibición de IKK- ϵ (Tili *et al.*, 2007). Probablemente la alta expresión de miR-155, podría ser un mecanismo por el cual *H. pylori* regule la respuesta inflamatoria de manera negativa y así poder persistir en la mucosa gástrica, sin embargo, este mecanismo aún no ha sido elucidado en células infectadas con *H. pylori*.

La sobreexpresión de miR-146a, miR-155 y miR-16 ha sido reportada en mucosa gástrica de pacientes infectados con *H. pylori* y en células AZ-521 infectadas con la cepa ATCC 49503 de *H. pylori (cagA+)* (Matsushima *et al.*, 2011), indicando que estos miRNAs juegan un papel importante durante la inflamación inducida por *H. pylori*.

Además de la oncoproteína CagA de *H. pylori*, otro factor de virulencia que puede inducir cambios en la expresión de miRNAs es el LPS. En este estudio encontramos que las cepas de *H. pylori vacA s2m2/babA2-/cagA-* y *vacA s1m1/babA2+/cagA-* inducen un incremento en la expresión de miR-21 en células mononucleares. La alta expresión de este miRNA puede deberse a la activación de AP-1 y NF- κ B, factores de transcripción que modulan su expresión (Fujita *et al.*, 2008). *H. pylori* estimula la

activación de AP-1 y NF- κ B, a través de la interacción entre el LPS y TLR4, dependiente de MyD88 (Suzuki *et al.*, 2009). Esta interacción activa la transcripción de miR-21 e *IL10*, en células mononucleares estimuladas por 6 h con LPS (Sheedy *et al.*, 2010). miR-21 inhibe la expresión de IL-12 (Lu *et al.*, 2011). La inhibición de la expresión de IL-12 por miR-21 no se observó en este estudio. Nosotros encontramos que la expresión de miR-21 se incrementa en las células mononucleares infectadas cepas *cagA*⁻, y la expresión de IL-12 es inducida por cepas *H. pylori cagA*⁺ y *vacA s1m1/babA2+/cagA*⁻, indicando que a pesar de la sobreexpresión de miR-21, existen otras moléculas de la bacteria, como *vacA*, por los cuales la expresión de IL-12 incrementa.

Observamos incremento de hasta 49 veces en la expresión de miR-150 en células mononucleares infectadas con *H. pylori vacA s1m1/babA2+/cagA*⁺ EPIYA ABC, comparado con el sistema control. La alta expresión de miR-150 conduce a la inhibición de su blanco c-Myb, un factor de transcripción que regula la maduración de linfocitos T y B. De esta manera miR-150 inhibe la diferenciación de un linfocito pro-B a pre-B (Xiao *et al.*, 2007). Ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado que *H. pylori* induce una respuesta de tipo Th1, y se atenúa la respuesta Th2. Probablemente miR-150 participe en la inhibición de la maduración de linfocitos B, regulando así la respuesta inmune en contra de *H. pylori*. Por otra parte, es probable que la oncoproteína CagA de *H. pylori*, de manera independiente de fosforilación, promueva la expresión de miR-150. CagA no fosforilada interacciona con E-cadherina, esta interacción desestabiliza el complejo E-cadherina/ β -catenina, lo que conduce a la acumulación de β -catenina en el citoplasma y núcleo (Murata-Kamiya *et al.*, 2007). La acumulación de β -catenina en el núcleo, induce la activación del factor de células T (TCF), el cual activa la transcripción del gen de miR-150. Es probable que este mecanismo ocurra en las células mononucleares infectadas con *H. pylori*, ya que estas células al igual que las epiteliales expresan β -catenina en la membrana celular (Thiele *et al.*, 2006). Sin embargo, faltan más estudios para elucidar este mecanismo.

Las cepas de *H. pylori* *cagA*⁻ (*s2m2/babA2*⁻/*cagA*⁻ y *vacA* *s1m1/babA2*⁺/*cagA*⁻) inducen una baja expresión de miR-19a. Este miRNA se encuentra en el clúster miR-17-92, un gen policistrónico, que codifica para 6 miRNAs (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b, and miR-92), altamente conservado en vertebrados (Ichimiya *et al.*, 2017). La expresión del clúster miR-17-92 puede ser inhibida por el factor de transcripción PU.1, el cual induce la expresión de EGR2. Por esta vía, EGR2 se une a la isla CpG del gen de miR-17-92 y recluta a Jarid1b, para que esta enzima desmetile la lisina 4 de la histona 3, e inhiba la transcripción de miR-17-92 (Pospisil *et al.*, 2011). PU.1 puede ser activado mediante el LPS de *H. pylori*, vía TLR4 (Yokota *et al.*, 2010).

Nosotros encontramos que la cepa de *H. pylori* *vacA* *1m1/babA2*⁺/*cagA*⁺ EPIYA ABCCC, considerada como la de mayor potencial oncogénico, no induce cambios en la expresión de miRNAs que participan en la respuesta inmune. Es probable que el cambio de alanina (A) por treonina (T), en el motivo EPIYA B de la cepa *H. pylori* *vacA* *1m1/babA2*⁺/*cagA*⁺ EPIYA ABCCC, sea el motivo por el cual no se encuentren cambios en la expresión de miRNAs, ya que se ha demostrado que este tipo de mutación en el motivo EPIYA B, inducen menor elongación celular y secreción de IL-8, en comparación con las que tienen el mismo motivo sin modificación (Reyes-Leon *et al.*, 2007).

Los mediadores que participan en la regulación del proceso inflamatorio en respuesta a la infección por *H. pylori* son las citocinas. La inflamación inducida por *H. pylori* comienza por infiltración de neutrófilos, seguido de linfocitos y monocitos, y un incremento de IL-1 β , IL-6 e IL-8 y TNF- α , citocinas proinflamatorias. La concentración de IL-1 β incrementó en las células infectadas con las diferentes cepas de *H. pylori*. La transcripción de esta citocina es activada por el factor de transcripción NF- κ B, que responde a diversas señales inducidas por moléculas de *H. pylori* como el LPS (Castaño-Rodríguez *et al.*, 2014), CagA (Maeda *et al.*, 2001), VacA (Luo *et al.*, 2013a), y peptidoglicano (PGN) (Viala *et al.*, 2004).

En este estudio encontramos que la concentración de las citocinas del perfil Th1 (IFN- γ , IL-12 p70 e IL-2) aumenta en las células mononucleares cocultivadas con *H. pylori*. La alta concentración de IFN- γ en células infectadas por *H. pylori* puede deberse a que CagA de *H. pylori*, promueve la activación de T-bet (Tanaka *et al.*, 2010), factor de transcripción que modula la expresión del gen de IFN- γ (Eaton *et al.*, 2006). Observamos también incremento en la expresión de IL-12 en las células infectadas con cepas de *H. pylori*. IL-12 promueve la activación de STAT4 que conduce a la expresión de IFN- γ (Robinson and O'Garra, 2002). Esta citocina se ha reportado aumentada en mucosa gástrica de pacientes infectados con *H. pylori* (Bhuiyan *et al.*, 2014; D'Elíos *et al.*, 1997), indicando que juega un papel muy importante durante la infección por *H. pylori*.

Aunque se sabe que la respuesta inmune de tipo Th2 es necesaria para la protección contra infecciones por bacterias extracelulares, las células Th2 no se asocian con la infección por *H. pylori* (Taylor *et al.*, 2008). La concentración de IL-13 fue significativamente menor en células mononucleares cocultivadas con la cepa *vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABCCC, comparado con la cepa que no expresa CagA (*vacA s1m1/babA2+/cagA-*). Es probable que CagA inhiba la actividad de GATA-3, factor de transcripción que activa la expresión de IL-13 (Kishikawa *et al.*, 2001), sin embargo este mecanismo es poco claro.

Los miRNAs regulan la expresión de citocinas, ya sea de manera directa o indirecta. En este estudio encontramos que las cepas de *H. pylori vacA s2m2/babA2-/cagA-* y *vacA s1m1/babA2+/cagA-* inducen baja expresión de mir-19a y aumento en la secreción de TNF- α . Este efecto puede ser debido a que la expresión de TNF- α es inhibida directamente por miR-19a (Liu *et al.*, 2011) y la alta expresión de TNF α puede ser promovida por *H. pylori*, mediante VacA (Luo *et al.*, 2013b) o CagA (Lin *et al.*, 2015), a través de la activación de NF- κ B.

Existe evidencia de que, además de los miRNAs, las citocinas también modulan la expresión de miRNAs. En este estudio encontramos sobreexpresión de miR-21 y alta

concentración de IFN- γ en células mononucleares cocultivadas con dos cepas de *H. pylori cagA*-. Se ha demostrado que IFN- γ promueve la activación de STAT3 y NF- κ B, lo que conduce a la expresión de miR-21, mediante la unión de estos factores de transcripción al promotor de miR-21, en líneas celulares de cáncer de próstata (PC3 y DU145) (Yang *et al.*, 2010).

En conclusión, nuestros resultados indican que la cepa de *H. pylori vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABC induce sobreexpresión de miR-142, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-16, miR-223 y miR-24 y la secreción de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , IL-12 p70, IL-2, IL-4, IL-17 e IL-10. La cepa de *H. pylori* considerada con mayor potencial oncogénico *vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABCCC, no indujo cambios en la expresión de inmuno-miRs, pero incrementó la secreción de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , IL-12 p70, IL-2, IL-4, IL-17, IL-10, comparado con el sistema control, y disminuyó la secreción de IL-13 e IL-10, comparado con *vacA s1m1/babA2+/cagA-* y *vacA s1m1/babA2+/cagA+* EPIYA ABC, respectivamente. En células mononucleares humanas infectadas con *H. pylori*, la expresión de miRNAs y el nivel de citocinas secretadas varía con el genotipo de la bacteria. No obstante, falta investigar el papel de los genotipos virulentos de *H. pylori* en la desregulación de miRNAs que regulan la respuesta inmune.

Referencias

- Argent, R.H., Hale, J.L., El-Omar, E.M., Atherton, J.C. (2008). Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. *Journal of Medical Microbiology*. 57. 1062–1067.
- Atherton, J.C., Cao, P., Peek, R.M., Tummuru, M.K.R., 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. *Journal of Biological Chemistry*. 270. 17771–17777.
- Bagnoli, F., Buti, L., Tompkins, L., Covacci, A., Amieva, M.R. (2005). *Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102. 16339–16344.
- Beltrán-Anaya, F., Poblete, T., Román-Román, A., Reyes, S., de Sampedro, J., Peralta-Zaragoza, O., et al. (2014). The EPIYA-ABCC motif pattern in CagA of *Helicobacter pylori* is associated with peptic ulcer and gastric cancer in Mexican population. *BMC Gastroenterology*. 14. 223.
- Bhuiyan, T.R., Islam, M.M.T., Uddin, T., Chowdhury, M.I., Janzon, A., Adamsson, J., et al. (2014). Th1 and Th17 Responses to *Helicobacter pylori* in Bangladeshi Infants, Children and Adults. *PLoS ONE*. 9. e93943.
- Brandt, S., Kwok, T., Hartig, R., König, W., Backert, S. (2005). NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*. 102. 9300–9305.
- Cadamuro, A.C.T., Rossi, A.F.T., Maniezzo, N.M., Silva, A.E. (2014). *Helicobacter pylori* infection: Host immune response, implications on gene expression and microRNAs. *World Journal of Gastroenterol.* 20. 1424–1437.
- Castaño-Rodríguez, N., Kaakoush, N.O., Mitchell, H.M. (2014). Pattern-Recognition Receptors and Gastric Cancer. *Frontiers in Immunology*. 5. 336.
- Chang, H., Kim, N., Park, J.H., Nam, R.H., Choi, Y.J., Lee, H.S., et al. (2014). Different MicroRNA Expression Levels in Gastric Cancer Depending on *Helicobacter pylori* Infection. *Gut and Liver*. 9. 188-96
- Chang, Y., Wang, L., Lee, M., Cheng, C., Wu, C., Shiau, M. (2006). Genotypic characterization of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* from biopsy specimens of patients with gastroduodenal diseases. *Mount Sinai Journal of Medicine*. 73. 622–626.
- Cheng, S.F., Li, L., Wang, L.M. (2015). miR-155 and miR-146b negatively regulates IL6 in *Helicobacter pylori* (*cagA*+) infected gastroduodenal ulcer. *European Review of Medical and Pharmacological Sciences*. 19. 607–613.
- Correa, P., Piazzuelo, M.B. (2011). *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Adenocarcinoma. *US Gastroenterology & Hepatology Review*. 7. 59–64.
- Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., et al. (1993). Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America. 90. 5791–5795.
- Curtale, G., Citarella, F., Carissimi, C., Goldoni, M., Carucci, N., Fulci, V., *et al.* (2010). An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. *Blood*. 115. 265–273.
- D’Elios, M.M., Manghetti, M., Carli, M.D., Costa, F., Baldari, C.T., Burrioni, D. *et al.* (1997). T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *Journal Immunology*. 158. 962–967.
- Du, C., Liu, C., Kang, J., Zhao, G., Ye, Z., Huang, S., *et al.* (2009). MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nature Immunology*. 10. 1252–1259.
- Eaton, K.A., Benson, L.H., Haeger, J., Gray, B.M. (2006). Role of Transcription Factor T-bet Expression by CD4+ Cells in Gastritis Due to *Helicobacter pylori* in Mice. *Infection Immunity*. 74. 4673–4684.
- Fujita, S., Ito, T., Mizutani, T., Minoguchi, S., Yamamichi, N., Sakurai, K., *et al.* (2008). miR-21 Gene Expression Triggered by AP-1 Is Sustained through a Double-Negative Feedback Mechanism. *Journal of Molecular Biology*. 378. 492–504.
- Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Borén, T., Rad, R., Schepp, W., *et al.* (1999). Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96. 12778–12783.
- Guerau-de-Arellano, M., Smith, K.M., Godlewski, J., Liu, Y., Winger, R., Lawler, S.E. *et al.* (2011). Micro-RNA dysregulation in multiple sclerosis favours pro-inflammatory T-cell-mediated autoimmunity. *Brain an Journal of Neurology*. 134. 3575–3586.
- Harris, J., Oliére, S., Sharma, S., Sun, Q., Lin, R., Hiscott, J., *et al.* (2006). Nuclear Accumulation of cRel following C-Terminal phosphorylation by TBK1/IKKε. *The Journal of Immunology*. 177. 2527–2535.
- Hatakeyama, M. (2008). SagA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*. 11. 30–37.
- Hoberg, J.E., Yeung, F., Mayo, M.W. (2004). SMRT Derepression by the IκB Kinase α. *Molecular Cell*. 16. 245–255.
- Hocès de la Guardia, A., Staedel, C., Kaafarany, I., Clément, A., Roubaud Baudron, C., Mégraud, F., *et al.* (2013). Inflammatory cytokine and microRNA responses of primary human dendritic cells cultured with *Helicobacter pylori* strains. *Frontiers in Microbiology*. 4.
- Hunter, J.E., Butterworth, J.A., Zhao, B., Sellier, H., Campbell, K.J., Thomas, H.D., *et al.* (2016). The NF-κB subunit c-Rel regulates Bach2 tumour suppressor expression in B-cell lymphoma. *Oncogene*. 35. 3476–3484.
- Ichimiya, S., Kamekura, R., Kawata, K., Kamei, M., Himi, T. (2017). Functional RNAs control T follicular helper cells. *Journal of Human Genetics*. 62. 81–86.
- Isomoto, H., Matsushima, K., Inoue, N., Hayashi, T., Nakayama, T., Kunizaki, M., *et al.* (2012). Interweaving MicroRNAs and Proinflammatory Cytokines in Gastric Mucosa with Reference to *H. pylori* Infection. *Journal of Clinical Immunology*. 32. 290–299.

- Jiang, L., Cheng, Z., Qiu, S., Que, Z., Bao, W., Jiang, C. (2012). Altered let-7 expression in Myasthenia gravis and let-7c mediated regulation of IL-10 by directly targeting IL-10 in Jurkat cells. *International Immunopharmacology*. 14. 217–223.
- Jones, K.R., Whitmire, J.M., Merrell, D.S. (2010). A Tale of Two Toxins: *Helicobacter Pylori* CagA and VacA Modulate Host Pathways that Impact Disease. *Frontiers Microbiology*. 1.
- Kaebisch, R., Mejías-Luque, R., Prinz, C., Gerhard, M. (2014). *Helicobacter pylori* Cytotoxin-Associated Gene A Impairs Human Dendritic Cell Maturation and Function through IL-10–Mediated Activation of STAT3. *The Journal of Immunology*. 192. 316–323.
- Kishikawa, H., Sun, J., Choi, A., Miaw, S.-C., Ho, I.-C. (2001). The Cell Type-Specific Expression of the Murine IL-13 Gene Is Regulated by GATA-3. *The Journal of Immunology*. 167. 4414–4420.
- Lin, Q., Xu, H., Chen, X., Tang, G., Gu, L., Wang, Y. (2015). *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A activates tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in gastric epithelial cells through P300/CBP-associated factor-mediated nuclear factor- κ B p65 acetylation. *Molecular Medicine Reports*. 12. 6337–6345.
- Lin, W.-C., Tsai, H.-F., Kuo, S.-H., Wu, M.-S., Lin, C.-W., Hsu, P.-I. (2010). Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Human B Lymphocytes, the Origin of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Cancer Research*. 70. 5740–5748.
- Liu, M., Wang, Z., Yang, S., Zhang, W., He, S., Hu, C., *et al.* (2011). TNF- α is a novel target of miR-19a. *International Journal of Oncology*. 38. 1013–1022.
- Liu, Y., Chen, Q., Song, Y., Lai, L., Wang, J., Yu, H. (2011). MicroRNA-98 negatively regulates IL-10 production and endotoxin tolerance in macrophages after LPS stimulation. *FEBS Letters*. 585. 1963–1968.
- Lu, L.-F., Boldin, M.P., Chaudhry, A., Lin, L.-L., Taganov, K.D., Hanada, T. (2010). Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell*. 142. 914–929.
- Lu, T.X., Hartner, J., Lim, E.-J., Fabry, V., Mingler, M.K., Cole, E.T., *et al.* (2011). MicroRNA-21 Limits In Vivo Immune Response-Mediated Activation of the IL-12/IFN- γ Pathway, Th1 Polarization, and the Severity of Delayed-Type Hypersensitivity. *The Journal of Immunology*. 187. 3362–3373.
- Luo, J.-J., Li, C.-Y., Liu, S., Yu, W., Tang, S.-Y., Cai, H.-L. *et al.* (2013a). Overexpression of *Helicobacter pylori* VacA N-terminal fragment induces proinflammatory cytokine expression and apoptosis in human monocytic cell line through activation of NF- κ B. *Canadian Journal of Microbiology*. 59. 523–533.
- Maeda, S., Akanuma, M., Mitsuno, Y., Hirata, Y., Ogura, K., Yoshida, H. *et al.* (2001). Distinct Mechanism of *Helicobacter pylori*-mediated NF- κ B Activation between Gastric Cancer Cells and Monocytic Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 276. 44856–44864.
- Martínez-Carrillo, D.N., Atrisco-Morales, J., Hernández-Pando, R., Reyes-Navarrete, S., Betancourt-Linares, R., Cruz-del Carmen, I., *et al.* (2014). *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotype diversity and interferon gamma expression in patients with chronic gastritis and patients with gastric cancer. *Revista de Gastroenterología de México*. 79. 220–228.

- Martínez-Carrillo, D.N., Garza-González, E., Betancourt-Linares, R., Mónico-Manzano, T., Antúnez-Rivera, C., Román-Román, A., *et al.* (2010). Association of IL1B - 511C/-31T haplotype and *Helicobacter pylori vacA* genotypes with gastric ulcer and chronic gastritis. *BMC Gastroenterology*. 10. 126.
- Matsushima, K., Isomoto, H., Inoue, N., Nakayama, T., Hayashi, T., Nakayama, M., *et al.* (2011). MicroRNA signatures in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *The International Journal of Cancer*. 128. 361–370.
- Mello, C., Sevéri, E., Ricci, E., Marangoni, A., Coelho, L., Ribeiro, D., *et al.* (2008). Fast differentiation of bacteria causing pharyngitis by low resolution Raman spectroscopy and PLS-discriminant analysis. *Journal of the Brazilian Chemical*. 19. 29–34.
- Murata-Kamiya, N., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Yamahashi, Y., Saito, Y., Higashi, H., *et al.* (2007). *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene*. 26. 4617–4626.
- Nešić, D., Buti, L., Lu, X., Stebbins, C.E. (2014). Structure of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein bound to the human tumor suppressor ASPP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111. 1562–1567.
- Odenbreit, S., Gebert, B., Püls, J., Fischer, W., Haas, R. (2001). Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the *cag* pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cellular Microbiology*. 3. 21–31.
- Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., *et al.* (2008). Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105. 1003–1008.
- Peters, T.M., Owen, R.J., Slater, E., Varea, R., Teare, E.L., Saverymuttu, S. (2001). Genetic diversity in the *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island and effect on expression of anti-CagA serum antibody in UK patients with dyspepsia. *Journal of Clinical Pathology*. 54. 219–223.
- Pospisil, V., Vargova, K., Kokavec, J., Rybarova, J., Savvulidi, F., Jonasova, A., *et al.* (2011). Epigenetic silencing of the oncogenic miR-17-92 cluster during PU.1-directed macrophage differentiation. *The EMBO Journal*. 30. 4450–4464.
- Reyes-Leon, A., Atherton, J.C., Argent, R.H., Puente, J.L., Torres, J. (2007). Heterogeneity in the Activity of Mexican *Helicobacter pylori* Strains in Gastric Epithelial Cells and Its Association with Diversity in the *cagA* Gene. *Infection and Immunity*. 75. 3445–3454.
- Robinson, D.S., O'Garra, A. (2002). Further Checkpoints in Th1 Development. *Immunity*. 16. 755–758.
- Rodriguez, A., Vigorito, E., Clare, S., Warren, M.V., Couttet, P., Soond, D.R., *et al.* (2007). Requirement of bic/microRNA-155 for Normal Immune Function. *Science*. 316. 608–611.
- Roesler, B.M., Rabelo-Gonçalves, E.M.A., Zeitune, J.M.R. (2014). Virulence Factors of *Helicobacter pylori*: A Review. *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology*. 7. 9–17.

- Rosa, A., Ballarino, M., Sorrentino, A., Sthandier, O., De Angelis, F.G., Marchioni, M., *et al.* (2007). The interplay between the master transcription factor PU.1 and miR-424 regulates human monocyte/macrophage differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104. 19849–19854.
- Rossi, A.F.T., Cadamuro, A.C.T., Biselli-Périco, J.M., Leite, K.R.M., Severino, F.E., Reis, P.P., *et al.* (2016). Interaction between inflammatory mediators and miRNAs in *Helicobacter pylori* infection. *Cellular Microbiology*. 18. 1444–1458.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*. 3. 1101–1108.
- Sheedy, F.J., Palsson-McDermott, E., Hennessy, E.J., Martin, C., O’Leary, J.J., Ruan, Q., *et al.* (2010). Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nature Immunology*. 11. 141–147.
- Sohn, S.-H., Lee, Y.-C. (2011). The genome-wide expression profile of gastric epithelial cells infected by naturally occurring *cagA* isogenic strains of *Helicobacter pylori*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 32. 382–389.
- Steiner, D.F., Thomas, M.F., Hu, J.K., Yang, Z., Babiarz, J.E., Allen, C.D.C., *et al.* (2011). MicroRNA-29 Regulates T-Box Transcription Factors and Interferon- γ Production in Helper T Cells. *Immunity*. 35. 169–181.
- Suzuki, M., Mimuro, H., Kiga, K., Fukumatsu, M., Ishijima, N., Morikawa, H., *et al.* (2009). *Helicobacter pylori* CagA Phosphorylation-Independent Function in Epithelial Proliferation and Inflammation. *Cell Host & Microbe*. 5. 23–34.
- Tanaka, H., Yoshida, M., Nishiumi, S., Ohnishi, N., Kobayashi, K., Yamamoto, K., *et al.* (2010). The CagA protein of *Helicobacter pylori* suppresses the functions of dendritic cell in mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 498. 35–42.
- Thiele, A., Nagamine, Y., Hauschildt, S., Clevers, H. (2006). AU-rich elements and alternative splicing in the β -catenin 3’UTR can influence the human β -catenin mRNA stability. *Experimental Cell Research*. 312. 2367–2378.
- Tili, E., Michaille, J.-J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C.D., Adair, B., *et al.* (2007). Modulation of miR-155 and miR-125b Levels following Lipopolysaccharide/TNF- α Stimulation and Their Possible Roles in Regulating the Response to Endotoxin Shock. *The Journal of Immunology*. 179. 5082–5089.
- Tummuru, M.K., Cover, T.L., Blaser, M.J. (1993). Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infection and Immunity*. 61. 1799–1809.
- Vaziri, F., Peerayeh, S.N., Alebouyeh, M., Maghsoudi, N., Azimzadeh, P., Siadat, S.D., *et al.* (2015). Novel effects of *Helicobacter pylori* CagA on key genes of gastric cancer signal transduction: a comparative transfection study. *Pathogens and Disease*. 73.
- Viala, J., Chaput, C., Boneca, I.G., Cardona, A., Girardin, S.E., Moran, A.P., *et al.* (2004). Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *Nature Immunology*. 5. 1166–1174.
- Wang, J., Wu, J., Cheng, Y., Jiang, Y., Li, G. (2016). Over-expression of microRNA-223 inhibited the proinflammatory responses in *Helicobacter pylori*-infection

- macrophages by down-regulating IRAK-1. *American Journal of Translational*. 8. 615–622.
- Warburton, V.J., Everett, S., Mapstone, N.P., Axon, A.T., Hawkey, P., Dixon, M.F. (1998). Clinical and histological associations of *cagA* and *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* gastritis. *Journal of Clinical Pathology*. 51. 55–61.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*. 11. 228–234.
- Wu, J., Xu, S., Zhu, Y. (2013). *Helicobacter pylori* CagA: A Critical Destroyer of the Gastric Epithelial Barrier. *Digestive Diseases and Sciences*. 58. 1830–1837.
- Xiao, C., Calado, D.P., Galler, G., Thai, T.-H., Patterson, H.C., Wang, J., et al. (2007). MiR-150 Controls B Cell Differentiation by Targeting the Transcription Factor c-Myb. *Cell*. 131. 146–159.
- Xue, Q., Guo, Z.-Y., Li, W., Wen, W.-H., Meng, Y.-L., Jia, L.-T., et al. (2011). Human activated CD4+ T lymphocytes increase IL-2 expression by downregulating microRNA-181c. *Molecular Immunology*. 48. 592–599.
- Yamaoka, Y., Kodama, T., Kashima, K., Graham, D.Y., Sepulveda, A.R. (1998). Variants of the 3' Region of the *cagA* Gene in *Helicobacter pylori* Isolates from Patients with Different *H. pylori*-Associated Diseases. *Journal of Clinical Microbiology*. 36. 2258–2263.
- Yamaoka, Y., Kodama, T., Kita, M., Imanishi, J., Kashima, K., Graham, D.Y. (1998). Relationship of *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* to *cagA* status, cytotoxin production, and clinical outcome. *Helicobacter*. 3. 241–253.
- Yang, C.H., Yue, J., Fan, M., Pfeffer, L.M. (2010). Interferon induces miR-21 through a STAT3-dependent pathway as a suppressive negative feedback on interferon-induced apoptosis. *Cancer Research*. 70. 8108–8116.
- Yao, Y., Li, G., Wu, J., Zhang, X., Wang, J. (2015). Inflammatory response of macrophages cultured with *Helicobacter pylori* strains was regulated by miR-155. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 8. 4545–4554.
- Yokota, S., Okabayashi, T., Rehli, M., Fujii, N., Amano, K. (2010). *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharides Upregulate Toll-Like Receptor 4 Expression and Proliferation of Gastric Epithelial Cells via the MEK1/2-ERK1/2 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Infection and Immunity*. 78. 468–476.
- Zhou, R., Li, X., Hu, G., Gong, A.-Y., Drescher, K.M., Chen, X.-M. (2012). miR-16 Targets Transcriptional Corepressor SMRT and Modulates NF-kappaB-Regulated Transactivation of Interleukin-8 Gene. *PLoS ONE*. 7.
- Zhu, Y., Jiang, Q., Lou, X., Ji, X., Wen, Z., Wu, J., et al. (2012). MicroRNAs Up-Regulated by CagA of *Helicobacter pylori* Induce Intestinal Metaplasia of Gastric Epithelial Cells. *PLoS ONE*. 7. e35147.