



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**Cambios morfológicos y expresión de RORyt y
UBR5 en células mononucleares humanas
infectadas con *H. pylori***

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

Q.B.P. Mónica Bibiano Pérez

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Gloria Fernández Tilapa

CO-DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Hilda Jiménez Wences

Chilpancingo de los Bravo, Gro., enero 2020

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

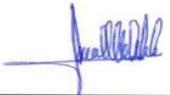
ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 22 días del mes de noviembre de dos mil diecinueve se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Cambios morfológicos y expresión de RORyt y UBR5 en células mononucleares humanas infectadas con *Helicobacter pylori*", presentada por la alumna Mónica Bibiano Pérez, 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



Dra. Hilda Jiménez Wences
Codirección de tesis



Dr. Oscar del Moral Hernández



Dra. Verónica Iranzú Martínez Santos

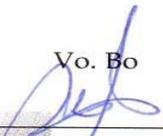


Dr. Francisco Avilés Jiménez

Vo. Bo

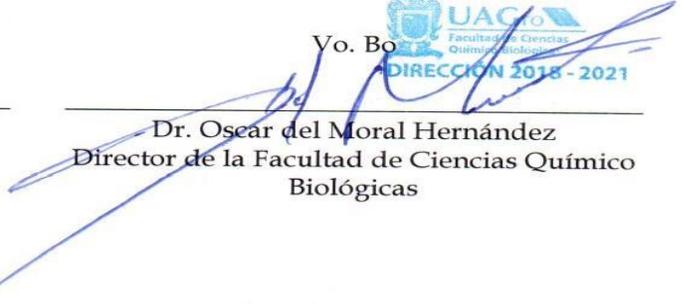
Vo. Bo


UAGro
FCQB: Coordinación de
Maestría en Ciencias
Biomédicas
DIRECCIÓN 2018 - 2021



Dr. Daniel Hernández Sotelo
Coordinador de la Maestría en Ciencias
Biomédicas


UAGro
Facultad de Ciencias
Químico Biológicas
DIRECCIÓN 2018 - 2021



Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación Clínica, en el Laboratorio de Investigación en Bacteriología y el Laboratorio de Investigación en Biomoléculas de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro).

Bajo la dirección de:

Dra. Gloria Fernández Tilapa

Codirección de:

Dra. Hilda Jiménez Wences

Asesoría externa de:

Dr. Francisco Jiménez Avilés

Y con la asesoría de:

Dra. Verónica Irazú Martínez Santos

Dr. Oscar del Moral Hernández

El proyecto se realizó en colaboración con **el M en C. Carlos Alberto Castañón Sánchez**, Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca, Oax.

La investigación se realizó con financiamiento otorgado por la Universidad Autónoma de Guerrero, Convocatoria para el financiamiento de Proyectos de Investigación SEMILLA 2018, al proyecto **Ubiquitinación de RORyt en la regulación de la respuesta Th17 a *Helicobacter pylori* por células mononucleares humanas** y con recursos otorgados por la secretaria de Educación Pública, a través del Programa de Fortalecimiento de la calidad Educativa (PFCE) 2016-2018 al cuerpo Académico Agentes Infecciosos y Cáncer (Consolidado, UAGro-CA194).

Durante el periodo en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas de la Q.B.P. Mónica Bibiano Pérez recibió la beca (No. 85771) otorgada por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** del Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

Dra. Gloria Fernández Tilapa, gracias por haberme brindado la oportunidad y la confianza, por ser un gran ejemplo de compromiso, trabajo, honestidad, liderazgo y amabilidad. Gracias infinitas por ser mi motivación e impulsora académica.

Dra. Hilda Jiménez Wences, mi más sincero agradecimiento por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la concreción de este trabajo.

Dra. Verónica Irazú Martínez Santos, por la acertada orientación, el soporte y discusión crítica que me permitió un buen aprovechamiento en el trabajo realizado.

Dr. Francisco Avilés Jiménez, por la importante colaboración en el desarrollo del trabajo de tesis, por sus aportaciones y por el invaluable tiempo y apoyo.

Dr. Oscar del Moral Hernández, agradezco sus aportaciones al trabajo, por el interés, tiempo y asesoría en el desarrollo profesional.

Dr. Miguel Ángel Mendoza Catalán y Dra. Dinorah Nashely Martínez Carrillo, gracias infinitas por compartir en todo momento el conocimiento científico.

Q.F.B. Nikandra Sofía Mora Miranda, quien aceptó colaborar como donador en la toma de muestra, por su disposición, interés y amabilidad.

A mis amigos y compañeros de Laboratorio.

Dedico este proyecto a:

Mi madre, eres el motor e inspiración, la razón por la que quiero que alguien este orgulloso de mi. Gracias por brindarme tu apoyo incondicional, por tu cariño y amor. **TE AMO.**

Mi padre, te dedico el fruto de NUESTRO esfuerzo, y te agradezco por estar conmigo siempre, por tu cariño, asesoría, consejos y alegría. Solo busco retribuir un poquito de todo lo que me has enseñado. **TE AMO PAPI.**

Mis hermanos Fernanda y Marcos, gracias por estar conmigo durante todo este proceso, por escucharme, por entenderme, por hacerme reír cada que sentía que las cosas no iban bien ¡Por que los amo!

**Cambios morfológicos y expresión de ROR γ t y
UBR5 en células mononucleares humanas
infectadas con *H. pylori***

ÍNDICE

Contenido	Pág.
Resumen	I
Abstract	II
Introducción	1
Material y métodos	5
Resultados	9
Discusión	17
Conclusiones	20
Anexos	21
Referencias	25

Resumen

Antecedentes: La infección por *H. pylori* induce alteraciones morfológicas de células epiteliales gástricas, infiltración de células mononucleares e incremento en el número de células Th17. El incremento de IL-17A es el resultado de la activación del factor de transcripción ROR γ t, el cual es postraduccionalmente regulado por UBR5. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la infección con cepas de *H. pylori* de diferente genotipo *vacA/cagA* sobre la morfología de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC's) y la relación entre los niveles de UBR5 y ROR γ t. **Métodos:** Las PBMC's fueron infectadas con 3 cepas de *H. pylori*; la cepa 26695 (genotipo *vacA s1m1/cagA*⁺), TX30 (genotipo *vacA s2m2/cagA*⁻) y la cepa 26695 Δ *cagA* (genotipo *vacA s1m1/\Delta cagA*). Los cambios en la morfología de las PBMC's en respuesta a la infección por *H. pylori* se determinaron por inmunofluorescencia debida a la tinción de F-actina con Faloidina rodaminada. La expresión de las proteínas ROR γ t y UBR5 en PBMC's infectadas y no infectadas con *H. pylori* se determinó por "Western Blot". **Resultados:** Las cepas de *H. pylori* 26695, TX30 y Δ *cagA* inducen cambios morfológicos en PBMC's a partir de las 6 h de infección. La severidad en los cambios morfológicos es más evidente en PBMC's infectadas con la cepa 26695 de *H. pylori*. La expresión de ROR γ t incrementó significativamente a las 24 h ($p=0.0317$) y disminuyó a las 48 h ($p=0.0230$) en PBMC's infectadas con la cepa TX30. En PBMC's infectadas con la cepa 26695 la expresión de ROR γ t incrementó a las 24 h, sin embargo, este cambio no fue significativo, y disminuyó significativamente ($p=0.0120$) a las 48 h. No se observaron cambios en la expresión de ROR γ t en PBMC's infectadas con la cepa Δ *cagA*. No se logró detectar la proteína UBR5 en PBMC's infectadas. **Conclusiones:** Los resultados sugieren que los cambios en la morfología de las PBMC's infectadas con *H. pylori*, es dependiente de la citotoxina CagA. La cepa de *H. pylori* TX30 incrementa la expresión de ROR γ t en PBMC's.

Abstract

Background: *H. pylori* infection induces morphological alterations of gastric epithelial cells, infiltration of mononuclear cells and increase in the number of Th17 cells. Reported data show an increase in IL-17A due to the activation of the ROR γ t transcription factor, which is post-translationally regulated by UBR5. The aim of this work was to evaluate the effect of infection with *H. pylori* strains of different *vacA/cagA* genotype on the morphology of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC's) and the relationship between UBR5 and ROR γ t levels. **Methods:** PBMC's were infected with 3 strains of *H. pylori*; strain 26695 (genotype *vacA s1m1/cagA* +), TX30 (genotype *vacA s2m2/cagA*-) and strain 26695 Δ *cagA* (genotype *vacA s1m1 / \Delta**cagA*). Changes in the morphology of PBMC's in response to *H. pylori* infection were determined by immunofluorescence due to staining of F-actin with rhodaminated Faloidine. The expression of the ROR γ t and UBR5 proteins in PBMC's infected and not infected with *H. pylori* was determined by "Western Blot". **Results:** The strains of *H. pylori* 26695, TX30 and Δ *cagA* induce morphological changes in PBMC's after 6 h of infection. The severity of morphological changes is more evident in PBMC's infected with *H. pylori* strain 26695. ROR γ t expression increased significantly at 24 h ($p = 0.0317$) and decreased at 48 h ($p = 0.0230$) in PBMC's infected with strain TX30. In PBMC's infected with strain 26695, the expression of ROR γ t increased at 24 h, however, this change was not significant, and decreased significantly ($p = 0.0120$) at 48 h. No changes in ROR γ t expression were observed in PBMC's infected with the Δ *cagA* strain. The UBR5 protein was not detected in infected PBMC's. **Conclusions:** The results suggest that the changes in the morphology of PBMC's infected with *H. pylori*, is dependent on the cytotoxin CagA. The strain of *H. pylori* TX30 increases the expression of ROR γ t in PBMC's.

Introducción

La infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una de las más comunes en los humanos. La infección crónica inducida por esta bacteria puede evolucionar a úlcera péptica, gastritis y cáncer gástrico, sin embargo, no todos los infectados desarrollan enfermedades gastrointestinales graves. El resultado clínico de la infección está determinado por la interacción entre los factores de virulencia de la bacteria, los factores ambientales y los factores genéticos del hospedero (Kronsteiner *et al.*, 2016). Durante el curso de la infección, los factores de virulencia de *H. pylori* influyen en la activación de la respuesta inmune.

Las cepas de *H. pylori* se clasifican de acuerdo a la presencia de la citotoxina asociada al gen A (CagA) y a la diversidad en la secuencia de los alelos del gen que codifica para la citotoxina vacuolizante A (VacA). Las cepas de *H. pylori* con genotipo *vacA s1m1/cagA+* son más virulentas que las cepas con genotipo *vacA s2m2/cagA-*. (Yong *et al.*, 2015) (Jones *et al.*, 2010). VacA y CagA dañan la barrera epitelial del estómago por ruptura de uniones estrechas, seguido de la activación de las células inmunes reclutadas al sitio de la infección, entre ellas monocitos, macrófagos y linfocitos (Figueiredo *et al.*, 2014). Así, VacA alcanza la submucosa e interactúa con leucocitos polimorfonucleares (PMN), linfocitos B y T (Oktem-Okullu *et al.*, 2015), mientras que CagA se trasloca a células dendríticas, linfocitos, células epiteliales gástricas y a macrófagos humanos (Bagheri *et al.*, 2015). Estos efectos inducidos por ambas citotoxinas pueden estimular inflamación, transformación celular, proliferación y cambios en la morfología y polaridad de células epiteliales (Alzahrani *et al.*, 2014, D'Elíos & Czinn, 2014, Posselt, 2013). Durante la respuesta inflamatoria, diversos factores de virulencia de *H. pylori* inducen la activación del factor de transcripción NF- κ B, que modula la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α (Gong *et al.*, 2016). La comunicación entre células infiltrantes y células epiteliales está mediada por IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8, IFN- γ , e IL-17A, que crean un medio inflamatorio característico de la infección por *H. pylori*, que estimula una respuesta celular T específica (Adamsson *et al.*, 2017).

H. pylori activa la respuesta inmune innata y adaptativa en el entorno gástrico (Arachchi *et al.*, 2017). La respuesta de células Th2 tiene un efecto protector, mientras que el aumento de células Th1 se relaciona con gastritis y otras patologías inducidas por *H. pylori*; sin embargo, la respuesta Th1 es insuficiente para explicar la patogénesis de las enfermedades gástricas inducidas por la bacteria. Actualmente se propone que la inmunidad contra *H. pylori* está relacionada también con la activación de la respuesta Th17, que actúa en sinergia con las células Th1 (Arachchi *et al.*, 2017), y la activación de las células T reguladoras como estrategia principal utilizada para modular las respuestas inflamatorias, lo que puede provocar la persistencia del patógeno y puede conducir a enfermedades gastrointestinales graves, incluido el cáncer (Figueiredo *et al.*, 2014). Las células Th17 participan en la inmunidad a infecciones contra patógenos extracelulares (Arachchi *et al.*, 2017), y contribuyen a la erradicación de *H. pylori*. Una mayor proporción de células Th17 baja la densidad bacteriana, pero daña de forma más severa el tejido gástrico (Gong *et al.*, 2016). Las células Th17 inducen la expresión de citocinas proinflamatorias, como IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 e IL-23, contribuyendo así a la expansión de la respuesta inflamatoria, mediante el reclutamiento y activación de neutrófilos y macrófagos que participan en la eliminación de la bacteria (Wilson *et al.*, 2007). La diferenciación de células T0 a Th17 inicia con el estímulo de IL-6, secretada por células dendríticas, seguido de las señales activadas por TGF- β 1, CCL20 e IL-23, y se consolida con la activación del factor de transcripción y transductor de señal (STAT3) y del factor de transcripción relacionado al ácido retinoico gamma-t (ROR γ t) (Wilson *et al.*, 2007). ROR γ t es un factor de transcripción clave para la diferenciación de células Th17, forma parte de la familia de receptores nucleares (NR), que regulan la expresión de genes de manera ligando dependiente (Rechavi *et al.*, 2003). La expresión del mRNA de ROR γ t se ha detectado exclusivamente en tejido y células de tipo linfóide (He *et al.*, 1998). En condiciones normales, es bajo el número de células Th17 que expresan ROR γ t, y un aumento en su número se relaciona con condiciones inflamatorias (Wacleche *et al.*, 2017) e infecciones por patógenos extracelulares (Castro *et al.*, 2017). La expresión de ROR γ t puede ser regulada de forma transcripcional, a través de factores de transcripción como USF1

y USF2 (factores estimuladores de la transcripción río arriba) y por activación de STAT3 (Cells *et al.*, 2014; Martínez *et al.* 2008). Postranscripcionalmente, por algunos microRNAs (miRNAs) que regulan el nivel de mRNA de ROR γ t y por lo tanto, modulan la diferenciación de las células Th17 (Hu *et al.*, 2013; Naghavian *et al.*, 2015); y por procesos de regulación postraduccional (PTMs), como la prenilación, fosforilación, citrulinación, carbamilación y ubiquitinación, definidos como mecanismos habituales que modulan el funcionamiento normal de las proteínas (Layman & Oliver, 2016). Sin embargo, a pesar de su importancia en la función y diferenciación de células Th17, se sabe poco acerca de las enzimas que regulan postraduccionalmente a ROR γ t.

Se ha reportado que la poliubiquitinación de ROR γ t conlleva a su degradación (Rutz *et al.*, 2016). La ubiquitinación es un proceso de marcaje selectivo a proteínas blanco o sustratos con moléculas de ubiquitina, que regularmente se relaciona con la degradación de proteínas vía proteasoma (Layman & Oliver, 2016). Este proceso enzimático involucra a tres clases de enzimas, E1, E2 y E3, que catalizan la conjugación covalente de proteínas sustrato específico con ubiquitina, y promueven la formación de cadenas de poliubiquitina a través de uno de los siete residuos de lisina accesibles Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 y Lys63, cada uno de estos residuos puede ser un punto de unión para cadenas de ubiquitina. Existen 3 formas de ubiquitinación, la monoubiquitinación, multi-monoubiquitinación y poliubiquitinación. En la monoubiquitinación y multi-monoubiquitinación, una molécula de ubiquitina típicamente es activada mediante la formación de un enlace covalente en un residuo de glicina en su extremo carboxilo terminal, mientras que la poliubiquitinación consiste en la formación de polímeros de ubiquitina en las lisinas 48 y 63 de la proteína y, generalmente conduce a la degradación de proteínas vía proteasoma (Sadowski *et al.*, 2010). Una cadena conformada por cuatro moléculas de ubiquitina es la señal mínima que media la degradación de una proteína (Ikeda *et al.*, 2008). Diversas enzimas de tipo E3 ligasas del sistema de ubiquitinación participan en la diferenciación de la estirpe celular Th17 a través de la degradación de proteínas involucradas en la respuesta inmune, desactivando así la señalización de IL17 (Zhong *et al.*, 2012).

La proteína con dominio PDZ-LIM (PDLIM2) es una ubiquitina ligasa nuclear que suprime la cascada de señalización mediada por STAT3 e inhibe la respuesta inflamatoria de células Th17 (Tanaka *et al.*, 2011). La ubiquitina de proteasa específica 25 (USP25) es un regulador negativo de la señalización mediada por IL-17 debido a que marca a los factores 5 y 6 asociados al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF5 y TRAF6) para su degradación vía proteasoma (Zhongdong Xie *et al.*, 2017). Así mismo, Rutz *et al.*, (2015) reportaron que UBR5 es una E3 ligasa que ubiquitina a ROR γ t en el residuo Lys 48 para su degradación vía proteasoma. Durante la participación de UBR5 en el marcaje de ROR γ t, la deubiquitinasa (DUB) relacionada a tumor de ovario (DUBA) media la estabilidad de UBR5 promoviendo la degradación del factor de transcripción. A través de RNAs interferentes de UBR5 y DUBA, observaron que tras la eliminación de ambos genes se incrementa la expresión de IL-17A y la producción de ROR γ t en células Th17 (Rutz *et al.*, 2015; Layman & Oliver, 2016). Cuando DUBA deubiquitina a UBR5 lo rescata de la degradación, entonces UBR5 queda libre para poliubiquitar a ROR γ t y en consecuencia, se inhibe la diferenciación de células Th17 y disminuyen los niveles de expresión de IL17A (Yang *et al.*, 2014; Rutz *et al.*, 2015).

La infección por *H. pylori* inicia tras el contacto de las células epiteliales con la bacteria y durante este proceso células inmunitarias infiltrantes participan modulando la expresión de citocinas que regulan la respuesta inmunológica contra *H. pylori*. Datos reportados muestran que las citotoxinas CagA y VacA inducen incremento de IL-17A en el antro gástrico (Marshall & Windsor, 2005). Por activación del factor de transcripción ROR γ t que es postraduccionalmente regulado por UBR5 (Rutz *et al.*, 2015). El aumento en la expresión de IL-17A en una infección por *H. pylori* puede ser el resultado de la disminución de UBR5. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la infección con cepas de *H. pylori* de diferente genotipo *vacA/cagA* sobre la viabilidad y morfología de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC's) y la relación entre los niveles de UBR5 y ROR γ t.

Material y métodos

Selección de donadores de sangre periférica

Se seleccionaron hombres y mujeres de entre 19 a 23 años, a quienes se les aplicó un cuestionario para obtener datos personales e información de salud. Se preseleccionaron aquellos que no referían síntomas de patología gástrica, sin antecedentes de dispepsias y sin indicios de infección por *H. pylori*. Se excluyeron a quienes habían recibido tratamiento con antibióticos, antivirales o antiinflamatorios una semana antes de la toma de muestra. A los candidatos se les solicitó una muestra de heces, para detección de antígenos de *H. pylori* por inmunoensayo cromatográfico (ONE STEP *Helicobacter pylori* CARD TEST, California, USA) y se les solicitó firmar una carta de consentimiento informado. Un sujeto de sexo femenino que resultó negativo para la infección por *H. pylori* fue elegido como donador de sangre periférica.

Aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre periférica

Se obtuvieron 12 mL de sangre venosa después de 8 a 12 h de ayuno. Las PBMC's se separaron mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll Histopaque (1077-Sigma Aldrich, Missouri, USA). Se cultivaron 5×10^5 células por pocillo en placas de doce pozos, con medio RPMI-1640 (R6504-Sigma Aldrich, Missouri, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), (Gibco, Massachusetts, USA). Las células se incubaron a 37°C en atmósfera humidificada, con 5% de CO₂ por 24 h. Las PBMC' se cultivaron por triplicado en tres tiempos independientes.

Cepas y condiciones del cultivo bacteriano

Para infectar a las PBMC's se utilizaron las cepas de *H. pylori* ATCC 26695 con genotipo *vacA* s1m1/*cagA*+ (aislada de un paciente con gastritis cónica), la cepa Hp 8822 (TX30) con genotipo *vacA* s2m2/*cagA*- y la cepa 26695 Δ *cagA* con genotipo *vacA* s1m1/ Δ *cagA*, la cual deriva de la cepa 26695 de *H. pylori* pero se le eliminó

la región central del gen *cagA* y se introdujo el casete de resistencia a cloranfenicol (cepa donada por el Dr. Miguel Ángel de la Cruz, CMN Siglo XXI. IMSS.)

Todas las cepas de *Helicobacter. pylori* fueron sembradas en medio Agar Columbia modificado (Becton Dickinson, North Caroline, USA), adicionado con 10% de sangre de carnero, enriquecimiento IsoVitaleX y suplemento selectivo de *Helicobacter pylori* Dent (10 mg/L de vancomicina, 5 mg/L de trimetoprima, 5 mg/L de cefsulodina, 5 mg/L de anfotericina B) (Oxoid Basingstoke, Reino Unido) a pH 6.8-7.0 e incubadas a 37°C con 5% de O₂ y 10% CO₂ durante 3 días.

Viabilidad celular

Con el fin de valorar el efecto que tiene *H. pylori* sobre el número de PBMC's vivas, se realizó un ensayo de viabilidad de tipo curso temporal mediante el método de exclusión del colorante azul de tripano. Las células fueron sembradas en placas de doce pozos a una densidad de 5×10^5 células e incubadas por 24 h. Después fueron infectadas con *H. pylori* en una proporción bacteria/célula de 100:1 e incubadas a 37°C con 5% de CO₂ por 0, 6, 12, 18, 24 y 48 h. Las células se colectaron en tubos Eppendorf, se tomaron 10 µL de la suspensión que se mezcló con 10 µL de azul de tripano para realizar el conteo celular a través de una cámara de Neubauer para identificar células viables. Adicionalmente se tomaron 25 µL de la suspensión celular para hacer extendidos que se tiñeron con Wright para corroborar ausencia de leucocitos polimorfonucleares.

Infección de células mononucleares con *H. pylori*

Para determinar el efecto de la infección por *H. pylori* sobre los cambios morfológicos celulares y la expresión de las proteínas UBR5 y RORyt, las PBMC's fueron sembradas en placas de doce pozos a una densidad de 5×10^5 células. Para la preparación de los inóculos bacterianos se utilizó el patrón de turbidez de McFarland 0,5 (escala 1×10^8), en medio de cultivo RPMI libre de antibióticos. Las PBMC's fueron infectadas con *H. pylori* en una proporción bacteria/célula de 100:1. Se utilizó como control células sin infección. Las PBMC's se incubaron a 37°C en

atmósfera húmeda con 5% de CO₂ por 24 y 48 h. Las células fueron cosechadas después de la infección con *H. pylori*.

Viabilidad bacteriana

De los cultivos de PBMC's infectadas con *H. pylori* se tomaron 25 µL de suspensión, se sembraron en placas de agar Columbia y se incubaron en las condiciones descritas previamente, con el propósito de verificar la viabilidad de *H. pylori*. La morfología de *H. pylori* se verificó con tinción de Gram.

Obtención de proteínas

Las células cosechadas fueron centrifugadas a 3,000 rpm durante 3 min. Se separó el sobrenadante y se añadieron 200 µL de buffer de lisis RIPA (NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, deoxicolato de sodio 1%, EDTA 5 mM y HEPES 50 mM pH 7.5), adicionado con inhibidores de fosfatasa y proteasas al pellet celular. El sobrenadante del extracto total fue colectado y centrifugado a 13,200 rpm por 10 min a 4°C. La concentración total de proteína se determinó por el método de BCA.

“Western Blot”

Se separaron 10 µg de proteínas totales mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 16% y 14%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU), durante 105 min en buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, 0.03% SDS, pH 8.3). Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con leche baja en grasa al 5% en TBST-Tween 20 a temperatura ambiente durante 24 h. La detección de RORγt se realizó con el anticuerpo primario monoclonal de conejo específico para la isoforma RORγt (anti-ROR gamma antibody [EPR20006] (Cat#ab201082; 1:1500) Abcam, Cambridge, EE. UU), UBR5 se detectó con un anticuerpo monoclonal de conejo anti-UBR5 D6O8Z, Rabbit mAb (Cat #65344; 1; 1000) Cell Signaling, Massachusetts, EE. UU.), durante toda la noche a 4°C, en agitación constante. Después las membranas se lavaron 5 veces con 3 mL de TBST-Tween 1X por 5 min, y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo Anti-IgG-HRP 1:2000 (Cell Signalling,

Massachusetts, EE.UU.) durante 2 h a temperatura ambiente. Como control de carga se detectó GAPDH, usando el anticuerpo monoclonal anti-GAPDH (14C10) Rabbit mAb (Cat #2118; 1:2000) (Cell Signaling, Massachusetts, EE. UU.). Las membranas fueron lavadas durante 5 min y se revelaron usando el kit de bioluminiscencia Chemiluminescent HRP Substrate (Milipore, California, EE. UU) y se observaron en un equipo de quimioluminiscencia ChemiDoc MP System (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU). La intensidad de las bandas se analizó mediante el software Image Lab (V.6.0).

Para confirmar que la falta de detección de UBR5 en PBMC's no fuera debido a problemas técnicos se determinó la expresión de UBR5 en células AGS, observando la expresión de la proteína.

Ensayo de Fluorescencia de F-actina

Las PBMC's infectadas y no infectadas con *H. pylori* fueron colocadas en un portaobjetos de vidrio, se fijaron y permeabilizaron con formaldehído al 4% Tritón X-100 al 0.5% en PBS 1x por 5 min. Las células fueron incubadas con una dilución 1:1500 de Faloidina rodaminada (#R415, Thermo Fisher Scientific, Eugene, Oregon, USA.) durante 30 min a 37°C para detectar los filamentos de actina. Las muestras fueron incubadas con DAPI para teñir el DNA (Invitrogen, P-36931, Carlsbad, CA USA) y se visualizaron en el equipo Olympus BX43 microscope.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se hizo utilizando el programa estadístico STATA 13.0. La comparación de medias o medianas de los niveles de expresión para UBR5 y ROR γ t se determinó con t de Student, Mann- Witney, ANOVA o Kruskal- Wallis según fue el caso. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

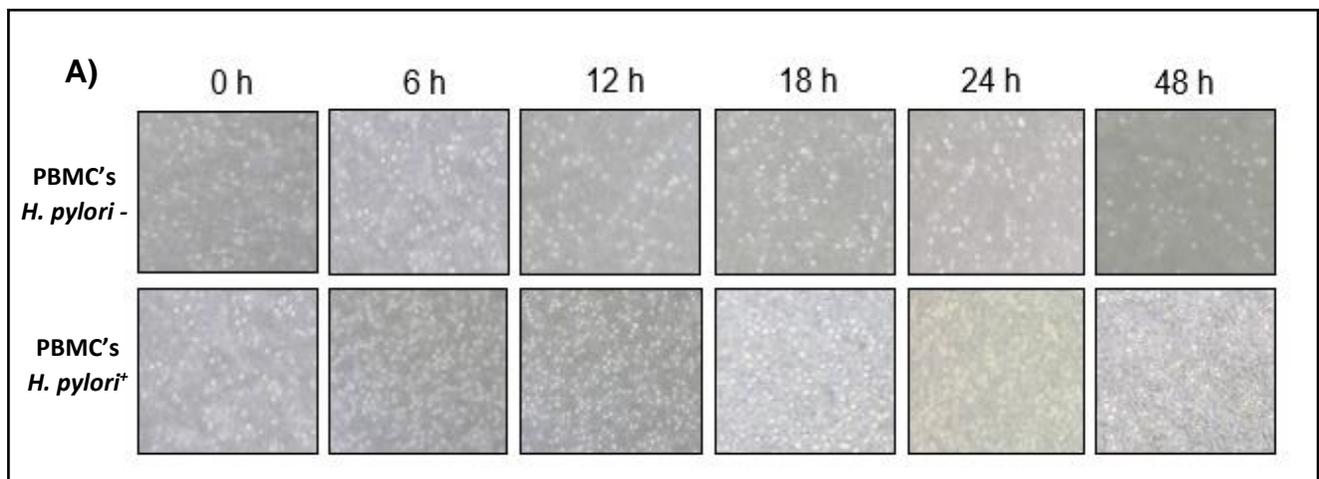
Resultados

Donadores de células mononucleares de sangre periférica

Se encuestaron 46 personas aparentemente sanas con edad promedio de 21 años, e intervalo de 19 a 23. De los sujetos encuestados, 20 no tenían síntomas ni diagnóstico de gastritis (Anexo 1 y 2). De los 20 sujetos, 16 informaron no tener familiares que padecieran de alguna enfermedad gástrica y fueron preseleccionados para la detección de antígenos contra *H. pylori*. De éstos, nueve resultaron positivos a la infección por *H. pylori* y fueron descartados del estudio, siete sujetos fueron negativos a la infección por la bacteria y seleccionados como posibles donadores. Finalmente, un sujeto fue seleccionado para la extracción y donación de sangre periférica.

Viabilidad de PBMC's

Para determinar la sobrevivencia de las PBMC's en el cultivo, después de la infección con la cepa de *H. pylori* ATCC 26695 (*vacA* s1m1/*cagA*+), analizamos el efecto de *H. pylori* sobre la viabilidad celular durante 48 h. El número de células incremento a partir de las 6 h postinfección (7.1×10^5) en comparación con las células sin *H. pylori* (5.5×10^5), y este incremento fue gradual hasta las 24 h de co-cultivo con la bacteria (Figura 1A y B).



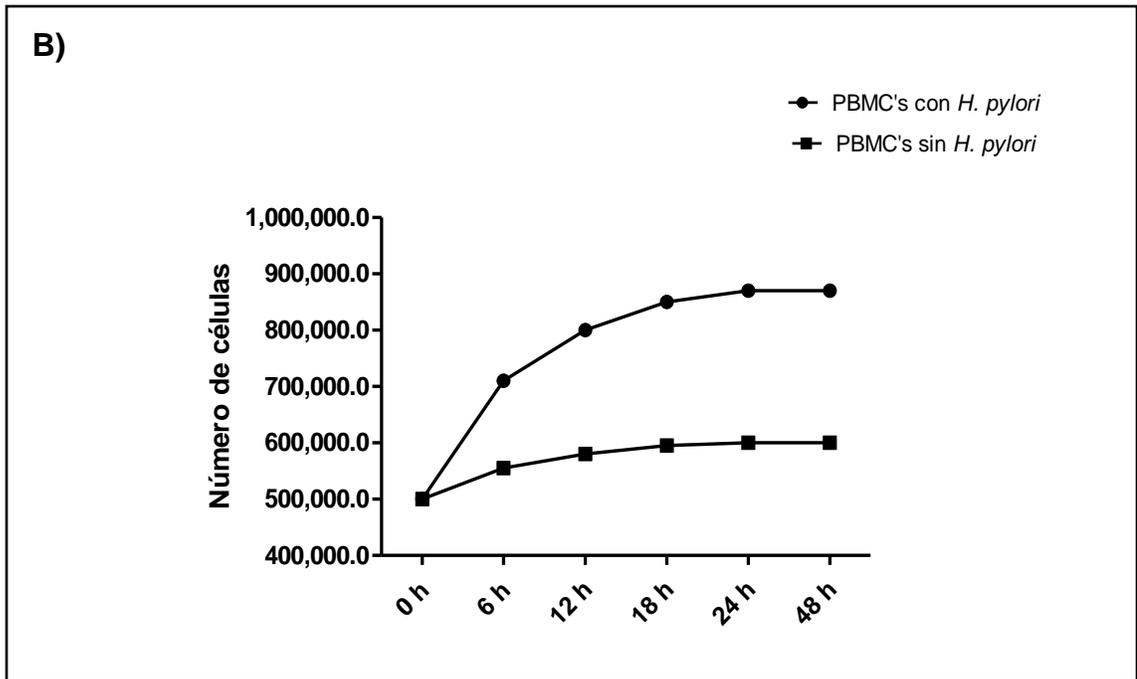


Figura 1. *H. pylori* induce proliferación celular. 5×10^5 células fueron sembradas para el ensayo de infección curso temporal. **A)** PBMC's cultivadas en presencia o en ausencia de *H. pylori*. Las fotografías fueron tomadas con la cámara VELAB MICROSCOPES INC. 22W364 Glen Ellyn, IL 60137, USA y observadas a 40x. **B)** Cuantificación de células viables infectadas y no infectadas por *H. pylori*. El número de células fue determinado usando el método de exclusión por azul de tripano. Se cuantificaron células viables (sin teñir), después de las 6, 12, 18, 24 y 48 h post infección con *H. pylori* ATCC 26695.

Crecimiento y viabilidad de *H. pylori* postinfección

Con el propósito de evidenciar la supervivencia, viabilidad y la conservación de la morfología de *H. pylori* 26695 en los diferentes tiempos de co-cultivo con las PBMC's, una alícuota del medio RPMI con bacterias suspendidas se sembró en agar Columbia y se incubó durante 48 h. En todos los tiempos de co-cultivo se observó crecimiento de *H. pylori* sobre el medio, lo que demostró que la bacteria se mantiene viable (Figura 2A). Para comprobar que *H. pylori* mantenía su forma bacilar durante el proceso de infección se hicieron extendidos de cada tiempo de cultivo y se tiñeron por la técnica de Gram. La presencia de *H. pylori* conserva su forma de bacilos cortos, Gram negativos hasta las 48 h. Así mismo, se logró observar un posible contacto de las bacterias con las células mononucleares (Figura 2B).

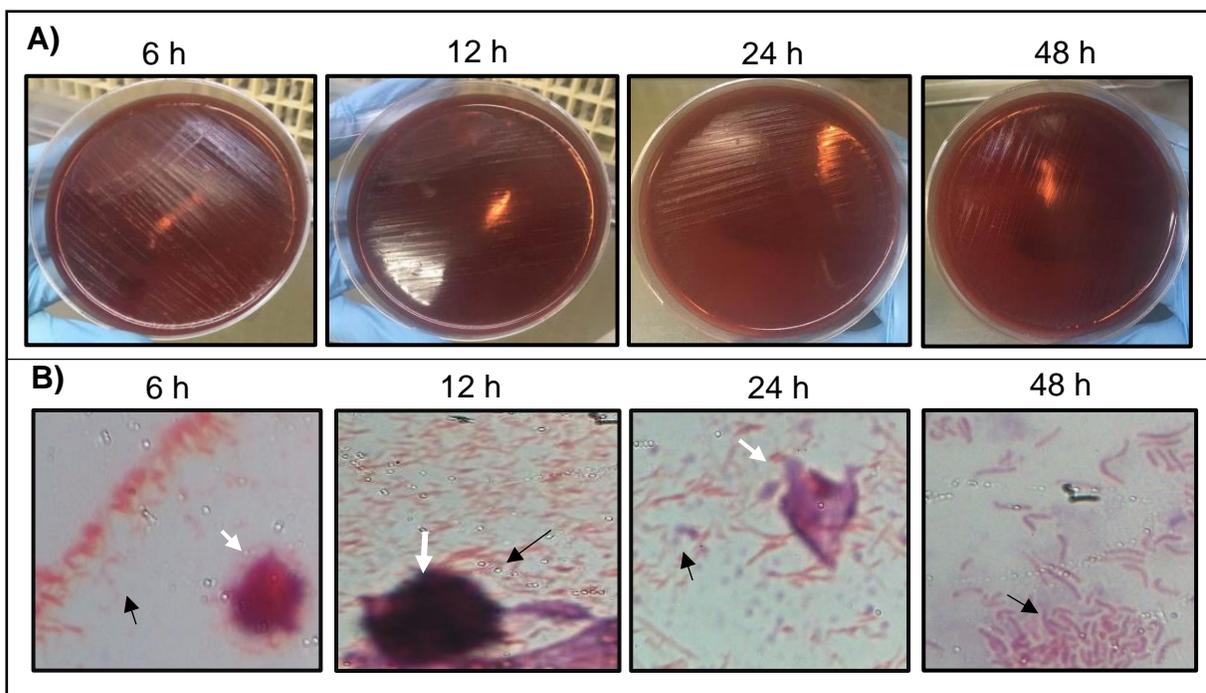


Figura 2. Viabilidad de *H. pylori* después del co-cultivo con PBMC's. A) Crecimiento de *H. pylori* 26695 en agar Columbia por cada tiempo de co-cultivo. B) De los co-cultivos de PBMC's con *H. pylori*, se obtuvo una muestra representativa de la suspensión para realizar la tinción de Gram al final de cada ensayo de infección. Las flechas negras señalan bacilos de *H. pylori* y las flechas blancas señalan células mononucleares. Las fotografías fueron tomadas con la cámara VELAB MICROSCOPES INC. 22W364 Glen Ellyn, IL 60137, USA y reveladas con el programa (Future WinJoe), observadas a 100x

Cambios morfológicos de PBMC's inducidos por *H. pylori*

Con el propósito de evaluar la interacción entre las diferentes cepas de *H. pylori* con las PBMC's, así como los efectos de esa interacción sobre la morfología celular, se marcaron los microfilamentos de actina del citoesqueleto con Faloidina, y el DNA con DAPI después de 6, 12, 24 y 48 h de co-cultivo (Figura 3). Las PBMC's que se cultivaron en ausencia de la bacteria mostraron una morfología redonda, sin protrusiones, con citoplasma y DNA organizado. Las PBMC's infectadas con las diferentes cepas de *H. pylori*, exhibían una morfología rugosa, no compacta, con poca definición del citoplasma y núcleo, después de las 6 hasta las 48 h de co-cultivo. Interesantemente, sólo se observó interacción entre las células mononucleares en aquellas PBMC's infectadas con *H. pylori* 26695 (*vacA* s1m1/*cagA*+) a las 6 h de infección (Figura 3).

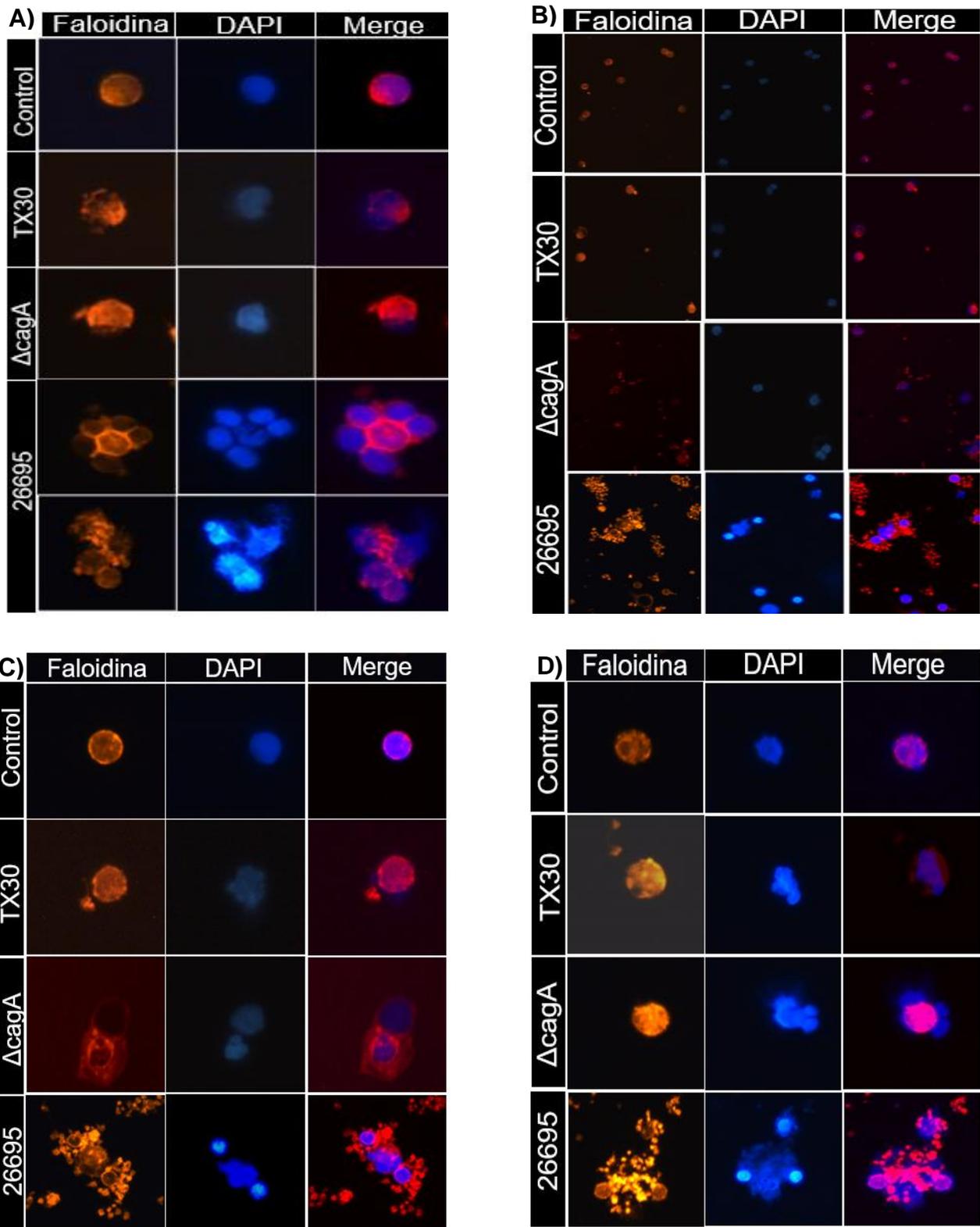
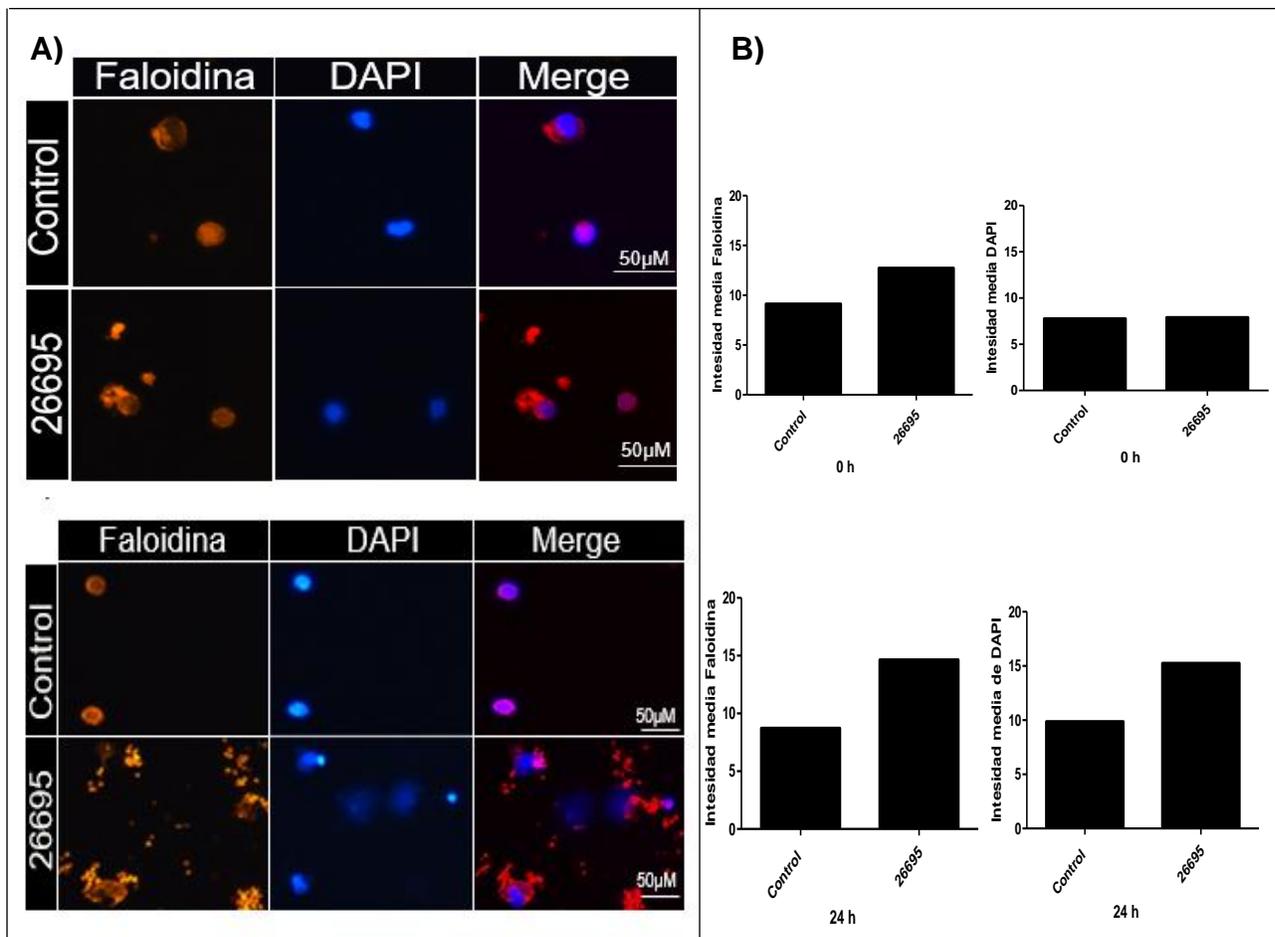


Figura 3. Tinción de F-actina en PBMC's infectadas y no infectadas con *H. pylori*. A) PBMC's a las 6 h post infección, B) PBMC's a las 12 h post infección. C) PBMC's a las 24 h post infección y, D) PBMC's a las 48 h post infección, con *H. pylori* TX30, Δ cagA y 26695. Los filamentos de actina se muestran en rojo y los núcleos en azul. Las fotografías fueron tomadas en el microscopio de fluorescencia convencional (Olympus BX43) y fueron observadas a 40x.

Adicionalmente, las PBMC's infectadas con la cepa 26695 (*vacA s1m1/cagA+*), se lisaron y perdieron por completo su forma, sufrieron cambios estructurales en la morfología nuclear y citoplasmática en comparación con aquellas células infectadas con las cepas TX30 y $\Delta cagA$ (genotipos *vacA s2m2/cagA-* y *vacA s1m1/\Delta cagA*, respectivamente) (Figura 4A). Para conocer la magnitud de las alteraciones morfológicas de las PBMC's a las 0, 24 y 48 h post infección con *H. pylori* 26695 (*vacA s1m1/cagA+*) cuantificamos la intensidad de la fluorescencia, con el fin de obtener una aproximación de los cambios en la organización del citoesqueleto de actina de PBMC's (Figura 4B). Las células co-cultivadas con *H. pylori* formaron múltiples estructuras citoplasmáticas, y se observaron modificaciones en los niveles de actina a las 24 h (14.626) y un incremento en la cantidad de DNA (15.239) en comparación con las células control (8.713 y 9.857, respectivamente).



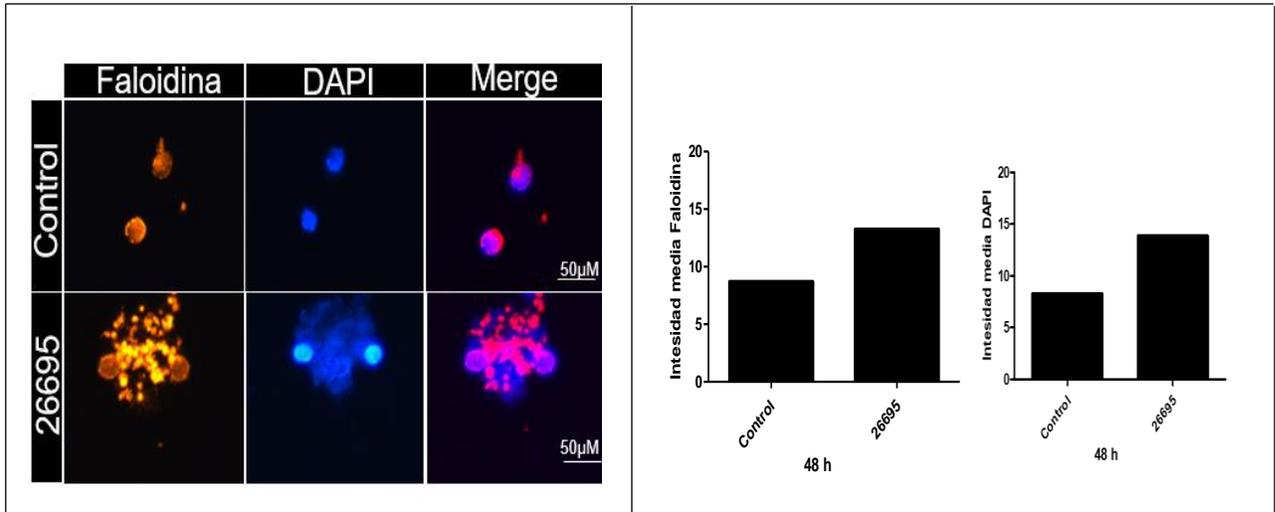


Figura 4. Análisis por microscopía de fluorescencia convencional de PBMC's. Microscopia de fluorescencia de PBMC's cultivadas durante 0, 24 y 48 h en ausencia de *H. pylori* (control) o en presencia de *H. pylori* 26695. A) Imágenes confocales de PBMC's infectadas y no infectadas. B) Análisis de los parámetros F-actina/DAPI, utilizados como criterios de referencia para evaluar modificaciones celulares de tipo estructura/función. Los filamentos de actina se muestran en rojo y los núcleos en azul. Las fotografías fueron tomadas en el microscopio de fluorescencia convencional (Olympus BX43) y observadas a 40x.

***H. pylori* y expresión de ROR γ t en PBMC's**

Para evaluar si la interacción entre las diferentes cepas de *H. pylori* con PBMC's modula la expresión de ROR γ t, analizamos la expresión de la proteína. Se observó un incremento significativo ($p=0.0317$) a las 24 h de co-cultivo con la cepa TX30 (*vacA* s2m2/*cagA*-), y una disminución de la expresión a las 48 h, siendo significativo para las cepas TX30 ($p=0.0230$) y *H. pylori* 26695 (*vacA* s1m1/*cagA*+) ($p=0.01202$) (Figura 5A). Así mismo, en células que fueron co-cultivadas con la cepa de *H. pylori* 26695 se observó un incremento no significativo en la expresión de ROR γ t a las 24 h y una disminución significativa a las 48 h con las cepas TX30 y 26695 (Figura 5B). Por otra parte, en PBMC's co-cultivadas con la cepa Δ *cagA* (*vacA* s1m1/ Δ *cagA*) no se encontraron cambios de la expresión de ROR γ t (Figuras 5A y B).

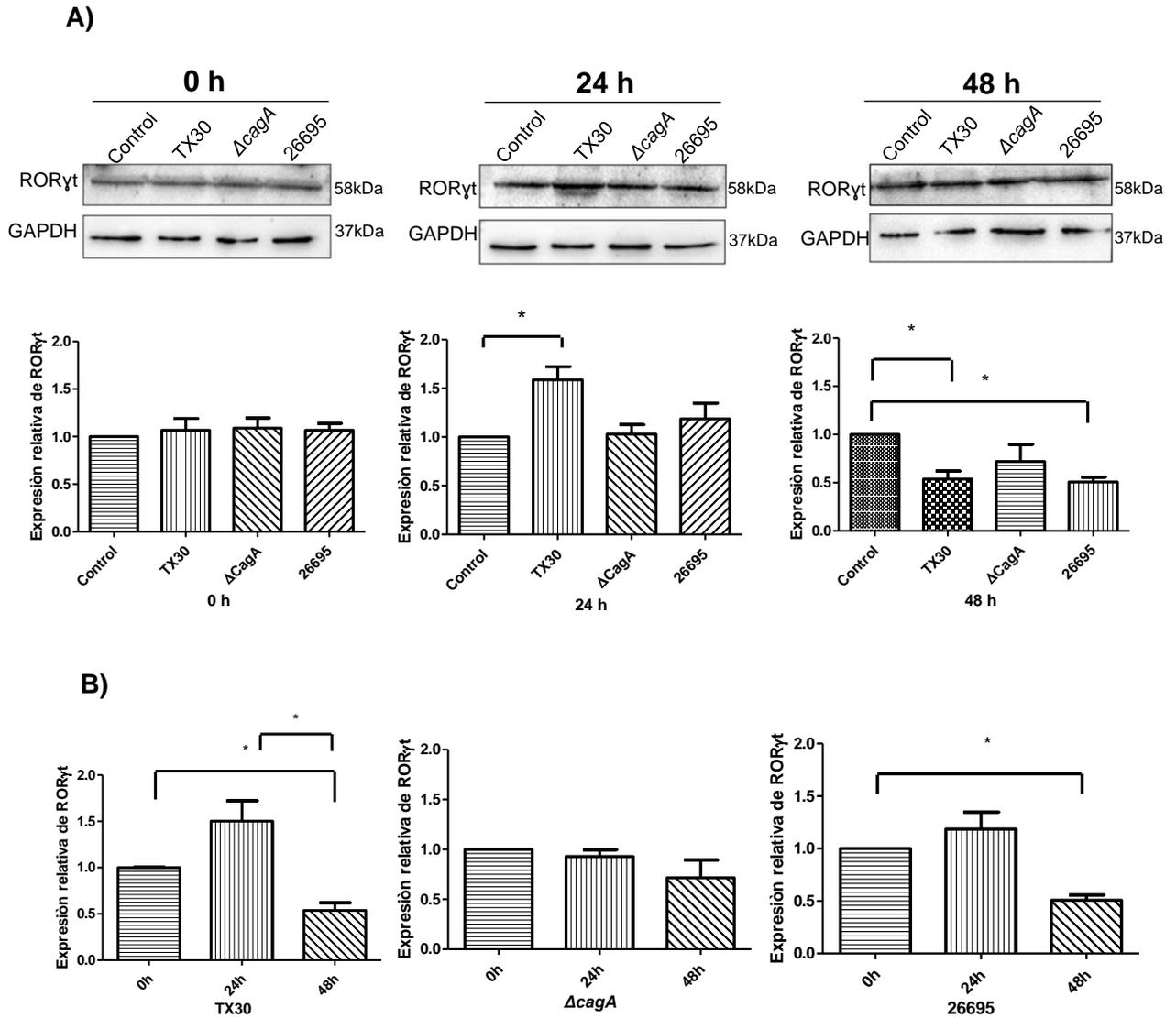


Figura 5. Expresión de RORyt en PBMC's infectadas y no infectadas con *H. pylori*. A). Se muestran las bandas correspondientes a RORyt y GAPDH obtenidas por "Western Blot" en PBMC's sin infección e infectadas con las distintas cepas de *H. pylori*, a las 0 h, 24 h y 48 h de infección. B). Grafica correspondiente a la densitometría de las bandas que muestra el nivel de expresión de RORyt en PBMC's infectadas con las distintas cepas a las 0, 24 y 48 h.

Expresión de UBR5 en células mononucleares infectadas con *H. pylori*.

Con el propósito de analizar si la expresión de RORyt correlacionaba con la expresión de UBR5, y si es modulado por la infección por *H. pylori* en PBMC's, se analizó mediante "Western Blot" la expresión de la proteína UBR5 a las 0, 24 y 48 h de co-cultivo con la bacteria (Figura 6). Se incluyeron células AGS (células de epitelio de adenocarcinoma gástrico), como un control positivo para la identificación de UBR5. Se logró la identificación de la proteína UBR5 con peso molecular de 300 kDa en células AGS, pero no en PBMC's. Únicamente, se detectó una banda con peso molecular de 150 kDa, en todas las PBMC's.

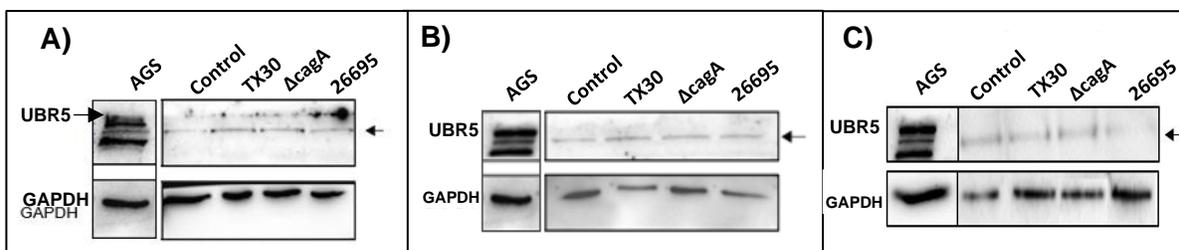


Figura 6. Expresión de UBR5 en PBMC's infectadas y no infectadas con *H. pylori*. Se valoró la expresión de la proteína UBR5 a las 0 h (A), 24 h (B) y 48 h (C) en PBMC's sin infección e infectadas con diferentes cepas de *H. pylori*. UBR5 se detectó por "Western Blot". El primer carril corresponde a la expresión de UBR5 en células AGS.

Discusión

H. pylori es una bacteria reconocida como agente causal de enfermedades gástricas y cáncer gástrico en humanos, a través de sus factores de virulencia que inducen apoptosis y proliferación de células epiteliales. Las células del sistema inmune aumentan significativamente en la mucosa gástrica infectada (Alzahrani *et al.*, 2014, D'Elíos & Czinn, 2014). En esta investigación nos interesamos en evaluar el efecto de la infección por *H. pylori* en PBMC's. Durante la valoración del modelo experimental, se encontró que la infección por la cepa de *H. pylori* ATCC 26695 (*vacA s1m1/cagA+*) en cultivo induce proliferación de las PBMC's, después de las 6 h y 24 h de co-cultivo. Este hecho puede deberse a que la proteína CagA de la cepa 26695 de *H. pylori* estimula la vía NF- κ B que interviene en la activación del ciclo celular, a través de la regulación positiva de la expresión de genes que incluyen citocinas como IL-2, que funciona como mitógeno para linfocitos y monocitos (Sokolova *et al.*, 2017). (Wang *et al.*, 2014). Adicionalmente, se ha reportado que la activación del TLR-4 por unión al lipopolisacárido (LPS) de *H. pylori* conlleva a la estimulación de NF- κ B, factor que modula la transcripción del gen que codifica para IL-2, (Lord *et al.*, 2000). En la mucosa gástrica del estómago humano, *H. pylori* tiene una morfología de bacilo en espiral y cuando crece en medios artificiales, la bacteria puede convertirse en coco, aquí encontramos que la bacteria conserva su forma y viabilidad hasta las 48 h de infección. Eaton *et al.*, 1995 estudiaron la virulencia de las formas cocoides y de las formas bacilares de *H. pylori*, y encontraron que de seis porcinos inoculados con formas cocoides ninguno mostró colonización, pero sí en todos los que fueron inoculados con la forma bacilar., Las formas cocoides de *H. pylori* tienen un nivel reducido de absorción de nutrientes y un metabolismo más lento, mientras que, las formas bacilares son fisiológicamente activas y conservan su capacidad infectiva y de virulencia. La infección sostenida por *H. pylori* produce alteraciones del citoesqueleto de células epiteliales, sin embargo, la severidad del daño también se relaciona con las distintas cepas de la bacteria (Ashorn *et al.*, 2000).

Hasta el momento no hay estudios que reporten cambios o alteraciones en la morfología de PBMC's infectadas con *H. pylori*. En el presente trabajo, se utilizaron tres diferentes cepas de la bacteria para caracterizar asimetrías morfológicas en PBMC's. Las células co-cultivadas con las tres cepas de *H. pylori* pierden la organización de su citoesqueleto a partir de las 6 h de infección. De manera peculiar, en PBMC's inoculadas con la cepa 26695 (*vacA s1m1/cagA+*) resaltan las modificaciones del citoesqueleto y los cambios estructurales asociados a la variación en los niveles de actina y DNA. Se ha documentado que las citotoxinas CagA y VacA son responsables de numerosas respuestas celulares, incluyendo el reordenamiento del citoesqueleto de actina a través de la activación de proteínas de la familia Rho GTPasa, que conducen a cambios morfológicos en células epiteliales, En un estudio realizado por Lynn *et al.*, 2000, demostraron que el LPS de *H. pylori* promueve cambios en la morfología de monocitos, a través de la activación de la cascada de señalización efectuada por la fosforilación de Pyk2. Las pocas evidencias sobre los cambios morfológicos de PBMC's debido a la infección por *H. pylori* nos exhorta a seguir indagando sobre los efectos que la bacteria puede tener en la forma y función de esas células. En PBMC's infectadas con la cepa 26695 (*vacA s1m1/cagA+*) de *H. pylori* se observó que a las 6 h de co-cultivo las PBMC's mantienen contacto de tipo célula-célula. La comunicación entre las células inmunes es una condición para efectuar la respuesta inmunológica; ya sea directamente a través del contacto intercelular o indirectamente, a través de la secreción de citocinas. La interacción física entre linfocitos T y células presentadoras de antígeno (APC), como los macrófagos es crítica para el inicio de la respuesta inmune (Burel *et al.*, 2019). Esto podría sugerir que en PBMC's co-cultivadas con *H. pylori* 26695, la interacción de tipo célula-célula podría contribuir a la activación de la respuesta inmune a través de la comunicación celular.

H. pylori es una bacteria extracelular con capacidad de activar la respuesta inmune de tipo Th17 a través de la estimulación del factor de transcripción ROR γ t (Wacleche *et al.*, 2017). Nuestros datos muestran que en PBMC's infectadas con la cepa TX30 (*vacA* s2m2/*cagA*-) de *H. pylori* incrementa la expresión de ROR γ t a las 24 h post infección ($p=0.0230$) y disminuye a las 48 h ($p=0.0230$). Por otra parte, la infección con las cepas 26695 Δ *cagA* (*vacA* s1m1/ Δ *cagA*) y 26695 (*vacA* s1m1/*cagA*+) induce disminución de la expresión de ROR γ t a las 48 h que solo fue significativa para la cepa 26695. En un estudio realizado por Torres *et al.*, 2007 en un modelo con PBMC's tratadas con la proteína VacA silvestre y células tratadas con una proteína mutante (VacA Δ 6-27), utilizadas como control, observaron que la intoxicación de PBMC's con VacA silvestre dio como resultado la inhibición de la proliferación de células T y B, en contraste a las células tratadas con VacA Δ 6-27. Esto podría sugerir que los efectos inhibitorios de la proliferación en células T reduce la actividad celular y por ende la diferenciación de células Th17.

La diferenciación de células del sistema inmune, esta modulada por proteínas cuya vida media está regulada por ubiquitinación. En un modelo experimental de linfocitos T CD4⁺ obtenidos de células mononucleares de ratón, se demostró que ROR γ t es poliubiquitinado por UBR5 (Rutz *et al.*, 2016). En este estudio no se logró detectar la expresión de UBR5 en PBMC's. Se ha reportado que cuando hay un aumento en la expresión de ROR γ t disminuye la expresión de UBR5. En nuestro estudio observamos la expresión de ROR γ t desde las 0 h hasta las 48 h, y es posible que este evento coexista con niveles indetectables de UBR5. Se ha relacionado el incremento en la expresión de UBR5 con la carcinogénesis; Panfil *et al.*, 2018 observaron un incremento en la expresión de UBR5 en células de linfoma de células T, pero no lograron detectar la expresión de la proteína en células T vírgenes aisladas de PBMC's. Los autores, sugieren que UBR5 no incrementa su expresión tempranamente durante la transformación celular. UBR5 se sobre expresa en cáncer de mama, de ovario y gástrico y han sido reportadas diversas mutaciones de la proteína (Meissner *et al.*, 2013). Aquí detectamos la expresión de ROR γ t, desde las 0 h de co-cultivo con *H. pylori*, por tanto, este hallazgo podría indicar que ROR γ t mantiene o incrementa su nivel, en ausencia o nivel mínimo de UBR5.

Conclusiones

1. La infección de PBMC's con la cepa 26695 (genotipo *vacA s1m1/cagA*⁺) de *H. pylori* induce proliferación de células mononucleares después de las 6 h post infección.
2. Las cepas de *H. pylori* TX30, Δ *cagA* y 26695 inducen cambios morfológicos en PBMC's a partir de las 6 h de infección observando cambios más evidentes con la cepa 26695. Estos cambios pueden deberse a la interacción y reconocimiento de proteínas de membrana externa de la bacteria por los receptores de las PBMC's.
3. La severidad en los cambios morfológicos de las PBMC's infectadas por *H. pylori* es dependiente de CagA.
4. La infección de PBMC's con la cepa TX30 de *H. pylori* induce el incremento en la expresión de ROR γ t.
5. UBR5 es indetectable por "Western Blot" en PBMC's infectadas por *H. pylori* en las condiciones experimentales usadas en esta investigación.

Anexos

Consentimiento informado Diagnóstico de infección por *Helicobacter pylori*

Al firmar este documento, doy mi consentimiento para que me entreviste un miembro del personal del Laboratorio de Investigación Clínica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, ubicada en Av. Lázaro Cárdenas S/N, Chilpancingo, Gro. Entiendo que seré entrevistado(a), en el horario que acordemos con el (la) entrevistador (a), y que se me harán preguntas familiares, personales y de salud. La entrevista aportará información útil para evaluar las probabilidades de infección gástrica por la bacteria *Helicobacter pylori*. Estoy informado(a) de que mis respuestas a las preguntas que se me hagan y demás información no serán reveladas a nadie y que en ningún informe de este estudio se me identificará jamás en forma alguna. Sé que la entrevista durará entre 10 y 20 minutos, además estoy enterado(a) que el entrevistador(a) puede ponerse en contacto conmigo en el futuro, a fin de obtener más información.

Entiendo que si reúno las características requeridas para el estudio seré elegido(a) para participar en este proyecto, y estoy de acuerdo en proporcionar una muestra de heces al entrevistador, que será usada para la detección de antígenos de *Helicobacter pylori*. Si el resultado es negativo, estoy de acuerdo en que se me tomen 12 ml de sangre venosa. Estoy consciente de que los resultados que se obtengan en el examen de laboratorio formarán parte de los resultados del proyecto de investigación.

Como compensación por cualquier esfuerzo o molestia relacionados con mi participación en este estudio me serán proporcionados los resultados de los análisis practicados, **sin costo alguno**. Entiendo que en caso de que tenga alguna pregunta acerca del estudio o sobre mis derechos como participante, debo buscar a la Dra. Gloria Fernández Tilapa o a la M en C. Josefina Atrisco Morales, que se encuentran en el Laboratorio de Investigación Clínica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la UAGro, o llamar al teléfono 4726977 o 7471304463.

Nombre y firma del participante

Nombre y firma del entrevistador (a)

Diagnóstico de infección por *Helicobacter pylori* en heces

Datos personales

Nombre: _____	Género: _____	Edad: _____
Dirección: _____		
Calle y número	Colonia	
Municipio o Localidad		Estado
Lugar de origen: _____	Ocupación: _____	
Talla: _____	Peso: _____	Teléfono: _____
Correo electrónico: _____		
¿Qué grado de escolaridad tiene?	00. Sin estudios 1. Primaria 2. Secundaria 3. Preparatoria 4. Profesional, especifique _____	

Salud

1. Padece alguno de los siguientes síntomas	Si	No	Ocasionalmente
Eructos frecuentes			
Náuseas			
Vómito			
Dolor abdominal (en epigastrio)			
Sensación de vacío en el estómago			
Ardor en el estómago			
Reflujo			
Distensión y llenura			
Indigestión frecuente			
Falta de apetito			
2. ¿Qué tipo de grupo sanguíneo y Rh es?	_____		
3. ¿Ha tenido alguna infección viral o bacteriana reciente?	1. Si	2. No	
4. ¿Cuándo?	_____		
5. ¿Actualmente toma algún medicamento?	1. Si	2. No	
6. ¿Cuál?	1. Antibiótico _____ 2. Antiinflamatorio _____ 3. Antivirales _____ 4. Otros _____		
7. ¿Hace cuánto tiempo ha estado en tratamiento?	_____		
8. ¿Le han diagnosticado gastritis o úlcera gástrica?	1. Gastritis	2. Úlcera	
	3. Otro, especifique _____		
	4. No		
9. Si es afirmativo, ¿cuándo?	_____		

10. ¿Cómo se lo diagnosticaron?	_____
11. ¿Le recetaron algún medicamento? ¿Cuál o cuáles fueron?	1. Si 2. No _____
12. ¿Por cuantos días le indicaron el tratamiento?	_____ días
13. ¿Concluyó el tratamiento?	1. Si 2. No
14. ¿Tiene algún familiar que padezca gastritis, úlcera gástrica o con síntomas similares a los que usted padece?	1. Si 2. No 3. No sabe
15. Si es afirmativo, ¿qué familiar?	_____
15. ¿Le han diagnosticado infección por <i>Helicobacter pylori</i> ?	1. Si 2. No
16. Si es afirmativo, ¿cuándo?	_____
17. ¿Le han recetado algún medicamento contra <i>Helicobacter pylori</i> ?	1. Si 2. No
18. ¿Cuál fue?	_____
19. ¿Padece usted alguna otra enfermedad, como diabetes mellitus, obesidad, artritis reumatoide, anemia?	1. Si 2. No ¿Cuál? _____
20. Si es afirmativo ¿Hace cuánto tiempo la padece?	_____
21. Fecha del último periodo menstrual, en el caso de ser mujer.	_____

Nombre y firma del entrevistado (a)

Nombre y firma del entrevistador (a)

Chilpancingo, Guerrero a _____ del mes de _____ del año _____.

Tabla 1. Condiciones y antecedentes de salud de las personas candidato a donación sanguínea.

Características	Género	
	Femenino n=26 (%)	Masculino n=20 (%)
Síntomas de dispepsia		
Si	11(42.30%)	6(30%)
No	15(57.69%)	14(70%)
Antecedentes familiares de gastritis o úlcera gástrica		
Si		16 (80%)
No	16 (61.53%)	2 (10%)
Sin dato	8(30.7%) 2 (7.69%)	2(10%)
Infección viral o bacteriana reciente		
Si	9(34.61%)	6(30%)
No	17(65.38%)	14(70%)
Diagnóstico de gastritis		
Si	6(23.07%)	0(0%)
No	20(67.92%)	20(100%)
Otras enfermedades		
	3(11.53%) 23(88.46%)	4(20%) 16(80%)

Referencias

- Adamsson, J., Ottsjo, L., Lundin, S., Svenner, H & Raghavan, S., (2017) 'Gastric expression of IL-17A and IFN γ in *Helicobacter pylori* infected individuals is related to symptoms', *Cytokine*, (99), pp. 30-34. doi: [10.1016/j.cyto.2017.06.013](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.06.013)
- Alzahrani, S., Lina, T., Gonzales, J., Beswick, E., Reyes, V., *et al* (2014) 'Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells', *World Journal Gastroenterology*, 20(36): 12767-12780. doi:10.3748/wjg. v20.i36.12767
- Arachchi, P., Fernanado, N., Weerasekera, M., Senevirathna, B., Weerasekera, D., Gunasekera, C., (2017) 'Proinflammatory Cytokine IL-17 Shows a Significant Association with *Helicobacter pylori* Infection and Disease Severity' *Gastroenterology Research and Practice*, pp. 1-7. doi: 10.1155/2017/6265150
- Cadamuro, A., Rossi, A., Maniezzo, N., Silva, A., *et al.* (2014) '*Helicobacter pylori* infection: Host immune response, implications on gene expression and MicroRNAs', *World Journal of Gastroenterology*, 20(6), pp. 1424–1437. doi: 10.3748/wjg.v20.i6.1424.
- Castro, G., Liu, X., De León-Tabaldo, A., Zhao, S., Luna-Roman, R., *et al.* (2017) 'ROR γ t and ROR α signature genes in human Th17 cells', *PLoS ONE*, 12(8), pp. 1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0181868
- D' Elios, M & Steven J., (2014) 'Immunity, Inflammation and Vaccines for *Helicobacter pylori*', *Helicobacter*, (Suppl.1)19-26
- Han, L., Yang, J., Wong, X., Wu, Q., Yin, S., Li, Z., *et al.* (2014) 'The E3 Deubiquitinase USP17 Is a Positive Regulator of Retinoic Acid-related Orphan Nuclear Receptor γ t (ROR γ t) in Th 17 cells', *Journal of biological chemistry*, 289(37), pp. 25546–25555. doi: 10.1074/jbc.M114.565291.
- Figueiredo, A., Marques, C., Costa, R., F da Silva, R., Neves, N., *et al.* (2014) 'Cytokines, cytokine gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: Friend or foe?', *World Journal of Gastroenterology*, 20(18), pp. 5235–5243. doi: 10.3748/wjg.v20.i18.5235.
- Gong, Y., Tao, L., Jing, L., Liu, D., Hu, S., Liu, W., *et al.* (2016) 'Association of TLR4 and treg in *Helicobacter pylori* colonization and inflammation in mice', *PLoS ONE*, 11(2), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0149629.
- He, Y., Deftos, M., Ojala, E., Bevan, M., *et al.* (1998) 'ROR γ t, a Novel Isoform of an Orphan Receptor, Negatively Regulates Fas Ligand Expression and IL-2 Production in T Cells', *Immunity*, 9(6), pp. 797–806. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80645-7.
- Hu, R., Huffaker, T., Kagele, D., Runtsch, M., Bake, E., Chaudhuri, A., *et al.* (2013) 'MicroRNA-155 Confers Encephalogenic Potential to Th17 Cells by Promoting Effector Gene Expression', *The Journal of Immunology*, 190(12), pp. 5972–5980. doi: 10.4049/jimmunol.1300351.
- Jafarzadeh, A., Larussa, T., Nemati, M., Jalapour, S., *et al.* (2009) 'Association of

the CagA status of *Helicobacter pylori* and serum levels of interleukin (IL) -17 and IL-23 in duodenal ulcer patients', pp. 8–13. doi: 10.1111/j.1751-2980.2009.00371.x.

Kronsteiner, B., Riera, J., Philipsom, C., Viladomiu, M., Carbo, A., Abedi, V., *et al.* (2016) 'Systems-wide analyses of mucosal immune responses to *Helicobacter pylori* at the interface between pathogenicity and symbiosis', *Gut Microbes*. Taylor & Francis, 7(1), pp. 3–21. doi: 10.1080/19490976.2015.1116673.

Layman, A., K. and Oliver, P.,. (2016) 'Ubiquitin Ligases and Deubiquitinating Enzymes in CD4 + T Cell Effector Fate Choice and Function', *The Journal of Immunology*, 196(10), pp. 3975–3982. doi: 10.4049/jimmunol.1502660.

Manuscript, A. (2014) 'NIH Public Access', 190(7), pp. 3054–3058. doi: 10.4049/jimmunol.1203275.Leptin-induced.

Marshall, B. J. and Windsor, H. M. (2005) 'The relation of *Helicobacter pylori* to gastric adenocarcinoma and lymphoma: Pathophysiology, epidemiology, screening, clinical presentation, treatment, and prevention', *Medical Clinics of North America*, 89(2), pp. 313–344. doi: 10.1016/j.mcna.2004.09.001.

Naghavian, R., Ghaedhi, K., Kiani-Esfahani, A., Ganjalikhani-Hakemi, M., Etemadifar, M., Nasr-Esfahani, M., *et al.* (2015) 'miR-141 and miR-200a, revelation of new possible players in modulation of Th17/Treg differentiation and pathogenesis of multiple sclerosis', *PLoS ONE*, 10(5), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0124555.

Posselt, G., Backert, S., Wessler, S.,(2013) 'The functional interplay of *Helicobacter pylori* factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis', *Cell Communication & Signaling*, pp.11-77

Robinson-Rechavi, M., Escriva, H., & Laudet, V., (2003) 'The nuclear receptor superfamily', *Journal of Cell Science*, 116(4), pp. 585–586. doi: 10.1242/jcs.00247.

Ruan, Q., Kameswaran, V., Zhang, Y., Zheng, S., Sun, J., Wang, J., *et al.* (2011) 'The Th17 immune response is controlled by the Rel–ROR γ –ROR γ T transcriptional axis', *The Journal of Experimental Medicine*, 208(11), pp. 2321–2333. doi: 10.1084/jem.20110462.

Rutz, S., Kayagaki, N., Phung, Q., Eidenschenk, C., Noubade, R., Tingwang, X., *et al.* (2015) 'Deubiquitinase DUBA is a post-translational brake on interleukin-17 production in T cells', *Nature*. Nature Publishing Group, 518(7539), pp. 417–421. doi: 10.1038/nature13979.

Sun, H., Yuan, H., Tan, R., Li, B., Guo, G., Zhang, Y., *et al.* (2018) 'Immunodominant antigens that induce Th1 and Th17 responses protect mice against *Helicobacter pylori* infection', 9(15), pp. 12050–12063.

Tanaka, T., Yamamoto, Y., Muromoto, R., Ikeda, O., Sekine, Y., Grusby, M., *et al.* (2011) 'PDLIM2 Inhibits T Helper 17 Cell Development and Granulomatous Inflammation Through Degradation of STAT3', 4(202), pp. 1–10.

Wacleche, S., Landay, A., Routh, J., Ancuta, P., *et al.* (2017) 'The Th17 lineage: From barrier surfaces homeostasis to autoimmunity, cancer, and HIV-1 pathogenesis', *Viruses*, 9(10), pp. 1–33. doi: 10.3390/v9100303.

Yang, J., Mark, S., Jil, S., Yamagata, T., *et al.* (2014) 'Targeting Th17 cells in autoimmune diseases', *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd, 35(10), pp. 493–500. doi: 10.1016/j.tips.2014.07.006.

Zhongdong X., Liang, H., Wang, J., Xu, X., Zhu, Y., Guo, A., *et al.* (2017) 'Significance of the E3 ubiquitin protein UBR5 as an oncogene and a prognostic biomarker in colorectal cancer', *Oncotarget*, 8(64), pp. 108079–108092. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309359.