



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**

---

---

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**EXPRESIÓN DE miR-155, miR-146a Y NÚMERO DE CÉLULAS Treg EN  
MUESTRAS DE PACIENTES CON GASTRITIS CRÓNICA Y CÁNCER GÁSTRICO  
ASOCIADOS A *H. pylori***

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**P R E S E N T A**

**M en C. DINORAH NASHELY MARTÍNEZ CARRILLO**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. GLORIA FERNÁNDEZ TILAPA  
CODIRECTOR DE TESIS: DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO**



CHILPANCINGO, GRO.,

ENERO DE 2015

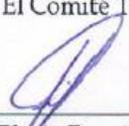


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

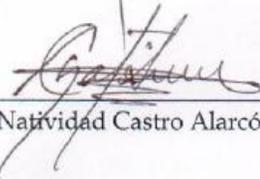
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 10 días del mes de julio del dos mil catorce, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado del Doctorado en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Expresión de miR-155, miR-146a y número de células Treg en muestras de pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico asociados a *H. pylori*", presentada por la alumna Dinorah Nashely Martínez Carrillo, para obtener el Grado de Doctora 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.

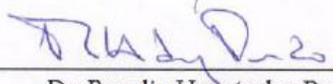
El Comité Tutorial

  
Dra. Gloria Fernández Tilapa  
Dirección de tesis

  
Dra. Isela Parra Rojas

  
Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

  
Dra. Natividad Castro Alarcón

  
Dr. Rogelio Hernández Pando

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



UAGro

Coordinación del Posgrado  
en Ciencias Biomédicas

  
Dra. Isela Parra Rojas  
Coordinadora del Posgrado en Ciencias  
Biomédicas

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



UAGro

Unidad Académica de Ciencias  
Químico Biológicas

  
Dra. Amalia Vences Velázquez  
Directora de la Unidad Académica de Ciencias  
Químico Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación Clínica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en Chilpancingo, Guerrero y en el Departamento de Patología en la Sección de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencia Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, México D.F., México.

**Bajo la dirección de:**

Dra. Gloria Fernández Tilapa

**La co-dirección del:**

Dr. Rogelio Hernández Pando

**La asesoría de:**

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Dra. Natividad Castro Alarcón

Dra. Isela Parra Rojas

En colaboración con el Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega”, ubicado en Acapulco Guerrero, el Hospital General “Dr. Raymundo Abarca Alarcón”, y la Unidad Especializada en Gastroenterología Endoscopia, ubicados en Chilpancingo, Gro.

Con la participación del médico especialista en Gastroenterología Endoscopista Reyes Betancourt Linares, jefe de la Unidad Especializada en Gastroenterología Endoscopia, los médicos especialistas en Gastroenterología Danny Iván Cruz del Carmen y José de Sampedro Reyes del Hospital General “Dr. Raymundo Abarca Alarcón”, y el médico especialista en Gastroenterología Endoscópica Salomón Reyes Navarrete del Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega”.

Esta investigación se realizó con financiamiento otorgado por la Universidad Autónoma de Guerrero, convocatoria 2012 y 2013 para proyectos de investigación, por la SEP a través del PIFI-2011 y por el CONACYT a través del Programa de Fortalecimiento Académico del Posgrado de Alta Calidad I010/455/2013 C-677/2013.

Durante el período en que cursó el Doctorado en Ciencias Biomédicas, la M en C. Dinorah Nashely Martínez Carrillo, recibió beca del CONACYT.

## AGRADECIMIENTOS

A la *Dra. Gloria Fernández Tilapa*, por arriesgarse conmigo en este proyecto, por impulsarme a seguir superándome día a día, por aguantar este camino que hoy culmina, muchas gracias por su apoyo.

A la *Dr. Rogelio Hernández Pando*, por todo el apoyo que me brindó para poder culminar este trabajo, por recibirme en su Laboratorio y permitirme aprender un poquito más. Mil gracias.

A la *Dra. Berenice Illades Aguiar*, por sus consejos y el tiempo dedicado en la mejora de este proyecto.

A las *Dras. Luz del Carmen Alarcón, Natividad Castro e Isela Parra*, por las aportaciones a este trabajo.

A la *Dra. Brenda Marquina*, gracias por el tiempo que me dedico en mis dos periodos de estancia en el Laboratorio, por confiar en mí y transmitirme su conocimiento y sobre todo su entusiasmo por hacer las cosas.

A *Josephine*, por todo tu apoyo y por estar siempre pendiente de las cosas, muchas gracias.

A todos los integrantes del Laboratorio de Investigación Clínica y de Investigación en Bacteriología, somos un gran equipo de trabajo, pero sobretodo una gran familia que crece día a día. Sigamos con esa buena vibra y ese compañerismo que nos caracteriza.

Pao, gracias por todo tu apoyo y perdón por la lata que te dí en estos años como estudiante, prometo no volver a hacerlo 😊

A mi familia Martínez, que siempre me han apoyado y me han dado animos para seguir adelante, porque siempre están, sé que cuento con ustedes, los quiero, mil gracias por todo.

A mi familia Carrillo, gracias por todo el apoyo que me han brindado, los quiero.

A Hilda, Julio y a la Peque, por que en su compañía se sintió menos cansado el camino, todo lo vivido en este recorrido ha fortalecido nuestra amistad, hemos aprendido un poco más de la vida en muchos sentidos, los quiero. Amiguiss, muchas gracias por siempre estar. La vida no esta hecha de sueños, si no de metas y hoy hemos cumplido una de nuestras metas, vamos por más... Recuenden... "Bonitos y Gorditos...y muy peligrosos"

## DEDICATORIAS

**A Dios** por ayudarme a cumplir mis metas día a día, por darme a la familia que tengo y por estar conmigo siempre.

**A mi papá** Victor Manuel Martínez Solís<sup>†</sup>, por haber sido el mejor padre. Empezamos a construir juntos esta meta con dos objetivos y aunque no los alcanzaste a ver aquí, sé que desde donde estes lo estarás disfrutando.

**A mi mamá** Virginia Carrillo Díaz, por ser una mujer luchadora desde pequeña y con su ejemplo he aprendido que cuando las cosas se quieren hacer se pueden hacer, Te Amo mami, sigue luchando día a día.

**A mis hermanas**, Karen, porque al igual que mi madre, es una mujer luchadora que no se deja vencer, Lorey, porque eres una mujer que sigue sus sueños, dedicada a su familia y de gran corazón. Saben que cuentan conmigo en todo lo que necesiten, que siempre estaré ahí para ustedes. Las Amo, y a pesar de las circunstancias que nos ha puesto la vida, nuestros padres nos dieron el mejor ejemplo de unión familiar, así que sigamos conservándolo.

**A mi flaco y a mi enana**, porque son unas personitas que apenas van iniciando este camino de la vida, pero que me inyectan de energía cada vez que los veo reír. Los amo.

<b>Resumen</b>	<u>1</u>
<b>Introducción</b>	<u>2</u>
<b>Resultados</b>	
<b>Capítulo I</b>	<u>9</u>
Diversidad de los genotipos <i>vacA</i> y <i>cagA</i> de <i>Helicobacter pylori</i> y expresión de IFN- $\gamma$ en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico.	
<b>Capítulo II</b>	<u>19</u>
Expresión de INF- $\gamma$ , IL-17, IL-4, TGF- $\beta$ 1, y <i>Helicobacter pylori</i> en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico.	
<b>Capítulo III</b>	<u>44</u>
Expresión de miR-155 y miR-146a, presencia de células T reguladoras y <i>H. pylori</i> en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico.	
<b>Discusión</b>	<u>62</u>
<b>Referencias</b>	<u>65</u>
<b>Anexos</b>	<u>69</u>

## Anexos

### Anexo I

69

---

IFN- $\gamma$ , IL-4 y *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico.

### Anexo II

75

---

IL-17A and TGF- $\beta$ 1 expression in patients with chronic gastritis and gastric cancer *H. pylori vacAs1m1/cagA*-positive.

## Resumen

**Introducción.** La inflamación local debida a la infección por *H. pylori* está caracterizada por la infiltración de neutrófilos y linfocitos, y por el incremento en la producción de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-17, IFN- $\gamma$ , y la baja expresión de IL-4 e IL-10, un número incrementado de células T reguladoras, involucradas en la modulación de la respuesta inmune en contra de *H. pylori*. Aunado a esto, se ha demostrado que *H. pylori* estimula la expresión de miR-155 y miR146a y ambos modulan negativamente la liberación de citocinas, debido a que tienen como genes blanco a IKK- $\epsilon$ , SMAD2, FADD, MyD88, IRAK-1 y TRAF6. **Objetivo.** Analizar la expresión de miR-155, miR146a, el perfil de citocinas y el número de células Treg en muestras de pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico asociados a *H. pylori*. **Material y Métodos.** Se incluyeron 99 pacientes con diagnóstico histopatológico de gastritis crónica y 12 con cáncer gástrico. Se tomaron 4 biopsias gástricas de cada paciente; una para el diagnóstico molecular y genotipificación de *H. pylori*, otra para determinar la expresión de citocinas y células Treg por Inmunohistoquímica, otra para determinar la expresión de miRNAs por RT-qPCR y la última para realizar el diagnóstico histopatológico. **Resultados.** La prevalencia de *H. pylori* fue del 56.8% y los genotipos más frecuentes fueron *vacAs1m1* (87.3%) y *cagA*-positivo (77.8%). La expresión de IFN- $\gamma$  fue significativamente mayor ( $p < 0.0001$ ) en los pacientes con gastritis crónica, mientras que en los enfermos con cáncer gástrico fue más alta la expresión de TGF- $\beta$ 1 ( $p = 0.0021$ ). La presencia de células T reguladoras fue mayor en los pacientes con gastritis crónica que en los enfermos con cáncer gástrico ( $p = 0.0116$ ). La expresión de miR-155 estuvo desregulada en muestras de pacientes con cáncer gástrico en comparación con los enfermos con gastritis crónica ( $p = 0.0388$ ). La expresión de miR-146a fue mayor en cáncer gástrico que en gastritis crónica ( $p = 0.0238$ ). **Conclusión.** Es probable que los pacientes con gastritis crónica infectados por *H. pylori vacAs1m1/cagA+* con alta expresión de IFN- $\gamma$ , IL-17A y TGF- $\beta$ 1 estén en mayor riesgo de evolucionar a una patología gástrica más severa. También, la determinación de la presencia de células T reguladoras y la expresión de miR-155 y miR-146a podrían ser utilizados como biomarcadores pronóstico de cáncer gástrico.

## Introducción

*Helicobacter pylori* infecta a más de la mitad de la población mundial (Borlace *et al.*, 2012; Salama *et al.*, 2013). La infección por *H. pylori* causa gastritis crónica, la cual en la mayoría de los infectados es asintomática pero se la infección es considerada el principal factor de riesgo para el desarrollo de úlcera gástrica y duodenal, linfoma de células B de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) y adenocarcinoma gástrico (Borlace *et al.*, 2012; Salama *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). *H. pylori* produce una variedad de factores de virulencia que pueden desregular vías de señalización intracelular del hospedero y favorecer la transformación maligna (Wang *et al.*, 2013).

Las cepas de *H. pylori* *cagA*-positivas se asocian con inflamación más severa que las cepas *cagA*-negativas. *H. pylori* transfiere la proteína CagA y otros factores solubles al citoplasma de la célula epitelial a través de su sistema de secreción tipo IV (Khamri *et al.*, 2010). CagA activa vías de señalización intracelulares que conducen a la activación de factores de transcripción, inducción de citocinas proinflamatorias, infiltración de células inmunes, daño a la unión célula-célula, a la polaridad y a la permeabilidad de la célula epitelial (Ding & Zheng, 2012). La toxina bacteriana VacA induce vacuolización, apoptosis e inhibición de la proliferación de linfocitos T (Sach & Scott, 2012; Ding & Zheng, 2012). Todas las cepas de *H. pylori* contienen el gen *vacA*, que es polimórfico en la región señal (alelos *s1a*, *s1b*, *s1c* y *s2*) y la región media (alelos *m1* y *m2*). Cada gen *vacA* contiene un alelo *s* y un alelo *m*, y la diversidad en la secuencia afecta a la actividad vacuolizante de la citotoxina. Las cepas *vacAs1m1* están asociadas a una enfermedad más severa (Jones *et al.*, 2010; Polk & Peek 2010).

Durante la infección aguda por *H. pylori*, hay acumulación de neutrófilos, monocitos y macrófagos en la mucosa, como resultado de las interacciones tempranas entre la bacteria con las células epiteliales y las células de la inmunidad innata, provocando el incremento en la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, entre ellas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-8 (D'Elíos & Czinn 2014). En etapas posteriores, las células T y B también son reclutadas. La inflamación crónica está caracterizada por la

presencia de células polimorfonucleares y células mononucleares (Bhuiyan *et al.*, 2014). Las células T cooperadoras orquestan la defensa contra patógenos, a través de la secreción de citocinas y sus funciones efectoras. En la infección por *H. pylori*, ocurre la activación de las células Th1 y Th17, con la consecuente producción de IFN- $\gamma$ , IL-17 y TNF- $\alpha$ , y baja expresión de IL-4 e IL-10 (D'Elíos & Czinn 2014; Wang *et al.*, 2013).

El IFN- $\gamma$  es un mediador importante de la inmunidad innata y adaptativa; es producido principalmente por células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y células asesinas naturales (NK). Esta citocina está sobreexpresada en el estómago de humanos y ratones infectados por *Helicobacter spp* (Tu *et al.*, 2011). IFN- $\gamma$  desempeña un papel dual en respuesta a la infección por *H. pylori*; por un lado, induce inflamación gástrica y promueve la aparición de lesiones preneoplásicas debidas a la infección y, por otra parte, el IFN- $\gamma$  disminuye la colonización bacteriana y es fundamental para la eliminación de la infección (Sayi *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2011). En estudios previos se encontró que los niveles de IFN- $\gamma$  fueron más altos en pacientes infectados por *H. pylori* que en pacientes sin infección (Lopes *et al.*, 2005; Lindholm *et al.*, 1998; Pellicano *et al.*, 2007; Lindgren *et al.*, 2011). Wang *et al.*, encontraron que en pacientes infectados por *H. pylori* CagA<sup>+</sup> la respuesta inmune celular mediada por células Th1 estuvo asociada a la gastritis crónica, mientras que la inmunidad humoral mediada por células Th2 predominó en cáncer gástrico (Wang *et al.*, 2007).

IL-17A es producida por células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y células de la respuesta inmune innata, como, células T $\gamma\delta$ , células NK1.1-NK<sub>T</sub>i y neutrófilos. (Tsai *et al.*, 2013; Curtis *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Hirota *et al.*, 2012). En ratones, se encontró que la vía Th17/IL-17 modula la respuesta de células Th1 y que las células Th1 y Th17 actúan sinérgicamente para inducir gastritis durante la infección por *H. pylori*; adicionalmente, el incremento de IL-17 puede jugar un papel importante en la respuesta inflamatoria contra la colonización por *H. pylori* e influir el resultado de la enfermedad asociada a esta bacteria (Shi *et al.*, 2010; Shiomi *et al.*, 2008; Gray *et al.*, 2013). Zhang *et al.*, (2011) demostraron que la subunidad B de la ureasa de *H.*

*pylori* promueve una respuesta de células Th17 *in vitro* e *in vivo*. Asimismo, Jafazadeh *et al.*, (2009) encontraron que la expresión de IL-17 fue mayor en pacientes con úlcera duodenal, que en personas asintomáticas portadoras de la bacteria y que en individuos aparentemente sanos *H. pylori*-negativos. En los pacientes con úlcera duodenal, la expresión de IL-17 fue mayor en los CagA-positivos comparados con los CagA-negativos, sugiriendo que los niveles séricos de IL-17 son influidos por las cepas CagA-positivas de *H. pylori* (Jafazadeh *et al.*, 2009). En ratones desnudos con tumores cervicales humanos se encontró que las células Th17 tienen actividad pro y anti-tumoral y se propone que la actividad pro-tumoral de IL-17 consiste en la inducción de angiogénesis y la producción de citocinas entre ellas, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-23 y TGF- $\beta$ 1 en el microambiente tumoral, lo cual favorece el crecimiento del tumor. A través de IL-6, IL-17 activa a Stat3, que resulta en la sobre-regulación de genes de sobrevivencia celular y pro-angiogénicos (Tartour *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2013). Son pocos los estudios que han analizado la expresión de IL-17 en pacientes con cáncer gástrico y los resultados son controversiales. Zhang *et al.*, y Yamada *et al.*, reportaron que hay un sesgo hacia el fenotipo Th17 y que IL-17 juega un papel importante en la progresión del cáncer gástrico (Zhang *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 2012), por otro lado Chen *et al.*, sugieren que la baja expresión de IL-17 puede indicar un pobre pronóstico en pacientes con adenocarcinoma gástrico (Chen *et al.*, 2011).

El factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1), es una citocina anti-inflamatoria, pleiotrópica, miembro de una familia de factores de crecimiento que juegan un papel importante en la regulación de un amplio rango de procesos biológicos durante la embriogénesis y la homeostasis en tejido adulto, y su desregulación se ha asociado con diversas enfermedades humanas, entre ellas el cáncer y la fibrosis (Zhao & Chen 2014). TGF- $\beta$ 1 es la isoforma predominante en humanos, es sintetizado por casi todas las células, principalmente por plaquetas, células Treg, macrófagos/monocitos, linfocitos, fibroblastos, células epiteliales y células dendríticas. TGF- $\beta$ 1, juega un papel central en la inmunoregulación, apoptosis y angiogénesis, con efectos opuestos en muchos tejidos, por un lado, inhibe el crecimiento de las células epiteliales y por otro, estimula la proliferación de

las células mesenquimales (Wang YQ *et al.*, 2013). En células de la respuesta inmune, TGF- $\beta$ 1 suprime la actividad antitumoral de las células T, de las células NK, neutrófilos, monocitos y macrófagos que tienen un papel importante en la regulación de la progresión tumoral (Zarzyńska 2014).

La sobre-expresión de TGF- $\beta$ 1 en el epitelio de cuello y cabeza causa una inflamación severa y angiogénesis, mediados por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la cinasa parecida al receptor de activina (ALK1); de este modo contribuye a la malignidad (Ma H *et al.*, 2014). En pacientes con cáncer gástrico, se encontró mayor expresión de TGF- $\beta$ 1 en tejido tumoral que en tejido normal adyacente (Naef *et al.*, 1997; Ma GF *et al.*, 2013; Ma H *et al.*, 2014).

IL-4 es una citocina pleiotropica producida principalmente por células TCD4+ activadas, pero también por mastocitos, basófilos y eosinófilos. Ejerce numerosos efectos en diferentes tipos celulares. Promueve la diferenciación de linfocitos T vírgenes hacia células de tipo Th2, inhibiendo la generación de células Th1 (Salinas., 2007; Luzina *et al.*, 2012) IL-4 en condiciones normales, actúa como un componente anti-inflamatorio, siendo responsable de la homeostasis del sistema inmune. Sin embargo, puede actuar promoviendo la supervivencia de células tumorales a través de la vía de Akt. STAT6 es responsable de mediar la acción anti-apoptótica de IL-4 la cual se refleja en la inducción de la expresión de Bcl-2 y Bcl-x (Curling 2011). En población china, se demostró que el polimorfismo T168C (rs2070874) de IL-4, se asocia con el riesgo de cáncer gástrico (Wu *et al.*, 2009). Sin embargo, los estudios que analizan la expresión de IL-4 y la infección por *H. pylori*, son contradictorios.

Las células T reguladoras, son moduladores importantes de la respuesta inmune contra *H. pylori* y están involucradas en la patogénesis de la enfermedad ulcero péptica y neoplasia gástrica asociadas a la infección por esta bacteria (Kandulski *et al.*, 2010). Se ha encontrado un número elevado de células Treg en mucosa gástrica de pacientes infectados por *H. pylori*, este incremento se ha asociado con el incremento de la colonización bacteriana, con los cambios inflamatorios crónicos y con la expresión de citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- $\beta$ , las cuales

juegan un papel importante en la inhibición de las células efectoras durante la infección por *H. pylori* (Kandulski *et al.*, 2010; Beswick *et al.*, 2007). En tejido gástrico de pacientes con adenocarcinoma hay un número elevado de células Treg (Kandulski *et al.*, 2010). Las células Treg dentro del microambiente tumoral juegan un papel importante en la supresión de la respuesta inmune local y se ha propuesto que la presencia de estas células es desfavorable para el paciente (Perrone *et al.*, 2008).

Las células Treg expresan un grupo de miRNAs característico distinto de las células TCD4 vírgenes, pero coinciden con las células T activadas. miR-155, bien conocido como onco-miR (micro-RNA asociado a cáncer), se expresa constitutivamente en grandes cantidades por las células Treg y juega un papel importante en la homeostasis y supervivencia, miR-155 reprime la expresión de la proteína SOCS1, resultando en un incremento de la sensibilidad a IL-2 y proliferación de las células Treg (Yamamoto *et al.*, 2011). miR-146a al igual que miR-155, es altamente expresado por las células Treg y se induce tras la activación de las células T efectoras y mieloides. miR-146a actúa como regulador negativo al limitar la señalización mediada por TRAF6 e IRAK1/2 en el entorno inflamatorio. Se ha sugerido que miR-146a en células T activadas humanas, se opone a la apoptosis y a la producción de IL-2. En células Treg miR-146a media la desregulación de STAT1, un factor de transcripción clave, requerido para la diferenciación de células Th1 efectoras (Lu *et al.*, 2010).

miR-155 es el miRNA regulador de la respuesta inmune más estudiado. En la infección por *H. pylori* se incrementa la expresión miR-155 en líneas celulares y tejido gástrico a través de la activación de la vía de NF- $\kappa$ B y AP-1. La sobreexpresión de miR-155, modula negativamente la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-8 y GRO- $\alpha$  (oncogén asociado a crecimiento alfa) (Wang *et al.*, 2010; O'Connell *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2009). En células mieloides, miR-155 se induce en respuesta a los ligandos de los TLR o por exposición a TNF- $\alpha$ , su expresión depende de los factores de transcripción AP-1 y NF- $\kappa$ B. miR-155 tiene efectos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios dependiendo del contexto y de la disponibilidad de los RNA mensajeros blanco. El efecto pro-inflamatorio se asocia a la represión de reguladores negativos

tales como SHIP1 y el supresor de señalización de citocinas 1 (SOCS1), mientras que el efecto anti-inflamatorio se ha asociado con la represión de la proteína de señalización TAB2 y la inhibición de la expresión de IL-1 $\beta$  (Oertli *et al.*, 2011).

Al igual que miR-155, miR-146a participa en la respuesta inmune innata y en enfermedades inflamatorias, la desregulación de la expresión de miR-146a se ha involucrado en el desarrollo y metástasis de múltiples cánceres (Liu *et al.*, 2010). Tras la activación de monocitos, miR-146a es rápidamente inducido, este miRNA tiene como genes blanco a la cinasa 1 asociada a IL-1R (IRAK1) y al factor 6 asociado a TNFR (TRAF6); miR-146a puede actuar como regulador negativo interfiriendo con las vías de señalización de TNFR/IL1R y TLR así como con la activación de NF- $\kappa$ B y la producción de interferones tipo 1 dependiente del gen inducible de ácido retinoico (Jurkin *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010). Liu *et al.*, (2010), reportaron que la inducción de miR-146a en respuesta a la infección por *H. pylori* es dependiente de la activación de NF- $\kappa$ B. También mostraron que en tejido gástrico de pacientes con gastritis crónica inducida por *H. pylori* había niveles incrementados de miR-146a cuando se comparó con sujetos control. Interesantemente, también encontraron una correlación positiva entre los niveles de miR-146a y miR-155 en pacientes con gastritis crónica (Liu *et al.*, 2010). Kogo *et al.*, y Hou *et al.*, (2011) reportaron que la expresión de miR-146a fue más bajo en tejido gástrico canceroso, comparado con tejido gástrico no canceroso (Kogo *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2011). Hou *et al.*, (2011) proponen a miR-146a como un potencial gen supresor en cáncer gástrico ya que la pérdida de este miRNA puede contribuir a que las células cancerosa escapen de la apoptosis y se promueva la diferenciación celular, lo que puede iniciar la progresión de cáncer gástrico y que miR-146a, podría ser un nuevo marcador pronóstico en cáncer gástrico (Hou *et al.*, 2011).

El Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM), reportó que el cáncer gástrico constituyó el 3% de los casos de cáncer diagnosticados en México durante el año 2000, con tres casos por 100,000 habitantes. La alta mortalidad, la baja sobrevivencia y el considerable deterioro de la calidad de vida de las personas que sufren esta enfermedad, significa que el cáncer gástrico representa un problema de salud pública en México y requiere una investigación encaminada a proponer

estrategias de prevención o diagnóstico temprano de la enfermedad (Sampieri & Mora, 2014). El objetivo de esta investigación fue analizar la expresión de miR-155, miR146a, el perfil de citocinas y el número de células Treg en muestras de pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico asociados a *H. pylori* y relacionar la expresión de miR-155, miR-146a, citocinas y el número de células Treg en muestras de pacientes con gastritis crónica. Para documentar el logro de este objetivo, los resultados de esta investigación se organizaron en tres capítulos que comprenden el análisis de la relación de la expresión de IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-4, TGF- $\beta$ 1 y la infección por *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico (capítulo I y II), así como la expresión de miR-155 y miR-146a, la presencia de células T reguladoras y *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico (capítulo III).

## Capítulo I

**Diversidad de los genotipos *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* y expresión de interferón gamma en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico**



REVISTA DE  
GASTROENTEROLOGÍA  
DE MÉXICO

www.elsevier.es/rgmx



ARTÍCULO ORIGINAL

**Diversidad de los genotipos *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* y expresión de interferón gamma en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico**

D.N. Martínez-Carrillo<sup>a</sup>, J. Atrisco-Morales<sup>a</sup>, R. Hernández-Pando<sup>b</sup>,  
S. Reyes-Navarrete<sup>c</sup>, R. Betancourt-Linares<sup>d</sup>, I. Cruz-del Carmen<sup>e</sup>,  
B. Illades Aguiar<sup>f</sup>, A. Román-Román<sup>g</sup> y G. Fernández-Tilapa<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Investigación Clínica, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México

<sup>b</sup> Sección de Patología Experimental, Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición «Salvador Zubirán», México D.F., México

<sup>c</sup> Servicio de Endoscopia, Instituto Estatal de Cancerología «Dr. Arturo Beltrán Ortega», Acapulco, Guerrero, México

<sup>d</sup> Unidad Especializada en Gastroenterología Endoscopia, Chilpancingo, Guerrero, México

<sup>e</sup> Servicio de Endoscopia, Hospital General «Dr. Raymundo Abarca Alarcón», Chilpancingo, Guerrero, México

<sup>f</sup> Laboratorio de Biomedicina, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México

<sup>g</sup> Laboratorio de Investigación en Bacteriología, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México

Recibido el 25 de enero de 2014; aceptado el 23 de octubre de 2014

**PALABRAS CLAVE**

*Helicobacter pylori*;  
*cagA*;  
*vacA*;  
Interferón gamma;  
Cáncer gástrico

**Resumen**

**Antecedentes:** El *H. pylori* es el principal factor de riesgo para el desarrollo de gastritis crónica, úlcera gástrica y cáncer gástrico. El resultado clínico en infectados por esta bacteria depende de varios factores, entre ellos los componentes bacterianos, la respuesta inmune, y la influencia del medio ambiente.

**Objetivo:** Comparar la expresión de IFN- $\gamma$  con los genotipos *vacA* y *cagA* de *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico.

**Pacientes y métodos:** Se incluyeron 95 pacientes con diagnóstico de gastritis crónica y 20 con cáncer gástrico. Se tomaron 3 biopsias gástricas, una se utilizó para la identificación molecular y genotipificación de *H. pylori*. Otra fue fijada en alcohol absoluto y realizaron cortes histológicos para determinar la expresión de IFN- $\gamma$  por inmunohistoquímica.

\* Autor para correspondencia: Laboratorio de Investigación Clínica, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Avenida Lázaro Cárdenas S/N Ciudad Universitaria Col. La Haciendita 39087, Chilpancingo, Guerrero, México. Teléfono y fax: +52-747-4725503.

Correo electrónico: [gferti@hotmail.com](mailto:gferti@hotmail.com) (G. Fernández-Tilapa).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rgmx.2014.10.003>

0375-0906/© 2014 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Todos los derechos reservados.

Cómo citar este artículo: Martínez-Carrillo DN, et al. Diversidad de los genotipos *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* y expresión de interferón gamma en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. Revista de Gastroenterología de México. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rgmx.2014.10.003>

**Resultados:** No se encontraron diferencias en las células que expresaron IFN- $\gamma$  entre pacientes con gastritis crónica (mediana del porcentaje de células positivas: 82.6% en pacientes sin *H. pylori* y 82% en personas infectadas) y cáncer gástrico (70.5% en pacientes *H. pylori*-negativos y 78.5% en infectados). En pacientes con gastritis crónica infectados por *H. pylori vacAs2m2/cagA* la expresión de IFN- $\gamma$  fue del 69%, en pacientes con *H. pylori vacAs1m2/cagA* fue de 86.5%, en *vacAs1m1/cagA* del 86.5%, y en *vacAs1m1/cagA*<sup>+</sup> del 82%. En cáncer se encontraron datos similares.

**Conclusión:** La expresión de IFN- $\gamma$  varía dependiendo del genotipo *vacA* y *cagA* de *H. pylori*, pero no de acuerdo a la presencia de gastritis crónica o cáncer gástrico.

© 2014 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Todos los derechos reservados.

## KEYWORDS

*Helicobacter pylori*;  
*cagA*;  
*vacA*;  
Interferon gamma;  
Gastric cancer

## *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotype diversity and interferon gamma expression in patients with chronic gastritis and patients with gastric cancer

### Abstract

**Background:** *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is the main risk factor for the development of chronic gastritis, gastric ulcer, and gastric cancer. In *H. pylori*-infected individuals, the clinical result is dependent on various factors, among which are bacterial components, the immune response, and environmental influence.

**Aims:** To compare IFN- $\gamma$  expression with the *H. pylori vacA* and *cagA* genotypes in patients with chronic gastritis and patients with gastric cancer.

**Methods:** Ninety-five patients diagnosed with chronic gastritis and 20 with gastric cancer were included in the study. Three gastric biopsies were taken; one was used for the molecular detection and genotyping of *H. pylori*; another was fixed in absolute alcohol and histologic sections were made for determining IFN- $\gamma$  expression through immunohistochemistry.

**Results:** No differences were found in the cells that expressed IFN- $\gamma$  between the patients with chronic gastritis (median percentage of positive cells: 82.6% in patients without *H. pylori* and 82% in infected persons) and those with gastric cancer (70.5% in *H. pylori*-negative patients and 78.5% in infected persons). IFN- $\gamma$  expression was 69% in chronic gastritis patients infected with *H. pylori vacAs2m2/cagA*, it was 86.5% in patients infected with *H. pylori vacAs1m2/cagA*, 86.5% in *vacAs1m1/cagA*, and 82% in *vacAs1m1/cagA*<sup>+</sup>. Similar data was found in the patients with gastric cancer.

**Conclusions:** IFN- $\gamma$  expression varied depending on the *H. pylori vacA* and *cagA* genotype, but not in accordance with the presence of chronic gastritis or gastric cancer.

© 2014 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Published by Masson Doyma México S.A. All rights reserved.

## Introducción

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infecta a casi la mitad de la población mundial y es la principal causa de gastritis crónica, úlcera gástrica o duodenal, cáncer gástrico y linfoma de células B de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)<sup>1-3</sup>.

La citotoxina asociada al gen A (*CagA*) y la citotoxina vacuolizante (*VacA*) son factores de virulencia de *H. pylori* que tienen múltiples efectos sobre la célula epitelial humana<sup>4</sup>. Las cepas de *H. pylori cagA* positivas se asocian a inflamación más severa que las cepas *cagA* negativas. *H. pylori* transfiere la proteína *CagA* y otros factores solubles al citoplasma de la célula epitelial a través de su sistema de secreción tipo IV<sup>5</sup>. *CagA* activa vías de señalización intracelulares que conducen a la activación de factores de transcripción que modulan la expresión de citocinas proinflamatorias, a la infiltración de células inmunes, al daño en las uniones célula-célula y al cambio en la polaridad

y la permeabilidad de la célula epitelial<sup>3</sup>. La toxina *VacA* induce vacuolización, apoptosis e inhibición de la proliferación celular<sup>3,6</sup>. Todas las cepas de *H. pylori* contienen el gen *vacA*, que es polimórfico en la región señal (alelos *s1a*, *s1b*, *s1c* y *s2*) y la región media (alelos *m1* y *m2*). Cada gen *vacA* contiene un alelo *s* y un alelo *m*, y la diversidad en la secuencia afecta a la actividad vacuolizante de la citotoxina. Las cepas *vacA s1m1* están asociadas a una enfermedad más severa<sup>4,7</sup>.

*H. pylori* induce una fuerte respuesta inmunológica, humoral y celular, caracterizada por infiltración de neutrófilos, macrófagos, eosinófilos y linfocitos al sitio de infección. La migración de leucocitos está mediada por citocinas y quimiocinas liberadas por las células epiteliales e inmunitarias; sin embargo, a pesar del alto número de leucocitos infiltrantes, en la mayoría de los sujetos infectados no se elimina la bacteria y la intensidad de la respuesta inflamatoria contribuye al resultado clínico de la infección<sup>8,9</sup>.

Cómo citar este artículo: Martínez-Carrillo DN, et al. Diversidad de los genotipos *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* y expresión de interferón gamma en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. Revista de Gastroenterología de México. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rgm.2014.10.003>

En la mucosa gástrica de adultos con gastritis o con úlcera péptica infectados por *H. pylori* hay una respuesta inmunitaria predominante de tipo Th1, con una elevada expresión de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-2 (IL-2) y baja expresión de IL-4 e IL-10<sup>9</sup>.

El IFN- $\gamma$  es un mediador importante de la inmunidad innata y adaptativa; es producido principalmente por células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y células asesinas naturales (NK). Esta citocina está sobreexpresada en el estómago de humanos y ratones infectados por *Helicobacter* spp.<sup>10</sup>. El IFN- $\gamma$  desempeña un papel dual en respuesta a la infección por *H. pylori*; por un lado, induce inflamación gástrica y promueve la aparición de lesiones preneoplásicas debidas a la infección y, por otra parte, el IFN- $\gamma$  disminuye la colonización bacteriana y es fundamental para la eliminación de la infección<sup>11,12</sup>.

En estudios previos se encontró que los niveles de IFN- $\gamma$  fueron más altos en pacientes infectados por *H. pylori* que en pacientes sin infección<sup>9,13-15</sup>. Wang et al., en 2007, encontraron que en pacientes infectados por *H. pylori cagA*<sup>+</sup> la respuesta inmunitaria celular mediada por células Th1 estuvo asociada a etapas más tempranas de la carcinogénesis gástrica, mientras que la inmunidad humoral mediada por células Th2 predominó en las etapas avanzadas<sup>16</sup>. A pesar de que se ha observado que la expresión de IFN- $\gamma$  se encuentra incrementada en la mucosa gástrica de pacientes *H. pylori* positivos, no se ha evaluado si la expresión de esta citocina varía con el genotipo *vacA* y *cagA* de la bacteria. En nuestro conocimiento, no se han publicado datos que documenten la expresión de IFN- $\gamma$  en pacientes mexicanos con enfermedades gástricas asociadas a la infección por *H. pylori*. El objetivo de este estudio fue relacionar la expresión de IFN- $\gamma$  con la infección por *H. pylori* y con los genotipos *vacA* y el estado de *cagA* de la bacteria en pacientes con gastritis crónica y cáncer.

**Métodos**

**Pacientes**

Se incluyó a pacientes que asistieron a realizarse una endoscopia digestiva alta al Hospital General «Raymundo Abarca Alarcón», a la Unidad Especializada en Gastroenterología Endoscopia de la Ciudad de Chilpancingo y al Servicio de Endoscopia del Instituto Estatal de Cancerología «Arturo Beltrán Ortega» en Acapulco, Guerrero, México, de agosto de del 2011 a marzo del 2013. Se seleccionó a pacientes sin tratamiento de erradicación para *H. pylori* durante el mes previo al procedimiento endoscópico. Se excluyó del estudio a los pacientes con tratamiento inmunosupresor o antiinflamatorio no esteroideo. Los pacientes o sus padres firmaron una carta de consentimiento informado. A los pacientes que aceptaron participar en el estudio se les aplicó una encuesta para registrar datos generales e información relacionada con la enfermedad. El proyecto se aprobó por el Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Guerrero y por los hospitales participantes.

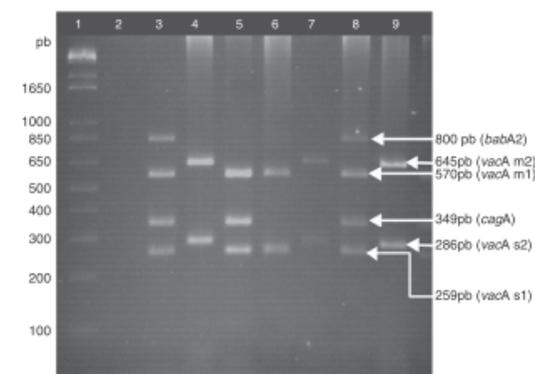
**Endoscopia y obtención de biopsias**

La endoscopia se llevó a cabo después de una noche de ayuno con un videoprocador y un videogastroscopio

(Fujinon, Wayne, EE. UU.). De cada paciente, se tomaron 3 biopsias gástricas de antro, cuerpo o del tumor; una fue colocada en solución amortiguadora (Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, SDS 0.5%) para el diagnóstico molecular de *H. pylori*. Otra fue fijada en alcohol absoluto para verificar la expresión de IFN- $\gamma$  por inmunohistoquímica. La última biopsia fue fijada en formol amortiguado para el estudio histopatológico. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina y eosina, y evaluados por un patólogo usando los criterios del sistema de Sydney actualizado<sup>17</sup> o la clasificación de Lauren<sup>18</sup>.

**Detección y genotipificación de *Helicobacter pylori***

Se extrajo el ADN total de las biopsias gástricas por la técnica de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, previa digestión con proteinasa K<sup>19</sup>. La detección de *H. pylori* se realizó por PCR, amplificando un fragmento del gen 16S del rNAr, siguiendo la metodología descrita previamente por Martínez-Carrillo et al.<sup>20</sup>. Las muestras *H. pylori* positivas fueron sometidas a una segunda PCR con iniciadores para amplificar las regiones *s* y *m* del gen *vacA*<sup>21,22</sup>, el gen *cagA*<sup>23</sup> y *babA2*<sup>24</sup>. En un volumen final de 25  $\mu$ L se mezclaron 500 ng de ADN, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.15 mM de dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.), 1.3 U de Taq DNA polimerasa Platinum (Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.) y las concentraciones requeridas de oligonucleótidos: 2.5 pM para *vacA*, 5 pM para *cagA* y 12.5 pM para *babA2*. El programa de amplificación incluyó un paso de desnaturalización inicial a 94 °C por 10 min, 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 57 °C por 1 min, 72 °C por 1 min y un paso de extensión final a 72 °C por 10 min (fig. 1). En cada PCR, se usó ADN de la cepa J99, con genotipo *vacAs1m1/cagA<sup>+</sup>/babA2<sup>+</sup>* como control positivo. Para el control negativo, el ADN fue sustituido por agua desionizada estéril. Todas las reacciones



**Figura 1** Genotipificación de *H. pylori*. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb plus; carril 2: control negativo; carril 3: control positivo, ADN de la cepa J99 de *H. pylori*, genotipo *vacAs1m1/cagA<sup>+</sup>/babA2<sup>+</sup>*; carril 4, 7 y 9: muestras clínicas genotipo *vacAs2m2/cagA<sup>-</sup>/babA2<sup>-</sup>*; carril 5: muestra clínica genotipo *vacAs1m1/cagA<sup>-</sup>/babA2<sup>-</sup>*; carril 6: muestra clínica genotipo *vacAs1m1/cagA<sup>-</sup>/babA2<sup>-</sup>*; carril 8: muestra clínica genotipo *vacAs1m1/cagA<sup>+</sup>/babA2<sup>+</sup>*. Gel de agarosa al 2.5%.

Cómo citar este artículo: Martínez-Carrillo DN, et al. Diversidad de los genotipos *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* y expresión de interferón gamma en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. Revista de Gastroenterología de México. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rgmx.2014.10.003>

Tabla 1 Prevalencia de infección por *H. pylori* y genotipos *vacA/cagA*

	Gastritis crónica (n = 95)	Cáncer gástrico (n = 20)	Valor de p
Edad (media ± DE; años)	47.4 ± 16	60.9 ± 16.2	< 0.001 <sup>a</sup>
Género, n (%)			
Femenino	59 (62.1)	11 (55)	0.554 <sup>b</sup>
Masculino	36 (37.9)	9 (45)	
<i>H. pylori</i> , n (%)			
Negativo	41 (43.2)	8 (40)	0.795 <sup>b</sup>
Positivo	54 (56.8)	12 (60)	
Genotipo <i>vacA/cagA</i> , n (%)			
<i>vacAs2m2/cagA</i> <sup>-</sup>	3 (5.5)	2 (16.7)	0.587 <sup>c</sup>
<i>vacAs2m2/cagA</i> <sup>+</sup>	1 (1.9)	0	
<i>vacAs1m2/cagA</i> <sup>-</sup>	1 (1.9)	0	
<i>vacAs1m2/cagA</i> <sup>+</sup>	2 (3.7)	0	
<i>vacAs1m1/cagA</i> <sup>-</sup>	8 (14.8)	3 (25)	
<i>vacAs1m1/cagA</i> <sup>+</sup>	39 (72.2)	7 (58.3)	
Total	54 (100)	12 (100)	

<sup>a</sup> Prueba de la t de Student.

<sup>b</sup> Prueba de la  $\chi^2$ .

<sup>c</sup> Prueba exacta de Fisher.

fueron hechas en un termociclador Mastercycler Ep gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemania).

#### Detección de la expresión de interferón gamma por inmunohistoquímica

Las muestras fijadas en alcohol absoluto fueron incluidas en parafina. Se hicieron cortes de 3  $\mu$ m. Cada sección de tejido fue desparafinado con xilol y rehidratado con alcohol en grados descendentes. Las laminillas se hirvieron con buffer de citratos (Declere 1X, Cell Marque, Rocklin, EE. UU.) por 20 min en autoclave, para recuperación antigénica. Después de la permeabilización y el bloqueo de la peroxidasa endógena, los cortes fueron incubados toda la noche con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-IFN- $\gamma$  humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EE. UU.) dilución 1:50. La unión del anticuerpo fue detectada con el Kit Mouse/Rabbit ImmunoDetector HRP/DAB Detection System (Bio SB, Santa Barbara, EE. UU.). Los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina (Biocare Medical, Concord, EE. UU.). En 5 campos seleccionados al azar, se contó un total de 100 células mononucleares y se consideraron positivas aquellas con tinción nuclear o citoplasmática marrón. Los datos fueron expresados como porcentaje de células positivas. Para validar los resultados del conteo manual de células IFN- $\gamma$ +, se seleccionó al azar un número de muestras equivalente al 10% y se verificó el porcentaje de células IFN- $\gamma$  mediante el software Leica Microsystems CMS GmbH versión 4.3.0.

#### Análisis estadístico

Se determinaron las frecuencias de las variables cualitativas, la media  $\pm$  desviación estándar de las variables cuantitativas paramétricas y mediana y rango intercuartílico

para variables no paramétricas. El valor de p se obtuvo con la prueba de la  $\chi^2$  o exacta de Fisher para variables cualitativas y prueba t de Student, ANOVA, Mann-Whitney o Kruskal-Wallis para variables cuantitativas. Un valor de p < 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

#### Resultados

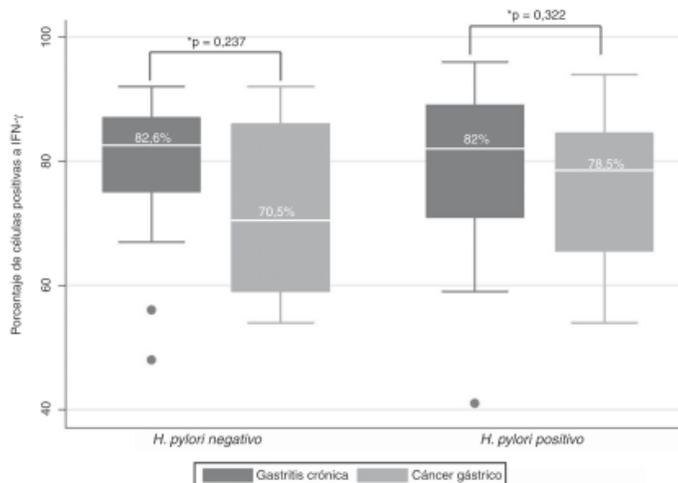
##### Prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* y genotipos *vacA/cagA*

Se estudió a 95 pacientes que recibieron diagnóstico histológico confirmatorio de gastritis crónica y 20 con resultados histopatológicos de adenocarcinoma gástrico. La media de edad para el grupo de gastritis crónica fue de 47.4 años y de 60.9 años en cáncer gástrico (p < 0.001, tabla 1). De los 115 pacientes incluidos en el estudio, 66 (57.4%) fueron *H. pylori* positivos y el genotipo más frecuente fue *vacAs1m1/cagA*<sup>+</sup>, el 69.7% (46/66). La prevalencia de infección por *H. pylori* y de los genotipos *vacA/cagA* varió entre los grupos (tabla 1).

##### Expresión de interferón gamma en gastritis crónica y cáncer gástrico

La expresión de IFN- $\gamma$  se localizó predominante en el citoplasma de las células mononucleares infiltrantes. Se detectó expresión de IFN- $\gamma$  en la mayoría de los pacientes *H. pylori* positivos y *H. pylori* negativos (99/115, datos no mostrados). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de IFN- $\gamma$  entre gastritis crónica y cáncer gástrico, pero la mediana del porcentaje de células positivas a IFN- $\gamma$  fue mayor en gastritis crónica (82.6% en pacientes sin *H. pylori* y 82% en personas infectadas) que en cáncer gástrico (70.5% en

Cómo citar este artículo: Martínez-Carrillo DN, et al. Diversidad de los genotipos *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* y expresión de interferón gamma en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. Revista de Gastroenterología de México. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rgmx.2014.10.003>

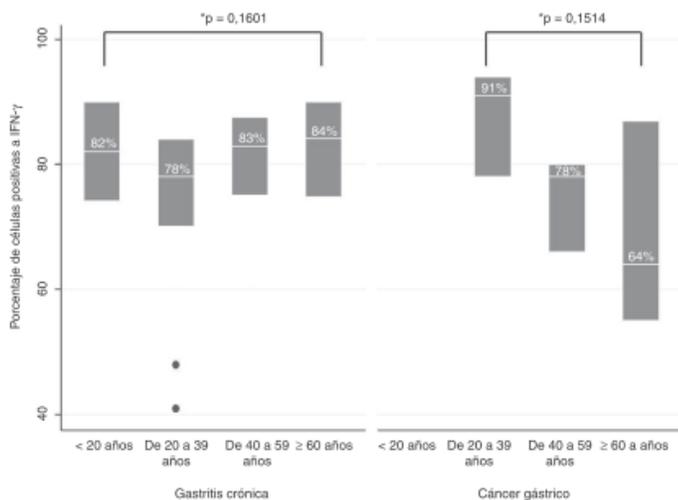


**Figura 2** Expresión de IFN-g en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico con y sin infección por *H. pylori*. \* Prueba de Mann-Whitney.

pacientes *H. pylori* negativos y 78.5% en infectados) (fig. 2). En gastritis crónica, la mediana del porcentaje de células con expresión de IFN-γ por grupo de edad varió entre el 78 y el 84% (rango intercuartílico del 70 al 90%); en cáncer gástrico, la mediana fue del 64 al 90% (rango intercuartílico del 55 al 94%) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de células IFN-γ positivas ni entre los grupos de edad de los pacientes con gastritis crónica ( $p=0.1601$ ) ni entre los grupos etarios con cáncer gástrico ( $p=0.1514$ ) (fig. 3). Tampoco se encontraron diferencias en el porcentaje de células con expresión de IFN-γ

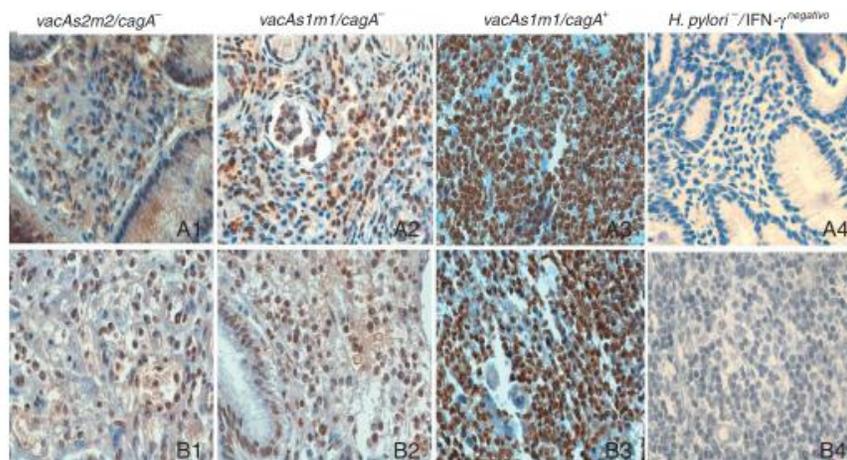
entre gastritis crónica y cáncer gástrico ( $p=0.8781$ ), datos no mostrados.

En pacientes con gastritis crónica y con cáncer gástrico, la expresión de IFN-γ varía con el genotipo de *H. pylori* (fig. 4). En el grupo de gastritis crónica, los infectados por *H. pylori vacAs2m2/cagA*<sup>-</sup> presentaron un porcentaje menor de células con expresión de IFN-γ (69%), en comparación con los pacientes con *H. pylori vacAs1m2/cagA*<sup>-</sup> (86.5%), *vacAs1m1/cagA*<sup>-</sup> (86.5%) y *vacAs1m1/cagA*<sup>+</sup> (82%) (fig. 5). De forma interesante, de 5 pacientes con genotipo *vacAs1m1/cagA*<sup>-</sup> de *H. pylori*, en 4 se encontró el



**Figura 3** Porcentaje de células positivas a IFN-g en pacientes con gastritis crónica o con cáncer gástrico distribuidos en grupos de edad. \* Prueba de Kruskal-Wallis.

Cómo citar este artículo: Martínez-Carrillo DN, et al. Diversidad de los genotipos *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* y expresión de interferón gamma en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. Revista de Gastroenterología de México. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rgmx.2014.10.003>



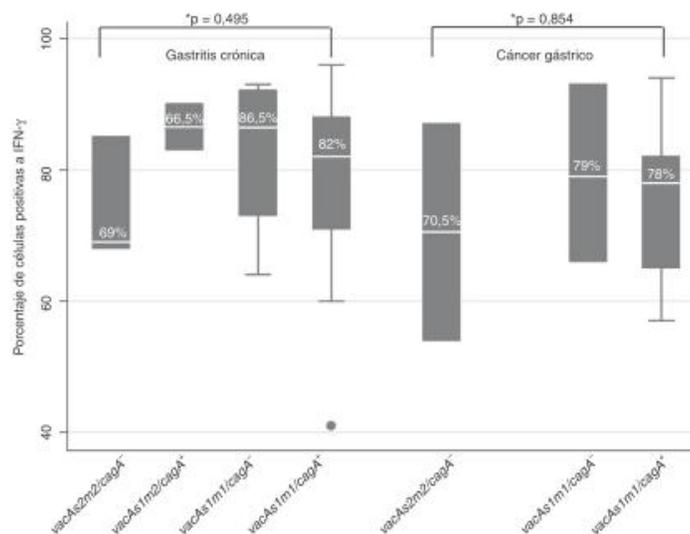
**Figura 4** Inmunohistoquímica de la expresión de IFN- $\gamma$  en biopsias gástricas de pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico, contrateñidas con hematoxilina (10). A1-A4) Biopsias gástricas de pacientes con gastritis crónica. B1-B3) Biopsias gástricas de pacientes con cáncer gástrico. B4) Biopsia de amígdala, control negativo de la reacción (se omitió el anticuerpo primario).

93% de células con expresión de IFN- $\gamma$  y en un paciente el 96%. En los pacientes con cáncer gástrico infectados por el genotipo *vacAs2m2/cagA*<sup>-</sup> se detectó un 70.5% de células con expresión de IFN- $\gamma$  en quienes tenían el genotipo *vacAs1m1/cagA*<sup>-</sup> el porcentaje de célula IFN- $\gamma$ -positivas alcanzó el 79% y en los infectados con el genotipo *vacAs1m1/cagA*<sup>+</sup> de *H. pylori* el porcentaje de células con expresión de IFN- $\gamma$  fue del 78%; uno de los 7 pacientes con este mismo genotipo tuvo una expresión de IFN- $\gamma$  del 94% (fig. 5).

Entre el porcentaje de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> contadas por observación microscópica y verificadas mediante el software Leica Microsystems, se encontró una variación de  $\pm 4.4$  células.

**Discusión**

Son pocos los reportes acerca de la prevalencia de infección por *H. pylori* y sus genotipos en población mexicana. En esta



**Figura 5** Expresión de IFN- $\gamma$  por genotipo de *H. pylori* en muestras de pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. \* Prueba de Kruskal-Wallis.

Cómo citar este artículo: Martínez-Carrillo DN, et al. Diversidad de los genotipos *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* y expresión de interferón gamma en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. Revista de Gastroenterología de México. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rgmx.2014.10.003>

investigación, el 60% de los casos de cáncer gástrico fueron positivos a *H. pylori*, siendo el genotipo *vacAs1m1/cagA+* el más frecuente, el 58.3% (7/12). La frecuencia de *H. pylori* encontrada en este estudio es igual a la reportada por Morales-Espinosa et al., y supera la reportada por López-Vidal et al., en 2008, en población mexicana, quienes detectaron la presencia de *H. pylori* en el 38% de las muestras de los pacientes con cáncer gástrico. La prevalencia de *H. pylori cagA+* informada por López-Vidal et al. es superior (72%) a la que encontramos en pacientes guerrerenses con cáncer gástrico (58%). Estas diferencias pueden deberse a las distintas regiones de procedencia de los pacientes. Se ha documentado que los genotipos de *H. pylori* circulan diferencialmente entre poblaciones y zonas geográficas. En población del noreste de Brasil, de Figueiredo-Cavalcante et al., en 2012, encontraron que en pacientes con cáncer gástrico el 83.3% de las cepas de *H. pylori* eran *vacAs1*, el 53.3% *vacAm1* y el 96.7% *cagA*<sup>25-28</sup>.

Por otro lado, encontramos que en los casos de gastritis crónica el 56.8% fueron *H. pylori* positivos y los genotipos más frecuentes fueron el *vacAs1m1* con un 87% y un 77.8% fueron *cagA+*. La frecuencia del genotipo *vacAs1m1* fue mayor a la reportada por Román-Román et al., en 2013, en población guerrerense con gastritis crónica (43.4%) y supera también la encontrada por Paniagua et al., en 2009, en pacientes del Estado de México con gastritis crónica *H. pylori*-positivos (60.1%), en quienes el 40% de los infectados tuvieron el genotipo *vacAs1m1* y el 52% fueron *cagA+*. De Figueiredo-Cavalcante et al., en 2012, encontraron que en pacientes con gastritis crónica los alelotipos *s1* y *m1* fueron los más frecuentes, el 72.4 y el 51.3%, respectivamente, y el 73.7% fueron *H. pylori cagA+*; Torres et al., en 2009, en pacientes cubanos con dispepsia funcional, encontraron una frecuencia del 54.9% para el genotipo *vacAs1m1* y del 70.6% para el genotipo *cagA+*. En este trabajo, la detección de los genotipos *vacA* y *cagA* se hizo con los mismos iniciadores usados por Torres et al., y en ambos estudios el ADN de *H. pylori* y de sus genotipos se hizo a partir de ADN total de biopsia gástrica, por lo que es probable que las discrepancias en las frecuencias puedan explicarse por diferencias en el origen de la población, en el número de pacientes y los criterios diagnósticos empleados, y quizá por diferencias en la metodología para obtener y procesar las biopsias<sup>28-31</sup>. La probabilidad de detectar el ADN de *H. pylori* está influido por el número de bacterias en el tejido empleado como fuente de ADN genómico. Los oligonucleótidos empleados en la PCR usada en este estudio para revelar el gen *RNAr 16S* de *H. pylori* permiten detectar 2.5 ng de ADN de la bacteria en 50 o 150 ng de ADN humano y discriminan entre el gen *RNAr 16S* de *H. pylori* con el de *Campylobacter* spp. y el de otras bacterias aisladas de la mucosa gástrica<sup>29</sup>. El uso de la PCR múltiple permitió obtener el genotipo bacteriano en un menor tiempo, disminuir el gasto de reactivos y agilizar la entrega de resultados a los pacientes.

La incidencia y/o la severidad de las patologías relacionadas con *H. pylori* pueden variar entre las áreas geográficas<sup>31</sup>; la prevalencia de la infección y la distribución de los genotipos varía entre países, entre regiones y grupos étnicos. En México, se ha reportado una variación en la prevalencia de *H. pylori* que va del 86.1% en el sureste al 47.1% en niños del noreste del país, y un 66% en una población de tepahuas (grupo étnico) del norte de México<sup>32-34</sup>. Torres et al., en

2005, notificaron que, en México, la prevalencia de *H. pylori cagA+* varía del 47.6 al 63.4%<sup>35</sup>.

La inflamación local debida a infección por *H. pylori* está caracterizada por la infiltración de neutrófilos y linfocitos, y por el incremento en la producción de varias citocinas; sin embargo, se ha demostrado que en la mayoría de los infectados no ocurren manifestaciones clínicas severas. Se sugiere que el resultado clínico de la infección está influido por la respuesta inmunitaria del huésped, por las interacciones de la célula epitelial con los componentes bacterianos y por la influencia del ambiente<sup>13,16</sup>. En este estudio comparamos la expresión de IFN- $\gamma$  en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico infectados y no infectados por *H. pylori*, así como entre grupos de edad y grupos de infectados por diferentes genotipos bacterianos. Encontramos que el 86.1% de las muestras expresaron IFN- $\gamma$  y que, a pesar de no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de IFN- $\gamma$  y la infección por *H. pylori* en ambos grupos de estudio, este análisis reveló que en el grupo de cáncer gástrico la expresión de IFN- $\gamma$  fue menor que en el grupo de gastritis crónica independientemente de la infección. Por el contrario, Lopes et al., en 2005, en muestras de niños y adolescentes de Portugal, y Lindholm et al., en 1998, en pacientes de Suecia, reportaron que la expresión de IFN- $\gamma$  fue mayor en las muestras de los pacientes *H. pylori*-positivos<sup>9,13</sup>. Considerando que la gastritis crónica es el proceso inflamatorio de magnitud variable que puede dar origen al adenocarcinoma gástrico, en un periodo de 10 a 15 años de evolución, y que la intensidad de la respuesta inmunitaria presenta cambios con la edad de las personas, se analizó el número de células con tinción positiva a IFN- $\gamma$  con respecto al grupo de edad de los pacientes. La falta de diferencias estadísticamente significativas con respecto a la edad pueden estar relacionada con la diversidad y la intensidad de los estímulos inflamatorios provenientes de *H. pylori*, con otros factores relacionados con el estilo de vida de los pacientes y con la presencia de otros agentes infecciosos, como el virus de Epstein-Barr.

Al analizar la expresión de IFN- $\gamma$  de acuerdo con el genotipo *vacA/cagA* de *H. pylori*, encontramos que en ambos grupos el porcentaje de células con expresión de la citocina fue menor cuando los sujetos estaban infectados con el genotipo menos virulento (*vacAs2m2/cagA+*), 69% en gastritis y 70.5% en cáncer gástrico; en el grupo de gastritis hubo una mayor expresión de IFN- $\gamma$  (86.5%) en aquellos pacientes *H. pylori* positivos *vacAs1m2/cagA+* y *vacAs1m1/cagA+*. En cáncer gástrico la expresión disminuyó a un 79 y 78% en pacientes *H. pylori* positivos *vacAs1m1/cagA+* y *vacAs1m1/cagA+*, respectivamente. Hallazgos similares fueron reportados por Wang et al., en 2007, en población China, que encontraron que la expresión de IFN- $\gamma$  en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico infectados por *H. pylori cagA+* fue disminuyendo conforme la lesión gástrica se hizo más severa<sup>16</sup>. En pacientes con gastritis crónica, los niveles incrementados de IFN- $\gamma$  podrían contribuir a la inflamación gástrica por activación de fagocitos mononucleares y por la sobrerregulación de la expresión de moléculas MHC-clase I y II<sup>13</sup>. Además de desempeñar un papel importante en la respuesta antitumoral, se ha reportado que el IFN- $\gamma$  también puede tener efectos tumorigénicos<sup>36</sup>. En 2009, Saiy et al. reportaron que, en un modelo murino, el IFN- $\gamma$  producido por las células T CD4+ desempeña un papel importante

Cómo citar este artículo: Martínez-Carrillo DN, et al. Diversidad de los genotipos *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* y expresión de interferón gamma en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. Revista de Gastroenterología de México. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rgmx.2014.10.003>

en el control de la infección por *H. pylori* y, por otro lado, induce cambios preneoplásicos de la mucosa gástrica<sup>11</sup>. La alta expresión de IFN- $\gamma$  en el grupo de pacientes con cáncer gástrico puede tener diversos significados: a) podría ser de buen pronóstico, debido a que se ha reportado que IFN- $\gamma$  puede promover la eliminación de las células neoplásicas a través de su acción angiostática, la cual restringe el crecimiento tumoral por interferir con el suministro de sangre<sup>13</sup>; b) puede estar ejerciendo un efecto protumoral a través de señales proliferativas y antiapoptóticas, y facilitando el escape de las células tumorales de la acción citolítica de las células NK y los linfocitos T citotóxicos<sup>36</sup>. Se necesitaría realizar un seguimiento de los pacientes para verificar el significado de nuestros hallazgos.

En conclusión, la expresión de IFN- $\gamma$  es menor en los casos de cáncer gástrico que en aquellos con gastritis crónica. Nuestros resultados indican que la expresión de IFN- $\gamma$  en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico no está asociada con la infección ni con los genotipos *vacA* y *cagA* de *H. pylori*. Es necesario que se realicen más estudios para determinar si la expresión de IFN- $\gamma$  podría ser un biomarcador útil en el pronóstico del cáncer gástrico.

### Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes y que todos los pacientes incluidos en el estudio han recibido información suficiente y han dado su consentimiento informado por escrito para participar en dicho estudio.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

### Financiamiento

La investigación se realizó con financiamiento de la Universidad Autónoma de Guerrero, convocatoria 2013; de la SEP a través del PIFI-2011 y del Programa de Fortalecimiento Académico del Posgrado de Alta Calidad, clave I010/455/2013 C-677/2013.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses.

### Agradecimientos

Agradecemos al Laboratorio de Biología Celular del Cáncer de la Universidad Autónoma de Guerrero por permitirnos

tomar las fotografías de la inmunohistoquímica. Al Dr. Miguel Ángel Mendoza Catalán, por el apoyo brindado en la captura de las imágenes. Al personal del Servicio de Endoscopia del Hospital General «Raymundo Abarca Alarcón», de la Unidad Especializada en Gastroenterología Endoscopia y del Instituto Estatal de Cancerología «Arturo Beltrán Ortega».

### Bibliografía

- Milco DM, Amedei A, Benagiano M, et al. Helicobacter pylori T cells and cytokines: The "dangerous liaisons". *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;44:113-9.
- Ricci V, Romano M, Boquet P. Molecular cross-talk between Helicobacter pylori and human gastric mucosa. *World J Gastroenterology*. 2011;17:1383-99.
- Ding SZ, Zheng PY. Helicobacter pylori infection induced gastric cancer; advance in gastric stem cell research and the remaining challenges. *Gut Pathog*. 2012;8:18.
- Jones KR, Whitmire JM, Merrell DS. A tale of two toxins: Helicobacter pylori CagA and VacA modulate host pathways that impact disease. *Front Microbiol*. 2010;1:115.
- Khamri W, Walker MM, Clark P, et al. Helicobacter pylori stimulates dendritic cells to induce interleukin-17 expression from CD4+ T lymphocytes. *Infect Immun*. 2010;78:845-53.
- Sachs G, Scott DR. Helicobacter pylori: Eradication or preservation F1000. *Med Rep*. 2012;4:7.
- Polk DB, Peek RM. Helicobacter pylori: Gastric cancer and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:403-14.
- Flach CF, Östberg AK, Nilsson AT, et al. Proinflammatory cytokine gene expression in the stomach correlates with vaccine-induced protection against Helicobacter pylori infection in mice: An important role for interleukin-17 during the effector phase. *Infect Immun*. 2011;79:879-86.
- Lopes AI, Quiding-Jarbrink M, Palha A, et al. Cytokine expression in pediatric Helicobacter pylori infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12:994-1002.
- Tu SP, Quante M, Bhagat G, et al. IFN- $\gamma$  inhibits gastric carcinogenesis by inducing epithelial cell autophagy and T-cell apoptosis. *Cancer Res*. 2011;71:4247-59.
- Sayi A, Kohler E, Hitzler I, et al. The CD4+T cell-mediated IFN- $\gamma$  response to Helicobacter infection is essential for clearance and determines gastric cancer risk. *J Immunol*. 2009;182:7085-101.
- Zhao Y, Zhou Y, Sun Y, et al. Virulence factor cytotoxin-associated gene A in Helicobacter pylori is downregulated by interferon- $\gamma$  in vitro. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;61:76-83.
- Lindholm C, Quiding-Jarbrink M, Lönroth H, et al. Local cytokine response in Helicobacter pylori-infected subjects. *Infect Immun*. 1998;66:5964-71.
- Pellicano A, Sebkova L, Monteleone G, et al. Interleukin-12 drives the Th1 signaling pathway in Helicobacter pylori-infected human gastric mucosa. *Infect Immun*. 2007;75:1738-44.
- Lindgren Å, Yun CH, Sjöling Å, et al. Impaired IFN- $\gamma$  production after stimulation with bacterial components by natural killer cells from gastric cancer patients. *Exp Cell Res*. 2011;317:849-58.
- Wang SK, Zhu HF, He BS, et al. CagA+ *H. pylori* infection is associated with polarization of T helper cell immune responses in gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2007;13:2923-31.
- Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, et al. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney system-International workshop on the histopathology of gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol*. 1996;20:1161-81.
- Lauren T. The two histologic main types of gastric carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:34.

Cómo citar este artículo: Martínez-Carrillo DN, et al. Diversidad de los genotipos *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* y expresión de interferón gamma en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. *Revista de Gastroenterología de México*. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rgmx.2014.10.003>

19. Sambrook J, Russel D. Molecular cloning a laboratory manual EU. New York: Col Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
20. Martínez-Carrillo DN, Garza-González E, Betancourt-Linares R, et al. Association of IL-1B -511C/-31T haplotype and *Helicobacter pylori* vacA genotypes with gastric ulcer and chronic gastritis. *BMC Gastroenterology*. 2010;10:126.
21. Atherton JC, Cao P, Peek RMR Jr. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*. 1995;270:17771-7.
22. Park CY, Kwak M, Gutierrez O, et al. Comparison of genotyping *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens and genotyping from bacterial cultures. *J Clin Microbiol*. 2003;41:3336-8.
23. Tummuru MK, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *H. pylori*: Evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun*. 1993;61:1799-809.
24. Mizushima T, Sugiyama T, Komatsu Y, et al. Clinical relevance of the babA2 genotype of *H. pylori* in Japanese clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2001;39:2463-5.
25. Morales-Espinosa R, Fernandez-Presas A, Gonzalez-Valencia G, et al. *Helicobacter pylori* in the oral cavity is associated with gastroesophageal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24:464-8.
26. López-Vidal Y, Ponce-de-León S, Castillo-Rojas G, et al. High diversity of vacA and cagA *Helicobacter pylori* genotypes in patients with and without gastric cancer. *PLoS One*. 2008;3:e3849.
27. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*. 2002;347:1175-86.
28. De Figueiredo-Cavalcante M, Simões-Silva CI, Braga-Neto MB, et al. *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107:561-3.
29. Román-Román A, Giono-Cerezo S, Camorlinga-Ponce M, et al. vacA genotypes of *Helicobacter pylori* in the oral cavity and stomach of patients with chronic gastritis and gastric ulcer. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31:130-5.
30. Paniagua GL, Monroy E, Rodríguez R, et al. Frequency of vacA, cagA and babA2 virulence markers in *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2009;8:14.
31. Torres LE, Melián K, Moreno A, et al. Prevalence of vacA, cagA and babA2 genes in Cuban *Helicobacter pylori* isolates. *World J Gastroenterol*. 2009;15:204-10.
32. Guarner J, Mohar A, Parsonnet J, et al. The association of *Helicobacter pylori* with gastric cancer and preneoplastic gastric lesions in Chiapas, Mexico. *Cancer*. 1993;71:297-301.
33. Jiménez-Guerra F, Shetty P, Kurpad A. Prevalence of and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in school children in Mexico. *Ann Epidemiol*. 2000;10:474.
34. Alvarado-Cosme E. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* Infection in Tepehuanos aged 15 years and older in Durango, Mexico. *J Pathog*. 2013;2013:243246. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/243246>.
35. Torres J, Lopez L, Lazzano E, et al. Trends in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Mexico. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14:1874-7.
36. Raza-Zaidi M, Merlino G. The two faces of interferon- $\gamma$  in Cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17:6118-24.

**Capítulo II**  
**Expresión de IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4, TGF- $\beta$ 1 y *Helicobacter pylori***  
**en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico**

## Introducción.

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es la principal causa de gastritis crónica, úlcera gastroduodenal y cáncer gástrico (Alzahrani, 2014; D'Elíos & Czinn 2014; Lina *et al.*, 2014). Diversos componentes de *H. pylori* inducen múltiples efectos sobre las células epiteliales, entre ellos apoptosis, proliferación celular y destrucción de las uniones celulares, además activan o inhiben las funciones de los monocitos, las células dendríticas, neutrófilos y las células natural killer (NK) (Alzahrani *et al.*, 2014, D'Elíos & Czinn 2014).

Durante la infección aguda por *H. pylori*, hay acumulación de neutrófilos, monocitos y macrófagos en la mucosa, como resultado de las interacciones tempranas entre la bacteria, las células epiteliales y las células de la inmunidad innata, provocando el incremento en la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, entre ellas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-8 (D'Elíos & Czinn 2014). En etapas posteriores, las células T y B también son reclutadas. La inflamación crónica está caracterizada por la presencia de células polimorfonucleares y células mononucleares (Bhuiyan *et al.*, 2014). En la infección por *H. pylori*, las células Th1 y Th17 activadas, producen IFN- $\gamma$ , IL-17 y TNF- $\alpha$  (D'Elíos & Czinn 2014) y hay una baja expresión de IL-4 e IL-10 (Lopes *et al.*, 2005). También se ha reportado expresión de TGF- $\beta$  en mucosa gástrica infectada (Alzahrani *et al.*, 2014).

El interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) producido principalmente por células T CD4+, CD8+ y células NK modula la inmunidad innata y adaptativa. Esta citocina está sobreexpresada en el estómago de humanos y ratones infectados por *Helicobacter spp.* (Tu *et al.*, 2011). El IFN- $\gamma$  desempeña un papel dual en respuesta a la infección por *H. pylori*; por un lado, induce inflamación gástrica y promueve la aparición de lesiones preneoplásicas debidas a la infección y, por otra parte, el IFN- $\gamma$  disminuye la colonización bacteriana y es fundamental para la eliminación de la infección (Sayi *et al.*, 2009; Zhao *et al.* 2011). Las células Th1 y Th17, actúan sinérgicamente para inducir gastritis durante la infección por *H. pylori*. IL-17 modula la respuesta de las células Th1. El incremento de IL-17 puede jugar un papel importante en la respuesta inflamatoria e interferir la colonización por *H. pylori*; de esta forma IL-17 puede influir

el resultado de la enfermedad asociada a esta bacteria (Shi *et al.*, 2010; Shiomi *et al.*, 2008; Gray *et al.*, 2013).

Interleucina 17A (IL-17A), es una citocina producida por células Th17 y neutrófilos. (Tsai *et al.*, 2013; Curtis *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Hirota *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011) demostraron que la subunidad B de la ureasa de *H. pylori* promueve una respuesta de células Th17 *in vitro* e *in vivo*. Jafazadeh *et al.*, (2009) encontraron que la expresión de IL-17 fue mayor en pacientes con úlcera duodenal, que en personas asintomáticas portadoras de la bacteria y que en individuos aparentemente sanos *H. pylori*-negativos. En los pacientes con úlcera duodenal, la expresión de IL-17 fue mayor en los CagA-positivos comparados con los CagA-negativos, sugiriendo que los niveles séricos de IL-17 son influidos por las cepas CagA-positivas de *H. pylori* (Jafazadet *et al.*, 2009). TGF- $\beta$  puede actuar de manera sinérgica con otras citocinas para regular la diferenciación de las células Treg y Th17 (Tu *et al.*, 2014). TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 son las citocinas más importantes para el inicio de la diferenciación de las células Th17, mientras que IL-23, parece ser importante para la expansión y/o mantenimiento de la respuesta Th17 (Li *et al.*, 2013).

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), es una citocina pleiotropica con propiedades anti-inflamatorias e inmunosupresoras. Se han identificado tres isoformas, TGF- $\beta$ 1 es la isoforma predominante en humanos (Landskron, 2014; Zarzynska 2014). TGF- $\beta$ 1 es sintetizado por casi todas las células, principalmente por plaquetas, células Treg, macrófagos/monocitos, linfocitos, fibroblastos, células epiteliales y células dendríticas. TGF- $\beta$ 1, juega un papel central en la inmunoregulación, apoptosis y angiogénesis, con efectos opuestos en muchos tejidos, por un lado, inhibe el crecimiento de las células epiteliales y por otro, estimula la proliferación de las células mesenquimales (Wang YQ *et al.*, 2013). TGF- $\beta$ 1 suprime la actividad antitumoral de las células T, de las células NK, neutrófilos, monocitos y macrófagos que tienen un papel importante en la regulación de la progresión tumoral (Zarzynska 2014). En pacientes con gastritis, se encontró que la expresión del mRNA de TGF- $\beta$ 1 fue significativamente mayor en los *H. pylori*-

positivos que en los negativos a la infección, y que dentro de los *H. pylori*-positivos la expresión de esta citocina fue mayor entre los infectados con el genotipo *vacAs1m1*. Se propone que TGF- $\beta$ 1 contribuye a la persistencia de la infección por la inhibición de la proliferación de las células T y de la respuesta inmune (Rahimian *et al.*, 2014). Por otro lado, en pacientes con cáncer gástrico, se encontró mayor expresión de TGF- $\beta$ 1 en tejido tumoral que en tejido normal adyacente (Naef *et al.*, 1997; Ma GF *et al.*, 2013; Ma H *et al.*, 2014). TGF- $\beta$  interfiere en la diferenciación y función de las células Th1 y Th2, a través de la inhibición de la expresión de STAT4 y GATA3, factores de transcripción requeridos para la diferenciación de las células Th1 y Th2, respectivamente (Tu *et al.*, 2014). Las células Th2 median la inmunidad humoral, por la secreción de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Wang *et al.*, 2007). Interleucina 4 (IL-4) es una citocina pleiotropica producida principalmente por células TCD4+ activadas, pero también por mastocitos, basófilos y eosinófilos. Ejerce numerosos efectos en diferentes tipos celulares. Promueve la diferenciación de linfocitos T vírgenes hacia células de tipo Th2, inhibiendo la generación de células Th1 (Salinas., 2007; Luzina *et al.*, 2012). En condiciones normales, IL-4 tienen función anti-inflamatoria y puede promover la supervivencia de células tumorales a través de la vía de Akt. Esta citocina induce la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl2 y Bcl-x por la vía STAT6. (Curling 2011). En población china, el polimorfismo T168C (rs2070874) de IL-4, se asocia con el riesgo de cáncer gástrico (Wu *et al.*, 2009). Sin embargo, los resultados de la expresión de IL-4 durante la infección por *H. pylori*, son contradictorios, varían en modelos murinos y en humanos y en función de las condiciones patológicas asociadas. Estudios en murinos revelan una disminución de la colonización bacteriana asociada con un aumento de la producción de IL-4 por las células CD4 del bazo estimuladas *in vitro*, lo que sugiere un efecto protector de la citocina (Saldinger *et al.*, 1998). En contraste, se ha reportado que IL-4 e IL-5 no son esenciales para la protección (Garhart *et al.* 2003). En biopsias de mucosa gástrica de pacientes alérgicos infectados por *H. pylori* encontraron concentraciones más altas de IL-4 que en los no alérgicos que estaban infectados. En otros estudios no se detecta a IL-4 en la mucosa gástrica de la mayoría de las personas infectadas por *H. pylori* (Quiding-Jarbrink *et al.*, 2001; Karttunen *et al.*, 1995).

Aun cuando la colonización de la mucosa por *H. pylori* induce una fuerte respuesta inmune innata y adaptativa, la infección no es eliminada y la gastritis crónica activa persiste de por vida si no se recibe tratamiento (Rahimian 2014). La inflamación aguda es una respuesta benéfica para restaurar el daño al tejido y eliminar agentes patógenos; sin embargo, una inflamación desregulada, puede volverse crónica induciendo la transformación maligna de las células y del tejido adyacente (Landskron, 2014). No se han encontrado estudios que relacionen la expresión local de IFN- $\gamma$ , IL-17A, TGF- $\beta$ 1 e IL-4 con los genotipos *vacA* y *cagA* de *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. El objetivo de este estudio fue analizar la relación entre la expresión de IFN- $\gamma$ , IL-17A, TGF- $\beta$ 1 e IL-4 con la infección por *H. pylori* y los genotipos *vacA* y *cagA* en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico.

## **Material y Métodos**

### **Pacientes**

Se incluyeron pacientes que asistieron a realizarse una endoscopia digestiva alta, entre agosto de 2011 y marzo de 2013, al Hospital General “Raymundo Abarca Alarcón”, a la Unidad Especializada en Gastroenterología Endoscopia de la Ciudad de Chilpancingo y al servicio de endoscopia del Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega” en Acapulco, Guerrero, México. Se seleccionaron pacientes sin tratamiento de erradicación para *H. pylori* durante el mes previo al procedimiento endoscópico. Se excluyeron del estudio los pacientes con tratamiento inmunosupresor o anti-inflamatorio. Los pacientes que aceptaron participar en el estudio firmaron una carta de consentimiento informado y posteriormente se les aplicó una encuesta para registrar datos generales e información relacionada con la enfermedad. El proyecto se aprobó por el Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Guerrero y por los hospitales participantes.

### **Endoscopia y obtención de biopsias**

La endoscopia se llevó a cabo después de una noche de ayuno con un videoprocador y videogastrosco (Fujinon, Wayne, NJ USA). De cada paciente, se tomaron 4 biopsias gástricas de antro, cuerpo o del tumor; una fue colocada en solución amortiguadora (Tris 10mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, SDS 0.5%) para el diagnóstico molecular de *H. pylori*. Otra fue fijada en alcohol absoluto para verificar la expresión de IFN- $\gamma$ , IL-17A TGF- $\beta$ 1 e IL-4 por inmunohistoquímica. Otra fue colocada en Trizol y almacenada a -70°C, para su posterior procesamiento. La última biopsia fue fijada en formol amortiguado e incluida en parafina para el estudio histopatológico. Cortes histológicos de 3  $\mu$ m de grosor fueron teñidos con hematoxilina y eosina y evaluados por un patólogo usando los criterios del sistema de Sydney actualizado (Dixon *et al*, 1996) o la clasificación de Lauren (Lauren, 1965). En base al diagnóstico histopatológico se clasificó a los pacientes en el grupo de gastritis crónica o cáncer gástrico.

### **Detección y genotipificación de *H. pylori***

Se extrajo el DNA total de las biopsias gástricas por la técnica de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, previa digestión con Proteinasa K (Sambrook & Russel, 2001). La detección de *H. pylori* se realizó por PCR, amplificando un fragmento del gen 16S del RNAr, siguiendo la metodología descrita previamente (Román-Román *et al.*, 2013). Las muestras *H. pylori* positivas fueron sometidas a una PCR múltiple para amplificar un fragmento del gen *cagA*, del gen *babA2* y la región *s* y *m* del gen *vacA*, de acuerdo a la metodología descrita previamente por este grupo de trabajo (Martínez-Carrillo *et al.*, 2014).

### **Expresión de IFN- $\gamma$ , IL-17A TGF- $\beta$ 1 e IL-4 por inmunohistoquímica**

Las muestras fijadas en alcohol absoluto fueron incluidas en parafina. Se hicieron cortes de 3  $\mu$ m de grosor. Cada sección de tejido fue desparafinado con xilol y rehidratado con alcohol en grados descendentes. Las laminillas se sometieron a ebullición con buffer de citratos (Declere 1X, Cell marque, Rocklin, CA, USA) por 20

min en autoclave, para recuperación antigénica. Después de permeabilización y bloqueo de la peroxidasa endógena, los cortes fueron incubados toda la noche a temperatura ambiente con los anticuerpos monoclonales de ratón anti-IFN- $\gamma$  humano o anti-IL-4 humano dilución 1:50 y 1:500, respectivamente, o con los anticuerpos policlonales de conejo anti-IL-17A humano o anti-TGF- $\beta$ 1 humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) dilución 1:1000. La unión del anticuerpo a la citocina fue detectada con el Kit Mouse/Rabbit ImmunoDetector HRP/DAB Detection System (Bio SB, Santa Barbara, CA, USA). Los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina (Biocare Medical, Concord, CA, USA). Los datos fueron obtenidos por el conteo manual de las células teñidas positivamente en cinco campos al azar bajo un poder de magnificación 400x usando el software Leica Microsystems CMS GmbH versión 4.3.0. Las células mononucleares con tinción nuclear o citoplasmática marrón fueron consideradas positivas. Los datos fueron expresados como porcentaje de células positivas.

### **Análisis estadístico**

Usando el paquete estadístico STATA versión 9.2 y Graphpad Prism versión 5.01, se determinaron las frecuencias de las variables cualitativas y mediana y rango intercuartilo del porcentaje de células positiva a IFN- $\gamma$ , IL-17A TGF- $\beta$ 1 e IL-4. El valor de p se obtuvo con la prueba de  $X^2$  o exacta de Fisher para variables cualitativas y la prueba de Mann-Witney y Kruskal-Wallis para las variables cuantitativas. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

### **Resultados**

#### **Población de estudio**

Se estudiaron 99 pacientes con diagnóstico histopatológico de gastritis crónica y 12 con cáncer gástrico; el 58.3% (7/12) de los pacientes fueron diagnosticados con cáncer gástrico de tipo difuso, el 25% (3/12) de tipo intestinal y el 16.7% (2/12) de tipo mixto. La media de edad en el grupo de gastritis crónica fue de 48 años con un

rango de 19 a 80 años y en el grupo de cáncer gástrico la media fue de 57 años con una edad mínima de 31 años y una máxima de 85 años. En ambos grupos de estudio hubo mayor participación del género femenino, 62.6% (62/99) en gastritis crónica y 66.7% (8/12) en cáncer gástrico.

### **Prevalencia de *H. pylori* y genotipos *vacA* y *cagA***

La prevalencia general de infección por *H. pylori* fue del 56.8% (63/111) y fue muy similar entre los grupos ( $p=0.907$ ) (Tabla 1). El 87.3% (55/63) de los infectados albergaba genotipos *vacAs1m1* y en el 77.8% (49/63) se detectaron cepas *H. pylori* *cagA*-positivas. El 73% (46/63) de los pacientes *H. pylori*-positivos tenían el genotipo *vacAs1m1/cagA*-positivo. La prevalencia de *H. pylori* varió con el tipo de cáncer; 71.4% (5/7) en el grupo de tipo difuso 33.3% (1/3) en el de tipo intestinal y 50% (1/2) en el tipo mixto.

Tabla 1. Prevalencia de infección por *H. pylori* y genotipos *vacA/cagA*

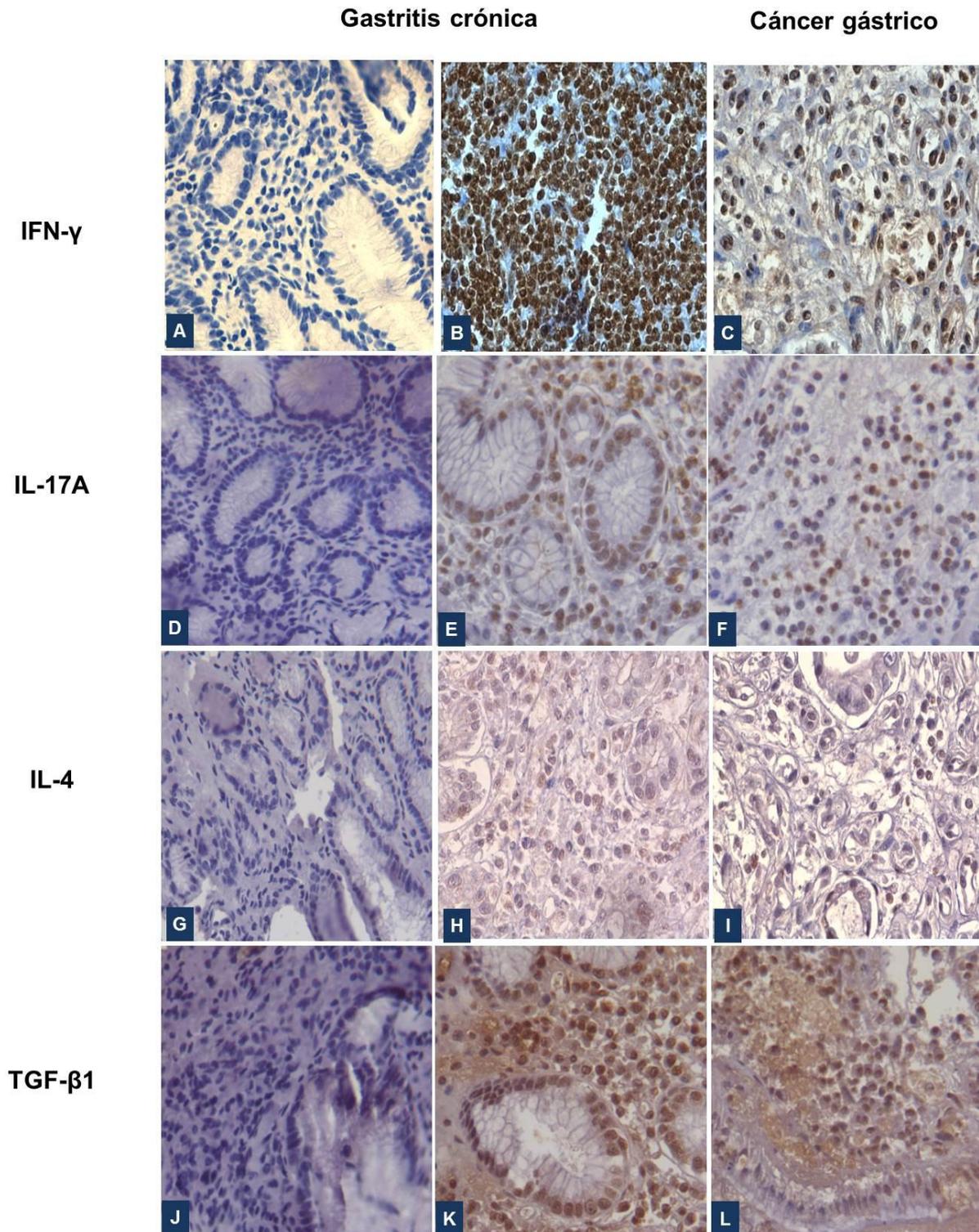
	Gastritis crónica n (%)	Cáncer gástrico n (%)	Valor de p
<b><i>H. pylori</i> n = 111</b>			
Negativo	43 (43.4)	5 (41.7)	0.907 <sup>a</sup>
Positivo	56 (56.6)	7 (58.3)	
<b>Genotipo <i>vacA</i> n = 63</b>			
<i>s2m2</i>	5 (8.9)	0	1.000 <sup>b</sup>
<i>s1m2</i>	3 (5.4)	0	
<i>s1m1</i>	48 (85.7)	7 (100)	
Total	56 (100)	7 (100)	
<b>Genotipo <i>cagA</i> n = 63</b>			
<i>cagA</i> <sup>-</sup>	13 (23.2)	1 (14.3)	1.000 <sup>b</sup>
<i>cagA</i> <sup>+</sup>	43 (76.8)	6 (85.7)	
Total	56 (100)	7 (100)	
<b>Genotipo <i>vacA/cagA</i> n = 63</b>			
<i>vacAs2m2/cagA</i> <sup>-</sup>	4 (7.1)	0	1.000 <sup>b</sup>
<i>vacAs1m1/cagA</i> <sup>-</sup>	8 (14.3)	1 (14.3)	
<i>vacAs1m1/cagA</i> <sup>+</sup>	40 (71.4)	6 (85.7)	
Otros genotipos*	4 (7.1)	0	
Total	56 (100)	7 (100)	

<sup>a</sup> Prueba de  $\chi^2$ ; <sup>b</sup> Prueba exacta de Fisher; \* Se incluye: *vacAs1m2/cagA*<sup>-</sup> y *vacAs2m2/cagA*<sup>+</sup>.

### Expresión de IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-4 y TGF- $\beta$ 1

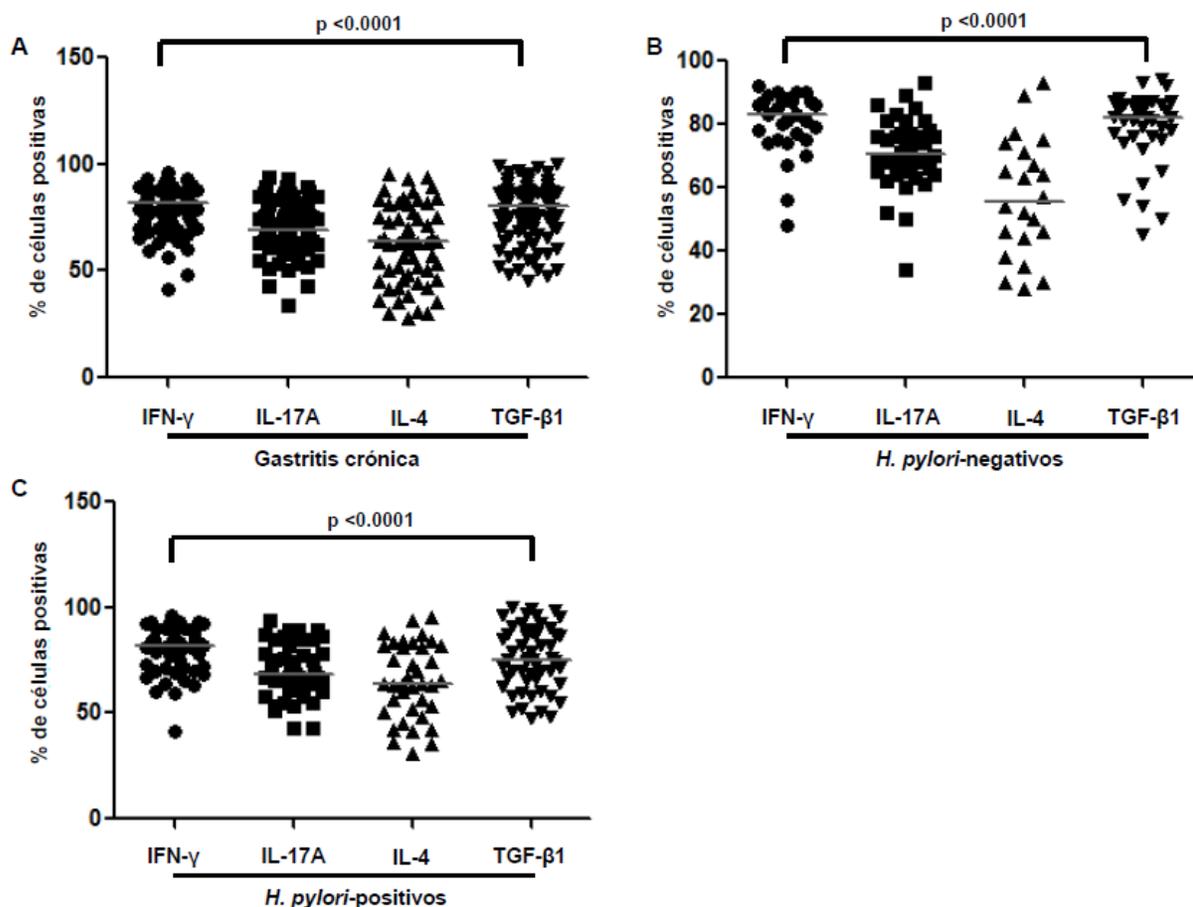
La inmunotinción de IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-4 y TGF- $\beta$ 1 se localizó predominantemente en el citoplasma y en menor frecuencia en el núcleo de las células mononucleares infiltrantes (Figura 1). En pacientes con gastritis crónica, la frecuencia de expresión de IFN- $\gamma$  fue del 83.8% (83/99), del 87.9% (87/99) para IL-17A, 66.7% (66/99) para IL-4 y del 94.9% (94/99) para TGF- $\beta$ 1. En enfermos con cáncer gástrico el 100%

(12/12) fueron positivos a la expresaron de IFN- $\gamma$ , IL-17A y TGF- $\beta$ 1, el 58.3% (7/12) fue IL-4 positivo.



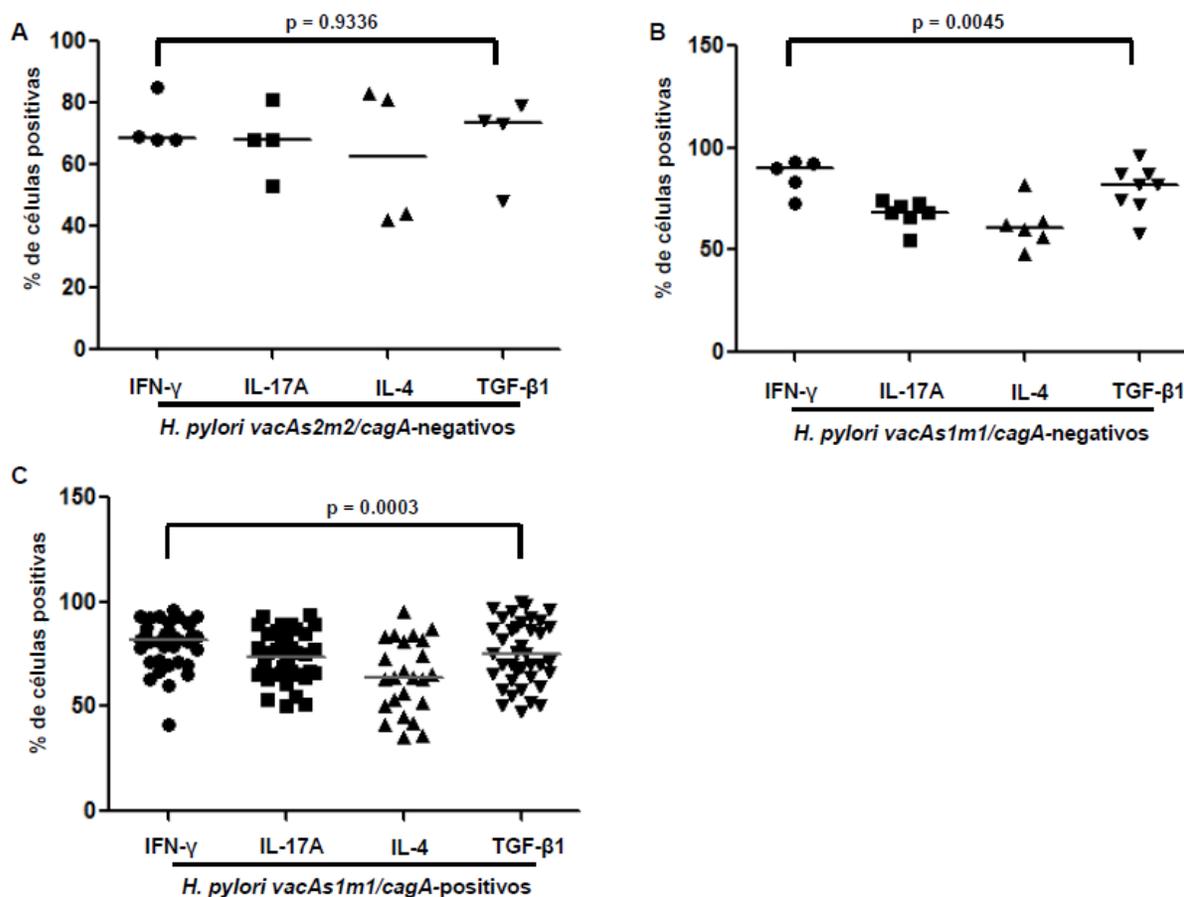
**Figura 1. Inmunohistoquímica de la expresión de IFN- $\gamma$ , IL-17 IL-4 y TGF- $\beta$ 1 en biopsias gástricas de pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico, contrateñidas con hematoxilina (40x). A, D, G, J. Biopsias gástrica de paciente con gastritis crónica negativa a IFN- $\gamma$ , IL-17 IL-4 y TGF- $\beta$ 1, respectivamente. B, E, H, K. Biopsias gástricas de paciente con gastritis crónica positiva a IFN- $\gamma$ , IL-17 IL-4 y TGF- $\beta$ 1, respectivamente C, F, I, L. Biopsias gástricas de paciente con cáncer gástrico positiva a IFN- $\gamma$ , IL-17 IL-4 y TGF- $\beta$ 1, respectivamente.**

Entre los pacientes con gastritis crónica, la mediana del porcentaje de células positivas a IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ 1 fue significativamente mayor (82% y 80, respectivamente) que a IL-17A (69%) e IL-4 (64%) ( $p < 0.0001$ ) (Figura 2A). Entre los que no estaban infectados por *H. pylori* el porcentaje de células positivas a IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ 1 fue significativamente mayor (83% y 82%, respectivamente;  $p < 0.0001$ ) que a IL-17A (68%) e IL-4 (56%), (Figura 2B). En los pacientes *H. pylori*-positivos la mediana del porcentaje de células positivas a IL-4 fue significativamente menor (64%) que a IFN- $\gamma$  (82%), a IL-17A (70%) y TGF- $\beta$ 1 (75%), ( $p < 0.0001$ ) (Figura 2C).



**Figura 2. Expresión de IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-4 y TGF- $\beta$ 1.** A. En pacientes con gastritis crónica. B. En pacientes con gastritis crónica *H. pylori*-negativos. C. En pacientes con gastritis crónica *H. pylori*-positivos.

Entre los pacientes con gastritis crónica infectados con el genotipo *vacAs2m2/cagA*-negativo, las medianas del porcentaje de células positivas más bajas, para IFN- $\gamma$  (69%) y para TGF- $\beta$ 1 (74%) (Figura 3A). En contraste, entre los portadores de cepas *vacAs1m1/cagA*-negativo, la mediana de células positivas fue de 90% para IFN- $\gamma$  y 82% para TGF- $\beta$ 1 (Figura 3B). El 71.4% de los pacientes con gastritis crónica estaban infectados con el genotipo más virulento de *H. pylori* (*vacAs1m1/cagA*-positivo), en éstos se encontró que el porcentaje de células positivas a IL-17A e IL-4 fue mayor (74% y 64%, respectivamente) (Figura 3C) en comparación con los genotipos bacterianos menos virulentos.

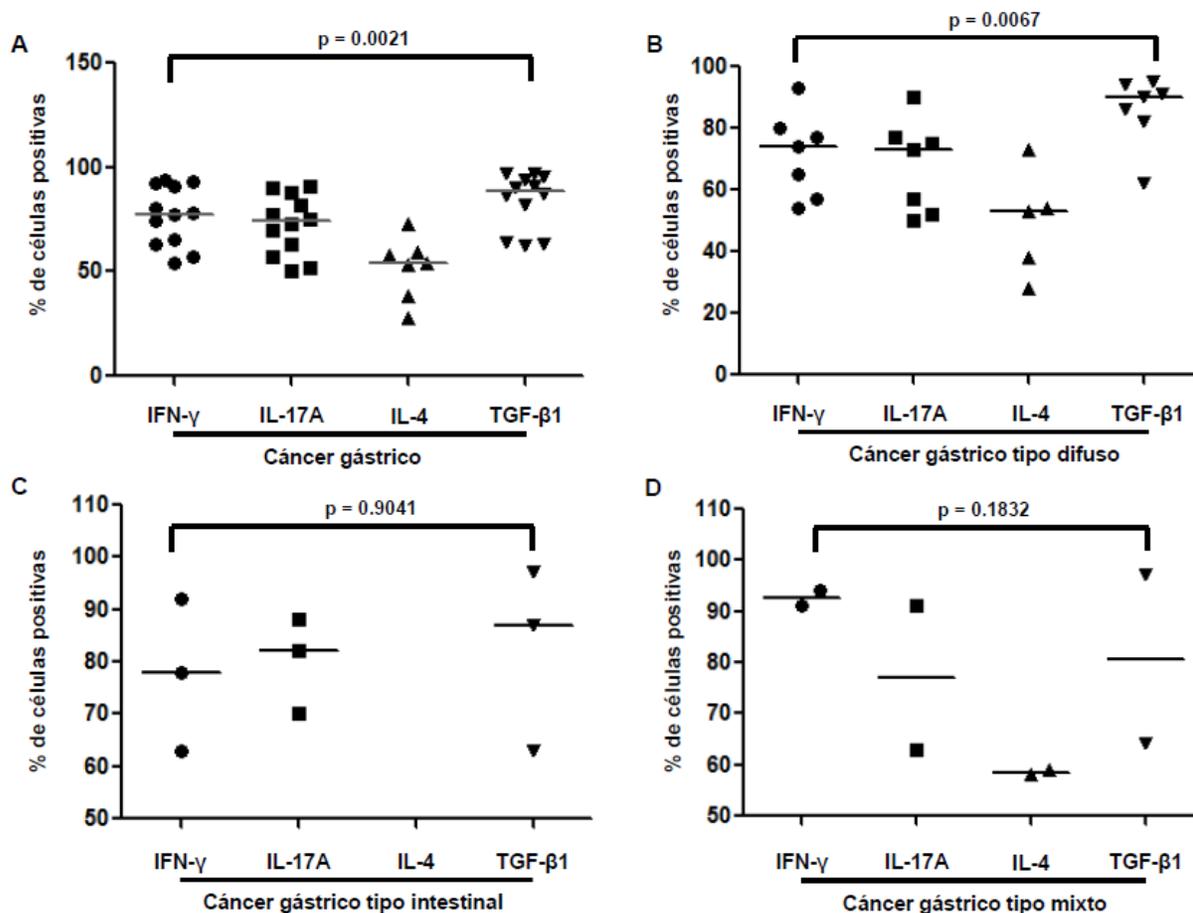


**Figura 3. Expresión de IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-4 y TGF- $\beta$ 1 en pacientes con gastritis crónica.**

**A.** En pacientes *H. pylori vacAs2m2/cagA-negativos*. **B.** En pacientes *H. pylori vacAs1m1/cagA-negativos*. **C.** En pacientes *H. pylori vacAs1m1/cagA-positivos*.

En los pacientes con cáncer gástrico, la mediana del porcentaje de células positivas a TGF- $\beta$ 1 fue significativamente mayor (89%) que la de IFN- $\gamma$  (78%), IL-17A (74%) e IL-4 (54%), ( $p=0.0021$ ) (Figura 4A). Entre los pacientes con cáncer gástrico de tipo difuso, se observó que la mediana del porcentaje de células positivas a TGF- $\beta$ 1 fue significativamente mayor (90%) que la de IFN- $\gamma$  (74%), IL-17A (73%) e IL-4 (53%), ( $p=0.0067$ ) (Figura 4B). En los pacientes con cáncer gástrico de tipo intestinal no se detectó expresión de IL-4 y las diferencias en el porcentaje de células con expresión de IFN- $\gamma$ , IL-17A y TGF- $\beta$ 1 no fueron significativas (Figura 4C). En los pacientes con cáncer gástrico de tipo mixto, la mediana del porcentaje de células positivas a IFN- $\gamma$

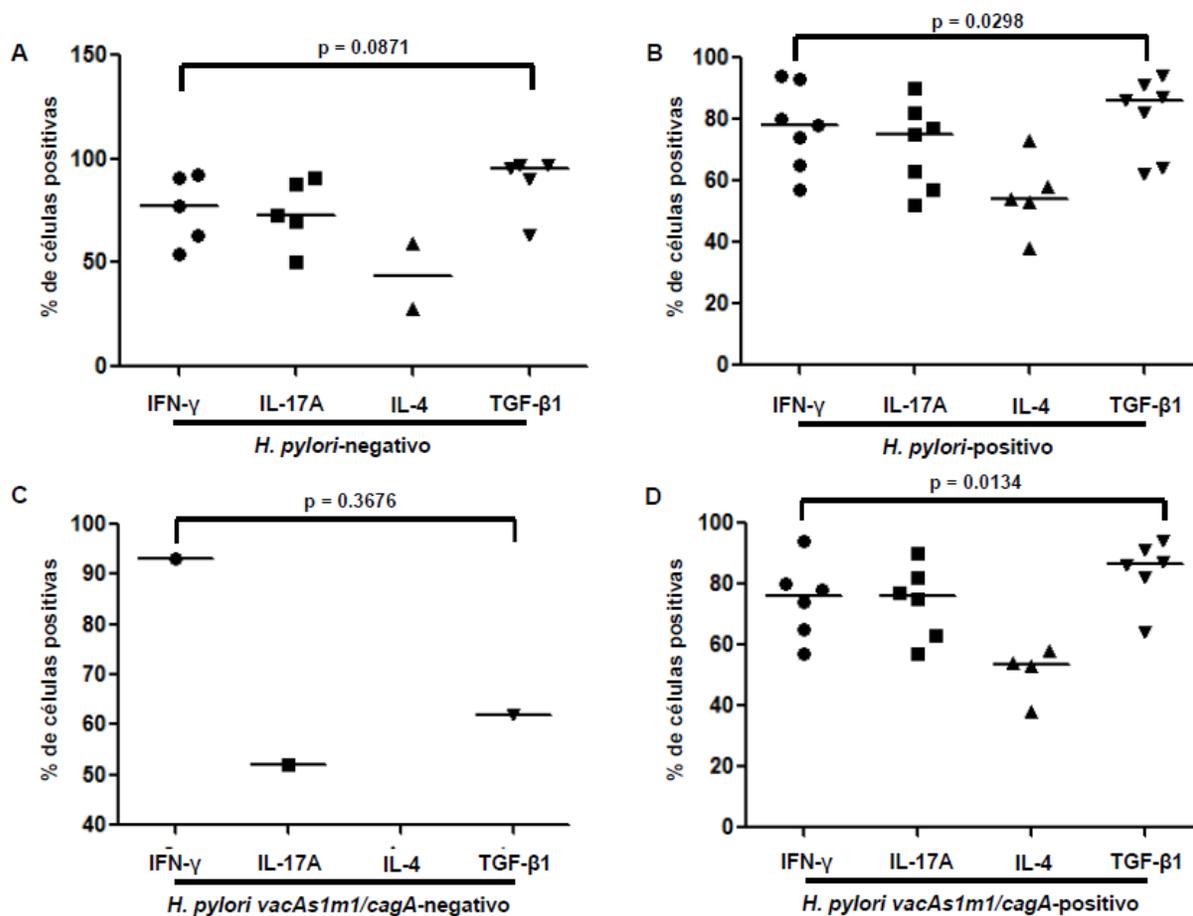
fue del 93%, la de IL-17A del 77%, la de IL-4 del 59% y la de TGF- $\beta$ 1 del 81%, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 4D).



**Figura 4. Expresión de IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-4 y TGF- $\beta$ 1.** A. En pacientes con cáncer gástrico de tipo difuso. B. En pacientes con cáncer gástrico de tipo intestinal. C. En pacientes con cáncer gástrico de tipo intestinal. D. En pacientes con cáncer gástrico de tipo mixto.

En los enfermos con cáncer gástrico sin infección por *H. pylori*, la mediana del porcentaje de células positivas a TGF- $\beta$ 1 fue mayor (95%) que la de IFN- $\gamma$  (77%), la de IL-17A (73%) y la de IL-4 (44%), ( $p=0.0871$ ) (Figura 5A). Este patrón de expresión de citocinas fue similar en los sujetos *H. pylori*-positivos (Figura 5B). En los infectados por *H. pylori vacAs1m1/cagA*-negativo no se detectó expresión de IL-4 y no se encontraron diferencias significativas entre la mediana del porcentaje de células positivas a IFN- $\gamma$ , IL-17A y TGF- $\beta$ 1 (Figura 5C). El 85.7% de los pacientes con cáncer gástrico estaban infectados por *H. pylori vacAs1m1/cagA*-positivo y entre

estos, la mediana del porcentaje de células con expresión de TGF- $\beta$ 1 fue significativamente mayor (87%) que la de IFN- $\gamma$  (76%), IL-17A (76%) e IL-4 (54%), ( $p=0.0134$ ) (Figura 5D).



**Figura 5. Expresión de IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-4 y TGF- $\beta$ 1 en pacientes con cáncer gástrico.** **A.** En pacientes *H. pylori*-negativos. **B.** En pacientes *H. pylori*-positivos. **C.** En pacientes *H. pylori vacAs1m1/cagA*-negativos. **D.** En pacientes *H. pylori vacAs1m1/cagA*-positivos.

### Discusión.

La inflamación crónica local debida a la infección por *H. pylori* está caracterizada por la infiltración de neutrófilos, monocitos-macrófagos y linfocitos, y por el incremento en la producción de diversas citocinas. El resultado clínico de la infección está influido por la respuesta inmunitaria del huésped, por las interacciones de la célula epitelial con los componentes bacterianos y por la influencia del ambiente (Lindholm *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2007; Rigoli & Caruso 2014; Pelayo-Correa 2013). En este estudio

comparamos la expresión de IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4 y TGF- $\beta$  en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico sin infección e infectados con diferentes genotipos de *H. pylori*.

En esta investigación, encontramos que el cáncer gástrico de tipo difuso fue el más frecuente (58.3%), en población del Suroeste de México. Este dato está en acuerdo con reportes previos en población mexicana informados por López-Vidal *et al.*, (63%) y por López-Carrillo *et al.*, (51.9%) (López-Vidal *et al.*, 2008; López-Carrillo *et al.*, 2012). Rigoli & Caruso, afirman que el cáncer de tipo difuso, tiende a desarrollarse en sujetos más jóvenes y que tiene pronóstico más pobre que el de tipo intestinal (Rigoli & Caruso 2014). Contradictoriamente, entre los pacientes incluidos en este trabajo, el cáncer gástrico de tipo intestinal se detectó en sujetos más jóvenes (31 años de edad) que el cáncer de tipo difuso (44 años).

El origen del cáncer gástrico es multifactorial, aunque la infección por *H. pylori* se reconoce como el principal factor etiológico (Pelayo-Correa 2013). En este estudio, la prevalencia de *H. pylori* fue del 58.3% (7/12) en los sujetos con cáncer gástrico y varió entre los tipos; el 71.4% en el tipo difuso, el 33.3% en el tipo intestinal y el 50% en el tipo mixto (Datos no mostrados). El 100% de las cepas fueron *H. pylori vacAs1m1* y el 85.7% también fue *cagA*<sup>+</sup>. de Souza *et al.*, (2014) en población del Noreste de Brasil con cáncer gástrico, encontraron que el 88% de los sujetos eran *H. pylori*-positivos y que la prevalencia de infección fue del 83.3% en los enfermos con cáncer de tipo difuso y del 91.5% en quienes tenían carcinoma gástrico de tipo intestinal. Por el contrario, en los pacientes mexicanos incluidos en este estudio, la frecuencia de *H. pylori* fue mayor en cáncer de tipo difuso que en el de tipo intestinal. La prevalencia de *H. pylori* y de los genotipos *vacA* y *cagA* en sujetos del Suroeste de México, supera a la informada por López-Vidal *et al.*, (2008) quienes reportaron que el 38% de los pacientes mexicanos con cáncer gástrico eran *H. pylori*-positivos y el 72% eran *cagA*<sup>+</sup>. En otras poblaciones de América Latina se han encontrado prevalencias variables de genotipos *vacAs1m1* y de *H. pylori cagA*<sup>+</sup>. En pacientes del Noreste de Brasil con cáncer gástrico Figueiredo-Cavalcante *et al.*, (2012)

encontraron que el 83.3% de las cepas de *H. pylori* eran *vacAs1*, el 53.3% *vacAm1* y el 96.7% eran *cagA+*. de Souza *et al.*, (2014) en sujetos con cáncer gástrico también del Noreste de Brasil reportaron un 67.2% de *H. pylori cagA+*. De acuerdo a los informes publicados, aproximadamente el 60% de los casos de cáncer gástrico distal (difuso e intestinal) son atribuibles a la infección por *H. pylori* (Rigoli & Caruso 2014; Cooke *et al.*, 2013).

En los casos de gastritis crónica, la prevalencia de *H. pylori* fue del 56.6%, inferior a la reportada por Paniagua *et al.*, (2009) en pacientes con gastritis crónica del Estado de México 60.1% y al 69.2% encontrado por de Souza *et al.*, (2014) en población del noreste de Brasil con la misma patología. Los genotipos *vacAs1m1* y *cagA+* son más frecuentes en pacientes con gastritis crónica del Suroeste de México (85.7% y 76.8%, respectivamente) que en pacientes cubanos con dispepsia funcional estudiados por Torres *et al.*, (2009). En población brasileña, de Sousa *et al.*, encontraron que el 61.5% de los pacientes *H. pylori* positivos eran *cagA+*. Oliveira *et al.*, (2014) en población del sureste de Brasil, reportaron una prevalencia de *cagA+* del 29.6%. La prevalencia de *H. pylori* y de sus genotipos virulentos varía entre áreas geográficas, entre países y entre grupos étnicos (Torres LE *et al.*, 2009; Alvarado-Esquivel 2013). El fondo genético, los estilos de vida y el área geográfica de procedencia de los pacientes, las condiciones de saneamiento ambiental, el número de biopsias usadas para el diagnóstico molecular, así como los métodos usados en la detección y genotipificación de la bacteria son factores que pueden determinar las diferencias en la prevalencia de infección y de los genotipos de *H. pylori* entre las distintas poblaciones.

En este estudio, encontramos que en los pacientes con gastritis crónica sin infección por *H. pylori* la mediana del porcentaje de células positivas a IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ 1 fue significativamente mayor (83% y 82%, respectivamente;  $p < 0.0001$ ), que a IL-17A (68%) e IL-4 (56%). Es probable que otros estímulos no infecciosos e infecciosos estén activando la expresión de citocinas, que mantienen el cuadro inflamatorio. El virus de Epstein-Barr y el Citomegalovirus inducen expresión de IFN- $\gamma$  y se han

encontrado en la mucosa gástrica humana (de Souza *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2014). Por otro lado, es probable que TGF- $\beta$ 1 esté ejerciendo su función inhibidora sobre células Th17 a fin de contrarrestar la respuesta inflamatoria gástrica.

En los pacientes con gastritis crónica *H. pylori*-positivos se encontró que la mediana del porcentaje de células positivas a IL-4 fue significativamente menor que la de IFN- $\gamma$ , IL-17A y TGF- $\beta$ 1. Este hallazgo, está en acuerdo con reportes previos que indican que en mucosa gástrica de pacientes infectados por *H. pylori* predomina el perfil de citocinas Th1 y Th17, favoreciendo la inflamación y evitando la eliminación de la bacteria (Lindholm *et al.*, 1998; Lizza *et al.*, 2000; Lopes *et al.*, 2005; Pellicano *et al.*, 2007; Lindgren *et al.*, 2011; Serrano *et al.*, 2013; Bhuiyan *et al.*, 2014). En los pacientes infectados por cepas *vacAs1m1/cagA*-negativo y *vacAs1m1/cagA*-positivo la mediana del porcentaje de células positivas a IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1 e IL-17A fue significativamente mayor que a la de IL-4. Es probable que el incremento en la expresión de IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1 e IL-17A esté relacionada con el genotipo *vacA/cagA* de *H. pylori*, algunos estudios han mostrado que la alta expresión de IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-4 y TGF- $\beta$ 1 está relacionada con cepas de *H. pylori* CagA-positivas (Wang *et al.*, 2007), con la subunidad B de la ureasa (Zhang *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2014) o con *vacAs1m1* (Rahimian *et al.*, 2014).

Es probable que en pacientes con gastritis crónica, los niveles incrementados de IFN- $\gamma$  promuevan la inflamación gástrica por activación de fagocitos mononucleares y por la sobrerregulación de la expresión de moléculas MHC clase I y II (Lindholm *et al.*, 1998). Además, IFN- $\gamma$  puede contribuir con el control de la infección por *H. pylori*, pero por otro lado, la alta expresión de esta citocina induce cambios preneoplásicos de la mucosa gástrica (Sayi *et al.*, 2009). Por su parte IL-17 promueve la eliminación de *H. pylori*, mediando la activación de neutrófilos, células que pueden infiltrar el epitelio gástrico, producir péptidos antimicrobianos y matar a la bacteria en el lumen (Serrano *et al.*, 2013; Bhuiyan *et al.*, 2014). IL-17 es un potente inductor de IL-8 (Sebkova *et al.*, 2004), quimiocina que atrae células mononucleares y neutrófilos al sitio de la infección (Mizuno *et al.*, 2005). Asimismo, IL-17 estimula a los fibroblastos para liberar metaloproteinasas que degradan la mucosa, favoreciendo la proliferación

celular y la hiperplasia e incrementar la producción de IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  (Jafarzadeh *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2014). Por otro lado, TGF- $\beta$ 1, participa en la diferenciación de las células T CD4+ vírgenes hacia el fenotipo Th17 o T regulador. TGF- $\beta$ 1 actúa sinérgicamente con IL-1 $\beta$  e IL-6 para favorecer la diferenciación hacia Th17, lo que resulta en el incremento de la expresión de IL-17, con el consecuente mantenimiento de la inflamación. Por otra parte, TGF- $\beta$ 1 e IL-6 promueven diferenciación de células T reguladoras y un número incrementado de células T reguladoras en la mucosa gástrica podría explicar el mantenimiento de la inflamación crónica, originando tolerancia inmunológica, lo que favorecería la persistencia de la infección por *H. pylori* (Zhang *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2014, Rahimian *et al.*, 2014). Es probable que TGF- $\beta$ 1 también esté involucrado en la inhibición de la diferenciación de las células Th2 y que esto sea una posible explicación al bajo porcentaje de células positivas a IL-4 encontrado en este estudio. VacA induce activación de macrófagos y células dendríticas que en respuesta producen IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-8, entre otras. Estas citocinas estimulan la producción de IL-17A e IFN- $\gamma$  e inhiben la respuesta Th2, a la que corresponde IL-4.

En los pacientes con cáncer gástrico infectados por *H. pylori vacAs1m1/cagA*-negativo se encontró que la mediana del porcentaje de células positivas a IFN- $\gamma$  fue mayor que en los *H. pylori vacAs1m1/cagA*-positivos, contrario a lo reportado por Wang *et al.*, quienes encontraron una mayor expresión de IFN- $\gamma$  en los CagA-positivos (Wang *et al.*, 2007). Por otro lado, la mediana del porcentaje de células positivas a IL-17A fue mayor en los pacientes con cáncer gástrico que en los enfermos con gastritis crónica (74% y 69%, respectivamente), hallazgos similares a los encontrados en reportes previos (Chen *et al.*, 2011; Yamada *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2014). Adicionalmente, Chen *et al.*, reportaron que la probabilidad de sobrevida a cinco años entre los pacientes que expresan niveles altos de IL-17 fue significativamente mayor que en aquellos que expresan niveles bajos. En contraste, Yamada *et al.*, encontraron que la tasa de sobrevida entre los pacientes con alta concentración de IL-17 fue del 47.1% y en pacientes con baja concentración de IL-17 fue del 83.9% (Chen *et al.*, 2011; Yamada *et al.*, 2012). No se han

encontrado reportes que comparen la expresión de IL-17 con los genotipos *vacA* y *cagA* de *H. pylori* en muestras de pacientes con cáncer gástrico. En el presente estudio se encontró que la mediana del porcentaje de células positivas a IL-17A fue mayor (76%) en los infectados por *H. pylori vacAs1m1/cagA*-positivos que en los *vacAs1m1/cagA*-negativos (52%), lo que sugiere que, probablemente *cagA* podría estar relacionada con el incremento de la expresión de IL-17A.

Asimismo, en los pacientes con cáncer gástrico negativos a *H. pylori* se observó mayor porcentaje de células positivas a TGF- $\beta$ 1 (95%). Estos resultados sugieren que la infección por *H. pylori* no se relaciona con la expresión de TGF- $\beta$ 1, y que otros estímulos, probablemente provenientes de las células tumorales, están participando induciendo la expresión de esta citocina en mucosa gástrica de pacientes con cáncer gástrico. Independientemente de la infección por *H. pylori*, nuestros hallazgos están en acuerdo con lo reportado por Naef *et al.*, (1997), Ma *et al.*, (2013), Docea *et al.*, (2012) y Ma *et al.*, (2014) quienes encontraron sobre-expresión de TGF- $\beta$ 1 en tejido canceroso comparado con tejido normal adyacente. Por otra parte, en este estudio, se encontró que la mediana del porcentaje de células positivas a IL-4 fue menor en los pacientes con cáncer gástrico que en los enfermos con gastritis crónica, lo que difiere con lo reportado por Wang *et al.*, quienes mencionan que la expresión de IL-4 incrementa gradualmente de gastritis crónica a cáncer gástrico (Wang *et al.*, 2007).

En los pacientes con cáncer gástrico, la alta expresión de IFN- $\gamma$  puede tener diversos significados: a) indicar buen pronóstico, debido a que se ha reportado que IFN- $\gamma$  puede promover la eliminación de las células neoplásicas a través de su acción angiostática, la cual restringe el crecimiento tumoral por interferir con el suministro de sangre (Lindgren *et al.*, 2011); b) puede estar ejerciendo un efecto protumoral a través de señales proliferativas y antiapoptóticas, y facilitando el escape de las células tumorales de la acción citolítica de las células NK y los linfocitos T citotóxicos (Raza-Zaidi & Merlino, 2011). Por su parte, IL-17 puede participar en la respuesta antitumoral o promover la carcinogénesis, en este sentido, existe controversia acerca

del papel que juega IL-17 en el cáncer gástrico. El papel de IL-17 puede depender del tipo de tumor y del estado inmunológico del paciente. IL-17 atrae a las células Th1 efectoras al sitio del tumor a través de las quimiocinas CXCL9 y CXCL10 (Chen *et al.*, 2011) y la unión de IL-17 con su receptor en las células endoteliales, estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos (Meng *et al.*, 2012). Adicionalmente, la alta expresión de TGF- $\beta$ 1 en el microambiente tumoral, juega un papel importante en la evasión de la inmunovigilancia, suprimiendo la activación, maduración y diferenciación de las células NK, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos y células CD4+ y CD8+ (Tu *et al.*, 2014). A pesar de que la principal función de IL-4 es anti-inflamatoria y está involucrada en la homeostasis del sistema inmune, también se ha propuesto que IL-4 tiene acción anti-apoptótica, a través de la activación de la vía Akt, con la consecuente supervivencia de las células tumorales (Curling 2011).

En este estudio, se encontró que en los pacientes con cáncer gástrico de tipo difuso, la mediana del porcentaje de células positivas a TGF- $\beta$ 1 fue significativamente mayor (90%) que a IFN- $\gamma$  (74%), IL-17A (73%) e IL-4 (53%). En los pacientes con cáncer de tipo intestinal, a pesar de que la diferencia no fue significativa, también se encontró una mayor expresión de TGF- $\beta$ 1, sin embargo la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-17A fue mayor en este grupo de pacientes que en los de cáncer de tipo difuso.

En conclusión, en este estudio encontramos una alta proporción de pacientes con gastritis crónica infectados por *H. pylori vacAs1m1/cagA*-positivo (71.4%), en los que predominó el perfil de citocinas Th1 y Th17 y es probable que estos pacientes estén en mayor riesgo de desarrollar lesiones precursoras más graves e incluso evolucionar a cáncer gástrico. En los pacientes con cáncer gástrico, es probable que las citocinas estén actuando sinérgicamente para mantener el microambiente tumoral inflamatorio, lo favorecería el crecimiento tumoral, metástasis y angiogénesis. Adicionalmente, es probable que la determinación del perfil de citocinas pueda ser útil como biomarcador diagnóstico que ayude en la clasificación del tipo de cáncer, sin embargo se requieren de más estudios que exploren este posible papel.

## Referencias

- Alvarado-Esquivel, C., 2013. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* Infection in Tepehuanos Aged 15 Years and Older in Durango, Mexico. *J. Pathog.* 2013, e243246.
- Alzahrani S, Lina TT, Gonzalez J, Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. 2014. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol*, 20(36): 12767-12780.
- Bhuiyan, T.R., Islam, M.M.T., Uddin, T., Chowdhury, M.I., Janzon, A., Adamsson, J., Lundin, S.B., *et al.*, 2014. Th1 and Th17 Responses to *Helicobacter pylori* in Bangladeshi Infants, Children and Adults. *PLoS ONE* 9. doi:10.1371/journal.pone.0093943
- Cavalcante, M.Q. de F., Silva, C.I.S., Braga-Neto, M.B., Fialho, A.B.C., Nunes Fialho, A., Barbosa, A.M.C., *et al.*, 2012. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 561–563.
- Chen, J., 2011. Intratumoral Expression of IL-17 and Its Prognostic Role in Gastric Adenocarcinoma Patients. *Int. J. Biol. Sci.* 53–60.
- Cooke, C.L., Torres, J., Solnick, J.V., 2013. Biomarkers of *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer. *Gut Microbes* 4, 532–540.
- Correa P, MD. 2013 Gastric Cancer: Overview. *Gastroenterol Clin North Am.* 42(2): 211–217. doi:10.1016/j.gtc.2013.01.002.
- Correa, P., Piazzuelo, M.B., 2013. The gastric cancer. *Colomb. Médica* 44, 192–201.
- Culig Z. 2011. Cytokine disbalance in common human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813 (2011) 308–314.
- Curtis, M.M., Way, S.S., 2009. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 126, 177–185.
- D’Elios, M.M., Czinn, S.J., 2014. Immunity, Inflammation, and Vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 19, 19–26. doi:10.1111/hel.12156
- de Figueiredo-Cavalcante M, Simões-Silva CI, Braga-Neto MB, Campelo-Fialho AB, Nunes-Fialho A, Barcosa AMC, *et al.* 2012. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 107(4): 561-563.
- De Souza, C.R., de Oliveira, K., Ferraz, J.J., Leal, M., Calcagno, D., Seabra, A., *et al.*, 2014. Occurrence of *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus infection in endoscopic and gastric cancer patients from Northern Brazil. *BMC Gastroenterol.* 14, 179.
- Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, *et al.* Classification and grading of gastritis. The updated Sydney system-International workshop on the histopathology of gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol.* 1996; 20:1161-1181.
- Docea, A.O., Mitruț, P., Grigore, D., Pirici, D., Călina, D.C., Gofiță, E., 2012. Immunohistochemical expression of TGF beta (TGF-β), TGF beta receptor 1 (TGFB1), and Ki67 in intestinal variant of gastric adenocarcinomas. *Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.* 53, 683–692.
- Egli A, Silva M Jr, O’Shea D, Wilson LE, Baluch A, *et al.* 2012. An Analysis of Regulatory T-Cell and Th-17 Cell Dynamics during Cytomegalovirus Replication in Solid Organ Transplant Recipients. *PLoS ONE* 7(11): e43937. doi:10.1371/journal.pone.0043937
- Fogga M, Murphyc JR, Lorchd J, Posnerd, M1, Wang F. Therapeutic targeting of regulatory T cells enhances tumor specific CD8+ T cell responses in Epstein-Barr virus associated nasopharyngeal carcinoma. 2013 *Virology* 441(2): 107–113. doi:10.1016/j.virol.2013.03.016.

- Garhart, C.A., Nedrud, J.G., Heinzl, F.P., Sigmund, N.E., Czinn, S.J., 2003. Vaccine-Induced Protection against *Helicobacter pylori* in Mice Lacking Both Antibodies and Interleukin-4. *Infect. Immun.* 71, 3628–3633.
- Gray, B.M., Fontaine, C.A., Poe, S.A., Eaton, K.A., 2013. Complex T Cell Interactions Contribute to *Helicobacter pylori* Gastritis in Mice. *Infect. Immun.* 81, 740–752.
- Hirota, K., Ahlfors, H., Duarte, J.H., Stockinger, B., 2012. Regulation and function of innate and adaptive interleukin-17-producing cells. *EMBO Rep.* 13, 113–120.
- Jafarzadeh, A., Mirzaee, V., Ahmad-Beygi, H., Nemati, M., Rezayati, M.T., 2009. Association of the CagA status of *Helicobacter pylori* and serum levels of interleukin (IL)-17 and IL-23 in duodenal ulcer patients. *J. Dig. Dis.* 10, 107–112.
- Jin J, Hu C, Wang P, Chen J, Wu T, Chen W *et al.* Latent infection of human cytomegalovirus is associated with the development of gastric cancer. *Oncology Letters* 8: 898-904, 2014.
- Karttunen, R., Karttunen, T., Ekre, H.P., MacDonald, T.T., 1995. Interferon gamma and interleukin 4 secreting cells in the gastric antrum in *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis. *Gut* 36, 341–345.
- Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. 2014. *Journal of Immunology Research*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/149185>.
- Lauren T. The two histologic main types of gastric carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965; 64:34.
- Li Q, LiQ, Chen J, Liu Y, Zhao X, Tan B, Al J, Zhang Z, Song J and Baoen S. 2013. Prevalence of Th17 and Treg cells in gastric cancer patients and its correlation with clinical parameters. *Oncology Reports* 30: 1215-1222, 2013.
- Lina TT, Alzahrani S, Gonzalez J, Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. 2014. Immune evasion strategies used by *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 20(36): 12753-12766.
- Lindgren, Å., Yun, C.-H., Sjöling, Å., Berggren, C., Sun, J.-B., Jonsson, E., *et al.*, 2011. Impaired IFN- $\gamma$  production after stimulation with bacterial components by natural killer cells from gastric cancer patients. *Exp. Cell Res.* 317, 849–858.
- Lindholm, C., Quiding-Järbrink, M., Lönroth, H., Hamlet, A., Svennerholm, A.-M., 1998. Local Cytokine Response in *Helicobacter pylori*-Infected Subjects. *Infect. Immun.* 66, 5964–5971.
- Liu, J.Z., Pezeshki, M., Raffatellu, M., 2009. Th17 cytokines and host-pathogen interactions at the mucosa: Dichotomies of help and harm. *Cytokine, Special Issue - Abstracts and Reviews: Tri-Society Annual Conference 2009 of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research Cellular and Cytokine Interactions in Health and Disease* 48, 156–160.
- Lopes, A.I., Quiding-Jarbrink, M., Palha, A., Ruivo, J., Monteiro, L., Oleastro, M., *et al.*, 2005. Cytokine Expression in Pediatric *Helicobacter pylori* Infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 994–1002.
- López-Carrillo, L., Camargo, M.C., Schneider, B.G., Sicinski, L.A., Hernández-Ramírez, R.U., Correa, P., *et al.*, 2012. Capsaicin consumption, *Helicobacter pylori* CagA status and IL1B-31C > T genotypes: A host and environment interaction in gastric cancer. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2118–2122.
- López-Vidal, Y., Ponce-de-León, S., Castillo-Rojas, G., Barreto-Zúñiga, R., Torre-Delgadillo, A., 2008. High Diversity of vacA and cagA *Helicobacter pylori* Genotypes in Patients with and without Gastric Cancer. *PLoS ONE* 3.
- Luzina, I.G., Keegan, A.D., Heller, N.M., Rook, G.A.W., Shea-Donohue, T., Atamas, S.P., 2012. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives.” *J. Leukoc. Biol.* 92, 753–764.

- Luzza, F., Parrello, T., Monteleone, G., Sebkova, L., Romano, M., Zarrilli, R., *et al.*, 2000. Up-Regulation of IL-17 Is Associated with Bioactive IL-8 Expression in Helicobacter pylori-Infected Human Gastric Mucosa. *J. Immunol.* 165, 5332–5337.
- Ma, G.-F., Miao, Q., Zeng, X.-Q., Luo, T.-C., Ma, L.-L., Liu, Y.-M., *et al.*, 2013. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 and - $\beta$ 2 in Gastric Precancer and Cancer and Roles in Tumor-Cell Interactions with Peripheral Blood Mononuclear Cells In Vitro. *PLoS ONE* 8.
- Ma, H., Wei, Y., Leng, Y., Li, S., Gao, L., Hu, H., Chen, L., *et al.*, 2014. TGF- $\beta$ 1-induced expression of Id-1 is associated with tumor progression in gastric cancer. *Med. Oncol.* 31, 1–10.
- Martínez-Carrillo, DN., Atrisco-Morales, J., Hernández-Pando, R., Reyes-Navarrete, S., Betancourt-Linares, R., Cruz-del Carmen, I., *et al.* 2014. Diversidad de los genotipos *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* y expresión de interferón gamma en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. *Revista de Gastroenterología de México*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rgm.2014.10.003>. Article in press.
- Meng, X.Y., Zhou, C.H., Ma, J., Jiang, C., Ji, P., 2012. Expression of interleukin-17 and its clinical significance in gastric cancer patients. *Med. Oncol.* 29, 3024–3028.
- Mizuno, T., Ando, T., Nobata, K., Tsuzuki, T., Maeda, O., Watanabe, O., *et al.*, 2005. Interleukin-17 levels in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa and pathologic sequelae of colonization. *World J. Gastroenterol.* WJG 11, 6305–6311.
- Naef, M., Ishiwata, T., Friess, H., Büchler, M.W., Gold, L.I., Korc, M., 1997. Differential localization of transforming growth factor- $\beta$  isoforms in human gastric mucosa and overexpression in gastric carcinoma. *Int. J. Cancer* 71, 131–137.
- Paniagua, G.L., Monroy, E., Rodríguez, R., Arroniz, S., Rodríguez, C., Cortés, J.L., *et al.*, 2009. Frequency of *vacA*, *cagA* and *babA2* virulence markers in Helicobacter pylori strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 8, 14.
- Quiding-Järbrink, M., Lundin, B.S., Lönroth, H., Svennerholm, A.-M., 2001. CD4+ and CD8+ T cell responses in Helicobacter pylori-infected individuals. *Clin. Exp. Immunol.* 123, 81–87.
- Rahimian G, Sanei MH, Shirzad H, Azadegan-Dehkordi F, Taghikhani A, Salimzadeh L, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Rafieian-Kopaei M, Bagheri N. 2014. Virulence factors of *Helicobacter pylori vacA* increase markedly gastric mucosal TGF- $\beta$ 1 mRNA expression in gastritis patients. *Microbial Pathogenesis* 67-68 (2014) 1e7
- Raza-Zaidi M, Merlino G. The Two Faces of Interferon- $\gamma$  in Cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:6118-6124.
- Rigoli, L., Caruso, R.A., 2014. Mitochondrial DNA alterations in the progression of gastric carcinomas: Unexplored issues and future research needs. *World J. Gastroenterol.* WJG 20, 16159–16166.
- Román-Román A, Giono-Cerezo S, Camorlinga-Ponce M, *et al.* *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* in the oral cavity and stomach of patients with chronic gastritis and gastric ulcer. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013; 31(3):130-5.
- Saldinger, P.F., Porta, N., Launois, P., Louis, J.A., Waanders, G.A., Bouzouréne, H., Michetti, P., *et al.*, 1998. Immunization of BALB/c mice with Helicobacter urease B induces a T helper 2 response absent in Helicobacter infection. *Gastroenterology* 115, 891–897.
- Salina, C.M. (2007). *Inmunología Médica*. Mc Graw Hill. 10:88-89.26
- Sambrook J, Russel D: *Molecular Cloning a Laboratory Manual EU: Col Spring Harbor Laboratory Press; 2001.*
- Sayi, A., Kohler, E., Hitzler, I., Arnold, I., Schwendener, R., Rehrauer, H., *et al.*, 2009. The CD4+ T Cell-Mediated IFN- $\gamma$  Response to Helicobacter Infection Is Essential for Clearance and Determines Gastric Cancer Risk. *J. Immunol.* 182, 7085–7101.

- Sebkova, L., Pellicanò, A., Monteleone, G., Grazioli, B., Guarnieri, G., Imeneo, M., *et al.*, 2004. Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Mediates Interleukin 17 (IL-17)-Induced IL-8 Secretion in Helicobacter pylori-Infected Human Gastric Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 72, 5019–5026.
- Serrano, C., Wright, S.W., Bimczok, D., Shaffer, C.L., Cover, T.L., Venegas, A., *et al.*, 2013. Downregulated Th17 responses are associated with reduced gastritis in Helicobacter pylori-infected children. *Mucosal Immunol.* 6, 950–959.
- Shi, Y., Liu, X.-F., Zhuang, Y., Zhang, J.-Y., Liu, T., Yin, Z., *et al.*, 2010. Helicobacter pylori-Induced Th17 Responses Modulate Th1 Cell Responses, Benefit Bacterial Growth, and Contribute to Pathology in Mice. *J. Immunol.* 184, 5121–5129.
- Shiomi, S., Toriie, A., Imamura, S., Konishi, H., Mitsufuji, S., Iwakura, Y., *et al.*, 2008. IL-17 is involved in Helicobacter pylori-Induced Gastric Inflammatory Responses in a Mouse Model. *Helicobacter* 13, 518–524.
- Sun, P., Wang, J.-Q., Zhang, Y.-T., Zhao, S.-G., 2014. Evaluating the immune responses of mice to subcutaneous immunization with Helicobacter pylori urease B subunit. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 5, 14.
- Terrazzini N, Bajwa M, Vita S, Cheek E, Thomas D, Seddiki E *et al.* A Novel Cytomegalovirus-Induced Regulatory-Type T-Cell Subset Increases in Size During Older Life and Links Virus-Specific Immunity to Vascular Pathology. *JID* 2014:209.
- Torres, L.-E., 2009. Prevalence of vacA, cagA and babA2 genes in Cuban Helicobacter pylori isolates. *World J. Gastroenterol.* 15, 204.
- Tsai, H.-C., Velichko, S., Hung, L.-Y., Wu, R., 2013. IL-17A and Th17 Cells in Lung Inflammation: An Update on the Role of Th17 Cell Differentiation and IL-17R Signaling in Host Defense against Infection. *J. Immunol. Res.* 2013, e267971.
- Tu, E., Chia, P.Z.C., Chen, W., 2014. TGF $\beta$  in T cell biology and tumor immunity: Angel or devil? *Cytokine Growth Factor Rev.*, Special Issue: Cytokines and cytokine receptors as Immunotherapeutics 25, 423–435.
- Tu, S.P., Quante, M., Bhagat, G., Takaishi, S., Cui, G., Yang, X.D., *et al.*, 2011. Interferon- $\gamma$  inhibits gastric carcinogenesis by inducing epithelial cell autophagy and T cell apoptosis. *Cancer Res.* 71, 4247–4259.
- Wang, S.-K., Zhu, H.-F., He, B.-S., Zhang, Z.-Y., Chen, Z.-T., Wang, Z.-Z., *et al.*, 2007. CagA+ H pylori infection is associated with polarization of T helper cell immune responses in gastric carcinogenesis. *World J. Gastroenterol. WJG* 13, 2923–2931.
- Wang, Y.-Q., Li, Y.-M., Li, X., Liu, T., Liu, X.-K., Zhang, J.-Q., *et al.*, 2013. Hypermethylation of TGF- $\beta$ 1 gene promoter in gastric cancer. *World J. Gastroenterol. WJG* 19, 5557–5564.
- Wu, J., Lu, Y., Ding, Y., Ke, Q., Hu, Z., Yan, Z., *et al.*, 2009. Promoter polymorphisms of IL2, IL4, and risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population. *Mol. Carcinog.* 48, 626–632.
- Yamada, Y., Saito, H., Ikeguchi, M., 2012. Prevalence and clinical relevance of Th17 cells in patients with gastric cancer. *J. Surg. Res.* 178, 685–691.
- Zarzynska, J.M., 2014. Two Faces of TGF-Beta1 in Breast Cancer. *Mediators Inflamm.* 2014, e141747.
- Zhang, J.-Y., Liu, T., Guo, H., Liu, X.-F., Zhuang, Y., Yu, S., *et al.*, 2011. Induction of a Th17 cell response by Helicobacter pylori Urease subunit B. *Immunobiology* 216, 803–810.
- Zhao, Y., Zhou, Y., Sun, Y., Yu, A., Yu, H., Li, W., *et al.*, 2011. Virulence factor cytotoxin associated gene A in Helicobacter pylori is downregulated by interferon- $\gamma$  in vitro. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 61, 76–83.

## Capítulo III

**Expresión de miR-155 y miR-146a, presencia de células T reguladoras y *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico**

---

## Introducción.

En el epitelio gástrico, induce apoptosis, proliferación celular y destrucción de las uniones celulares, activa o inhiben las funciones de los monocitos, las células dendríticas, neutrófilos y las células natural killer (NK) (Alzahrani *et al.*, 2014, D'Elis & Czinn 2014).

La extraordinaria capacidad de *H. pylori* para resistir la fuerte respuesta inmune adaptativa, se atribuye a su potencial de subvertir la respuesta inmune innata y adaptativa, en especial la polarización de las células efectoras hacia el fenotipo Th1 y Th17 (Oerleti *et al.*, 2013). *H. pylori* ha colonizado la mucosa gástrica humana por al menos 60,000 años y durante ese largo periodo de coevolución ha desarrollado mecanismos para inducir la diferenciación preferencial de las células T reguladoras (Treg) sobre las células T efectoras (Robison *et al.*, 2008; Oerleti *et al.*, 2013). Las células Treg tienen una destacada actividad supresora bajo condiciones inflamatorias para evitar el daño, pero también tienen la desafortunada tendencia de proteger a los tumores de la vigilancia inmunológica (Lin *et al.*, 2013).

Las células Treg, son una pequeña población de linfocitos T que pueden inducir y mantener la homeostasis inmune (Cheng *et al.*, 2012) se caracterizan por la expresión nuclear de FOXP3 (Li *et al.*, 2013) y la coexpresión de los marcadores de superficie CD4 y CD25 (Hu *et al.*, 2013). Ejercen su función supresora a través de la liberación de IL-10 o TGF- $\beta$  y por la supresión de las células T efectoras dependiente de contacto (Li *et al.*, 2013). Se ha encontrado una mayor proporción de Treg FOXP3+ en linfocitos infiltrantes de tumor en mucosa gástrica cancerosa comparada con mucosa gástrica normal (Enarsson *et al.*, 2006; Mizukami *et al.*, 2008; Jang *et al.*, 2010) y el número de Treg FOXP3+ también está incrementado en gastritis asociada a *H. pylori* (Jang *et al.*, 2010).

Las células Treg expresan un grupo de miRNAs característico distinto de las células TCD4 vírgenes, pero coinciden con las células T activadas. miR-155, conocido como un onco-miR (micro-RNA asociado a cáncer), es expresado constitutivamente en grandes cantidades por las células Treg. miR-155 reprime la expresión de la proteína SOCS1, resultando en un incremento de la sensibilidad a IL-2 y en la proliferación de las células Treg (Yamamoto *et al.*, 2011). miR-146a al igual que miR-155, es expresado por las células Treg y se induce tras la activación de las células T efectoras y mieloides. miR-146a actúa como regulador negativo al limitar la señalización mediada por TRAF6 e IRAK1/2 en el entorno inflamatorio. Se ha sugerido que miR-146a en células T activadas humanas, se opone a la apoptosis y a la

producción de IL-2. En células Treg miR-146a media la desregulación de STAT1, un factor de transcripción clave, requerido para la diferenciación de células Th1 efectoras (Lu *et al.*, 2010). miR-155 y miR-146a son reguladores de la respuesta inmune. En la infección por *H. pylori* se ha encontrado que la expresión de miR-155 esta incrementada en líneas celulares y tejido gástrico. La sobreexpresión de miR-155, modula negativamente la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-8 y GRO-a (Xiao *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). La desregulación de la expresión de miR-146a se ha involucrado en el desarrollo y metástasis de múltiples cánceres (Liu *et al.*, 2010). Se ha reportado que la inducción de la expresión de miR-146a en respuesta a la infección por *H. pylori* es dependiente de la activación de NF- $\kappa$ B. En tejido gástrico de pacientes con gastritis crónica inducida por *H. pylori* se han encontrado niveles incrementados de miR-146a en comparación con tejido gástrico sujetos asintomáticos y determinaron una correlación positiva entre los niveles de miR-146a y miR-155 en pacientes con gastritis crónica (Liu *et al.*, 2010). En muestras de pacientes con cáncer gástrico se ha encontrado que la expresión de miR-146a es más baja que en tejido gástrico no canceroso, sugiriendo a este miRNA como un supresor de tumor (Kogo *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2011). Se ha propuesto que los miRNAs podrían ser buenos marcadores pronóstico en cáncer gástrico (Hou *et al.*, 2011).

Sólo hay un reporte de la expresión de miR-155 y miR-146a en muestras de pacientes con gastritis crónica (Xiao *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010) y son pocos los estudios que han analizado la expresión de estos dos miRNAs en pacientes con cáncer gástrico (Liu *et al.*, 2010; Hou *et al.*, 2011; Kogo *et al.*, 2011). El objetivo de este estudio fue, relacionar la expresión de miR-155 y miR-146a con la presencia de células T reguladoras y con la infección por *H. pylori* y los genotipos *vacA* y *cagA* en muestras de pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico.

## Material y Métodos

### Pacientes

Se incluyeron pacientes que asistieron a realizarse una endoscopia digestiva alta, entre agosto de 2011 y marzo de 2013, al Hospital General "Raymundo Abarca Alarcón", a la Unidad Especializada en Gastroenterología Endoscopia de la Ciudad de Chilpancingo y al servicio de endoscopia del Instituto Estatal de Cancerología "Dr. Arturo Beltrán Ortega" en Acapulco, Guerrero, México. Se seleccionaron pacientes sin tratamiento de erradicación para

*H. pylori* durante el mes previo al procedimiento endoscópico. Se excluyeron del estudio los pacientes con tratamiento inmunosupresor o anti-inflamatorio. Los pacientes que aceptaron participar en el estudio firmaron una carta de consentimiento informado y posteriormente se les aplicó una encuesta para registrar datos generales e información relacionada con la enfermedad. El proyecto se aprobó por el Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Guerrero y por los hospitales participantes.

### **Endoscopia y obtención de biopsias**

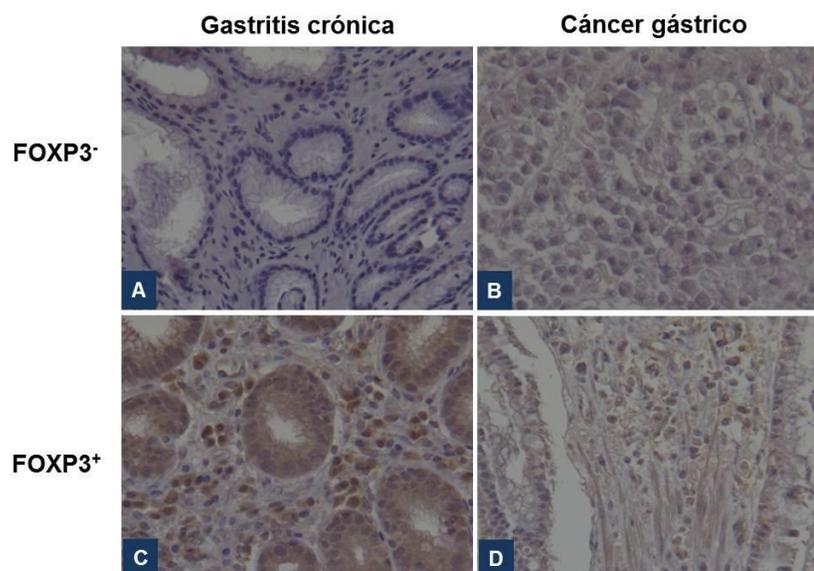
La endoscopia se llevó a cabo después de una noche de ayuno con un videoprocador y videogastroscoPIO (Fujinon, Wayne, NJ USA). De cada paciente, se tomaron 4 biopsias gástricas de antro, cuerpo o del tumor; una fue colocada en solución amortiguadora (Tris 10mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, SDS 0.5%) para el diagnóstico molecular de *H. pylori*. Otra fue fijada en alcohol absoluto e incluida en parafina para determinar la presencia de las células T reguladoras FOXP3+ por inmunohistoquímica. Otra fue colocada en Trizol para extraer el RNA y determinar la expresión de miR-155 y miR-146a por RT-PCR en tiempo real. La última biopsia fue fijada en formol amortiguado e incluida en parafina para el estudio histopatológico. Los cortes histológicos de 3 µm de grosor fueron teñidos con hematoxilina y eosina y evaluados por un patólogo usando los criterios del sistema de Sydney actualizado (Dixon *et al*, 1996) o la clasificación de Lauren (Lauren, 1965). En base al diagnóstico histopatológico se clasificó a los pacientes en el grupo de gastritis crónica o cáncer gástrico.

### **Detección y genotipificación de *H. pylori***

Se extrajo el DNA total de las biopsias gástricas por la técnica de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, previa digestión con Proteinasa K (Sambrook & Russel, 2001). La detección de *H. pylori* se realizó por PCR, amplificando un fragmento del gen 16S del RNAr, siguiendo la metodología descrita previamente (Román-Román *et al.*, 2013). Las muestras *H. pylori* positivas fueron sometidas a una PCR múltiple para amplificar un fragmento del gen *cagA*, del gen *babA2* y la región *s* y *m* del gen *vacA*, de acuerdo a la metodología descrita previamente por este mismo grupo de trabajo (Martínez-Carrillo *et al.*, 2014).

### Determinación de células T reguladoras por inmunohistoquímica

Las muestras fijadas en alcohol absoluto fueron incluidas en parafina. Se hicieron cortes de 3  $\mu\text{m}$  de grosor. Cada sección de tejido fue desparafinado con xilol y rehidratado con alcohol en grados descendentes. Las laminillas se sometieron a ebullición con buffer de citratos (Declere 1X, Cell marque, Rocklin, CA, USA) por 20 min en autoclave, para recuperación antigénica. Después de permeabilización y bloqueo de la peroxidasa endógena, los cortes fueron incubados toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-FOXP3 humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), dilución 1:1000. La unión del anticuerpo a la citocina fue detectada con el Kit Mouse/Rabbit ImmunoDetector HRP/DAB Detection System (Bio SB, Santa Barbara, CA, USA). Los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina (Biocare Medical, Concord, CA, USA). Los datos fueron obtenidos por el conteo manual de las células teñidas positivamente en cinco campos al azar bajo un poder de magnificación 400x usando el software Leica Microsystems CMS GmbH versión 4.3.0. Las células mononucleares con tinción nuclear o citoplasmática marrón fueron consideradas positivas. Los datos fueron expresados como porcentaje de células positivas (Figura 1).



**Figura 1. Inmunohistoquímica para la detección de células T reguladoras en biopsias gástricas de pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico, contrateñidas con hematoxilina (40x).**

**A:** biopsia gástrica de paciente con gastritis crónica negativo a la presencia de células T reguladoras;  
**B:** biopsia gástrica de paciente con cáncer gástrico negativo a la presencia de células T reguladoras;  
**C:** biopsia gástrica de paciente con gastritis crónica positivo a la presencia de células T reguladoras;  
**D:** biopsia gástrica de paciente con cáncer gástrico positivo a la presencia de células T reguladoras.

### **Transcripción reversa y cuantificación por PCR en tiempo real de miRNAs**

La expresión de miR-155 y miR-146a se determinó en un equipo AB 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando ensayos TaqMan para miRNAs de acuerdo a las indicaciones del fabricante (002287 y 002163; Applied Biosystems). Para la RT se utilizaron 10 ng de RNA total, 3 µl de primer de RT en stem-loop (1X), 1.5 µl de buffer RT (1X), 0.15 µl de dNTPs (1 mM), 1 µl de transcriptasa reversa MultiScribe (1U/µl) y 0.19 µl de Inhibidor de RNasa (0.25 U/µl), en un volumen final de 15 µl. Las reacciones se incubaron en un termociclador eppendorf durante 30 min a 16°C, 30 min a 42°C, 5 min a 85°C y posteriormente mantenidas a 4°C hasta su posterior uso. Para la PCR se utilizó 1.33 µl del producto RT, 10 µl de Master mix PCR TaqMan Universal (1X), 1µL de la mezcla de cebadores (1X) y 10 µl de sonda TaqMan Universal sin UNG (1X), en un volumen final de 10 µL según el protocolo de Ensayos TaqMan MicroRNA (Applied Biosystems). Las reacciones se incubaron a 95°C durante 10 min, seguido de 45 ciclos de 95°C durante 15 s y 60°C durante 30 s. La expresión relativa se determinó por el método  $\Delta\Delta CT$ . La expresión de los miRNAs se normalizo usando la expresión del gen hsa-miR-92 como control endógeno en cada muestra (000431, Applied Biosystems).

### **Análisis estadístico**

Usando el paquete estadístico STATA versión 9.2 y Graphpad Prism versión 5.01, se determinaron las frecuencias de las variables cualitativas y mediana y rango intercuartilo del porcentaje de células T reguladoras y de la expresión de miR-155 y miR-146a. La comparación de la expresión de los miRNAs y del porcentaje de células T reguladoras entre los pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico y entre la infección por *H. pylori* y sus genotipos *vacA/cagA*, así como entre los tipos de cáncer gástrico se hizo utilizando la prueba de Mann-Witney o Kruskal-Wallis. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

---

## Resultados

### Población de estudio

Se estudiaron 99 pacientes con diagnóstico histopatológico de gastritis crónica y 12 con cáncer gástrico; el 58.3% (7/12) de los pacientes fueron diagnosticados con cáncer gástrico de tipo difuso, el 25% (3/12) de tipo intestinal y el 16.7% (2/12) de tipo mixto. La media de edad en el grupo de gastritis crónica fue de 48 años con un rango de 19 a 80 años y en el grupo de cáncer gástrico la media fue de 57 años con una edad mínima de 31 años y una máxima de 85 años. En ambos grupos de estudio hubo mayor participación del género femenino, 62.6% (62/99) en gastritis crónica y 66.7% (8/12) en cáncer gástrico.

### Prevalencia de *H. pylori* y genotipos *vacA* y *cagA*

La prevalencia general de infección por *H. pylori* fue del 56.8% (63/111) y fue muy similar entre los grupos ( $p=0.907$ ) (Tabla 1). El 87.3% (55/63) de los infectados albergaba genotipos *vacAs1m1* y en el 77.8% (49/63) se detectaron cepas *H. pylori cagA*-positivas. El 73% (46/63) de los pacientes *H. pylori*-positivos tenían el genotipo *vacAs1m1/cagA*-positivo. La prevalencia de *H. pylori* varió con el tipo de cáncer; 71.4% (5/7) en el grupo de tipo difuso 33.3% (1/3) en el de tipo intestinal y 50% (1/2) en el tipo mixto.

Tabla 1. Prevalencia de infección por *H. pylori* y genotipos *vacA/cagA*

	Gastritis crónica n (%)	Cáncer gástrico n (%)	Valor de p
<b><i>H. pylori</i> n = 111</b>			
Negativo	43 (43.4)	5 (41.7)	0.907 <sup>a</sup>
Positivo	56 (56.6)	7 (58.3)	
<b>Genotipo <i>vacA</i> n = 63</b>			
<i>s2m2</i>	5 (8.9)	0	1.000 <sup>b</sup>
<i>s1m2</i>	3 (5.4)	0	
<i>s1m1</i>	48 (85.7)	7 (100)	
Total	56 (100)	7 (100)	
<b>Genotipo <i>cagA</i> n = 63</b>			
<i>cagA</i> <sup>-</sup>	13 (23.2)	1 (14.3)	1.000 <sup>b</sup>
<i>cagA</i> <sup>+</sup>	43 (76.8)	6 (85.7)	
Total	56 (100)	7 (100)	
<b>Genotipo <i>vacA/cagA</i> n = 63</b>			
<i>vacAs2m2/cagA</i> <sup>-</sup>	4 (7.1)	0	1.000 <sup>b</sup>
<i>vacAs1m1/cagA</i> <sup>-</sup>	8 (14.3)	1 (14.3)	
<i>vacAs1m1/cagA</i> <sup>+</sup>	40 (71.4)	6 (85.7)	
Otros genotipos*	4 (7.1)	0	
Total	56 (100)	7 (100)	

<sup>a</sup> Prueba de  $\chi^2$ ; <sup>b</sup> Prueba exacta de Fisher; \* Se incluye: *vacAs1m2/cagA*<sup>- o +</sup> y *vacAs2m2/cagA*<sup>+</sup>.

### Células T reguladoras

En pacientes con gastritis crónica la frecuencia de células T reguladoras fue del 48.5% (48/99) y en los enfermos con cáncer gástrico fue del 25% (3/12) (Tabla 2). Entre los pacientes con gastritis crónica el 25.3% (25/99) fueron *H. pylori*-positivo y se detectó la presencia de células T reguladoras. En los sujetos con cáncer gástrico infectados por *H. pylori* la frecuencia de células T reguladoras fue del 16.6% (2/12) (Tabla 3).

Tabla 2. Frecuencia de células T reguladoras en gastritis crónica y cáncer gástrico

Células T reguladoras	Gastritis crónica	Cáncer gástrico	Valor de p <sup>b</sup>
Negativo	51 (51.5%)	9 (75%)	0.140
Positivo	48 (48.5%)	3 (25%)	
<b>Total</b>	<b>99 (100%)</b>	<b>12 (100%)</b>	

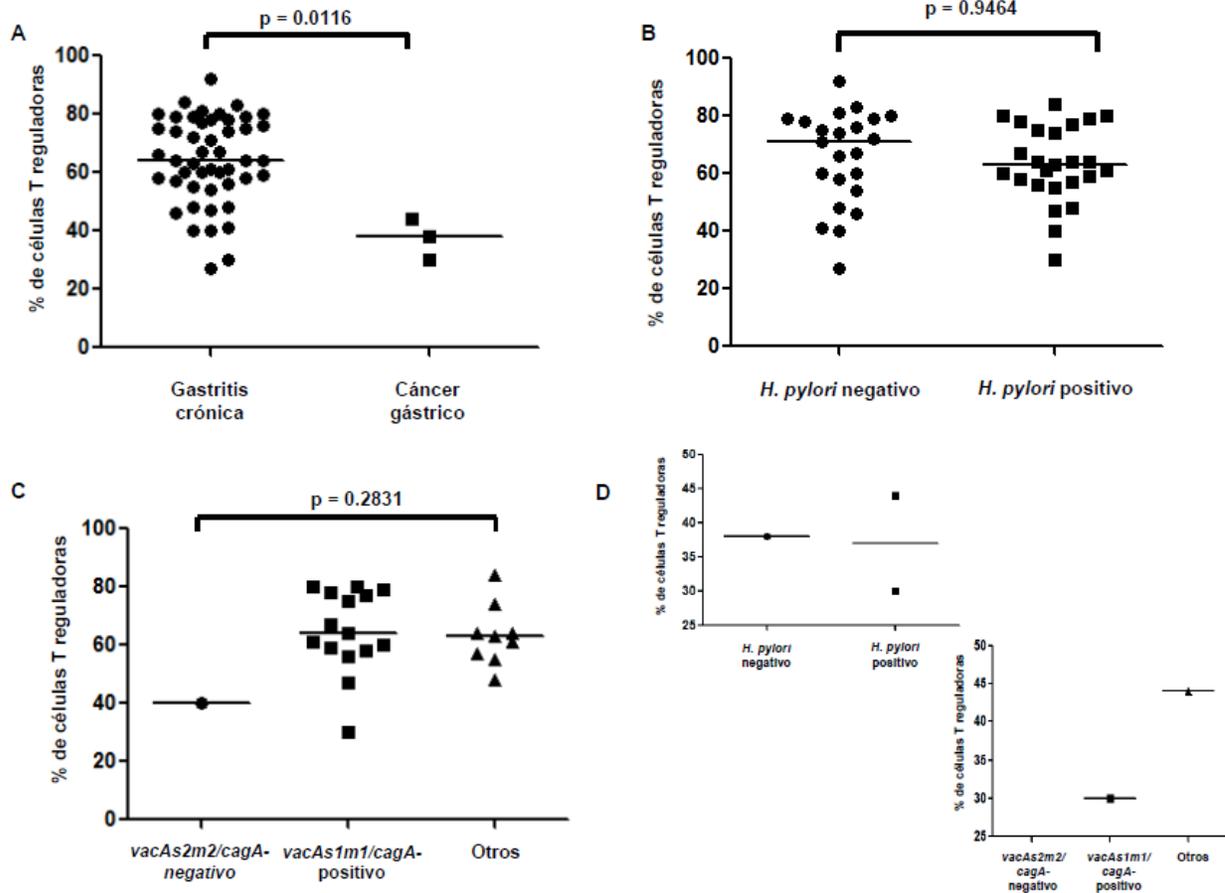
<sup>b</sup> Prueba exacta de Fisher

Tabla 3. Células T reguladoras e infección por *H. pylori* en gastritis crónica y cáncer gástrico

Células T reguladoras	Gastritis crónica n=99		Cáncer gástrico n=12	
	<i>H. pylori</i> -negativo	<i>H. pylori</i> -positivo	<i>H. pylori</i> -negativo	<i>H. pylori</i> -positivo
Negativo	20 (20.2%)	31 (31.3%)	4 (33.3%)	5 (41.7%)
Positivo	23 (23.2%)	25 (25.3%)	1 (8.3.0%)	2 (16.6%)
<b>Total</b>	<b>43 (43.4%)</b>	<b>56 (56.6%)</b>	<b>5 (41.6%)</b>	<b>7 (58.3%)</b>
<b>Valor de p</b>	0.383 <sup>a</sup>		0.1000 <sup>b</sup>	

<sup>a</sup> Prueba de X<sup>2</sup>; <sup>b</sup> Prueba exacta de Fisher.

La mediana del porcentaje de células T reguladoras fue significativamente mayor en pacientes con gastritis crónica que en los enfermos con cáncer gástrico, 64% y 38%, respectivamente ( $p= 0.0116$ ) (Figura 1A). En los pacientes con gastritis crónica *H. pylori*-negativos la mediana del porcentaje de células T reguladoras fue del 71% y en los *H. pylori*-positivos fue del 63%, no se encontraron diferencias significativas, (Figura 1B). En los sujetos infectados por cepas *H. pylori vacAs2m2/cagA*<sup>-</sup> y *vacAs1m1/cagA*<sup>+</sup>, el porcentaje de células T reguladoras fue del 40% y 64%, respectivamente (Figura 1C). En los pacientes con cáncer gástrico *H. pylori*-negativos, la mediana del porcentaje de células T reguladoras fue del 38% y en los *H. pylori*-positivos del 37%, (Figura 1D).



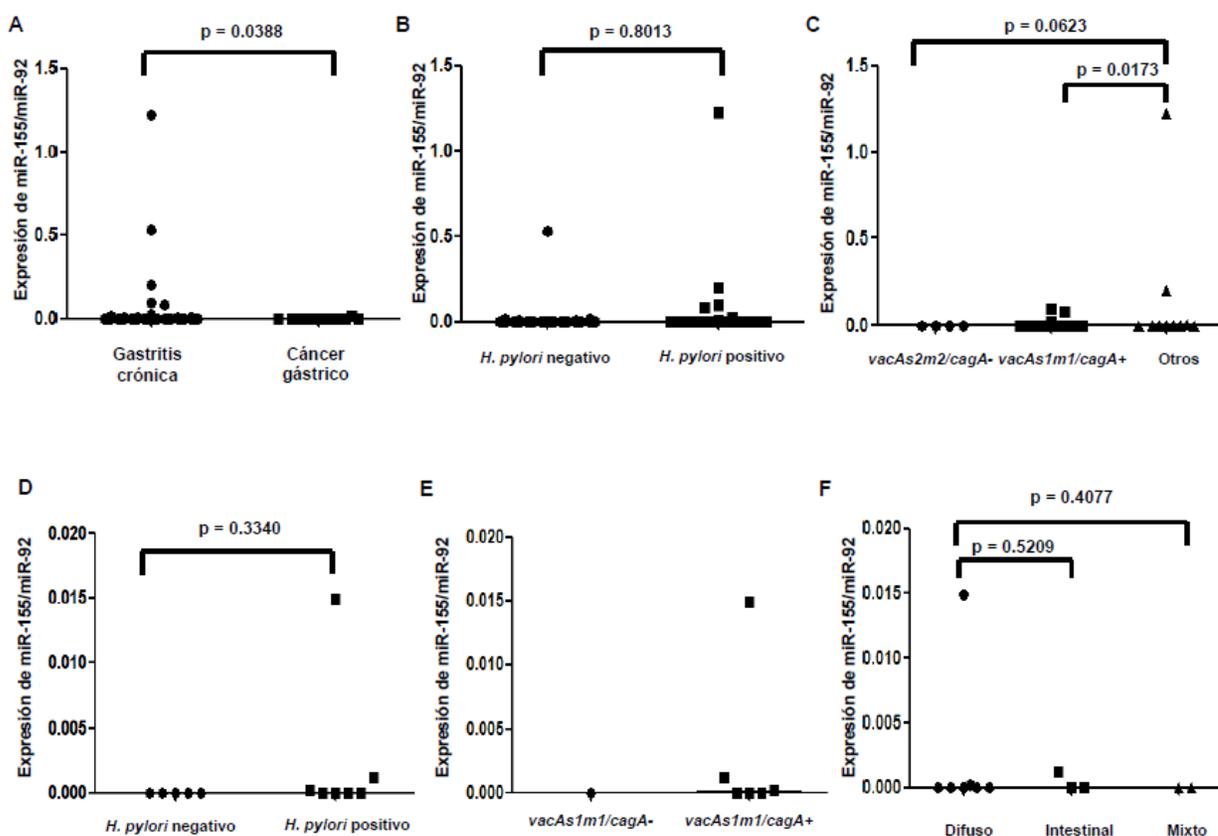
**Figura 1. Presencia de células T reguladoras en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. A.** En pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. **B.** En pacientes con gastritis crónica *H. pylori*-negativos y *H. pylori*-positivos. **C.** En pacientes con gastritis crónica *H. pylori vacAs2m2/cagA*-negativos, *vacAs1m1/cagA*-positivos y otros. **D.** En pacientes con cáncer gástrico; arriba: en *H. pylori*-negativos y *H. pylori*-positivos; abajo: en *H. pylori vacAs1m1/cagA*-negativos y *vacAs1m1/cagA*-positivos.

### Expresión de miR-155

La expresión de miR-155 fue significativamente mayor en los pacientes con gastritis crónica que en los enfermos con cáncer gástrico (p=0.0388) (Figura 2A). No se encontraron diferencias significativas de la expresión de miR-155 entre los pacientes con gastritis crónica *H. pylori*-negativos y *H. pylori*-positivos, sin embargo, un paciente positivo a la infección tuvo los niveles más altos de miR-155 (Figura 2B). La expresión de miR-155 fue significativamente

menor en los pacientes con gastritis crónica infectados por *H. pylori vacAs1m1/cagA*-positivos que entre los infectados con otros genotipos de *H. pylori* (Figura 2C).

En los pacientes con cáncer gástrico, no se encontraron diferencias en la expresión de miR-155 entre los *H. pylori*-negativos y *H. pylori*-positivos (Figura 2D), la mayor proporción de los pacientes con cáncer gástrico, estaban infectados por la cepa más virulenta de *H. pylori* (*vacAs1m1/cagA*-positivo) y entre ellos a un paciente expresó los niveles más altos de miR-155 (Figura 2E). No se encontraron diferencias significativas entre la expresión de miR-155 y el tipo de cáncer, sin embargo, la más baja expresión de este miRNA se observó entre los pacientes con cáncer gástrico de tipo difuso (Figura 2F).

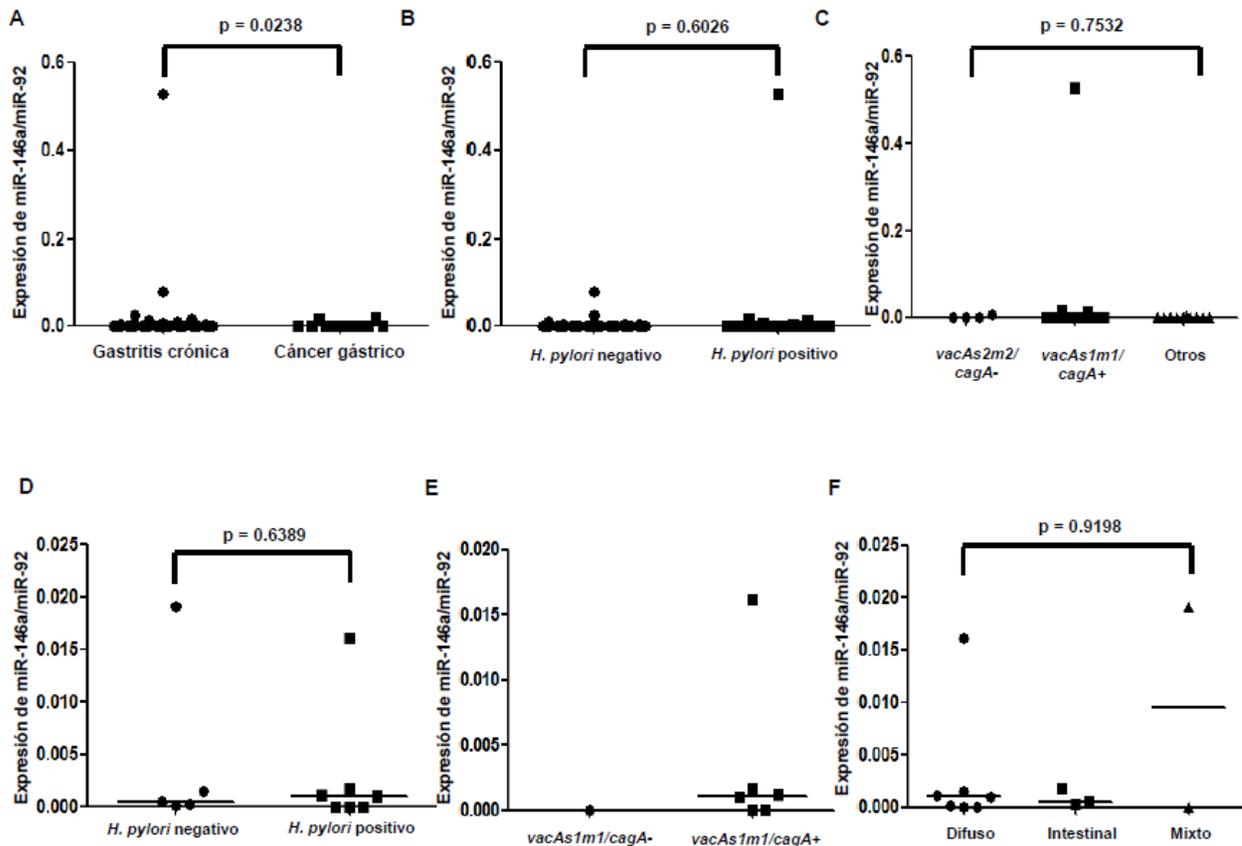


**Figura 2. Nivel de expresión de miR-155 en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. A.** En pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. **B.** En pacientes con gastritis crónica *H. pylori*-negativos y *H. pylori*-positivos. **C.** En pacientes con gastritis crónica *H. pylori vacAs2m2/cagA*-negativos, *vacAs1m1/cagA*-positivos y otros. **D.** En pacientes con cáncer gástrico *H. pylori*-negativos y *H. pylori*-positivos. **E.** En pacientes con cáncer gástrico *vacAs1m1/cagA*-negativos y *vacAs1m1/cagA*-positivos. **F:** En pacientes con cáncer gástrico de tipo difuso, intestinal y mixto. \* Se incluye: *vacAs1m2/cagA*<sup>o+</sup>, *vacAs2m2/cagA*<sup>+</sup> y *vacAs1m1/cagA*<sup>-</sup>.

### Expresión de miR-146a

Al determinar la expresión de miR-146a, se encontró que en pacientes con gastritis crónica era significativamente menor que en pacientes con cáncer gástrico (Figura 3A;  $p=0.0238$ ). No se hubo diferencias significativas de la expresión de miR-146a entre los pacientes con gastritis crónica *H. pylori*-negativos y *H. pylori*-positivos, sin embargo, en un paciente positivo a la infección que encontraron los niveles más altos de expresión de miR-146a (Figura 3B). Contrario a lo encontrado en miR-155, aunque no se encontraron diferencias significativas entre la expresión de miR-146a y los genotipos *vacA/cagA* de *H. pylori* en los pacientes con gastritis crónica, se observó que uno de los enfermos infectados por *H. pylori vacAs1m1/cagA*-positivo tuvo la expresión más alta de miR-146a (Figura 3C).

Entre los pacientes con cáncer gástrico, se observó una mayor expresión de miR-146a entre los infectados por *H. pylori* que entre los negativos a la infección, sin embargo no fue estadísticamente significativa (3D). El 85.7% de los pacientes con cáncer gástrico estaban infectados por *H. pylori vacAs1m1/cagA*-positivo, entre ellos la expresión de miR-146a fue mayor que en los portadores de la cepa *vacAs1m1/cagA*-negativo (Figura 3E). A pesar de no ser significativa la diferencia, la expresión de miR-146a entre los pacientes con cáncer gástrico de tipo difuso fue mayor que en los que tenían cáncer gástrico de tipo intestinal (Figura 3F).

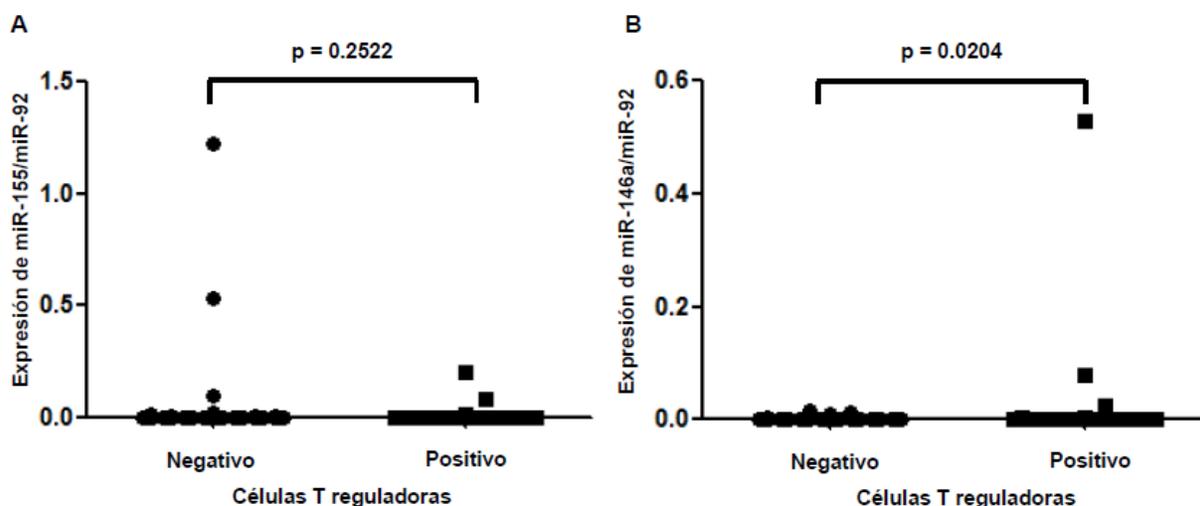


**Figura 3. Nivel de expresión de miR-146a en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico.**  
**A.** En pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. **B.** En pacientes con gastritis crónica *H. pylori*-negativos y *H. pylori*-positivos. **C.** En pacientes con gastritis crónica *H. pylori vacAs2m2/cagA*-negativos, *vacAs1m1/cagA*-positivos y otros. **D.** En pacientes con cáncer gástrico *H. pylori*-negativos y *H. pylori*-positivos. **E.** En pacientes con cáncer gástrico *vacAs1m1/cagA*-negativos y *vacAs1m1/cagA*-positivos. **F.** En pacientes con cáncer gástrico de tipo difuso, intestinal y mixto.

### Relación de la expresión de miR-155 y miR-146a con la presencia de células T reguladoras

Al analizar la expresión de miR-155 y la presencia de células T reguladoras en pacientes con gastritis crónica, se encontró que había mayor expresión de miR-155 entre aquellos pacientes donde no se detectó la presencia de células T reguladoras que en los que si había (Figura 4A). Contrario a lo encontrado al analizar la expresión de miR-146a, donde se observó que en aquellos enfermos con gastritis crónica positivos a la presencia de células T reguladoras, la

expresión de miR-146a fue significativamente mayor que en los que no se detectó la presencia de este subtipo celular (Figura 4B;  $p=0.0204$ ).



**Figura 4.** Nivel de expresión de miR-155 y miR-146a y presencia de células T reguladoras en pacientes con gastritis crónica. **A.** Expresión de miR-155 y presencia de células T reguladoras. **B.** Expresión de miR-146a y presencia de células T reguladoras.

## Discusión.

En el presente estudio, se encontró que la mediana del porcentaje de células T reguladoras fue significativamente mayor en gastritis crónica (64%) que en cáncer gástrico (38%) ( $p=0.0116$ ). Estos hallazgos, difieren con lo reportado por Cheng *et al.*, quienes reportaron que el número de células T reguladoras fue significativamente mayor en los pacientes con cáncer gástrico que en los enfermos con úlcera péptica y que en los sujetos con gastritis crónica (Cheng *et al.*, 2012). Es probable que las diferencias se deban a que en esta investigación el tamaño de muestra en el grupo de pacientes con cáncer gástrico fue pequeña ( $n=12$ ) y de entre estos, solo en tres pacientes se detectó la presencia de células T reguladoras. Sin embargo, en estos tres casos se encontró que el porcentaje de células positivas fue de 30%, 38% y 44%, similar a lo reportado por Mizukami *et al.*, quienes encontraron en mucosa gástrica de pacientes con cáncer gástrico una mediana de células T reguladoras FOXP3+ de 34.5 (rango 2-525); y es superior a lo reportado por Perrone *et al.*, quienes encontraron una mediana de 6 células FOXP3+ (rango 0-49.5) (Mizukami *et al.*,

2008; Perrone *et al.*, 2008). Sin embargo, es necesario incrementar el tamaño de muestra para verificar los hallazgos encontrados.

En los pacientes con gastritis crónica *H. pylori*-negativos la mediana del porcentaje de células T reguladoras fue mayor (71%) que en los *H. pylori*-positivos (63%). Datos que difieren a lo reportado previamente, que indican que hay mayor número de las células T reguladoras en mucosa gástricas de pacientes *H. pylori*-positivos que en los *H. pylori*-negativos (Harris *et al.*, 2008; Kandulski *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012). Estos hallazgos probablemente estén relacionados con los resultados encontrados en esta misma población donde hubo un mayor porcentaje de células positivas a IFN- $\gamma$  (83%) y es posible que las células T reguladoras estén siendo atraídas por la presencia de algún otro agente infeccioso diferente a *H. pylori*, como el virus del Epstein-Barr o citomegalovirus, donde se ha documentado que la presencia de células T reguladoras es una respuesta fisiológica contra la estimulación antigénica crónica en infección virales persistentes (Egli *et al.*, 2012; Fogg *et al.*, 2013; Terrazzini *et al.*, 2014), aunque no se ha documentado la relación entre la presencia de células T reguladoras y la infección por citomegalovirus o virus del Epstein-Barr en mucosa gástrica. Por otro lado, es probable que las células T reguladoras puedan ser en parte la fuente celular de la producción de TGF- $\beta$ 1 en estos pacientes.

Hasta donde es de nuestro conocimiento, este es el primer estudio en el que se analiza la relación de las células T reguladoras y los genotipos *vacA/cagA* de *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico, a pesar de que no se encontró relación estadística, en los sujetos con gastritis crónica infectados por cepas *H. pylori vacAs1m1/cagA*<sup>+</sup> el porcentaje de células T reguladoras fue mayor (64%) que en los portadores de cepas *vacAs2m2/cagA*<sup>-</sup> (40%).

Adicionalmente a estos hallazgos, en el presente trabajo, se analizó la expresión de miR-155 y miR-146a, encontrando que no había diferencias significativas al comparar la expresión de miR-155 y miR-146a entre los pacientes con gastritis crónica *H. pylori*-positivos y *H. pylori*-negativos. Hallazgos que difieren con lo reportado previamente, que muestran una expresión incrementada de ambos miRNAs en tejido gástrico de pacientes con gastritis crónica comparado con tejido normal de personas aparentemente sanas (Xiao *et al.*, 2009 y Liu *et al.*, 2010). Una limitación de este estudio fue, que no se tuvo un grupo de pacientes sin inflamación gástrica, debido a que éticamente no se puede realizar un estudio invasivo como

es la endoscopia a personas sin sintomatología gástrica y mucho menos tomar biopsias gástricas, lo cual no permitió comparar la expresión de miR-155 y miR-146a en tejido normal. Se ha establecido que *H. pylori* inducen la expresión de miR-155 y miR-146a y que ambos miRNAs pueden modular negativamente la liberación de citocinas, debido a que tienen como genes blanco a IKK- $\epsilon$ , SMAD2, FADD, MyD88, IRAK-1 y TRAF6 (Xiao *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2012). La expresión de miR-155 fue mayor en los pacientes con gastritis crónica *H. pylori*-negativos, esto probablemente esté relacionado con que en estos pacientes hubo una mayor expresión de TGF- $\beta$ 1 y se ha reportado que TGF- $\beta$ 1 induce la expresión de miR-155 (Wu *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2009). La respuesta inmune contra la infección por *H. pylori* puede ser modulada por múltiples factores, el grado de sobre-regulación de miR-155 y miR-146a, como nuevos reguladores negativos, es moderado y no es suficiente para suprimir la respuesta inflamatoria inducida por *H. pylori* por la activación de NF- $\kappa$ B (Liu *et al.*, 2010)

En los pacientes con cáncer gástrico la expresión de miR-155 fue significativamente menor que en los enfermos con gastritis crónica ( $p=0.0388$ ) y contrariamente, la expresión de miR-146a fue significativamente mayor en los pacientes con cáncer que en los sujetos con gastritis crónica ( $p=0.0238$ ). Estos hallazgos son opuestos a lo encontrado previamente que muestran que la expresión de miR-155 fue más alta en tejido tumoral que en tejido adyacente no canceroso (Liu *et al.*, 2010). En líneas celulares de cáncer gástrico demostró que SMAD2 es blanco de miR-155 y se encontró que la expresión de miR-155 estaba disminuida, proponiéndolo como supresor de tumor y sugiriendo que la desregulación de la expresión de miR-155 podría ser atribuida parcialmente a la metilación (Li *et al.*, 2012). Por otro lado, se reportó que la expresión de miR-146a en tejido tumoral fue más baja que en tejido adyacente no canceroso. (Hou *et al.*, 2011; Kogo *et al.*, 2011). Adicionalmente, se reportó que en los pacientes que tenían la más baja expresión de miR-146a el tamaño del tumor tiende a ser mayor, hay más pobre diferenciación celular y tienen un pronóstico más pobre que aquellos con una mayor expresión de miR-146a debido a la actividad de IRAK-1 y EGFR (Kogo *et al.*, 2011). Otros blanco de miR-146a son L1CAM (molécula de adhesión celular L1), SMAD4, CARD10, COPS8, PTGS2 y WASF2 (Hou *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2012; Crone *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2013). La alta expresión de miR-146a en los pacientes con cáncer gástrico podría ser de buen pronóstico, ya que es probable que contribuya en inhibir a sus proteínas blanco, algunas de las cuales están implicadas en inducir proliferación celular y

metástasis, sin embargo se requieren de más estudios para confirmar el posible papel de miR-155 y miR-146a en muestras de pacientes con cáncer gástrico.

Finalmente, este es el primer estudio que compara la expresión de miR-155 y miR-146a y los genotipos *vacA* y *cagA* de *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico, así como la relación de la presencia de las células T reguladoras y la expresión de ambos miRNAs, en este sentido, es probable que en los pacientes con gastritis crónica donde se detectó la presencia de las células T reguladoras sean al menos en parte responsables de la expresión de miR-146a.

En conclusión, la determinación de la presencia de células T reguladoras, la expresión de miR-155 y miR-146, podrían ser empleados como biomarcadores pronósticos que ayuden a identificar a sujetos en mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico, sin embargo se requiere de más estudios que profundicen en su posible papel como biomarcadores.

## Referencias

- Alzahrani S, Lina TT, Gonzalez J, Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. 2014. Effect of Helicobacter pylori on gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol*, 20(36): 12767-12780.
- Cheng HH, Tseng GY, Yang HB, Wang HJ, Lin HJ, Wang WC. 2012. Increased numbers of Foxp3-positive regulatory T cells in gastritis, peptic ulcer and gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 7; 18(1): 34-43
- Crone, S.G., Jacobsen, A., Federspiel, B., Bardram, L., Krogh, A., Lund, A.H., *et al.*, 2012. microRNA-146a inhibits G protein-coupled receptor-mediated activation of NF- $\kappa$ B by targeting CARD10 and COPS8 in gastric cancer. *Mol. Cancer* 11, 71.
- D'Elios, M.M., Czinn, S.J., 2014. Immunity, Inflammation, and Vaccines for Helicobacter pylori. *Helicobacter* 19, 19–26. doi:10.1111/hel.12156
- Harris, P.R., Wright, S.W., Serrano, C., Riera, F., Duarte, I., Torres, J., *et al.*, 2008. Helicobacter pylori Gastritis in Children Is Associated With a Regulatory T-Cell Response. *Gastroenterology* 134, 491–499.
- Hou, Z., Xie, L., Yu, L., Qian, X., Liu, B., 2012. MicroRNA-146a is down-regulated in gastric cancer and regulates cell proliferation and apoptosis. *Med. Oncol.* 29, 886–892.
- Hu JL, Yang Z, Tang JR, Fu XQ, Yao LJ. 2013. Effects of Gastric Cancer Cells on the Differentiation of Treg Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14 (8), 4607-4610.
- Kandulski, A., Wex, T., Kuester, D., Peitz, U., Gebert, I., Roessner, A., *et al.*, 2008. Naturally Occurring Regulatory T cells (CD4+, CD25high, FOXP3+) in the Antrum and Cardia are Associated with Higher H. pylori Colonization and Increased Gene Expression of TGF- $\beta$ 1. *Helicobacter* 13, 295–303.
- Kogo, R., Mimori, K., Tanaka, F., Komune, S., Mori, M., 2011. Clinical Significance of miR-146a in Gastric Cancer Cases. *Clin. Cancer Res.* 17, 4277–4284.
- Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. 2014. *Journal of Immunology Research*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/149185>.
- Lin X, Chen M, Liu Y, Guo Z, He X, Brand D, *et al.* 2013. Advances in distinguishing natural from induced Foxp3 + regulatory T cells. *Int J Clin Exp Pathol* 6(2):116-123.

- Liu, Z., Wang, D., Hu, Y., Zhou, G., Zhu, C., Yu, Q., *et al.*, 2013. MicroRNA-146a negatively regulates PTGS2 expression induced by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells. *J. Gastroenterol.* 48, 86–92.
- Liu, Z., Xiao, B., Tang, B., Li, B., Li, N., Zhu, E., Guo, *et al.*, 2010. Up-regulated microRNA-146a negatively modulate *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response in human gastric epithelial cells. *Microbes Infect.* 12, 854–863.
- Lu, L.-F., Boldin, M.P., Chaudhry, A., Lin, L.-L., Taganov, K.D., Hanada, T., *et al.*, 2010. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* 142, 914–929.
- Mizukami, Y., Kono, K., Daigo, Y., Takano, A., Tsunoda, T., Kawaguchi, Y., *et al.*, 2008. Detection of novel cancer-testis antigen-specific T-cell responses in TIL, regional lymph nodes, and PBL in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 99, 1448–1454.
- Oertli M, Noben M, Engler DB, Semper RP, Reuter S, Maxeiner J. 2013. *Helicobacter pylori*  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase and vacuolating cytotoxin promote gastric persistence and immune tolerance. *PNAS* 20(8): 3047-3052.
- Perrone, G., Ruffini, P.A., Catalano, V., Spino, C., Santini, D., Muretto, P., *et al.*, 2008. Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. *Eur. J. Cancer* 44, 1875–1882.
- Tang, B., Xiao, B., Liu, Z., Li, N., Zhu, E.-D., Li, B.-S., *et al.*, 2010. Identification of MyD88 as a novel target of miR-155, involved in negative regulation of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *FEBS Lett.* 584, 1481–1486.
- Wang, J., Wang, Q., Liu, H., Hu, B., Zhou, W., Cheng, Y., 2010. MicroRNA expression and its implication for the diagnosis and therapeutic strategies of gastric cancer. *Cancer Lett.* 297, 137–143.
- Xiao, B., Liu, Z., Li, B.-S., Tang, B., Li, W., Guo, G., *et al.*, 2009. Induction of microRNA-155 during *Helicobacter pylori* Infection and Its Negative Regulatory Role in the Inflammatory Response. *J. Infect. Dis.* 200, 916–925.
- Yamamoto, M., Kondo, E., Takeuchi, M., Harashima, A., Otani, T., Tsuji-Takayama, K., *et al.*, 2011. miR-155, a Modulator of FOXO3a Protein Expression, Is Underexpressed and Cannot Be Upregulated by Stimulation of HOZOT, a Line of Multifunctional Treg. *PLoS ONE* 6.
- Yao, T., Rao, Q., Liu, L., Zheng, C., Xie, Q., Liang, J., Lin, Z., 2013. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in cervical cancer. *Virology* 10, 175.

## Discusión

El cáncer gástrico es una enfermedad multifactorial y el principal factor de riesgo es la infección por *H. pylori*. Se ha reportado que existe un riesgo de desarrollar cáncer de 6 veces más en los infectados por *H. pylori* comparado con los no infectados (Malnick, 2014). Los factores de virulencia de *H. pylori* como VacA, CagA, HP-NAP, entre otros, dañan el epitelio gástrico y provocan úlcera péptica o incluso cáncer, si la infección no se trata (Lina *et al.*, 2014). La prevalencia general de infección por *H. pylori* fue del 56.8%, y el 73% de la población albergaba *H. pylori vacAs1m1/cagA*-positivo, considerada la cepa más virulenta asociada con cáncer gástrico. Los hallazgos de prevalencia de *H. pylori* y de los genotipos *vacA* y *cagA* fueron discutidos en los capítulos I y II de este trabajo.

Los factores de virulencia de *H. pylori*, factores del hospedero y factores del ambiente determinan la severidad de la enfermedad. Aunque se ha examinado cómo la bacteria interactúa con el hospedero aún no está claro cómo evade la respuesta inmune (Lina *et al.*, 2014). Los pacientes infectados usualmente fallan en eliminar la infección, a pesar de que se induce una fuerte respuesta inmune innata y adaptativa (D'Elis & Czinn 2014). *H. pylori* es capaz de evadir la respuesta inmune y persistir por décadas en la mucosa gástrica (Alzahrani *et al.*, 2014). Una mejor comprensión de los mecanismos que *H. pylori* utiliza para evadir la respuesta inmune del huésped es crucial para el diseño de un tratamiento, una vacuna exitosa que ayude en la eliminación de este patógeno altamente prevalente y letal o para establecer un panel de biomarcadores pronósticos (Lina *et al.*, 2014). En este estudio, se analizó la expresión de IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-4 y TGF- $\beta$ 1 en relación con la infección y con los genotipos de *H. pylori* y los hallazgos se presentan y discuten en el capítulo II.

Brevemente, se encontró que el 73% de los pacientes incluidos en este estudio, estaban infectados por cepas de *H. pylori vacAs1m1/cagA*-positiva, y que en los enfermos con gastritis crónica fue significativamente mayor la expresión de IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ 1 y es probable que TGF- $\beta$ 1, es probable que VacA esté induciendo la

activación de macrófagos y células dendríticas que en respuesta producen IL-1B, IL-12 e IL-18, entre otras. Estas citocinas estimulan la producción de IL-17A e IFN- $\gamma$  e inhiben la respuesta Th2, a la que corresponde IL-4. Por otra parte, es probable que TGF- $\beta$ 1 este favoreciendo la diferenciación de las células Th0 hacia el fenotipo Th17 y que esta forma contribuya a mantener de la inflamación en la mucosa gástrica. Lo que probablemente sea desfavorable para los pacientes, ya que estarían en mayor riesgo de desarrollar lesiones precursoras más graves y de evolucionar a cáncer gástrico. En los pacientes con cáncer gástrico, es probable que la determinación del perfil de citocinas pueda ser útil como biomarcador diagnóstico que ayude en la clasificación del tipo de cáncer, sin embargo se requieren más estudios que exploren esta probabilidad.

Aunque los factores de virulencia de la bacteria son determinantes cruciales del resultado de la enfermedad, el sistema inmune también contribuye a la sucesión de la serie de cambios patológicos que progresan a cáncer. Los mediadores de la inflamación crónica podrían servir como potenciales blancos terapéuticos para suprimir la patogénesis gástrica (Lee *et al.*, 2014). Por otro lado, el crecimiento tumoral es favorecido por citocinas proinflamatorias, que estimulan la proliferación celular y reducen la apoptosis, mientras que las citocinas anti-inflamatorias, como IL-10 y TGF- $\beta$ , contribuyen a que las células tumorales evadan al sistema inmune. Las propiedades invasivas de los tumores están asociadas a la transición epitelio-mesénquima, inducido por TGF- $\beta$  y por el aumento de las citocinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$  e IL-6 inducidas por componentes de *H. pylori*. Las citocinas proinflamatorias también juegan un papel importante en la angiogénesis y metástasis (Landskron *et al.*, 2014).

Muchas citocinas contribuyen a la carcinogénesis, su papel pro o anti-tumoral depende del balance entre los diferentes mediadores inflamatorios y de la etapa de desarrollo del tumor. Por esta razón, estudiar el papel de estos mediadores en los diferentes tumores o etapas de desarrollo del cáncer es esencial para diseñar nuevos tratamientos dirigidos a la respuesta de citocinas. Se propone que las citocinas

pueden tener un papel potencial como marcador diagnóstico de cáncer (Landskron *et al.*, 2014).

Adicionalmente, en el capítulo III de este trabajo se relacionó la expresión de miR-155 y miR-146a con la presencia de células T reguladoras en muestras de pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico y con la infección por *H. pylori* y los genotipos *vacA* y *cagA*. Se encontró que la presencia de células T reguladoras fue mayor en los pacientes con gastritis crónica que en los enfermos con cáncer gástrico ( $p=0.0116$ ). La expresión de miR-155 estuvo desregulada en muestras de pacientes con cáncer gástrico en comparación con los enfermos con gastritis crónica ( $p=0.0388$ ). La expresión de miR-146a fue mayor en cáncer gástrico que en gastritis crónica ( $p=0.0238$ ). Es probable que la determinación de la presencia de células T reguladoras, la expresión de miR-155 y miR-146, puedan ser empleados como biomarcadores pronósticos que ayuden a identificar a sujetos en mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico, sin embargo se requieren de más estudios que profundicen en su posible papel como biomarcadores.

En conclusión, los resultados de este estudio sugieren que adicionalmente a la detección de la infección por *H. pylori* y su genotipificación, la determinación del perfil de citocinas, la presencia de células T reguladoras y la medición de la expresión de miR-155 y miR-146a, podría ayudar en la identificación de pacientes en riesgo de desarrollar lesiones gástricas pre-malignas y cáncer gástrico. En conjunto, estos hallazgos contribuyen al entendimiento de las interacciones huésped-patógeno.

## Referencias

- Beswick, E.J., Pinchuk, I.V., Das, S., Powell, D.W., Reyes, V.E., 2007. Expression of the Programmed Death Ligand 1, B7-H1, on Gastric Epithelial Cells after *Helicobacter pylori* Exposure Promotes Development of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Regulatory T Cells. *Infect. Immun.* 75, 4334–4341.
- Bhuiyan, T.R., Islam, M.M.T., Uddin, T., Chowdhury, M.I., Janzon, A., Adamsson, J., Lundin, S.B., *et al.*, 2014. Th1 and Th17 Responses to *Helicobacter pylori* in Bangladeshi Infants, Children and Adults. *PLoS ONE* 9. doi:10.1371/journal.pone.0093943
- Borlace, G.N., Keep, S.J., Prodoehl, M.J.R., Jones, H.F., Butler, R.N., Brooks, D.A., 2012. A role for altered phagosome maturation in the long-term persistence of *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 303, G169–G179.
- Curtis, M.M., Way, S.S., 2009. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 126, 177–185.
- D'Elis, M.M., Czinn, S.J., 2014. Immunity, Inflammation, and Vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 19, 19–26. doi:10.1111/hel.12156
- Ding, S.-Z., Zheng, P.-Y., 2012. *Helicobacter pylori* infection induced gastric cancer; advance in gastric stem cell research and the remaining challenges. *Gut Pathog.* 4, 18.
- Gray, B.M., Fontaine, C.A., Poe, S.A., Eaton, K.A., 2013. Complex T Cell Interactions Contribute to *Helicobacter pylori* Gastritis in Mice. *Infect. Immun.* 81, 740–752.
- Hirota, K., Ahlfors, H., Duarte, J.H., Stockinger, B., 2012. Regulation and function of innate and adaptive interleukin-17-producing cells. *EMBO Rep.* 13, 113–120.
- Hou, Z., Xie, L., Yu, L., Qian, X., Liu, B., 2012. MicroRNA-146a is down-regulated in gastric cancer and regulates cell proliferation and apoptosis. *Med. Oncol.* 29, 886–892.
- Jafarzadeh, A., Mirzaee, V., Ahmad-Beygi, H., Nemati, M., Rezayati, M.T., 2009. Association of the CagA status of *Helicobacter pylori* and serum levels of interleukin (IL)-17 and IL-23 in duodenal ulcer patients. *J. Dig. Dis.* 10, 107–112.
- 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. *Cell. Infect. Microbiol. - Closed Sect.* 1, 115.
- Jurkin, J., Schichl, Y.M., Koeffel, R., Bauer, T., Richter, S., Konradi, S., *et al.*, 2010. miR-146a Is Differentially Expressed by Myeloid Dendritic Cell Subsets and Desensitizes Cells to TLR2-Dependent Activation. *J. Immunol.* 184, 4955–4965.
- Kandulski, A., Malfertheiner, P., Wex, T., 2010. Role of Regulatory T-cells in *H. pylori*-induced Gastritis and Gastric Cancer. *Anticancer Res.* 30, 1093–1103.
- Khamri, W., Walker, M.M., Clark, P., Atherton, J.C., Thursz, M.R., Bamford, K.B., *et al.*, 2010. *Helicobacter pylori* Stimulates Dendritic Cells To Induce Interleukin-17 Expression from CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes. *Infect. Immun.* 78, 845–853.
- Kogo, R., Mimori, K., Tanaka, F., Komune, S., Mori, M., 2011. Clinical Significance of miR-146a in Gastric Cancer Cases. *Clin. Cancer Res.* 17, 4277–4284.

- Lindgren, Å., Yun, C.-H., Sjöling, Å., Berggren, C., Sun, J.-B., Jonsson, E., *et al.*, 2011. Impaired IFN- $\gamma$  production after stimulation with bacterial components by natural killer cells from gastric cancer patients. *Exp. Cell Res.* 317, 849–858.
- Lindholm, C., Quiding-Järbrink, M., Lönroth, H., Hamlet, A., Svennerholm, A.-M., 1998. Local Cytokine Response in Helicobacter pylori-Infected Subjects. *Infect. Immun.* 66, 5964–5971.
- Liu, J.Z., Pezeshki, M., Raffatellu, M., 2009. Th17 cytokines and host-pathogen interactions at the mucosa: Dichotomies of help and harm. *Cytokine, Special Issue - Abstracts and Reviews: Tri-Society Annual Conference 2009 of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research Cellular and Cytokine Interactions in Health and Disease* 48, 156–160.
- Liu, Z., Xiao, B., Tang, B., Li, B., Li, N., Zhu, E., Guo, *et al.*, 2010. Up-regulated microRNA-146a negatively modulate Helicobacter pylori-induced inflammatory response in human gastric epithelial cells. *Microbes Infect.* 12, 854–863.
- Lopes, A.I., Quiding-Jarbrink, M., Palha, A., Ruivo, J., Monteiro, L., Oleastro, M., *et al.*, 2005. Cytokine Expression in Pediatric Helicobacter pylori Infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 994–1002.
- Lu, L.-F., Boldin, M.P., Chaudhry, A., Lin, L.-L., Taganov, K.D., Hanada, T., *et al.*, 2010. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* 142, 914–929.
- Luzina, I.G., Keegan, A.D., Heller, N.M., Rook, G.A.W., Shea-Donohue, T., Atamas, S.P., 2012. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives.” *J. Leukoc. Biol.* 92, 753–764.
- Ma, G.-F., Miao, Q., Zeng, X.-Q., Luo, T.-C., Ma, L.-L., Liu, Y.-M., *et al.*, 2013. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 and - $\beta$ 2 in Gastric Precancer and Cancer and Roles in Tumor-Cell Interactions with Peripheral Blood Mononuclear Cells In Vitro. *PLoS ONE* 8.
- Ma, H., Wei, Y., Leng, Y., Li, S., Gao, L., Hu, H., Chen, L., *et al.*, 2014. TGF- $\beta$ 1-induced expression of Id-1 is associated with tumor progression in gastric cancer. *Med. Oncol.* 31, 1–10.
- Naef, M., Ishiwata, T., Friess, H., Büchler, M.W., Gold, L.I., Korc, M., 1997. Differential localization of transforming growth factor- $\beta$  isoforms in human gastric mucosa and overexpression in gastric carcinoma. *Int. J. Cancer* 71, 131–137.
- O’Connell, R.M., Kahn, D., Gibson, W.S.J., Round, J.L., Scholz, R.L., Chaudhuri, A.A., *et al.*, 2010. MicroRNA-155 Promotes Autoimmune Inflammation by Enhancing Inflammatory T Cell Development. *Immunity* 33, 607–619.
- Oertli, M., Engler, D.B., Kohler, E., Koch, M., Meyer, T.F., Müller, A., 2011. MicroRNA-155 Is Essential for the T Cell-Mediated Control of Helicobacter pylori Infection and for the Induction of Chronic Gastritis and Colitis. *J. Immunol.* 187, 3578–3586.
- Pellicanò, A., Sebkova, L., Monteleone, G., Guarnieri, G., Imeneo, M., Pallone, F., *et al.*, 2007. Interleukin-12 Drives the Th1 Signaling Pathway in Helicobacter pylori-Infected Human Gastric Mucosa. *Infect. Immun.* 75, 1738–1744.

- Perrone, G., Ruffini, P.A., Catalano, V., Spino, C., Santini, D., Mureto, P., *et al.*, 2008. Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. *Eur. J. Cancer* 44, 1875–1882.
- Polk, D.B., Peek, R.M., 2010. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 10, 403–414.
- Sachs, G., Scott, D., 2012. *Helicobacter pylori*: Destruction or Preservation. *F1000 Med. Rep.*
- Salama, N.R., Hartung, M.L., Müller, A., 2013. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 385–399.
- Sampieri CL, Mora M. 2014. Gastric cancer research in Mexico: a public health priority. *World J Gastroenterol.* 2014 28;20(16):4491-502. doi: 10.3748/wjg.v20.i16.4491.
- Sayi, A., Kohler, E., Hitzler, I., Arnold, I., Schwendener, R., Rehrauer, H., *et al.*, 2009. The CD4+ T Cell-Mediated IFN- $\gamma$  Response to *Helicobacter* Infection Is Essential for Clearance and Determines Gastric Cancer Risk. *J. Immunol.* 182, 7085–7101.
- Shi, Y., Liu, X.-F., Zhuang, Y., Zhang, J.-Y., Liu, T., Yin, Z., *et al.*, 2010. *Helicobacter pylori*-Induced Th17 Responses Modulate Th1 Cell Responses, Benefit Bacterial Growth, and Contribute to Pathology in Mice. *J. Immunol.* 184, 5121–5129.
- Shiomi, S., Toriie, A., Imamura, S., Konishi, H., Mitsufuji, S., Iwakura, Y., *et al.*, 2008. IL-17 is involved in *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Inflammatory Responses in a Mouse Model. *Helicobacter* 13, 518–524.
- Tartour, E., Fossiez, F., Joyeux, I., Galinha, A., Gey, A., Claret, E., *et al.*, 1999. Interleukin 17, a T-cell-derived Cytokine, Promotes Tumorigenicity of Human Cervical Tumors in Nude Mice. *Cancer Res.* 59, 3698–3704.
- Tsai, H.-C., Velichko, S., Hung, L.-Y., Wu, R., 2013. IL-17A and Th17 Cells in Lung Inflammation: An Update on the Role of Th17 Cell Differentiation and IL-17R Signaling in Host Defense against Infection. *J. Immunol. Res.* 2013, e267971.
- Tu, S.P., Quante, M., Bhagat, G., Takaishi, S., Cui, G., Yang, X.D., *et al.*, 2011. Interferon- $\gamma$  inhibits gastric carcinogenesis by inducing epithelial cell autophagy and T cell apoptosis. *Cancer Res.* 71, 4247–4259.
- Wang, J., Wang, Q., Liu, H., Hu, B., Zhou, W., Cheng, Y., 2010. MicroRNA expression and its implication for the diagnosis and therapeutic strategies of gastric cancer. *Cancer Lett.* 297, 137–143.
- Wang, S.-K., Zhu, H.-F., He, B.-S., Zhang, Z.-Y., Chen, Z.-T., Wang, Z.-Z., *et al.*, 2007. CagA+ *H. pylori* infection is associated with polarization of T helper cell immune responses in gastric carcinogenesis. *World J. Gastroenterol.* WJG 13, 2923–2931.
- Wang, Y.-Q., Li, Y.-M., Li, X., Liu, T., Liu, X.-K., Zhang, J.-Q., *et al.*, 2013. Hypermethylation of TGF- $\beta$ 1 gene promoter in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* WJG 19, 5557–5564.
- Wu, J., Lu, Y., Ding, Y., Ke, Q., Hu, Z., Yan, Z., *et al.*, 2009. Promoter polymorphisms of IL2, IL4, and risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population. *Mol. Carcinog.* 48, 626–632.

- 
- Xiao, B., Liu, Z., Li, B.-S., Tang, B., Li, W., Guo, G., *et al.*, 2009. Induction of microRNA-155 during *Helicobacter pylori* Infection and Its Negative Regulatory Role in the Inflammatory Response. *J. Infect. Dis.* 200, 916–925.
- Yamamoto, M., Kondo, E., Takeuchi, M., Harashima, A., Otani, T., Tsuji-Takayama, K., *et al.*, 2011. miR-155, a Modulator of FOXO3a Protein Expression, Is Underexpressed and Cannot Be Upregulated by Stimulation of HOZOT, a Line of Multifunctional Treg. *PLoS ONE* 6.
- Ye, J., Livergood, R.S., Peng, G., 2013. The Role and Regulation of Human Th17 Cells in Tumor Immunity. *Am. J. Pathol.* 182, 10–20. doi:10.1016/j.ajpath.2012.08.041
- Zarzynska, J.M., 2014. Two Faces of TGF-Beta1 in Breast Cancer. *Mediators Inflamm.* 2014, e141747.
- Zhang, J.-Y., Liu, T., Guo, H., Liu, X.-F., Zhuang, Y., Yu, S., *et al.*, 2011. Induction of a Th17 cell response by *Helicobacter pylori* Urease subunit B. *Immunobiology* 216, 803–810.
- Zhao, B., Chen, Y.-G., 2014. Regulation of TGF- $\beta$  Signal Transduction. *Scientifica* 2014, e874065.
- Zhao, Y., Zhou, Y., Sun, Y., Yu, A., Yu, H., Li, W., *et al.*, 2011. Virulence factor cytotoxin-associated gene A in *Helicobacter pylori* is downregulated by interferon- $\gamma$  in vitro. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 61, 76–83.

## **ANEXO I**

### **IFN- $\gamma$ , IL-4 y *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico**

## IFN- $\gamma$ , IL-4 y *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico

IFN- $\gamma$ , IL-4 and *Helicobacter pylori* in patients with chronic gastritis and gastric cancer

Alina Mora González\*, Víctor Manuel Villegas Román\*, Josefina Atrisco Morales\*, Dinorah Nashely Martínez Carrillo\*, Rogelio Hernández Pando\*\*, Salomón Reyes Navarrete\*\*\*, Reyes Betancourt Linares\*\*\*\*, Iván Cruz del Carmen\*\*\*\*\*, Berenice Illades Aguiar\*\*\*\*\*, Adolfo Román Román\*\*\*\*\*, Gloria Fernández Tilapa\*

### RESUMEN

La infección por *Helicobacter pylori* es el principal factor de riesgo para cáncer gástrico; en la respuesta inmune inducida por la bacteria existe un infiltrado de células que secretan citocinas, favoreciendo el desarrollo de la carcinogénesis gástrica. El objetivo fue evaluar la relación de la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-4 con la infección por *H. pylori*, gastritis crónica y cáncer gástrico. Se incluyeron 100 pacientes con gastritis crónica y 20 con cáncer gástrico; se determinó la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-4 por inmunohistoquímica. El 57.5% de los casos fueron positivos de *H. pylori*, la mayor frecuencia de expresión de IFN- $\gamma$  se encontró en los casos de cáncer positivos a la bacteria, en el caso de IL-4 se encontró más frecuente en gastritis crónica *H. pylori* positivo. Se localizó mayor frecuencia de expresión de IFN- $\gamma$  en comparación con IL-4; en la mayoría de las muestras positivas a *H. pylori* expresaron las dos citocinas.

### ABSTRACT

The *Helicobacter pylori* infection is the main factor of risk for gastric cancer, in the immune response induced for the bacterium there is an infiltration of cells which produce high levels of cytokines, which may be involved in gastric carcinogenesis. The objective of this investigation is to evaluate the relation of the expression of IFN- $\gamma$  and IL-4 with the *H. pylori* infection, chronic gastritis and gastric cancer. 100 patients with chronic gastritis and twenty with gastric cancer were included; the expression of IFN- $\gamma$  and IL-4 was determined by immunohistochemistry. 57.5% of cases were positive for *H. pylori*, the highest frequency of IFN- $\gamma$  expression was found in cases of cancer *H. pylori*-positive, in the case of IL-4 was more frequent in patients *H. pylori*-positive with chronic gastritis. The IFN- $\gamma$  expression frequency was higher than the IL-4 expression. In the majority of the samples *H. pylori*-positive were expressed the two cytokines.

Recibido: 31 de enero de 2014  
Aceptado: 12 de febrero de 2014

#### Palabras clave:

Cáncer gástrico; gastritis crónica; *H. pylori*, IFN- $\gamma$ ; IL-4.

#### Keywords:

Gastric cancer; chronic gastritis; *H. pylori*, IFN- $\gamma$ ; IL-4.

#### Cómo citar:

Mora González, A., Villegas Román, V. M., Atrisco Morales, J., Martínez Carrillo, D. N., Hernández Pando, R., Reyes Navarrete, S., Betancourt Linares, R., Cruz del Carmen, I., Illades Aguiar, B., Román Román, A. & Fernández Tilapa, G. (2014) IFN- $\gamma$ , IL-4 y *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. *Acta Universitaria*, 24(NE- 2), 8-12. doi:

### INTRODUCCIÓN

El adenocarcinoma gástrico es uno de los tumores más frecuentes, independientemente de la edad, la raza o los factores predisponentes que presente el paciente (Rosai, 2011). El país con mayor prevalencia de cáncer gástrico es Japón; y en países de Latinoamérica, donde se ha notificado una de las incidencias más elevadas, es en Chile con 23.6% y en Colombia con 13%, mientras que en México se aproxima al 8% (Rojas-Pedraza, Sobrino-Cossío,

\* Laboratorio de Investigación Clínica, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero. Avenida Lázaro Cárdenas s/n, Ciudad Universitaria, Col. La Hacienda, Chilpancingo, Guerrero, México. C.P. 39087. Tel. y fax: (747) 4725503. Correo electrónico: giferi@hotmail.com

\*\* Sección de Patología Experimental, Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F.

\*\*\* Servicio de Endoscopia, Instituto Estatal de Cancerología Dr. Arturo Beltrán Ortega, Acapulco, Guerrero, México.

\*\*\*\* Unidad Especializada en Gastroenterología Endoscopia, Chilpancingo, Guerrero, México.

\*\*\*\*\* Servicio de Endoscopia, Hospital General Dr. Raymundo Abarca Alarcón, Chilpancingo, Guerrero, México.

\*\*\*\*\* Laboratorio de Biomedicina, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México.

\*\*\*\*\* Laboratorio de Investigación en Bacteriología, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México.

Hernández-Guerrero, Alonso-Lárraga & Zeichner-Gancz, 2007). El cáncer gástrico es multifactorial, se asocia a la predisposición genética y a la respuesta inmunológica del huésped, así como a otros factores como el estilo de vida, el alto consumo de alimentos salados, obesidad, alcoholismo y tabaquismo, así como a los factores de virulencia de *Helicobacter pylori* (Lee, Kim, Cheong & Noh, 2012; Namiot, Kemoná & Namiot, 2007).

*H. pylori* es una bacteria microaerofílica, flagelada, Gram-negativa, que coloniza específicamente el epitelio gástrico (Romero-Adrian *et al.*, 2010). Esta bacteria posee factores de virulencia que le confieren la capacidad de dañar el tejido gástrico. La isla de patogenicidad *cag* (*cag* PAI), que codifica para un sistema de secreción tipo IV (T4SS) y que contiene el gen *cagA*, transloca la proteína oncogénica efectora, *CagA*. *Cag*-PAI está asociada con daño al tejido y riesgo de padecer enfermedades graves como úlcera y cáncer gástrico (Wroblewski, Peek, & Wilson, 2010). *VacA* es una proteína secretada con efecto vacuolizante en varias líneas celulares, incluyendo células gástricas. El genotipo *vacA* *s1/m1* se asocia con inflamación aumentada y con mayor riesgo de desarrollar cáncer (Fox & Wang, 2007).

Cuando la infección por *H. pylori* persiste, favorece el establecimiento de un cuadro inflamatorio crónico, posiblemente causante del daño del epitelio gástrico que posteriormente puede progresar en cáncer (Ihan, Pinchuk & Beswick, 2012).

La inflamación inicia en el epitelio con el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) como el lipopolisacárido (LPS), que es una molécula con actividad endotóxica (Kusters, Van Vliet & Kuipers, 2006). El LPS estimula a las células del epitelio gástrico para secretar IL-8, un quimioatractor de leucocitos que conduce al aumento en la infiltración de polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos (Fuentes, Camorlinga & Maldonado, 2009).

Además, las células del infiltrado inflamatorio producen concentraciones elevadas de citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-10 e IFN- $\gamma$ ; esta respuesta provoca cambios en la fisiología del estómago, por daño directo a las células o regulación de la proliferación celular y la apoptosis (Fuentes *et al.*, 2009). Todo esto tiene como consecuencia un daño directo en la mucosa epitelial, lo cual desempeña un papel importante en la carcinogénesis gástrica (Chitcholtan, Hampton & Keenan, 2008). IFN- $\gamma$  ayuda a disminuir la colonización por *H. pylori*, pero al mismo tiempo la sobreexpresión de esta citocina en la mucosa gástrica promueve una respuesta inflamatoria pro-

longada conduciendo desde gastritis superficial a gastritis crónica, úlcera y posteriormente cáncer (Zhao *et al.*, 2011). IL-4 participa en el proceso de la inflamación que media la carcinogénesis de órganos humanos, incluyendo el tracto gastrointestinal. IL-4 es una potente citocina anti-apoptótica, factor de supervivencia para las células tumorales, y puede proteger a las células tumorales de la apoptosis inducida por varios agentes, incluidos los utilizados en terapias antitumorales. Por lo tanto, es posible que la IL-4 participe en la resistencia a tratamientos contra el cáncer (Zamorano, Rivas & Pérez, 2003). El objetivo fue evaluar la relación de la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-4 con la infección por *H. pylori*, gastritis crónica y cáncer gástrico.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron a los pacientes que estuvieron de acuerdo en participar en el estudio. Se obtuvieron biopsias gástricas del sitio de lesión, una se utilizó para la identificación molecular de *H. pylori* y a la otra se le realizó inmunohistoquímica para observar la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-4. Se realizó la extracción de DNA a partir de las biopsias gástricas, por el método de Trizol, se añadió 1 ml de este reactivo por cada 50 ng -100 ng de tejido, posteriormente se añadieron 200  $\mu$ l de cloroformo por cada mililitro de trizol. Se cuantificó el DNA genómico en el biofotómetro (Eppendorf Biofotometer 22331, Hamburg, Germany), donde se determinó la concentración y pureza, utilizando una dilución de 1:100.

### Detección de *H. pylori* por PCR

La identificación de *H. pylori* se realizó empleando los siguientes oligonucleótidos: HP16-219 5'-GCTAAGAGATCAGCCTATGTCC-3' y HPGR16SR 5'-CAATCAGCGTCAGTAATGTTC-3', que amplifican una región de 522 pb del gen RNAr 16S de la bacteria. La mezcla de reacción tuvo un volumen final de 15  $\mu$ l, que contenía 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM de dNTP's, 5 pmol de cada oligonucleótido, 1 U de Taq DNA polimerasa Platinum (Invitrogen, Brasil) y 150 ng de DNA total. El programa de amplificación incluyó: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 40 ciclos a 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, y un ciclo de extensión final a 72 °C por 7 min. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz ultravioleta (UV) en un transiluminador (BIORAD).

### Detección de IFN- $\gamma$ e IL-4 por inmunohistoquímica

Las biopsias fueron incluidas en parafina. Se realizaron cortes de 3  $\mu$ m, después de la permeabilización y el bloqueo de la peroxidasa endógena; los cortes se incubaron durante 22 h con los anticuerpos monoclonales de ratón anti-IFN- $\gamma$  y anti-IL-4 humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) dilución 1:50 y 1:500, respectivamente. La unión del anticuerpo fue detectada con el Kit Mouse/Rabbit ImmunoDetector HRP/DAB Detection System (Bio SB, Santa Barbara, CA, USA). Se realizó una contratinción con hematoxilina (Biocare Medical, Concord, CA, USA). Las células mononucleares con tinción nuclear y citoplasmática distinta se consideraron positivas.

### RESULTADOS

#### Determinación de *H. pylori*

En el estudio se incluyeron 120 pacientes, 100 con diagnóstico endoscópico e histopatológico de gastritis crónica y 20 de cáncer gástrico. Hubo una mayor participación del sexo femenino ( $n=74$ ). En los casos de gastritis crónica la edad media fue de 48 años, con un intervalo de 19 a 80 años; en los pacientes con cáncer gástrico la media de edad fue de 60 años con un intervalo de 31 a 85 años, las características generales de la población se muestran en la tabla 1. Se determinó la presencia de *H. pylori* en todos los casos, donde se encontró que hubo más casos positivos en cáncer gástrico (tabla 2).

**Tabla 1.**  
Características generales de la población estudiada

Características	Gastritis crónica n = 100	Cáncer gástrico n = 20	Valor de p*
Edad ( media $\pm$ DE, años)	48.2 $\pm$ 16	60.9 $\pm$ 16.2	
Sexo n (%)			
Femenino	63 (63)	11 (55)	0.616
Masculino	37 (37)	9 (45)	
Escolaridad n (%)			
Licenciatura y más	36 (36)	1 (5)	
Bachillerato	20 (20)	1 (5)	<0.05
Secundaria	17 (17)	2 (10)	
Primaria	20 (20)	11 (55)	
Sin estudios	7 (7)	5 (25)	
Tabaquismo n (%)			
No	60 (60)	11 (55)	0.804
Sí o consumía	40 (40)	9 (45)	
Consumo de café n (%)			
No	36 (36)	9 (45)	0.605
Sí	46 (46)	9 (45)	
Consumía	18 (18)	2 (10)	
Consumo del alcohol n (%)			
No	23 (23)	5 (25)	0.781
Sí o consumía	77 (77)	15 (75)	

\* $\chi^2$ . n = Tamaño de la muestra.

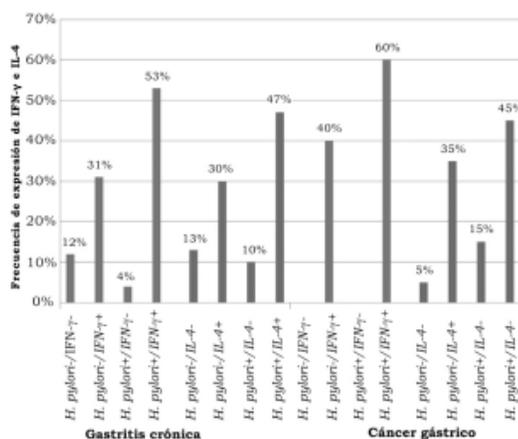
Fuente: Elaboración propia con base en los resultados del estudio.

**Tabla 2.**  
Frecuencia de *H. pylori* en gastritis crónica y cáncer gástrico.

Patología	Frecuencia de <i>Helicobacter pylori</i>		Total
	Negativo	Positivo	
Gastritis crónica	43 (43%)	57 (57%)	100 (100%)
Cáncer gástrico	8 (40%)	12 (60%)	20 (100%)
Total	51	69	120

Expresión de IFN- $\gamma$  e IL-4.

Fuente: Elaboración propia con base en los resultados del estudio.



**Figura 1.** Expresión de IFN- $\gamma$  e IL-4 en pacientes *H. pylori*-negativos y *H. pylori*-positivos con gastritis crónica y cáncer gástrico

Fuente: Elaboración propia con base en los resultados del estudio.

La mayoría de las muestras analizadas expresaron IFN- $\gamma$  (104/120) e IL-4 (93/120); los 20 casos de cáncer gástrico expresaron IFN- $\gamma$ , de éstas, 60% de las muestras fueron positivas para *H. pylori*; el 80% de las muestras de cáncer tanto *H. pylori*-negativas como *H. pylori*-positivas expresaron IL-4. Los datos de la expresión de ambas citocinas en el grupo de gastritis crónica se muestran en la figura 1.

## DISCUSIÓN

*H. pylori* es el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico; la erradicación de esta bacteria disminuye significativamente el riesgo de desarrollar cáncer en individuos infectados sin lesiones pre-malignas,

lo que refuerza el principio de que este organismo influye en las primeras etapas de la carcinogénesis gástrica (Wen & Moss, 2009). En el presente estudio se evaluó la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-4 en gastritis crónica y cáncer gástrico con y sin infección por *H. pylori*, observando una frecuencia de infección del 57% (57/100) en los pacientes con gastritis crónica y del 60% (12/20) en pacientes con cáncer gástrico, encontrando que en la mayoría de los casos de gastritis crónica *H. pylori*-positivos hubo una mayor frecuencia de expresión de IFN- $\gamma$  en comparación con los *H. pylori*-negativos, contrario a lo encontrado en los casos de cáncer gástrico donde tanto *H. pylori* positivos como negativos expresaron IFN- $\gamma$ . Por otro lado, se encontró que la expresión de IL-4 tuvo un comportamiento similar al de IFN- $\gamma$ , encontrándose una mayor frecuencia de expresión de IL-4 en pacientes *H. pylori*-positivos comparados con los *H. pylori*-negativos, tanto en gastritis crónica como en cáncer gástrico.

Karttunen, Karttunen, Ekre & Macdonald (1995) no hallaron diferencias entre la frecuencia de células secretoras de IL-4 en gastritis y mucosa gástrica no inflamada, además de que no observaron un aumento de las células secretoras de IL-4 en pacientes *H. pylori* positivo y negativo con gastritis. En otro estudio, Wang *et al.* (2007) encontraron que la expresión de IFN- $\gamma$  iba disminuyendo conforme la patología gástrica evolucionaba a cáncer gástrico, es decir, que había mayor expresión de IFN- $\gamma$  en pacientes con gastritis que en los pacientes con cáncer gástrico y que la expresión de IL-4 era mayor en los pacientes con cáncer gástrico que los pacientes con gastritis crónica; cabe señalar que todos los pacientes incluidos en el estudio de Wang *et al.* (2007) fueron *H. pylori*-positivos. Hosseini *et al.* (2010) encontraron que existía un aumento en la expresión de IFN- $\gamma$  en mucosa gástrica de pacientes con cáncer gástrico en comparación con los pacientes con dispepsia no ulcerosa y úlcera péptica. En un estudio hecho en ratones, los cuales fueron infectados con *H. felis*, Zavros *et al.* (2003) encontraron que la gastrina y somatostatina son péptidos regulados por IFN- $\gamma$  e IL-4, respectivamente. El mecanismo del efecto anti-inflamatorio de IL-4 es a través del aumento de la expresión y liberación de somatostatina de las células D gástricas. Además, mostraron que la expresión de la gastrina es inducida por IFN- $\gamma$ , una citocina pro-inflamatoria. Estos resultados implican que los cambios recíprocos de la gastrina y la somatostatina durante la infección por *Helicobacter* en humanos pueden ser debido a un aumento en la expresión de IFN- $\gamma$  durante una gastritis mediada por Th1 y no debido a un efecto directo del microorganismo (Zavros *et al.*, 2003). Los resultados encontrados en este estudio coinciden con

lo reportado por Abdollahi *et al.* (2011), quienes reportaron que los niveles de INF- $\gamma$  en mucosa gástrica de pacientes infectados por *H. pylori* fueron más altos que en aquellos pacientes *H. pylori* negativos.

En conclusión, en este estudio se encontró que la frecuencia de expresión de INF- $\gamma$  fue mayor en comparación con la de IL-4; se observó una mayor frecuencia de expresión de ambas citocinas en pacientes *H. pylori*-positivos, tanto en gastritis crónica como en cáncer gástrico.

## AGRADECIMIENTOS

La investigación se realizó con financiamiento de la Universidad Autónoma de Guerrero, convocatoria 2013, por tal motivo se extiende un sincero agradecimiento a dicha institución educativa.

## REFERENCIAS

- Abdollah, H., Sham, S., Zahedi, M. J., Moghadam, S. D., Hayatbakhsh, M. M. & Jafarzadeh, A. (2011). IL-10, TNF- $\alpha$  and INF- $\gamma$  Levels in Serum and Stomach Mucosa of *Helicobacter Pylori*-Infected Patients. *Iran Journal Allergy Asthma Immunology*, 10(4), 267-271.
- Chitcholtan, K., Hampton, M. & Keenan, I. (2008). Outer membrane vesicles enhance the carcinogenic potential of *Helicobacter pylori*. *Carcinogenesis*, 29(12), 2400-2405.
- Fox, J. G. & Wang, T. C. (2007). Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 60-69.
- Fuentes, P. E., Camorlinga, P. M. & Maldonado B. C. (2009). Infection, inflammation and gastric cancer. *Salud Pública de México*, 51(5), 427-433.
- Hosseini, E., Oghalaie, A., Habibi, G., Nahvijoo, A., Hosseini, Z. M., Tashakoripoor, M. & Mohammadi, M. (2010). Molecular detection of host cytokine expression in *Helicobacter pylori* infected patients via semi-quantitative RT-PCR. *Biotechnology Research Center*, 28(1), 40-44.
- Ihan, A., Pinchuk, I. V. & Beswick, E. J. (2012). Inflammation, immunity, and vaccines for *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 17(Suppl. 1), 16-21.
- Karttunen, R., Karttunen, T., Ekre, H. P. & Macdonald, T. T. (1995). Interferon gamma and interleukin 4 secreting cells in the gastric antrum in *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis. *Gut*, 36(3), 341-345.
- Kusters, J. G., Van Vliet, A. H. & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 449-490.
- Lee, J. H., Kim, K. M., Cheong, J. H., Noh, S. H. (2012). Current management and future strategies of gastric cancer. *Yonsei Medical Journal*, 53(2), 248-57.
- Namiot, A., Kemona, A. & Namiot, Z. (2007). Smoking habit and gastritis histology. *Advances in Medical Sciences*, 52, 191-195.
- Rojas-Pedraza, O., Sobrino-Cossio, S., Hernández-Guerrero, A., Alonso-Lárraga, J. O. & Zeichner-Gancz, I. (2007). Supervivencia en cáncer gástrico en el Instituto Nacional de Cancerología. *Endoscopia*, 19(4), 330-338.
- Romero-Adrian, T. B., Leal, M. J., Monsalve, C. F., Mengual, M. E., Mogregor, E. G., Perini, L. & Antúnez, A. (2010). *Helicobacter pylori*: bacterial factors and the role of cytokines in the immune response. *Current Microbiology*, 60(2), 143-155.
- Rosai, J. (2011). *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology* (10th ed.). St. Louis: Mosby Press.
- Wang, S. K., Zhu, H. F., He, B. S., Zhang, Z. Y., Chen, Z. T., Wang, Z. Z. & Wu, G. L. (2007). CagA+ *H. pylori* infection is associated with polarization of T helper cell immune responses in gastric carcinogenesis. *World Journal Gastroenterology*, 13(13), 2923-2931.
- Wen, S. & Moss, S. F. (2009). *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Lett*, 282(1), 1-8.
- Wroblewski, L. E., Peek, R. M., Jr. & Wilson, K. T. (2010). *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(4), 713-739.
- Zamorano, J., Rivas, M. D. & Pérez, M. (2003). Interleukin-4: A multifunctional cytokine. *Inmunología*, 22(2), 215-216.
- Zavros, W., Rathinavelu, S., Kao, J., Todisco, A., Del Valle, J., Weinstock, J., Low, M. J. & Merchant, J. L. (2003). Treatment of *Helicobacter gastritis* with IL-4 require somatostatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100(22), 12944-12949.
- Zhao, Y., Zhou, Y., Sun, Y., Yu, A., Yu, H., Li, W., Liu, Z., Zeng, J., Li, X., Chen, C. & Jia, J. (2011). Virulence factor cytotoxin-associated gene A in *Helicobacter pylori* is downregulated by interferon- $\gamma$  in vitro. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 61(1), 76-83.

## Anexo 2

**IL-17A and TGF- $\beta$ 1 expression in patients with chronic gastritis and gastric cancer *H. pylori vacAs1m1/cagA*<sup>+</sup>**

---

## **IL-17A and TGF- $\beta$ 1 expression in patients with chronic gastritis and gastric cancer *H. pylori vacAs1m1/cagA* positive**

Dinorah N Martínez-Carrillo<sup>1</sup>, Olga L Garibay-Cerdenares<sup>2</sup>, Miguel A Mendoza-Catalán<sup>3</sup>, Rogelio Hernández-Pando<sup>4</sup>, Josefina Atrisco-Morales<sup>1</sup>, Salomón Reyes-Navarrete<sup>5</sup>, Marco A Jiménez-López<sup>5</sup>, Reyes Betancourt-Linares<sup>6</sup>, Iván Cruz-del Carmen<sup>7</sup>, Berenice Illades-Aguiar<sup>3</sup>, Adolfo Román-Román<sup>8</sup>, Gloria Fernández-Tilapa<sup>1§</sup>.

<sup>1</sup> Laboratorio de Investigación Clínica, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México.

<sup>2</sup> Investigador por Cátedras CONACYT, adscrito a la Universidad Autónoma de Guerrero.

<sup>3</sup> Laboratorio de Biomedicina, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México.

<sup>4</sup> Sección de Patología Experimental, Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencia Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, México D.F., México.

<sup>5</sup> Servicio de Endoscopia y Servicio de Patología, Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega”, Acapulco, Guerrero, México.

<sup>6</sup> Unidad Especializada en Gastroenterología y Endoscopía, Chilpancingo, Guerrero, México.

<sup>7</sup> Servicio de Endoscopía, Hospital General “Dr. Raymundo Abarca Alarcón”, Chilpancingo, Guerrero, México.

<sup>8</sup> Laboratorio de Investigación en Bacteriología, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México.

§Corresponding author: Gloria Fernández-Tilapa, Laboratorio de Investigación Clínica, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Avenida Lázaro Cárdenas S/N Ciudad Universitaria Col. La Haciendita 39087, Chilpancingo, Guerrero, México. E-mail: [gferti@hotmail.com](mailto:gferti@hotmail.com).

Email addresses:

DNMC: [chirris774@hotmail.com](mailto:chirris774@hotmail.com)

OLGC: [olgaribayce@conacyt.mx](mailto:olgaribayce@conacyt.mx)

MAMC: [mglmendoza7@gmail.com](mailto:mglmendoza7@gmail.com)

JAM: [babynort@hotmail.com](mailto:babynort@hotmail.com)

RHP: [rhdezpando@hotmail.com](mailto:rhdezpando@hotmail.com)

SRN: [dr\\_sreyes@yahoo.com.mx](mailto:dr_sreyes@yahoo.com.mx)

MAJL: [marcoajl16@gmail.com](mailto:marcoajl16@gmail.com)

RBL: [reyesb@prodigy.net.mx](mailto:reyesb@prodigy.net.mx)

ICC: [d\\_r\\_cruz@hotmail.com](mailto:d_r_cruz@hotmail.com)

BIA: [b.illadesaguiar@gmail.com](mailto:b.illadesaguiar@gmail.com)

ARR: [arroman6046@gmail.com](mailto:arroman6046@gmail.com)

GFT: [gferti@hotmail.com](mailto:gferti@hotmail.com)

## Abstract

The inflammatory response induced by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection favors the bacterial persistence and damage to the gastric epithelium. Some of the cytokines produced by the gastric epithelium are induced directly by the virulence factors of *H. pylori*, however, it is important to keep in mind that *in vivo* there is a complex network of interactions between the immune cells, the bacteria and microenvironment. The objective of this study was to analyze the relationship between the expression of IL-17 and TGF- $\beta$ 1 with *H. pylori* infection and the *vacA* and *cagA* genotypes, in patients with chronic gastritis and gastric cancer. We included 99 patients with histopathologic diagnosis of chronic gastritis and 12 with gastric cancer. Three gastric biopsies of each patient were analyzed to molecular diagnosis and genotyping of *H. pylori*, to evaluate the expression of cytokines by immunohistochemistry and one for the histopathological diagnosis, in patients with chronic gastritis the prevalence of *H. pylori* infection was 56.6 % and the more frequent genotypes were *vacAs1m1* (85.7 %) and *cagA* (76.8 %). The frequency of patients with chronic gastritis, positive to IL-17A expression was higher in *H. pylori* infected than in the *H. pylori*-uninfected patients ( $p < 0.05$ ). In gastric cancer, 100% of the patients expressed IL-17A. The expression of TGF- $\beta$ 1 was higher in patients with gastric cancer than that in the subjects with chronic gastritis ( $p = 0.05$ ). Finally, in patients with chronic gastritis infected with *H. pylori vacAs1m1/cagA*-positive genotypes a positive correlation was founded between the percentage of cells positive for the expression of IL-17A and TGF- $\beta$ 1 ( $r = 0.4340$ ;  $p < 0.05$ ). The results suggest that the expression of IL-17A is associated with *H. pylori* infection, but not with their *vacA* and *cagA* genotypes. It is likely that the expression of TGF- $\beta$ 1 in gastric mucosa of patients with chronic gastritis might contribute in the differentiation of the Th17 cells.

Key Word: IL-17A, TGF- $\beta$ 1, *H. pylori*, Gastric cancer, inflammation.

## Introduction

Gastric cancer is the second leading cause of death worldwide [1] and the gastric infection associated to *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) has been correlated with acute and chronic inflammation and, more variably, with other gastric lesions, including, atrophic gastritis and intestinal metaplasia [2]. Different components of *H. pylori* have the capacity to activate or inhibit the functions of epithelial cells, monocytes, dendritic cells, neutrophils and natural killer cells [3].

During acute *H. pylori* infection, neutrophils and macrophages accumulate in the mucosa as a result of early interactions between the bacteria, the epithelium and the innate immune cells leading to the production of increased levels of proinflammatory cytokines and chemokines including IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-8 [3]. During the later stages of the infection T and B cells are also recruited to the mucosa, the chronic inflammation is characterized by the presence of both mononuclear and polymorphonuclear cells [4]. In *H. pylori* infection, there is an activation of both Th1 and Th17 cells with the consequent production of IFN- $\gamma$ , IL-17 and TNF- $\alpha$  [3]. In addition, Th17 cells also produce pro-inflammatory cytokines such as IL-17F, IL-22, IL-26, CCL20 (chemokine C-C motif- ligand 20) and GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor); these cytokines act on different target cells, contributing to different diseases [5]. Also gastric epithelial cells express IL-17 receptors, IL-17 interactions with its receptor stimulates the epithelial cells to produce IL-8 [6]. IL-17 induces the secretion of IL-8 through the activation of ERK1/2, then IL-8 attracts neutrophils to the site of inflammation and this effect is more prominent in *H. pylori* CagA-positive strain infection [5-6].

The Th17 main effector cytokine is IL-17A. IL-17A is produced by CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> cells as a response to the innate immunity, such as T  $\gamma\delta$  cells, NK1.1-NK<sub>T</sub>i cells and

neutrophils [7]. IL-17A appears to act primarily on nonhematopoietic cells such as endothelial cells, epithelial cells and fibroblasts due to the restricted expression of one of its receptor subunits, IL-17RC. The receptors for IL-17A and IL-17F (IL-17RA and IL-17RC) are present in antigen-presenting cells and epithelial cells [8-10]. It is known that Th17/IL-17 pathway modulates Th1 and Th17 cells to act synergistically to induce gastritis during *H. pylori* infection, moreover the increased in IL-17 production plays an important role in the inflammatory response against *H. pylori* colonization and is also involved in the disease associated with the bacterium [11-13].

In 80% of the infected patients, *H. pylori* establishes a chronic infection, because it promotes a balance between the immune response and the virulence factors [14] showing a complex network of interaction among infiltrating cells, epithelial cells and the bacteria [6]. In *H. pylori*-infected duodenal ulcer patients, the expression of IL-17 was higher in comparison with asymptomatic carriers and healthy uninfected subjects. In these patients, the expression of IL-17 was higher in the CagA-positive in comparison with CagA-negative genotype, suggesting that the serum levels of IL-17 are influenced by CagA-positive *H. pylori* strains [15]. Similar results were found with urease subunit B that promotes a Th17 cell response *in vitro* and *in vivo* contributing to the pathogenesis of gastric diseases caused by *H. pylori* [16].

Th17 cells are predominant in the tumor microenvironment, however, they play a complex and controversial role in tumoral immunity. On human cervical tumors transplanted in nude mice it was determined that the Th17 cells have a pro and anti-tumoral activity, and it is proposed that the pro-tumoral activity of IL-17 stimulates angiogenesis and the production of cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-23 and TGF- $\beta$ 1, which promotes tumor growth, and, the production of IL-6 and IL-17 through activation of STAT3, induces the up-regulation of genes implicated in cell survival and angiogenesis [17-18]. There have been few studies that

analyze the expression of IL-17 in patients with gastric cancer, however, the results remain controversial [19-21].

The transforming growth factor beta1 (TGF- $\beta$ 1) is a differentiation factor for both Treg and Th17 cells, from naive CD4<sup>+</sup> T cells [22]. These cells have been characterized as preferential producers of IL-17A, although in humans Th17-cell development is poorly understood. TGF- $\beta$ , IL-23, and pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and IL-6) have been shown to synergistically mediate differentiation of human Th17 cells *in vitro*, suggesting an active role in gastric pathogenesis [19].

TGF- $\beta$ , is an anti-inflammatory cytokine, member of a family of growth factors that play an important role in the regulation of a wide range of biological processes such as embryogenesis and homeostasis, and its deregulation has been associated with several human diseases including fibrosis and cancer [23]. TGF- $\beta$  exists in five isomeric forms from  $\beta$ 1 to  $\beta$ 5, produced by alternative splicing, with a 60-80% of homology. TGF- $\beta$ 1 is the predominant isoform in humans, synthesized by almost all cells, mainly platelets, Treg cells, macrophages/monocytes, lymphocytes, fibroblasts, epithelial cells and dendritic cells.

TGF- $\beta$ 1 plays a central role in immunoregulation, apoptosis and angiogenesis, with opposite effects in many tissues. On the one hand, inhibiting the growth of epithelial cells and, on the other hand, stimulating the proliferation of mesenchymal cells [24]. During a cellular immune response, TGF- $\beta$ 1 suppresses antitumor activity of T cells, NK cells, neutrophils, monocytes and macrophages which are important regulators of tumoral progression [25]. TGF- $\beta$ 1 also acts as a potential growth inhibitor, inhibiting epithelial cell cycle progression and promoting apoptosis, functions that contribute significantly to tumor suppression. However, TGF- $\beta$ 1 is also an inductor of malignant progression and angiogenesis in cancer [25].

In head and neck cancer, the severe epithelium inflammation is produced by the overexpression of TGF- $\beta$ 1, and angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor (VEGF) and activin receptor-like kinase-1 (ALK1); thus contributing to malignancy [26]. In gastric cancer, there is an increased expression of TGF- $\beta$ 1 found in tumor tissue, compared with normal adjacent tissue [26-28].

There are no reports involving the local expression of IL-17A and TGF- $\beta$ 1 with *vacA* and *cagA* genotypes of *H. pylori*. The aim of this study was to analyze the relationship between the expression of IL-17A and TGF- $\beta$ 1 with the *H. pylori* infection and the *vacA* and *cagA* genotypes in patients with chronic gastritis and gastric cancer from Southwest of Mexico.

## Materials and Methods

### Patients

All patients attended an upper digestive endoscopy, between august 2011 to march 2013, in the Hospital General “Raymundo Abarca Alarcón”, Unidad Especializada en Gastroenterología y Endoscopía in the city of Chilpancingo, Guerrero, Mexico, and in the service of endoscopy of the Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega” in Acapulco, Guerrero, Mexico. Patients untreated for *H. pylori* infection were selected during the month prior to the endoscopic procedure. Patients under immunosuppressant’s or anti-inflammatory treatment were excluded. The study was approved by the Bioethics Committee of the “Universidad Autónoma de Guerrero” and Hospitals , and written consent and a survey to register general data and information related to the disease, were obtained from patients prior to sample collection.

### **Endoscopy and gastric histology**

For each patient, endoscopy was carried out using a video processor and video gastroscope (Fujinon, Wayne, NJ, USA). From each patient, three biopsies from the antrum, corpus, or tumor were taken; the first one was placed in buffer solution (Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, SDS 0.5%) for *H. pylori* molecular diagnosis, other one was fixed in absolute alcohol to verify the IL-17A and TGF- $\beta$ 1 expression through immunohistochemistry. The last one was immediately fixed in formalin for histological diagnosis. The biopsies intended for *H. pylori* detection were kept at -20°C until processing. The histological sections of three-micron thickness were stained with hematoxylin-eosin and were evaluated by a pathologist using updated Sydney system [29] or the classification of Lauren [30]. Based on the histopathological diagnosis, the patients were classified into groups with chronic gastritis or gastric cancer (diffuse, intestinal or mixed type).

### **Detection and genotyping of *H. pylori*.**

Total DNA was extracted from gastric biopsies with phenol-chloroform-isoamyl alcohol technique, with a previous digestion with proteinase K [31]. The detection of *H. pylori* was obtained by PCR method, amplifying a fragment of the 16S rRNA gene, following a methodology previously described [32]. *H. pylori* positive samples were then subjected to a multiplex PCR to amplify a fragment of the genes *cagA*, *babA2* and the *s* and *m* regions from the *vacA* gene, according to the methodology described by the same group [33].

### **Expression of IL-17A and TGF- $\beta$ 1 by immunohistochemistry**

Formalin-fixed, paraffin-embedded samples were cut to a thickness of 3  $\mu$ m. Each tissue section was deparaffinized and rehydrated with graded ethanol. The slides were boiled in

citrate buffer (Declere 1X, Cell marque, Rocklin, CA, USA) for 20 min in an autoclave for antigen retrieval. Then samples were permeabilized and endogenous peroxidase was blocked and sections were incubated overnight with a rabbit polyclonal antibody anti-IL-17A and anti-human TGF- $\beta$ 1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) 1:1000 dilution. The antibody bound to the cytokine was detected with the mouse and rabbit specific HRP/DAB detection kit (Bio SB, Santa Barbara, CA, USA). The sections were counterstained with hematoxylin (Biocare Medical, Concord, CA, USA). Data were obtained by manually counting positively stained cells in five random fields under 400 $\times$  high-power magnification using the Leica microsystems CMS GmbH version 4.3.0 software. The mononuclear cells with brown nuclear or cytoplasmic staining were considered positives. The data were expressed as percentage of positives cells.

### **Statistical analysis**

All analyses were performed using the statistical STATA version 9.2 and Graph Prism ver. 5.01 software. The frequencies of the qualitative variables, median and interquartile range of the percentage of positive cells to IL -17A and TGF- $\beta$  were evaluated. The  $p$  value was obtained with the  $X^2$  test or the Fisher exact test for qualitative variables and the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test to obtain the quantitative variables. The correlation between the percentage of positive cells for IL-17A and for TGF- $\beta$ 1 was calculated by the Spearman's rank correlation coefficient ( $r$ ). A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## **Results**

### **Population study**

The study was conducted with 111 patients, of which 99 were diagnosed with chronic gastritis and 12 with gastric cancer. From those histologically diagnosed with gastric cancer 58.3% (7/12) were diffuse-type, 25% (3/12) of intestinal type and 16.7% (2/12) of mixed type. The mean age of the group with chronic gastritis was 48 years with a range of 19-80 years and in the gastric cancer group the mean age was 57 years with a minimum age of 31 years and a maximum of 85 years. In both groups, there was a high frequency of females, 62.6% (62/99) in chronic gastritis and 66.7% (8/12) in gastric cancer.

#### **Prevalence of *H. pylori* *cagA* and *vacA* genotypes**

The prevalence of *H. pylori* infection was 56.8% (63/111). From those positive to *H. pylori* infection, the general frequencies of virulence factors were, 87.3% (55/63) carried the *vacAs1m1* genotype and 77.8% (49/63) the *cagA*-positive genotype, whereas 73% (46/63) of the patients were *H. pylori vacAs1m1/cagA*-positive. The prevalence of *H. pylori* according with the histopathological type of gastric cancer was 71.4% (5/7) diffuse type, 33.3% (1/3) intestinal type and 50% (1/2) mixed type. Table 1 describes the prevalence of *H. pylori* infection and the *vacA* and *cagA* genotypes founded in chronic gastritis and gastric cancer. There was not any statistical significance between them ( $p < 0.05$ ).

#### **Expression of IL-17A**

The IL-17A immunostaining was localized predominantly in the cytoplasm and less frequent in the nucleus of the infiltrating mononuclear cells (Figure 1). In Patients with chronic gastritis, the frequency of IL-17A expression was 87.9% (87/99) and in gastric cancer 100% (12/12) (data not shown). In patients with chronic gastritis and *H. pylori*-positives, the 94.6% (53/56) expressed IL-17A, a frequency significantly higher than *H. pylori*-negative ( $p < 0.05$ ) (Table 2).

Between patients positive to *H. pylori* infection with chronic gastritis and gastric cancer, there was no significant differences in the median of percentage of IL-17A positive cells ( $p>0.05$ ). In patients with chronic gastritis without *H. pylori* infection, the percentage of IL-17A positive cells showed a variation of positive cells from 34 to 86%, meanwhile in gastric cancer was from 50 to 91% (Table 3).

The median of percentage of positive cells to IL-17A was higher in patients with gastric cancer in comparison with chronic gastritis patients (74% and 69%, respectively), without significant differences among groups ( $p>0.05$ ) (Figure 2A). In Patients with chronic gastritis infected with *vacA* genotypes *s2m2*, *s1m2* and *s1m1*, the median of positive cells to IL-17A was 68, 62, and 71%, respectively. Importantly, 85.7% of patients with chronic gastritis are infected with the most virulent genotype (*vacAs1m1*). Due to the gastric cancer, *vacAs2m2* and *s1m2* genotypes were not detected the, the comparison between chronic gastritis and cancer gastric patients infected only with *vacAs1m1* therefore was done. Even though the results did not show significant differences between groups ( $p>0.05$ ), all patients diagnosed with gastric cancer were infected with the *H. pylori vacAs1m1* genotype(Figure 2B). Similar frequencies of *vacAs1m1* genotype were found for *cagA* genotype, in which high values were associated with chronic gastritis patients, here the median of percentage of positive cells to *cagA* genotype was 75%, meanwhile in gastric cancer, the median positive cells to IL-17A was 76%. There was not significant differences between groups ( $p>0.05$ ) (Figure 2C).

### **Expression of TGF- $\beta$ 1**

The expression of TGF- $\beta$ 1 was observed in the nucleus and the cytoplasm of infiltrating mononuclear cells and epithelial cells of the gastric mucosa (Figure 1). In patients with chronic gastritis, TGF- $\beta$ 1 was detected in 94.9% (94/99) and all the patients with gastric

cancer were positive to TGF- $\beta$ 1 (data not shown). In patients with chronic gastritis *H. pylori*-positive, the 98.2% (55/56) were positive to the expression of TGF- $\beta$ 1 (Table 2).

The percentage of TGF- $\beta$ 1 positive cells was significantly higher in patients with gastric cancer *H. pylori*-negative compared to patients with chronic gastritis *H. pylori*-negative (95% and 82%, respectively,  $p < 0.05$ ). In patients with chronic gastritis without *H. pylori* infection, the percentage of positive cells to TGF- $\beta$ 1 had a higher variation of positive cells (45-94%), than gastric cancer (63-97%) (Table 3).

The median of positive cells to TGF- $\beta$ 1 was higher in patients with gastric cancer in comparison to chronic gastritis (89% and 80% respectively,  $p = 0.05$ ) (Figure 3A). Patients with chronic gastritis infected with *vacA s2m2*, *s1m2* and *s1m1* genotypes had a median of TGF- $\beta$ 1 positive cells very similar (74%, 76% and 75%, respectively), and even though there were not patients with gastric cancer infected with *vacA s2m2* and *s1m2* genotypes in this study, the median of TGF- $\beta$ 1 positive cells with *vacAs1m1* genotype did not show significant differences in comparison with chronic gastritis. However, the greater percentage of the population (85.7%) with chronic gastritis was infected with the most virulent genotype (*vacAs1m1*). From those patients *H. pylori* infected with *vacAs1m1* genotypes, the percentage of positive cells to TGF- $\beta$ 1 was 86% in gastric cancer (Figure 3B). There was no significant difference between the percentages of positive cells to TGF- $\beta$ 1 in *H. pylori* infected between *cagA*-positive and *cagA*-negative. The patients with gastric cancer *H. pylori* infected, *vacAs1m1* genotype, plus positive to *cagA* genotype, showed a median of TGF- $\beta$ 1 positive cells of was 87%. There was no significant differences between groups ( $p > 0.05$ ) (Figure 3C).

### **Correlation between the expression of IL-17A and TGF- $\beta$ 1 in patients with chronic gastritis and gastric cancer**

The simultaneous analysis of IL-17A and TGF- $\beta$ 1 in patients with chronic gastritis revealed that 86% of patients expressed both cytokines, with a statistical significance of  $p < 0.001$  (Table 4). Therefore, to evaluate the association between IL-17 and TGF- $\beta$ 1 in patients *H. pylori* infected, with *vacA**s1m1/cagA*-positive genotypes in chronic gastritis and gastric cancer, a correlation analysis was done. In chronic gastritis, a positive correlation was found ( $r = 0.4340$ ,  $p < 0.05$ ), whereas a negative correlation was found in gastric cancer ( $r = -0.08$ ,  $p > 0.05$ ) (Figure 4).

## Discussion

Although it is clear that the development of gastric cancer is multifactorial and requires the simultaneous presence of host susceptibility genetic factors and the *H. pylori* infection, in this study have been tried to analyze the implications of some virulence factors of *H. pylori* (*vacA* and *cagA*) and the expression of two cytokines, IL-17A and TGF- $\beta$ 1 in chronic gastritis and gastric cancer.

In this research, we found that the diffuse type of gastric cancer was the most common (58.3%), in the southwestern Mexican population. This finding is consistent with previous reports in Mexican population by López-Vidal *et al.*, (63%) [34] and by Lopez-Carrillo *et al.*, (51.9%) [35]. Rigoli and Caruso established that diffuse type carcinomas tends to develop in younger subjects and had a poorer diagnosis than the intestinal type tumors [36]. On the contrary, in this study the intestinal type of gastric cancer was detected in younger subjects (median age 31 years old) compared to diffuse type of cancer (median age 44 years old).

In the development of gastric cancer, the infection with *H. pylori* is considered the main etiological factor [37]. In this study, the prevalence of *H. pylori* was 58.3% (7/12) in patients with gastric cancer and varied among types; 71.4% in the diffuse type, 33.3% in the intestinal

type, and 50% in the mixed type. The prevalence of *H. pylori* and its virulent genotypes varies between geographical areas, countries and ethnic groups [42, 44]. In gastric cancer, all patients that were infected with *H. pylori* strains, were positives for the *vacAs1m1* genotypes and only 85.7% of them were positive for *cagA*. Teixeira de Souza *et al.*, [38] reported that in the population of northeastern Brazil, with gastric cancer, 88% of the subjects were *H. pylori* positive and the prevalence of the infection was 83.3% in patients with gastric cancer of diffuse type and 91.5% in those with gastric carcinoma of intestinal type. In this study, the frequency of *H. pylori* was higher in diffuse type than intestinal type. The prevalence of *H. pylori vacA* and *cagA* genotypes that we found, exceeds that reported by López-Vidal *et al.*, [34] who reported that 38% of Mexican patients with gastric cancer were *H. pylori*-positive and 72% were *cagA* positive. There are reports in other Latin American populations, where the prevalence is variable among the *vacAs1m1* and the *H. pylori cagA*-positive genotypes. In patients with gastric cancer in northeast Brazil, Figueiredo-Cavalcante *et al.*, [39] reported that 83.3% of the strains of *H. pylori* were *vacAs1*, 53.3% were *vacAm1* and 96.7% were *cagA*-positive. Teixeira de Souza *et al.*, [38] reported that in subjects with gastric cancer in Northeast Brazil 67.2% were *H. pylori cagA*-positive. According to published reports approximately, 60% of the cases of distal gastric cancer (diffuse and intestinal) are attributed to the infection with *H. pylori* [36, 40]. In the cases of chronic gastritis, the prevalence of *H. pylori* was 56.6%, lower than the one reported by Paniagua *et al.*, [41], in patients with chronic gastritis of the state of Mexico (60.1%) or 69.2% founded by Teixeira de Souza *et al.*, [38] in populations of northeastern Brazil with the same pathology. The *vacAs1m1* and *cagA*-positive are the most common genotypes in patients with chronic gastritis in southwestern Mexico (85.7% and 76.8%, respectively) in comparison with Cubans with functional dyspepsia studied by Torres *et al.*, [42]. In Brazilian population, Teixeira de Sousa *et al.*, [38]

found that 61.5% of the *H. pylori*-positive patients were *cagA*-positive. Oliveira *et al.*, [43] reported that in the population of southeastern Brazil, the prevalence of *cagA*-positive was 29.6%. Clinical outcome of the infection with *H. pylori* may correlate with specific virulence-associated bacterial genotypes, such as *cagA* and *vacAs1m1* genotypes and with the immune response triggered by the bacteria [36-3]. In this study, there was a greater frequency of IL-17A positive cells in patients with chronic gastritis *H. pylori*-positive (94.6%) than *H. pylori*-negative (79.1%) ( $p < 0.05$ ). Median of percentage of IL-17A positive cells, was higher in *H. pylori* infected than uninfected. Our data agreed with those reported by Luzza *et al.*, [45], Serrano *et al.*, [46] and Bhuiyan *et al.*, [4], who found that in the gastric mucosa of patients infected with *H. pylori* there was a higher expression of IL-17A in comparison with uninfected mucosa. Although there was no significant difference when comparing the expression of the cytokine with *vacA* and *cagA* genotypes of *H. pylori*, the median of the positive cells to IL-17A was higher in the infected *vacAs1m1* genotype (71%) and in the *cagA*-positive (75%) than in the carrier of the strains for *vacAs2m2* and the *cagA*-negative.

IL-17 may contribute to the protection against *H. pylori*; mediating the activation of neutrophils, cells that can infiltrate the gastric epithelium and produce antimicrobial peptides, that can kill the bacteria in the lumen [4, 46]. It has been described that in epithelial cell lines, IL-17 is a potent inducer of IL-8 [47]. Mizuno *et al.*, [48] reported that the levels of IL-17 and IL-8 correlates with the number of mononuclear cells and infiltrating neutrophils in the antrum, suggesting that the secretion of both cytokines in the gastric antrum, are key factors for the recruitment and activation of neutrophils in *H. pylori*-positive patients. Although the mechanism through which IL-17 increase the expression of IL-8 has not been fully described, it is known that IL-17 can activate transcription factors such as NF- $\kappa$ B and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) capable of modulating the expression of IL-8 [45]. IL-17

stimulates the fibroblasts to release metalloproteinases which degrades the mucosa, promoting cell proliferation and hyperplasia and increasing the production of IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  [15, 49].

In gastric cancer, 100% of the patients (12/12) expressed IL-17A. This result is similar to that reported by Chen *et al.*, (2011) who found that 90.6% (174/192) of cases of cancer were IL-17A-positive. In the present study the median of the positive cells to IL-17A was higher in patients with gastric cancer than in patients with chronic gastritis 74% and 69% respectively, similar to that reported by Yamada *et al.*, [21], Meng *et al.*, [50] and Su *et al.*, [49] who found higher levels of IL-17 in patients with gastric cancer in comparison with people apparently healthy. Chen *et al.*, [20] reported that the probability of five years survival among the patients expressing high levels of IL-17 was significantly higher than the probabilities of patients expressed low levels. In contrast, Yamada *et al.*, [21], found that the survival among patients with high concentration of IL-17 was 47.1% and in patients with low concentrations of IL-17 was 83.9%.

IL-17 has a dual role, it is involved in the antitumor response but also promotes carcinogenesis, in this sense there is a controversy about the role of IL-17 in gastric cancer. The role of IL-17 may depend on the tumor type or the immune response system of the patient. IL-17 attracts effector Th1 cells to the tumor site through the CXCL9 and CXCL10 chemokine [20]. Binding of IL-17 with its receptor on endothelial cells, stimulates the formation of new blood vessels [50].

TGF- $\beta$  indirectly promotes the differentiation of Th17 cells by inhibiting the expression of STAT4 and GATA3, which are required for the differentiation of Th1 and Th2 cells. TGF- $\beta$  may act synergistically with other cytokines to regulate the development of Treg and Th17 cells. It has been established that TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 are the most important cytokines for

the start of the differentiation of Th17 cells, while IL-23 appears to be important for the expansion and/or maintenance of the Th17 response [51].

In this study TGF- $\beta$ 1 expression was also analyzed; it was found that the median of the expression of TGF- $\beta$ 1 was higher in patients with gastric cancer (89%) than in the subjects with chronic gastritis (80%;  $p=0.05$ ), which suggest that there are differences in the expression of TGF- $\beta$ 1 in patients with gastric cancer and chronic gastritis. Our findings are in agreement with those reported by Naef *et al.*, [27], Docea *et al.*, [52], Ma *et al.*, [28], and Ma *et al.*, [26] who established that there is an overexpression of TGF-  $\beta$ 1 in cancerous tissue compared with adjacent normal tissue.

In patients with gastric cancer *H. pylori*- negative, there was a higher expression of TGF-  $\beta$ 1 that in patients with chronic gastritis also negative to the infection 95% and 82%, respectively ( $p<0.05$ ), probably indicating that *H. pylori* infection does not affect the expression level of TGF- $\beta$ 1, and also that there must be other stimuli produced by tumor cells that are involved in the induction of the expression of this cytokine in the gastric mucosa of patients with gastric cancer. The high expression of TGF-  $\beta$ 1 in tumoral microenvironment plays an important role in the evasion of immunosurveillance, inhibiting the activation, maturing and differentiation of the innate and adaptive immune cell responses, including NK cells, dendritic cells, macrophages, neutrophils and CD4+ and CD8+ [22].

In this study, a positive correlation between the percentage of positive cells expressing IL-17A and TGF- $\beta$ 1 in patients with chronic gastritis *H. pylori* infected *vacAs1m1/cagA*-positive genotypes ( $r= 0.4340$ ,  $p<0.05$ ) was found. These results probably indicated that TGF- $\beta$ 1 could be participating in the differentiation of cells, and in this way influence the maintenance of inflammation. We suggest that in patients with the high expression of TGF- $\beta$ 1 and IL-17A,

these cytokines could be produce damage in the gastric mucosa. However, further studies are required to understand the role of IL-17 and TGF- $\beta$ 1 in the *H. pylori*-infected gastric mucosa. In conclusion, the results of our study suggest that the expression of IL-17 may be related to the infection by *H. pylori*, but not with *vacA* and *cagA* genotypes. The expression of TGF- $\beta$ 1 was not related with the infection by *H. pylori* and that among patients with chronic gastritis and gastric cancer the expression of this cytokine is different. It is likely that the expression of TGF- $\beta$ 1 contributes to the differentiation of Th17 cells.

## Acknowledgements

The authors thank the nurses and the support staff of the Unidad Especializada en Gastroenterología y Endoscopia, Endoscopy Service of the Hospital General “Dr. Raymundo Abarca Alarcón” in Chilpancingo, Guerrero and Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega” in Acapulco, Guerrero who helped in obtaining the samples. We thank Víctor Manuel Villegas Román and Alina Mora González for their support in conducting this project. We acknowledge QBP. Anik Aimeé Mendoza Hernández for their assistance in preparing histological sections. We thank Dr. Victor Hugo Garzón-Barrientos and the MCB. Monica Virginia Saavedra Herrera from the Instituto Estatal de Cancerología for the facilities provided for the completion of this research. This research was supported by Universidad Autónoma de Guerrero (2013) and the Secretaría de Educación Pública through PIFI-2011 program. During the performance of this work, Dinorah Nashely Martínez-Carrillo had a scholarship from the National Council of Science and Technology of Mexico.

## Author Contributions

The manuscript was written with the participation of: DNMC designed the study, wrote the manuscript, and carried out the immunohistochemistry, data analysis and interpretation. OLGC contributed in the writing of the manuscript and the data interpretation. MAMC participated in data analysis and interpretation. GFT participated in the design and coordinated the study and also contributed in the writing the manuscript. RHP coordinated the immunohistochemistry and the image analysis and also contributed in the writing the manuscript. SRN, RBL y ICC recruited patients and carried out the endoscopies and obtained gastric biopsies taken. MAJL contributed in the histopathological diagnosis of samples. ARR coordinated the patient's selection and molecular genotyping *H. pylori*. JAM carried out the DNA extraction and molecular genotyping *H. pylori*. BIA participated in the study design and data analysis.

## Conflict of Interests

The authors declare that they did not have any conflict of interest with respect to this manuscript.

## References

1. Lee, K., Hwang, H., Taek Nam, K. 2014. Immune Response and the Tumor Communicate to Regulate Gastric Cancer. Gut Liver 2014; 8:131-139.
2. Compare, D., Rocco, A., Nardone, G. 2014. Screening for and surveillance of gastric cancer. World J Gastroenterol 14; 20(38): 13681-13691.

3. D'Elcios, M.M., Czinn, S.J., 2014. Immunity, Inflammation, and Vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 19, 19–26. doi:10.1111/hel.12156.
4. Bhuiyan, T.R., Islam, M.M.T., Uddin, T., Chowdhury, M.I., Janzon, A., Adamsson, J., Lundin, S.B., *et al.*, 2014. Th1 and Th17 Responses to *Helicobacter pylori* in Bangladeshi Infants, Children and Adults. *PLoS ONE* 9. doi:10.1371/journal.pone.0093943
5. Kabir, S. 2011. The Role of Interleukin-17 in the *Helicobacter pylori* Induced
6. Infection and Immunity. *Helicobacter* 16: 1–8. *World J Gastroenterol* 28; 20(36): 12767-12780.
7. Alzahrani, S., Lina, TT., Gonzalez, J., Pinchuk, IV., Beswick, JE., Reyes, VE. 2014. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells.
8. Tsai, H.-C., Velichko, S., Hung, L.-Y., Wu, R., 2013. IL-17A and Th17 Cells in Lung Inflammation: An Update on the Role of Th17 Cell Differentiation and IL-17R Signaling in Host Defense against Infection. *J. Immunol. Res.* 2013, e267971.
9. Curtis, M.M., Way, S.S., 2009. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 126, 177–185.
10. Liu, J.Z., Pezeshki, M., Raffatellu, M., 2009. Th17 cytokines and host-pathogen interactions at the mucosa: Dichotomies of help and harm. *Cytokine, Special Issue - Abstracts and Reviews: Tri-Society Annual Conference 2009 of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research Cellular and Cytokine Interactions in Health and Disease* 48, 156–160.

11. Hirota, K., Ahlfors, H., Duarte, J.H., Stockinger, B., 2012. Regulation and function of innate and adaptive interleukin-17-producing cells. *EMBO Rep.* 13, 113–120.
12. Shiomi, S., Toriie, A., Imamura, S., Konishi, H., Mitsufuji, S., Iwakura, Y., *et al.*, 2008. IL-17 is involved in *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Inflammatory Responses in a Mouse Model. *Helicobacter* 13, 518–524.
13. Shi, Y., Liu, X.-F., Zhuang, Y., Zhang, J.-Y., Liu, T., Yin, Z., *et al.*, 2010. *Helicobacter pylori*-Induced Th17 Responses Modulate Th1 Cell Responses, Benefit Bacterial Growth, and Contribute to Pathology in Mice. *J. Immunol.* 184, 5121–5129.
14. Gray, B.M., Fontaine, C.A., Poe, S.A., Eaton, K.A., 2013. Complex T Cell Interactions Contribute to *Helicobacter pylori* Gastritis in Mice. *Infect. Immun.* 81, 740–752.
15. Lina, T.T., Alzahrani, S., Gonzalez, J., Pinchuk, I., Beswick, E.J., Reyes, V.E. 2014. Immune evasion strategies used by *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 28; 20(36): 12753-12766.
16. Jafarzadeh, A., Mirzaee, V., Ahmad-Beygi, H., Nemati, M., Rezayati, M.T., 2009. Association of the CagA status of *Helicobacter pylori* and serum levels of interleukin (IL)-17 and IL-23 in duodenal ulcer patients. *J. Dig. Dis.* 10, 107–112.
17. Zhang, J.-Y., Liu, T., Guo, H., Liu, X.-F., Zhuang, Y., Yu, S., *et al.*, 2011. Induction of a Th17 cell response by *Helicobacter pylori* Urease subunit B. *Immunobiology* 216, 803–810.

18. Tartour, E., Fossiez, F., Joyeux, I., Galinha, A., Gey, A., Claret, E., *et al.*, 1999. Interleukin 17, a T-cell-derived Cytokine, Promotes Tumorigenicity of Human Cervical Tumors in Nude Mice. *Cancer Res.* 59, 3698–3704.
19. Ye, J., Livergood, R.S., Peng, G., 2013. The Role and Regulation of Human Th17 Cells in Tumor Immunity. *Am. J. Pathol.* 182, 10–20. doi:10.1016/j.ajpath.2012.08.041.
20. Zhang, B., Rong, G., Wei, H., Zhang, M., Bi, J., Ma, L., *et al.* 2008. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 374 (2008) 533–537.
21. Chen, J., 2011. Intratumoral Expression of IL-17 and Its Prognostic Role in Gastric Adenocarcinoma Patients. *Int. J. Biol. Sci.* 53–60.
22. Yamada, Y., Saito, H., Ikeguchi, M., 2012. Prevalence and clinical relevance of Th17 cells in patients with gastric cancer. *J. Surg. Res.* 178, 685–691.
23. Tu, E., Chia, P.Z.C., Chen, W., 2014. TGF $\beta$  in T cell biology and tumor immunity: Angel or devil? *Cytokine Growth Factor Rev.*, Special Issue: Cytokines and cytokine receptors as Immunotherapeutics 25, 423–435.
24. Zhao, B., Chen, Y.-G., 2014. Regulation of TGF- $\beta$ 2; Signal Transduction. *Scientifica* 2014, e874065.
25. Wang, Y.-Q., Li, Y.-M., Li, X., Liu, T., Liu, X.-K., Zhang, J.-Q., *et al.*, 2013. Hypermethylation of TGF- $\beta$ 1 gene promoter in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* WJG 19, 5557–5564.

- 
26. Zarzynska, J.M., 2014. Two Faces of TGF-Beta1 in Breast Cancer. *Mediators Inflamm.* 2014, e141747.
27. Ma, H., Wei, Y., Leng, Y., Li, S., Gao, L., Hu, H., Chen, L., *et al.*, 2014. TGF- $\beta$ 1-induced expression of Id-1 is associated with tumor progression in gastric cancer. *Med. Oncol.* 31, 1–10.
28. Naef, M., Ishiwata, T., Friess, H., Büchler, M.W., Gold, L.I., Korc, M., 1997. Differential localization of transforming growth factor- $\beta$  isoforms in human gastric mucosa and overexpression in gastric carcinoma. *Int. J. Cancer* 71, 131–137.
29. Ma, G.-F., Miao, Q., Zeng, X.-Q., Luo, T.-C., Ma, L.-L., Liu, Y.-M., *et al.*, 2013. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 and - $\beta$ 2 in Gastric Precancer and Cancer and Roles in Tumor-Cell Interactions with Peripheral Blood Mononuclear Cells In Vitro. *PLoS ONE* 8.
30. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, *et al.* Classification and grading of gastritis. The updated Sydney system-International workshop on the histopathology of gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol.* 1996; 20:1161-1181.
31. Lauren T. The two histologic main types of gastric carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965; 64:34.
32. Sambrook J, Russel D: *Molecular Cloning a Laboratory Manual* EU: Col Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
33. Román-Román A, Giono-Cerezo S, Camorlinga-Ponce M, *et al.* *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* in the oral cavity and stomach of patients with chronic gastritis and gastric ulcer. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013; 31(3):130-5.

- 
34. Martínez-Carrillo, DN., Atrisco-Morales, J., Hernández-Pando, R., Reyes-Navarrete, S., Betancourt-Linares, R., Cruz-del Carmen, I., *et al.* 2014. Diversidad de los genotipos *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* y expresión de interferón gamma en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. Revista de Gastroenterología de México. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rgmx.2014.10.003>. Article in press.
35. López-Vidal, Y., Ponce-de-León, S., Castillo-Rojas, G., Barreto-Zúñiga, R., Torre-Delgadillo, A., 2008. High Diversity of *vacA* and *cagA* *Helicobacter pylori* Genotypes in Patients with and without Gastric Cancer. PLoS ONE 3.
36. López-Carrillo, L., Camargo, M.C., Schneider, B.G., Sicinschi, L.A., Hernández-Ramírez, R.U., Correa, P., *et al.*, 2012. Capsaicin consumption, *Helicobacter pylori* CagA status and IL1B-31C > T genotypes: A host and environment interaction in gastric cancer. Food Chem. Toxicol. 50, 2118–2122.
37. Rigoli, L., Caruso, R.A., 2014. Mitochondrial DNA alterations in the progression of gastric carcinomas: Unexplored issues and future research needs. World J. Gastroenterol. WJG 20, 16159–16166.
38. Correa, P. 2013. Gastric Cancer: Overview. Gastroenterol Clin North Am. 42(2): 211–217. doi:10.1016/j.gtc.2013.01.002.
39. Teixeira de Souza, C.R., de Oliveira, K., Ferraz, J.J., Leal, M., Calcagno, D., Seabra, A., *et al.*, 2014. Occurrence of *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus infection in endoscopic and gastric cancer patients from Northern Brazil. BMC Gastroenterol. 14, 179.

- 
40. de Figueiredo-Cavalcante M, Simões-Silva CI, Braga-Neto MB, *et al.* *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012; 107(4): 561-563.
41. Cooke, C., Torres, J., Solnick, J V. 2013. Biomarkers of *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer. *Gut Microbes*, 4:6, 532-540, DOI:10.4161/gmic.25720.
42. Paniagua, G.L., Monroy, E., Rodríguez, R., Arroniz, S., Rodríguez, C., Cortés, J.L., *et al.*, 2009. Frequency of *vacA*, *cagA* and *babA2* virulence markers in *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 8, 14.
43. Torres, L.-E., 2009. Prevalence of *vacA*, *cagA* and *babA2* genes in Cuban *Helicobacter pylori* isolates. *World J. Gastroenterol.* 15, 204.
44. de Oliveira, JG., Ferreira, CHT., Camerin, ACS., Rota, CA., Meurer, L., da Silveira, TR. 2014. Prevalence of infection with *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains among children and adolescents in Southern Brazil. *Arq Gastroenterol.* 51:3, 180-185.
45. Alvarado-Esquivel, C., 2013. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* Infection in Tepehuanos Aged 15 Years and Older in Durango, Mexico. *J. Pathog.* e243246.
46. Lizza, F., Parrello, T., Monteleone, G., Sebkova, L., Romano, M., Zarrilli, R., *et al.*, 2000. Up-Regulation of IL-17 Is Associated with Bioactive IL-8 Expression in *Helicobacter pylori*-Infected Human Gastric Mucosa. *J. Immunol.* 165, 5332–5337.

- 
47. Serrano, C., Wright, S.W., Bimczok, D., Shaffer, C.L., Cover, T.L., Venegas, A., *et al.*, 2013. Downregulated Th17 responses are associated with reduced gastritis in *Helicobacter pylori*-infected children. *Mucosal Immunol.* 6, 950–959.
48. Sebkova, L., Pellicanò, A., Monteleone, G., Grazioli, B., Guarnieri, G., Imeneo, M., *et al.*, 2004. Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Mediates Interleukin 17 (IL-17)-Induced IL-8 Secretion in *Helicobacter pylori*-Infected Human Gastric Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 72, 5019–5026.
49. Mizuno, T., Ando, T., Nobata, K., Tsuzuki, T., Maeda, O., Watanabe, O., *et al.*, 2005. Interleukin-17 levels in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa and pathologic sequelae of colonization. *World J. Gastroenterol.* WJG 11, 6305–6311.
50. Su, Z., Sun, Y., Zhu, H., Liu, Y., Lin, X., Shen, H., *et al.*, 2014. Th17 cell expansion in gastric cancer may contribute to cancer development and metastasis. *Immunol. Res.* 58, 118–124.
51. Meng, X.Y., Zhou, C.H., Ma, J., Jiang, C., Ji, P., 2012. Expression of interleukin-17 and its clinical significance in gastric cancer patients. *Med. Oncol.* 29, 3024–3028.
52. Li, Q., Li, Q., Chen, J., Liu, Y., Zhao, X., Tan, B., Ai, J., Zhang, Z., Song, J., Shan, B. 2013. Prevalence of Th17 and Treg cells in gastric cancer patients and its correlation with clinical parameters. *Oncology reports* 30: 1215-1222.
53. Docea, A.O., Mitruț, P., Grigore, D., Pirici, D., Călina, D.C., Gofiță, E., 2012. Immunohistochemical expression of TGF beta (TGF- $\beta$ ), TGF beta receptor 1

(TGFBR1), and Ki67 in intestinal variant of gastric adenocarcinomas. Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol. 53, 683–692.

**Figure 1.** Immunohistochemical expression of IL-17 and TGF- $\beta$ 1 in gastric biopsies from patients with chronic gastritis and gastric cancer, counterstained with hematoxylin-eosin (400x). **A:** Gastric biopsy from patients with chronic gastritis IL-17-negative; **B:** Gastric biopsy from patients with chronic gastritis IL-17-positive; **C:** Gastric biopsy from patients with gastric cancer IL-17-positive; **D:** Tonsil biopsy positive control for the expression of IL-17; **E:** Tonsil biopsy, negative control for the reaction (primary antibody was omitted); **F:** gastric biopsy from patients with chronic gastritis TGF- $\beta$ 1-negative; **G:** Gastric biopsy from patients with chronic gastritis TGF- $\beta$ 1-positive; **I:** tonsil biopsy, positive control to the expression of TGF- $\beta$ 1; **J:** tonsil biopsy, negative control to the reaction (primary antibody was omitted).

**Figure 2.** IL-17A expression in patients with chronic gastritis and gastric cancer. **A.** Median of percentage of positive cells for IL-17A in all samples. **B.** Median of percentage of positive cells for IL-17A in patients *H. pylori vacA s1m1*, *s1m1* and *s2m2* genotypes. **C.** Median of percentage of positive cells for IL-17A in patients *vacAs1m1cagA*-negative and positive.

**Figure 3.** TGF-  $\beta$ 1 expression in patients with chronic gastritis and gastric cancer. **A.** Median of percentage of positive cells for TGF-  $\beta$ 1 in all samples. **B.** Median of percentage of positive cells for TGF-  $\beta$ 1 in patients *H. pylori vacA s1m1*, *s1m2* and *s2m2* genotypes. **C.** Median of percentage of positive cells for TGF-  $\beta$ 1 in patients *vacAs1m1cagA*-negative and positive.

**Figure 4:** Correlation between the percentage of positive cells expressing IL-17A and TGF- $\beta$ 1. **A.** Patients with chronic gastritis *vacAs1mlcagA*-positive. **B.** Patients with gastric cancer *vacAs1mlcagA*-positive.

## Tables

**Table 1 - Prevalence of *H. pylori* infection and *vacA* and *cagA* genotypes**

	Chronic gastritis n (%)	Gastric cancer n (%)	<i>p</i> value
<b><i>H. pylori</i> n = 111</b>			
Negative	43 (43.4)	5 (41.7)	> 0.05 <sup>a</sup>
Positive	56 (56.6)	7 (58.3)	
<b><i>vacA</i> Genotype n = 63</b>			
<i>s2m2</i>	5 (8.9)	0	
<i>s1m2</i>	3 (5.4)	0	> 0.05 <sup>b</sup>
<i>s1m1</i>	48 (85.7)	7 (100)	
Total	56 (100)	7 (100)	
<b><i>cagA</i> Genotype n = 63</b>			
<i>cagA</i> -negative	13 (23.2)	1 (14.3)	> 0.05 <sup>b</sup>
<i>cagA</i> -positive	43 (76.8)	6 (85.7)	
Total	56 (100)	7 (100)	
<b><i>vacA/cagA</i> Genotype n = 63</b>			
<i>vacAs2m2/cagA</i> -negative	4 (7.1)	0	
<i>vacAs1m1/cagA</i> -positive	40 (71.4)	6 (85.7)	> 0.05 <sup>b</sup>
Others <sup>δ</sup>	12 (21.4)	1 (14.3)	
Total	56 (100)	7 (100)	

<sup>a</sup> X<sup>2</sup> test; <sup>b</sup> Fisher's exact test; <sup>δ</sup> In others *vacAs1m1/cagA*-negative, *vacAs1m2/cagA*-negative or positive and *vacAs2m2/cagA*-positive are included

**Table 2 – Expression frequency of IL-17A y TGF-β1 in chronic gastritis and gastric cancer patients**

	Chronic gastritis n=99		Gastric cancer n=12	
<b>IL-17A expression</b>	<i>H. pylori</i> -negative	<i>H. pylori</i> -positive	<i>H. pylori</i> -negative	<i>H. pylori</i> -positive
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Negative	9 (20.9)	3 (5.4)	0	0
Positive	34 (79.1)	53 (94.6)	5 (100)	7 (100)
<b>Total</b>	<b>43 (100)</b>	<b>56 (100)</b>	<b>5 (100)</b>	<b>7 (100)</b>
<b>p value <sup>b</sup></b>	< 0.05		ND <sup>ε</sup>	
<b>TGF-β1 expression</b>	Negative	1 (1.8%)	0	0
	Positive	39 (90.7%)	5 (100%)	7 (100%)
<b>Total</b>	<b>43 (100%)</b>	<b>56 (100%)</b>	<b>5 (100%)</b>	<b>7 (100%)</b>
<b>p value <sup>b</sup></b>	> 0.05		ND <sup>ε</sup>	

<sup>b</sup> Fisher's exact test; <sup>ε</sup> Not Determinated.

**Table 3 – Percentage of positive cells to IL-17A and TGF- $\beta$ 1 expression and *H. pylori* infection in chronic gastritis and gastric cancer patients**

	IL-17A expression			TGF- $\beta$ 1 expression		
	Chronic gastritis	Gastric cancer	p value	Chronic gastritis	Gastric cancer	p value
<i>H. pylori</i> Negative	68 (34-86)	73 (50-91)	> 0.05	82 (45-94)	95 (63-97)	< 0.05
<i>H. pylori</i> Positive	70 (50-94)	75 (52-90)	> 0.05	75 (47-100)	86 (62-94)	> 0.05
<b>p value</b>	> 0.05	> 0.05		> 0.05	> 0.05	

Mann-Whitney test; Median, minimum and maximum values were reported.

**Table 4 - Relation of IL-17A and TGF- $\beta$ 1 expression in patients with chronic gastritis**

IL-17A expression	TGF- $\beta$ 1 expression		Total n (%)	p values <sup>b</sup>
	Negative n (%)	Positive n (%)		
Negative	4 (4)	8 (8.1)	<b>12 (12.1)</b>	< 0.05
Positive	1 (1)	86 (86.9)	<b>87 (87.9)</b>	
<b>Total</b>	<b>5 (5)</b>	<b>94 (95)</b>	<b>99 (100)</b>	

<sup>b</sup> Fisher's exact test.

Figure

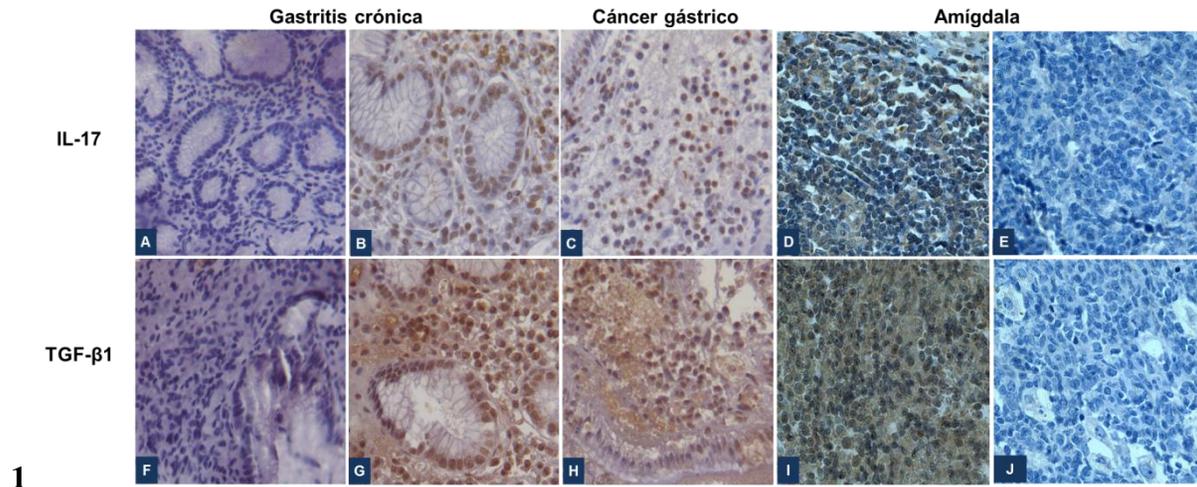


Figure 2.

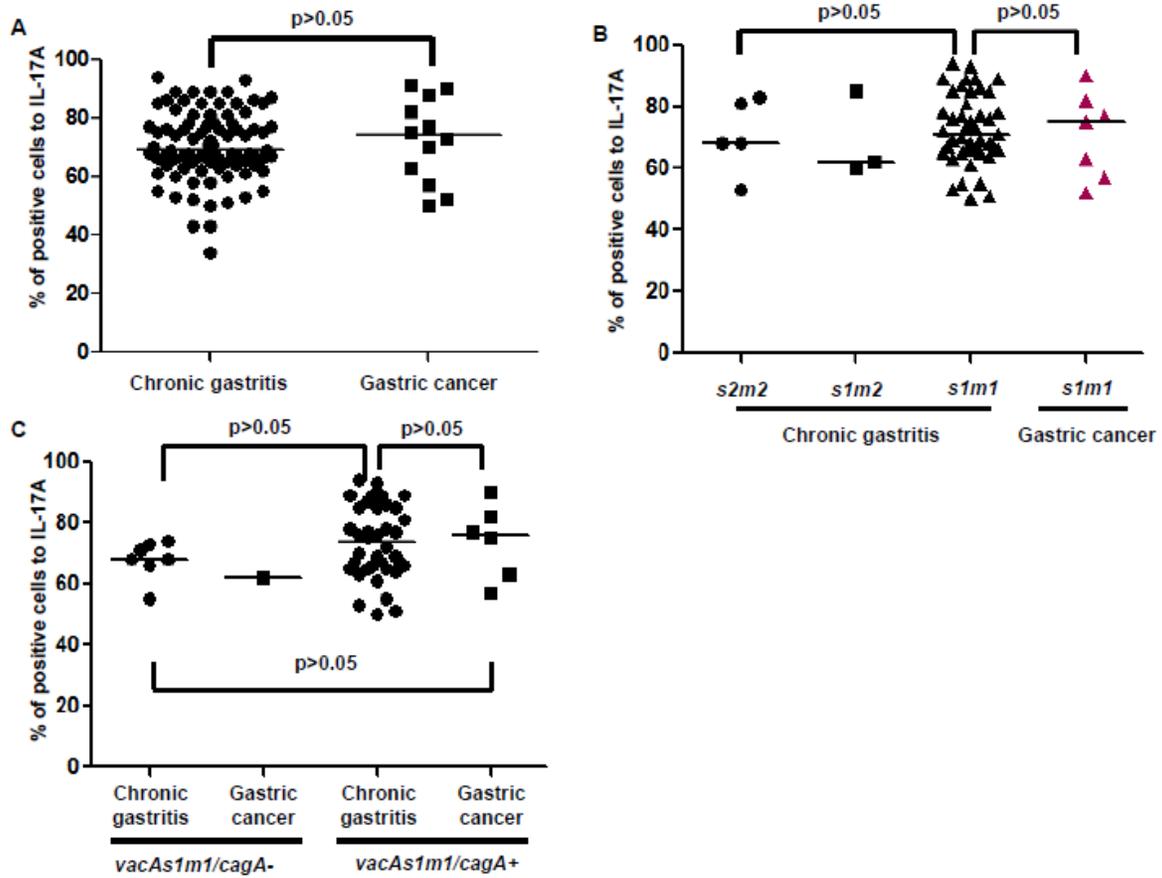


Figure 3.

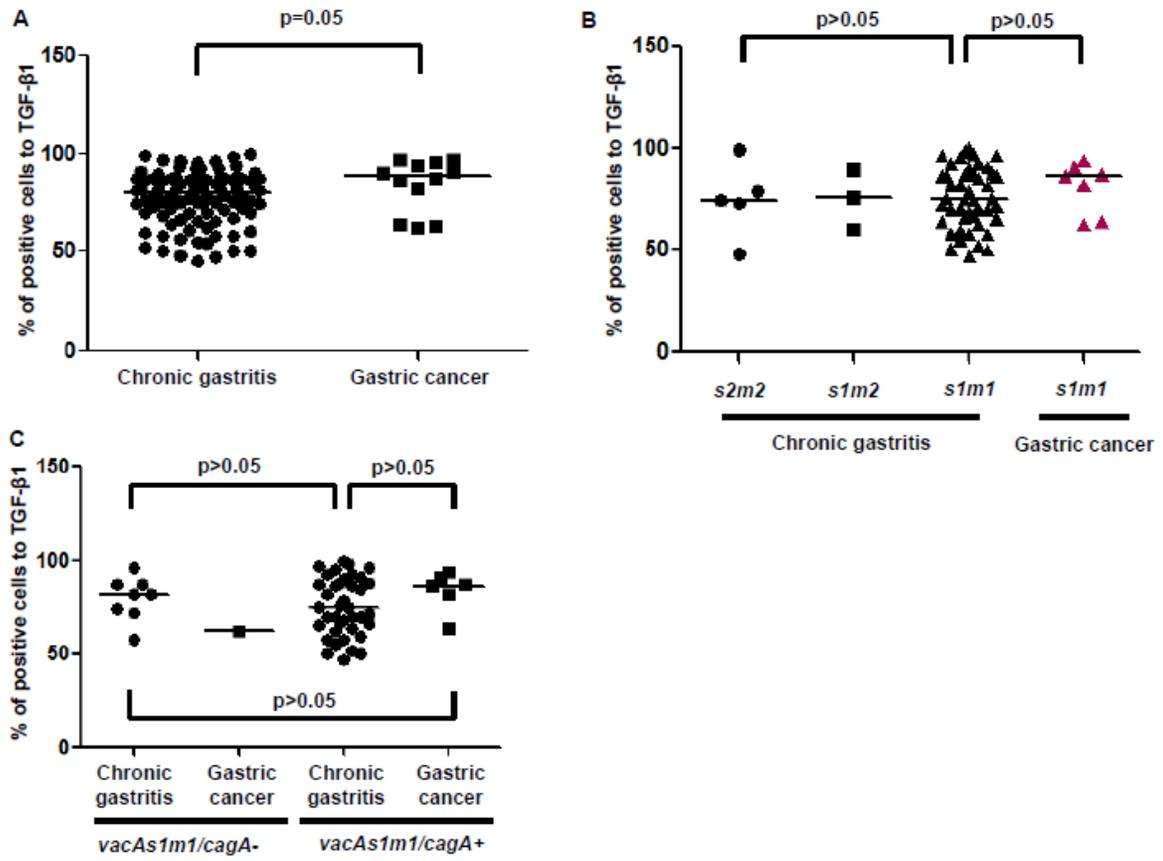
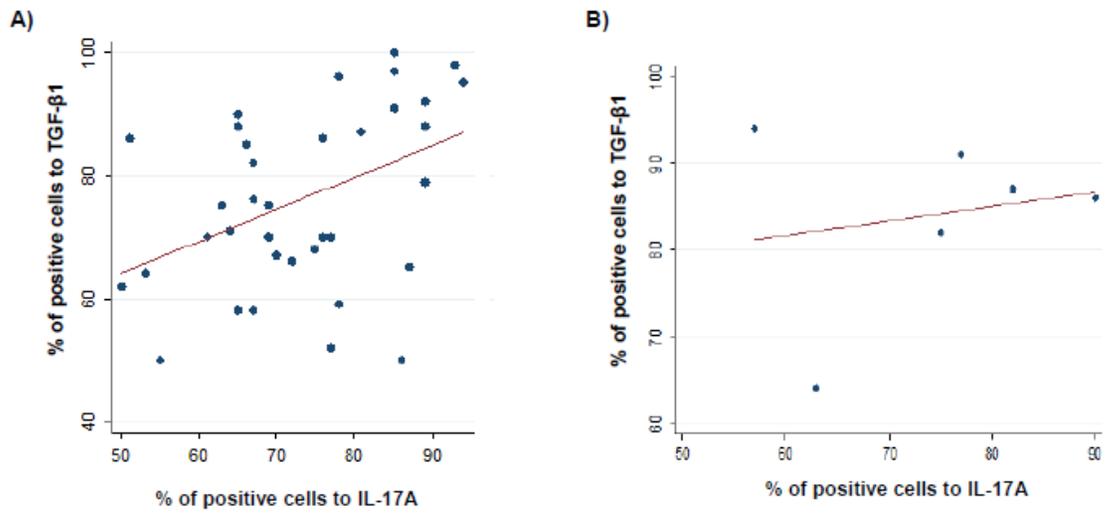


Figure 4.



*“Everybody is a genius. But if you judge a fish by its ability to climb a tree,  
it will live its whole life believing that it is stupid”*

*Albert Einstein*