



**Universidad Autónoma de Guerrero**  
Facultad de Ciencias Químico Biológicas  
Facultad de Medicina  
Unidad de Investigación Especializada en Microbiología

Maestría en Ciencias Biomédicas

---

**miR-24-3p y miR-142-3p: Expresión en pacientes con  
patología gástrica y relación con PKC $\alpha$  en macrófagos  
humanos infectados por *Helicobacter pylori***

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

**Q.B.P. Gladys Wendy Valente Niño**

Directora de tesis: **Dra. Gloria Fernández Tilapa**

Co-Director: **Dr. Adolfo Román Román**



Chilpancingo Gro., enero de 2020.



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

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 11 días del mes de diciembre de dos mil diecinueve se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "miR-24-3p y miR-142-3p: Expresión en pacientes con patología gástrica y relación con PKC $\alpha$  en macrófagos humanos infectados por *Helicobacter pylori*", presentada por la alumna Gladys Wendy Valente Niño, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dra. Gloria Fernández Tilapa  
Dirección de tesis

Dra. Hilda Jiménez Wences

Dra. Dinorah Nashely Martínez Carrillo

Vo. Bo

Daniel Hernández Sotelo  
Coordinador de la Maestría en Ciencias Biomédicas

Dr. Daniel Hernández Sotelo

Dr. Oscar Parafía Zaragoza

Vo. Bo

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



Este trabajo se realizó en los Laboratorios de Investigación Clínica, de Investigación en Biomoléculas y de Investigación en Bacteriología, de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, en Chilpancingo, Guerrero. Parte de la investigación se realizó en el Laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias Centro Médico Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, en la Ciudad de México.

Bajo la dirección de:

**Dra. Gloria Fernández Tilapa**

Co-dirección de:

**Dr. Adolfo Román Román**

La asesoría externa de:

**Dr. Oscar Peralta Zaragoza**

Y la asesoría interna de:

**Dra. Dinorah Nashely Martínez Carrillo**

**Dra. Hilda Jiménez Wences**

**Dr. Daniel Hernández Sotelo**

El proyecto se realizó en colaboración con el **Dr. Salomón Reyes Navarrete**, director médico y jefe del servicio de endoscopia del Instituto Estatal de Cancerología Dr. Arturo Beltrán Ortega, Acapulco Gro., el **Dr. Iván Cruz del Carmen** del Hospital General Dr. Raymundo Abarca Alarcón, Chilpancingo, Gro.,

con el **M en C. Carlos Alberto Castañón Sánchez**, Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca, Oax., con la **Dra. Yolanda González Hernández**, Jefa del Departamento de Investigación en Microbiología del Instituto de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Ciudad de México., con el **Dr. Eduardo Castañeda Saucedo** del Laboratorio de Biología Celular del Cáncer , con el **Dr. Miguel Ángel Mendoza Catalán** del laboratorio de Biomedicina Molecular de la Universidad Autónoma de Guerrero

### **Fuentes de financiamiento**

La investigación se realizó con financiamiento otorgado por la Secretaría de Educación Pública, a través del Programa de Fortalecimiento de la Calidad Educativa (PFCE) 2016-2018 al cuerpo Académico Agentes Infecciosos y Cáncer (Consolidado, UAGro-CA194) y con recursos otorgados por el CONACYT al proyecto 258433, en la convocatoria de Investigación Científica Básica 2015-01, bajo la responsabilidad de la Dra. Dinorah Nashely Matínez Carrillo.

Durante el periodo que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la QBP. Gladys Wendy Valente Niño fue beneficiada con la beca CONACYT, folio 627617 y con apoyo por Beca de Movilidad otorgada por CONACYT, folio 291249, para la realización de una estancia de Investigación.

## **Agradecimientos**

A la **Dra. Gloria Fernández Tilapa**, por la confianza, paciencia y oportunidad para desarrollar este proyecto, por todas las sugerencias y consejos que permitieron enriquecer este trabajo y por siempre motivarme a ser mejor persona.

A los **Dr. Adolfo Román Román** y al **Dr. Oscar Peralta Zaragoza**, por sus aportaciones y colaboración para la realización de este proyecto.

A la **Dra. Dinorah Nashely Martínez Carrillo**, la **Dra. Hilda Jiménez Wences** y al **Dr. Daniel Hernández Sotelo**, por su amistad, aportaciones, cuestionamientos y sugerencias fundamentales que permitieron obtener un trabajo de calidad.

A la **Dra. Yolanda González Hernández**, el **Dr. Eduardo Castañeda Saucedo**, al **Dr. Miguel Ángel Mendoza Catalán** y al **Dr. Marco Antonio Ramírez Vargas**, por el tiempo, las facilidades y aportaciones que contribuyeron a la realización y culminación de este proyecto.

A la **Dra. Margarita Camorlinga Ponce**, por el recibimiento y la estancia amena en su laboratorio, por el conocimiento compartido y paciencia.

A la **Dra. Gabriela Elizabeth Campos Viguri**, por el apoyo y disposición para la colaboración en este proyecto.

A la **M. en C. Josefina Atrisco Morales**, por siempre estar dispuesta a apoyarme y aconsejarme, por su infinita amistad y complicidad que hicieron más agradable esta etapa.

A todos mis **Amigos**, por ser siempre mi apoyo y compartir conmigo esta maravillosa experiencia. De corazón ¡Gracias!

## Dedicatorias

**La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste.**

Marie Curie

**A mis padres, Fausto Valente García y Gladys Niño García**, por siempre estar a mi lado y no permitirme caer, por ser siempre mi sustento y aliento, por ser motivación para ser mejor hija cada día, por creer en mi siempre y por ser mi mejor ejemplo de superación y constancia, este éxito es completamente suyo. ¡Los quiero mucho!

**A mi hermano, Jesús Emmanuel**, por siempre inspirarme a ser tu mejor ejemplo, por darme ánimos día a día, por todas tus ocurrencias y alegrías, gracias hermano por todo tu cariño y apoyo. ¡Te quiero mucho!

**A mi familia**, a cada uno de ustedes que no terminaría de mencionar, infinitas gracias por cada una de las palabras de motivación, por enseñarme que la unidad es el mejor de los valores y por cada una de alegrías que me dan.

*Gladys Wendy Valente Niño*

miR-24-3p y miR-142-3p: Expresión en pacientes  
con patología gástrica y relación con PKC $\alpha$  en  
macrófagos humanos infectados por *Helicobacter*  
*pylori*

# ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	ABSTRACT .....	2
III.	INTRODUCCIÓN.....	3
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	5
V.	RESULTADOS .....	11
VI.	DISCUSIÓN.....	20
VII.	CONCLUSIÓN.....	24
VIII.	REFERENCIAS.....	25

## I. RESUMEN

**Introducción:** *H. pylori* es el agente causal de gastritis crónica y cáncer gástrico. En respuesta a *H. pylori*, se acumulan monocitos y macrófagos en la mucosa gástrica, sin embargo, la bacteria es resistente a la muerte por estas células. *H. pylori* promueve la expresión de miRNAs que participan en la regulación postranscripcional de genes con funciones clave en procesos de proliferación, apoptosis e inflamación. **Objetivo:** Evaluar el nivel de expresión de miR-24-3p y miR-142-3p en pacientes con patologías gástricas y su relación con la expresión de PKC $\alpha$  en macrófagos humanos infectados con genotipo virulento y avirulento de *H. pylori*. **Metodología:** La expresión de miR-24-3p, miR-142-3p y el mRNA de PKC $\alpha$  se determinó por qRT-PCR en biopsias gástricas de pacientes con diagnóstico histopatológico de gastritis crónica o cáncer gástrico y en macrófagos derivados de monocitos humanos infectados con *H. pylori vacA s1m1/cagA+/BabA+* y *vacA s2m2/cagA-/BabA-*. La expresión de PKC $\alpha$  se evaluó por Western Blot. La endocitosis de *H. pylori* por macrófagos, se determinó por inmunofluorescencia. **Resultados:** La expresión de miR-24-3p y miR-142-3p es más alta en pacientes con gastritis crónica en comparación con cáncer gástrico ( $p < 0.05$ ). En pacientes con gastritis crónica infectados por *H. pylori*, la expresión de miR-24-3p es menor en comparación con los no infectados ( $p < 0.05$ ). En macrófagos humanos, la expresión de miR-24-3p y miR-142-3p incrementó a 1 y 3 h post-infección, respectivamente, con el genotipo virulento y avirulento de *H. pylori*. La expresión de la proteína PKC $\alpha$  aumenta en macrófagos infectados con el genotipo virulento y avirulento de *H. pylori*. El mayor número de bacterias intracelulares se observó en macrófagos infectados con el genotipo virulento de *H. pylori*. **Conclusión:** El nivel de expresión menor de miR-24-3p y miR-142-3p en pacientes con cáncer gástrico en comparación con gastritis crónica sugiere que estos miRNAs son supresores de tumor en la carcinogénesis gástrica. La infección por *H. pylori* contribuye a la modulación de la expresión de miR-24-3p y miR-142-3p en pacientes con gastritis crónica. En macrófagos humanos infectados, la expresión de miR-24-3p, miR-142-3p y PKC $\alpha$  es independiente del genotipo de *H. pylori*. Se observó mayor número de bacterias endocitadas en macrófagos infectados con el genotipo virulento de *H. pylori*.

**Palabras clave:** Cáncer gástrico, gastritis crónica, *H. pylori*, miR-142-3p, miR-24-3p, y PKC $\alpha$

## II. ABSTRACT

**Introduction:** *H. pylori* is the main cause of chronic gastritis and gastric cancer. In response to *H. pylori*, monocytes and macrophages accumulate in the gastric mucosa, however, the bacteria is resistant to death by these cells. *H. pylori* promotes the expression of miRNAs that participate in the post-transcriptional regulation of genes with key functions in proliferation, apoptosis and inflammation processes. **Objective:** To evaluate the expression of miR-24-3p and miR-142-3p in patients with gastric pathologies and their relationship with PKC $\alpha$  expression in human macrophages infected with virulent and avirulent genotype of *H. pylori*. **Methodology:** The expression of miR-24-3p, miR-142-3p and PKC $\alpha$  mRNA was determined by qRT-PCR in gastric biopsies from patients with histopathological diagnosis of chronic gastritis or gastric cancer and in macrophages derived from human monocytes infected with *H. pylori* vacA s1m1 / cagA + / BabA + and vacA s2m2 / cagA- / BabA-. PKC $\alpha$  expression was evaluated by Western Blot. The endocytosis of *H. pylori* by macrophages was determined by immunofluorescence. **Results:** The expression of miR-24-3p and miR-142-3p was higher in patients with chronic gastritis compared to gastric cancer ( $p < 0.05$ ). In patients with chronic gastritis infected by *H. pylori*, the expression of miR-24-3p was lower compared to those not infected ( $p < 0.05$ ). In human macrophages, the expression of miR-24-3p and miR-142-3p increased to 1 and 3 h post-infection, respectively, with the virulent and avirulent genotype of *H. pylori*. PKC $\alpha$  protein expression increases in macrophages infected with the virulent and avirulent genotype of *H. pylori*. The highest number of intracellular bacteria was observed in macrophages infected with the virulent genotype of *H. pylori*. **Conclusion:** The lower expression level of miR-24-3p and miR-142-3p in patients with gastric cancer compared with chronic gastritis suggests that these miRNAs are tumor suppressors in gastric carcinogenesis. *H. pylori* infection contributes to the modulation of miR-24-3p and miR-142-3p expression in patients with chronic gastritis. In infected human macrophages, the expression of miR-24-3p, miR-142-3p and PKC $\alpha$  is independent of the *H. pylori* genotype. A greater number of endocyte bacteria was observed in macrophages infected with the virulent genotype.

**Key words:** Gastric cancer, chronic gastritis, *H. pylori*, miR-142-3p, miR-24-3p and PKC $\alpha$ .

### III. INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria Gram negativa con morfología curva y espiralada (Kusters, *et al.*, 2006). La frecuencia de infección por *H. pylori* a nivel mundial varía entre 50% a 70%, y es más alta en países con mayor incidencia de cáncer gástrico (Peleteiro, *et al.*, 2014). En la mayoría de los casos, la infección es asintomática y, aproximadamente, el 20% de los sujetos infectados desarrollan patología gástrica (Quach, *et al.*, 2018). El tipo y la severidad de enfermedades ocasionadas por *H. pylori* depende de factores bacterianos como el genotipo de la cepa; factores ambientales como el consumo de tabaco o dieta alta en sal; y factores del hospedero como la respuesta inmune. La interacción de algunos de esos factores promueve la inflamación persistente en la mucosa gástrica, que da lugar a lesiones gástricas como gastritis crónica, que progresa a atrofia gástrica, metaplasia intestinal, displasia y cáncer gástrico (Vannarath *et al.*, 2014; Román-Román *et al.*, 2017; Kawamura *et al.*, 2019).

*H. pylori* coloniza la mucosa gastrointestinal y sus factores de virulencia como la citotoxina A vacuolizante (VacA), la citotoxina asociada al gen A (CagA), la adhesina de unión a antígenos Lewis b (BabA), la adhesina de unión al ácido siálico (SabA), pueden estar en contacto con células del sistema inmune en la lámina propia (Kalali, *et al.*, 2014; Kao, *et al.*, 2016). *H. pylori* promueve el reclutamiento de linfocitos, células plasmáticas, células dendríticas, macrófagos y células polimorfonucleares al sitio de la infección e induce una respuesta de tipo Th1 y Th17 que es ineficaz para eliminar la bacteria (Kao *et al.*, 2016; Johnson and Otteman, 2018). Aunque la respuesta inmune del hospedero elimina la mayoría de los patógenos, *H. pylori* ha desarrollado mecanismos para modular y evadir la respuesta innata y adaptativa y esto resulta en la exitosa persistencia de la bacteria en el hospedero (Borlace, *et al.*, 2012; Abadi, *et al.*, 2017).

Los macrófagos son los principales efectores de la respuesta inmune innata en la mucosa gástrica, el proceso de fagocitosis y la maduración del fagosoma podrían modular el tipo de respuesta frente a patógenos. *H. pylori* altera la función de macrófagos por diversos mecanismos, evade la opsonización por anticuerpos

(Allen, 2007), retarda el proceso de fagocitosis (Allen, *et al.*, 2002), altera el tráfico de membrana, la maduración del fagosoma (Zheng and Jones, 2003) y promueve la formación de megasomas donde la bacteria es capaz de residir (Borlace, *et al.*, 2012), de esta manera *H. pylori* evade la muerte por macrófagos.

*H. pylori* promueve la expresión de microRNAs (miRNAs) que regulan la respuesta inmune, favorecen la colonización y persistencia de la bacteria en la mucosa gástrica (Chang *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2017). Los miRNAs son pequeños ácidos ribonucleicos (RNA) no codificantes, que se unen por complementariedad a su mRNA blanco, promoviendo su degradación o causando la represión de su traducción. *H. pylori* regula la expresión de miR-155, miR-223-3p, miR-196, miR-488, let7b y miR-370 (Liu, *et al.*, 2013; Pachathundikandi and Backert, 2018; Chung, *et al.*, 2017; Rossi, *et al.*, 2016), que actúan como reguladores de la respuesta inmune; y la expresión de miR-21, miR-27b, miR-194 y miR-196 (Shiotani, *et al.*, 2012; Geng, *et al.*, 2016) que regulan proliferación, inhibición de la apoptosis y modulan la vía de Wnt en la tumorigénesis gástrica. miR-24-3p y miR-142-3p se expresan diferencialmente en monocitos, macrófagos y células dendríticas, modulan la diferenciación de estas células y la capacidad para establecer una respuesta inmune frente a patógenos (Fordham, *et al.*, 2015). La sobre expresión de miR-24-3p y miR-142-3p en macrófagos humanos se asocia con la disminución en la expresión del mRNA de PKC $\alpha$ , proteína requerida para la polimerización de actina y la fusión del fagosoma con el lisosoma. Como resultado de la subexpresión de PKC $\alpha$ , disminuye significativamente la fagocitosis de *E. coli* y *S. aureus* (Naqvi, *et al.*, 2015). En macrófagos murinos y macrófagos primarios humanos, *Mycobacterium tuberculosis* induce la expresión de miR-142-3p, que regula negativamente los niveles de N-Wasp, proteína que modula la polimerización de actina. Estos eventos, conducen a la disminución de la fagocitosis de *M. tuberculosis* (Bettencourt *et al.*, 2013). miR-24-3p y miR-142-3p están aumentados en pacientes con gastritis crónica y disminuidos en pacientes con cáncer gástrico, sin embargo, la expresión de esos miRNAs no se asoció con la infección por *H. pylori* (Duang, *et al.*, 2014; Fernández, *et al.*, 2017; Wang, *et al.*, 2018)

No se ha estudiado la participación de miR-142-3p y miR-24-3p en la regulación de PKC $\alpha$  durante la infección por *H. pylori* en macrófagos humanos, ni la relación entre la expresión de estos miRNAs y la infección por *H. pylori* con gastritis crónica y cáncer gástrico. El objetivo de este trabajo es evaluar la relación entre el nivel de expresión de miR-24-3p y miR-142-3p con el de PKC $\alpha$  y con la regulación de la fagocitosis en macrófagos humanos infectados con genotipo virulento y avirulento de *Helicobacter pylori* y la expresión de estos miRNAs en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico.

#### **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

##### **Selección de mRNA blanco para miR-142-3p y miR-24-3p**

La selección del mRNA blanco para miR-24-3p y miR-142-3p se hizo con base en la revisión de la literatura. Se consideraron sólo artículos originales que incluían la validación *in vitro* de los genes blanco, involucrados en la fagocitosis bacteriana, para cada miRNA. Se utilizaron los siguientes software para el análisis *in silico*, que permitió ubicar elementos de respuesta a microRNAs (MRE) específicos para miR-24-3p y miR-142-3p en los mRNA blanco.

- Target Scan Human: [www.targetscan.org/](http://www.targetscan.org/)
- miRanda: <http://www.microrna.org/microrna/home.do>
- miRSystem: <http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/index.php>
- miRSearch: <https://www.exiqon.com/miRSearch>
- mirDB: <http://www.mirdb.org/miRDB/>
- miRTarBase: <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>
- DianaTools: [http://diana.imis.athenainnovation.gr/DianaTools/index.php?r=miroT\\_CDS/index](http://diana.imis.athenainnovation.gr/DianaTools/index.php?r=miroT_CDS/index)
- MicroCosm: <http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm>

##### **Pacientes**

Se incluyeron 29 pacientes que fueron sometidos a endoscopia digestiva alta en el Hospital General Raymundo Abarca Alarcón, en Chilpancingo o en el Servicio de Endoscopia del Instituto Estatal de Cancerología Arturo Beltrán Ortega, en

Acapulco, Guerrero, México. Se seleccionaron pacientes con diagnóstico histopatológico de gastritis crónica o cáncer gástrico. Se excluyeron pacientes bajo tratamiento inmunosupresor o antiinflamatorio. Se incluyeron pacientes sin tratamiento anti-microbiano y sin consumo de inhibidores de la bomba de protones o de neutralizadores de pH gástrico, durante las dos semanas previas al estudio endoscópico. Los pacientes firmaron una carta de consentimiento informado y respondieron un cuestionario acerca de hábitos alimenticios, factores sociodemográficos, consumo de alcohol y tabaco. Este proyecto fue aprobado por el comité de bioética de la Universidad Autónoma de Guerrero, por el departamento de Investigación del Instituto Estatal de Cancerología y por la Jefatura de Enseñanza e Investigación del Hospital General Raymundo Abarca Alarcón.

### **Endoscopía e histología**

El estudio endoscópico se llevó a cabo después de una noche de ayuno con un videoprocador y videogastroscopio (Fujinon, Wayne, NJ USA). Se obtuvieron dos biopsias del antro o cuerpo gástrico, dependiendo del sitio de lesión. A los pacientes con cáncer gástrico se les tomó biopsia del tumor y del tejido adyacente. Una biopsia de cada sitio se fijó inmediatamente en formalina al 10% para examen histológico y otra se colocó en Trizol para la obtención de DNA genómico y RNA total, a fin de hacer el diagnóstico de *H. pylori*, medir la expresión de miRNAs y el mRNA de PKC- $\alpha$ , respectivamente.

### **Cultivo y diferenciación de células THP-1**

Las células THP-1 (ATCC® TIB202™), derivadas de un paciente con leucemia monocítica humana se cultivaron en medio RPMI-1640 (R6504-Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), adicionado con HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2.8 mM y suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (Gibco, Waltham, MA. USA). Los cultivos se incubaron a 37°C, en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, a una densidad de 4x10<sup>5</sup> cels/mL. Para inducir la diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos, las células se estimularon con 20 ng/mL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Guzmán-

Beltrán, *et al.*, 2015). Después de 72 h de estimulación, el medio fue reemplazado con RPMI-1640 suplementado, sin PMA por 4 h, previas a la infección con *H. pylori*.

### **Cultivo de *H. pylori***

Las cepas Tx30 (*vacA* s2m2/*cagA*-) y ATCC 26695 (*vacA* s1m1/ *cagA*+) de *H. pylori* se cultivaron en Agar Columbia con polienriquecimiento IsoVitaleX (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) y adicionado con suplemento selectivo de *Helicobacter pylori* Dent (10 mg/L de vancomicina, 5 mg/L de trimetoprim, 5 mg/L de cefsulodina, 5 mg/L de anfotericina B) (Oxoid, Basingstoke, UK) a pH 6.8-7.0. Los cultivos se incubaron a 37°C por 72 h, en condiciones de microaerofilia con niveles de O<sub>2</sub> de 2 a 5% y CO<sub>2</sub> de 5 a 10%.

### **Infección de macrófagos derivados de monocitos humanos con *H. pylori***

Las cepas 26695 y TX-30 de *H. pylori* se resuspendieron en medio RPMI-1640 con 10% SFB y la suspensión se ajustó a 2.5x10<sup>7</sup> unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), mediante espectrofotometría utilizando la escala de McFarland. Se infectaron 2.5x10<sup>5</sup> macrófagos derivados de monocitos humanos (hMDM) con las dos cepas de *H. pylori* por separado, a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.01 (Pachathundikandi and Backert, 2017; Tavares and Pathak, 2017). La placa de cultivo se incubó en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C durante 0, 1, 3 y 6 h. Se cultivaron 2.5x10<sup>5</sup> hMDM sin infección como control negativo. Los ensayos se hicieron por triplicado en tres momentos independientes.

### **Obtención de RNA total y RT-qPCR para PKC-α, miR-24-3p y miR-142-3p**

Las biopsias obtenidas de pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico fueron maceradas y colocadas en reactivo Trizol para obtención de RNA. A los hMDM infectados con las dos cepas de *H. pylori* por 0, 1, 3 y 6 h se les retiró el medio RPMI-1640, los hMDM se lavaron dos veces con PBS 1X y se les colocó Trizol para obtención de RNA (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del RNA total de hMDM y biopsias se determinó en un NanoDrop™ One (ThermoFisher Scientific, Madison, WI, USA).

Para determinar la expresión de los miRNAs, se usaron 5 ng de RNA total de células o biopsias para la síntesis de cDNA con el kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription de un solo paso (Applied Biosystems, Vilnius, LT) y los iniciadores específicos para miR-24-3p (No. ensayo: 000402), miR-142-3p (No. Ensayo: 000464), RNU6 (No. ensayo: 001973) y RNU44 (No. de ensayo: 001094) (Anauatea *et al.*, 2017). RNU6 y RNU44 se usaron como control endógeno para normalizar los datos en hMDM y biopsias, respectivamente. La qPCR se hizo con 2  $\mu$ L del producto de la RT, con el ensayo individual TaqMan específico para cada miRNA y Master Mix PCR TaqMan Universal (1X), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones se corrieron en un equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Pleasanton, CA, USA).

Para determinar la expresión del mRNA de PKC- $\alpha$ , se usaron 5 ng de RNA de hMDM infectados con *H. pylori*, y la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para la síntesis de cDNA siguiendo las instrucciones del fabricante. La RT-qPCR se realizó con las sondas específicas para PKC- $\alpha$  (No. ensayo: Hs00925193) y GADPH (No. ensayo: Hs99999905). El mRNA de GADPH se usó para normalizar los datos de expresión. La expresión relativa de miRNAs y mRNA en hMDM se calculó con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , y la expresión de miRNAs en biopsias se obtuvo con la fórmula  $\Delta Ct = \Delta Ct (\text{treated}) - Ct (\text{control})$ .

### **Western Blot**

Después de 0, 1, 3, y 6 h de infección con las cepas de *H. pylori*, se retiró el medio RPMI-1640 y los hMDM se lavaron dos veces con PBS 1X y se lisaron con el buffer de lisis (NaCl 150 mM, N-P40 1%, Deoxicolato de sodio 1%, EDTA 5 mM y HEPES 50 mM) adicionado con inhibidores de proteasas (Roche, Penzberg, BA, GE). El homogenizado se centrifugó a 12,000 rpm por 12 minutos a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta su uso. La concentración de proteínas se cuantificó por el método de ácido bicinonínico (BCA) (ThermoFisher Scientific, Rockford, USA). Treinta  $\mu$ g de proteínas totales se separaron por electroforesis en SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con 0.5% de leche descremada por 1 h, se incubó con una

dilución 1:1000 del anticuerpo de conejo anti-pkc- $\alpha$  (#2056S, Cell Signalling, Technology, USA) y anticuerpo de conejo anti-GAPDH (#2118, Cell Signalling, Technology, USA) a una dilución 1:1000, a 4°C durante toda la noche. Después de lavar tres veces por 5 min, los inmunocomplejos se detectaron con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (#7074p2, Cell Signalling, Technology, USA). Las bandas se revelaron con el kit de detección Immobilon™ Western (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Las imágenes se observaron con el Sistema de Imagen Digital ChemiDoc (Bio-Rad, California, EUA). Los niveles de PKC $\alpha$  fueron calculados por análisis densitométrico de las bandas con el programa Image Lab 6.0.1 y normalizados con GAPDH.

### **Inmunofluorescencia**

Para determinar si los macrófagos humanos fagocitan *H. pylori* se realizó la técnica de inmunofluorescencia. Se sembraron  $2.5 \times 10^5$  células THP-1 en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB, en placas de 6 pozos. Las placas se incubaron a 37°C, en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Para inducir la diferenciación de las células THP-1 a macrófagos, las células se estimularon con 20 ng/mL de PMA. Después de 72 h de estimulación, el medio fue reemplazado con medio RPMI-1640, sin PMA por 4 h, previas a la infección con *H. pylori*. Los hMDM se infectaron con las cepas 26695 y TX-30 de *H. pylori* por separado, a una MOI de 0.1, durante 1, 3, y 6 h. Las células se lavaron 3 veces con PBS 1X, se fijaron y permeabilizaron con formaldehído al 4% y Tritón X-100 al 0.5%. Las laminillas se bloquearon con SFB al 20% en PBS durante 50 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Las células se incubaron con anticuerpo de conejo anti-*H. pylori* (#B0471, Dako California, EUA) a una dilución 1:100 durante toda la noche a 4°C. El anticuerpo primario se detectó con un anticuerpo secundario de clase IgG de ratón, anti-conejo, marcado con fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) (#sc-2359 Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA) a una dilución 1:100 por 2 h, a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas con 40,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) por 30 min y después visualizadas usando un microscopio de epifluorescencia (Olympus modelo BX43, Tokio, JP).

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 7.0. Se obtuvieron frecuencias absolutas y relativas de las variables cualitativas y las diferencias se calcularon con la prueba exacta de Fisher. Las variables cuantitativas se reportaron como media  $\pm$  DE. Se usó la prueba t-Student o Mann-Whitney para comparar dos medias o medianas y la prueba ANOVA o Kruscal-Wallis para comparar más de dos medias o medianas. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró significativo.

## V. RESULTADOS

### Pacientes

Se estudiaron 29 pacientes, 20 (68.9%) con diagnóstico hispatológico de gastritis crónica y 9 (31%) de cáncer gástrico. La edad promedio para los pacientes con gastritis crónica fue de 57 años (intervalo de 18 a 90 años) y para los casos de cáncer gástrico fue de 62 años (intervalo de 51 a 89 años). La frecuencia de infección por *H. pylori* en el total de pacientes fue de 52.7% (15/29). Las características de la población se muestran en la tabla 1.

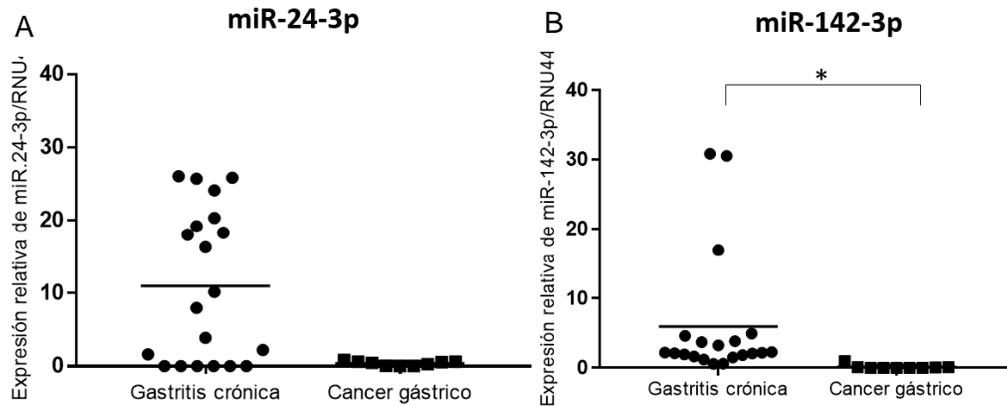
**Tabla 1** Características de la población y frecuencia de infección por *H. pylori* en pacientes con gastritis y cáncer gástrico.

		Gastritis crónica n=20 (%)	Cáncer gástrico n=9 (%)	Valor de $p^{\circ}$
<b>Género</b>	Femenino	9 (45)	6 (66.6)	0.427
	Masculino	11 (55)	3 (33.3)	
<b>Edad</b>	Menores de 20 años	1 (5)	0 (0)	0.374
	20-39 años	1 (5)	1 (11.1)	
	40-59 años	10 (50)	2 (22.2)	
	Más de 60 años	8 (40)	6 (66.6)	
<b><i>H. pylori</i></b>	Negativo	10 (50)	4 (44.4)	0.408
	Positivo	10 (50)	5 (55.5)	
<b>Hábito de fumar</b>	Si	9 (45)	3 (33.3)	0.694
	No	11 (55)	6 (66.6)	
<b>Consumo de alcohol</b>	Si	17 (85)	4 (44.4)	0.067
	No	3 (15)	5 (55.5)	
<b>Antecedentes familiares de patología gástrica</b>	Si	6 (30)	6 (66.6)	0.242
	No	13 (65)	2 (22.2)	

$^{\circ}$ Prueba exacta de Fisher

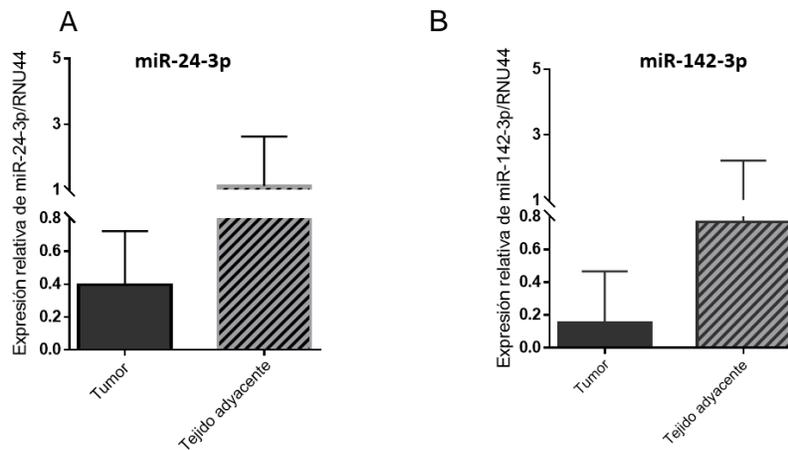
## Expresión de miR-24-3p y miR-142-3p en mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico

La expresión de miR-24-3p es menor en pacientes con cáncer gástrico en comparación con el grupo de gastritis crónica. La expresión de miR-142-3p fue significativamente más alta en pacientes con gastritis crónica en comparación con cáncer gástrico, figura 1 ( $p < 0.05$ ).



**Figura 1. Expresión relativa de miR-24-3p y miR-142-3p en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico.** A) Expresión relativa de miR-24-3p B) Expresión relativa de miR-142-3p. La expresión de miR-24-3p y miR-142-3p se normalizó con RNU44 como control endógeno. La expresión relativa se determinó por el método de  $2^{-\Delta Ct}$ . Las diferencias en el nivel de expresión de ambos miRNAs entre los grupos de pacientes se determinaron por la prueba de Mann-Whitney ( $* p < 0.05$ ).

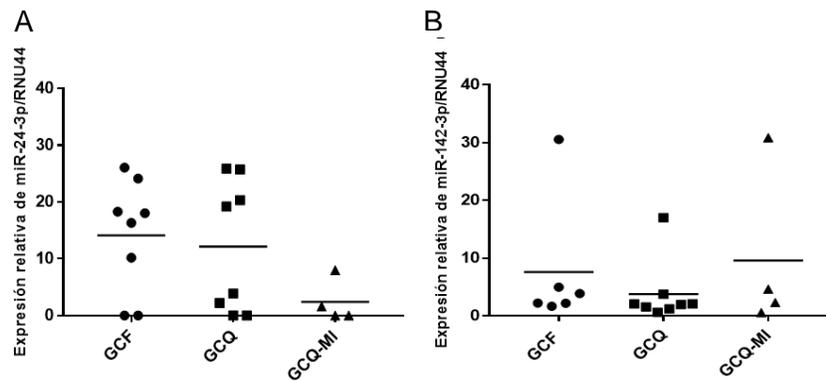
No se encontraron diferencias significativas en la expresión de miR-24-3p y miR-142-3p en tejido tumoral en comparación con el tejido adyacente, figura 2.



**Figura 2. Expresión relativa de miR-24-3p y miR-142-3p en pacientes con cáncer gástrico.** El nivel de expresión de A) miR-24-3p y B) miR-142-3p se determinó por RT-qPCR en biopsias de

cáncer gástrico y de tejido adyacente al tumor. La expresión de ambos miRNAs se normalizó con RNU44 como control endógeno. La expresión relativa se determinó por el método  $2^{-\Delta Ct}$ . Las diferencias en el nivel de expresión de ambos miRNAs entre los grupos de pacientes se determinaron por la prueba de Mann-Whitney.

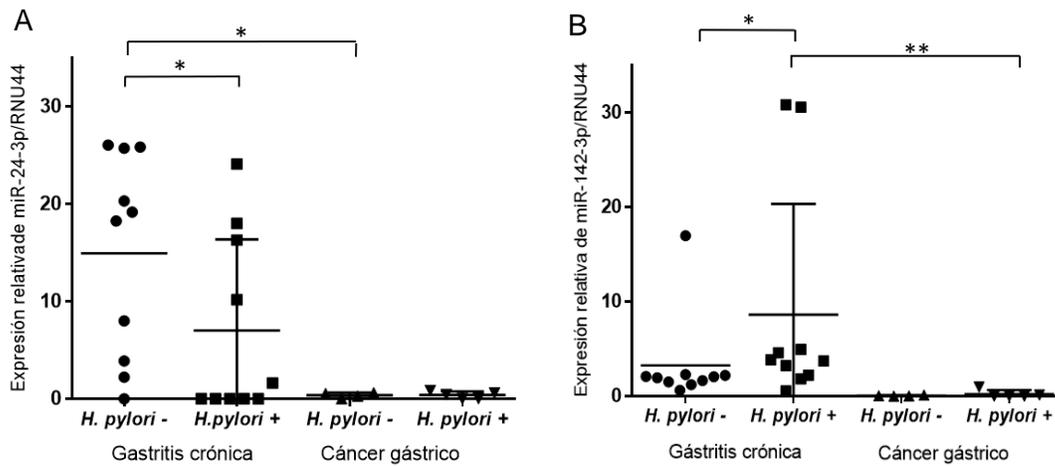
De los 20 casos de gastritis crónica, el 40% (8/20) tenían gastritis crónica folicular, 40% (8/20) gastritis química y 20% (4/20) gastritis crónica química con metaplasia intestinal. El nivel de expresión de miR-24-3p fue menor en los pacientes que presentaron gastritis crónica con metaplasia intestinal en comparación con los demás grupos, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. No hubo diferencia en la expresión de miR-142-3p entre los grupos, figura 3.



**Figura 3. Expresión de miR-24-3p y miR-142-3p en pacientes con gastritis crónica.** A) Expresión relativa de miR-24-3p por tipo de gastritis. B) Expresión relativa de miR-142-3p por tipo de gastritis. La expresión de ambos miRNAs se normalizó con RNU44. La expresión relativa se determinó por el método  $2^{-\Delta Ct}$ . Las diferencias en el nivel de expresión de ambos miRNAs entre los grupos de pacientes se determinaron por la prueba de Kruskal Wallis. GCF; gastritis crónica folicular, GCQ: gastritis crónica química, GCQ-MI; gastritis crónica con metaplasia intestinal.

### **Infección por *H. pylori* y expresión de miR-24-3p y miR-142-3p**

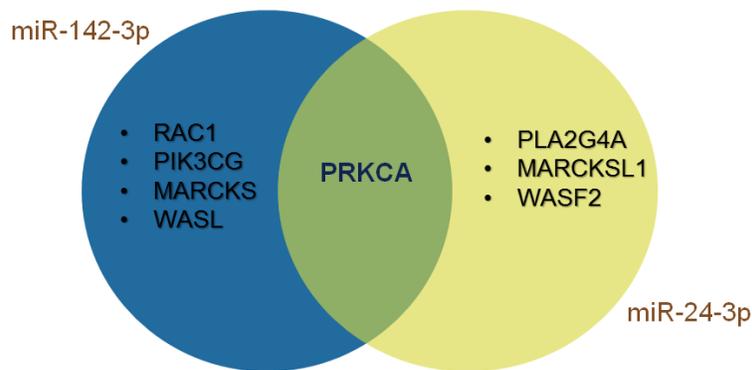
En pacientes con gastritis crónica la expresión de miR-24-3p fue significativamente menor en pacientes infectados por *H. pylori* en comparación con los no infectados ( $p < 0.05$ ). En muestras *H. pylori*-positivas la expresión de miR-142-3p es significativamente menor en cáncer gástrico en comparación con gastritis crónica ( $p < 0.001$ ), figura 4.



**Figura 4. Expresión relativa de miR-24-3p y miR-142-3p en mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica o con cáncer gástrico infectados y sin infección por *H. pylori*.** La expresión de A) miR-24-3p y B) miR-142-3p se midió por RT-qPCR y se normalizó con RNU44. La expresión relativa se determinó por el método de  $2^{-\Delta Ct}$ . El valor de  $p$  se calculó con la prueba de Mann-Whitney. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ ).

### Análisis bioinformático

Con el programa miRTarBase se encontraron cuatro mRNAs blanco para miR-24-3p y cinco para miR-142-3p. Los nueve mRNAs codifican proteínas que participan en el proceso de fagocitosis. El transcrito de PKC $\alpha$  (PRKCA) tiene secuencias complementarias para miR-142-3p y para miR-24-3p en su región 3'UTR, figura 5.



**Figura 5. mRNAs blanco de miR-142-3p y miR-24-3p.** Las proteínas codificadas por los nueve mRNAs participan en la fagocitosis. El diagrama de Venn muestra los transcritos que son blanco de uno o ambos miRNAs, según el programa miRTarBase.

Se buscaron elementos de respuesta a miRNAs (MRE) para miR-142-3p y mir-24-3p en la región 3'UTR del mRNA de PKC $\alpha$ . Se encontró que para miR-142-3p el sitio de unión con el mRNA es 7 mer-A1 y para miR-24-3p es 8 mer. Para ambos miRNAs, existen otros sitios de complementariedad en la región 3'UTR, tabla 3. Estos resultados sugieren que ambos miRNAs pueden inhibir la traducción del mRNA de PKC $\alpha$  o inducir su degradación, regulando negativamente la expresión de PKC $\alpha$ .

**Tabla 3** Complementariedad entre el mRNA de PKC $\alpha$  con miR-24-3p y miR-142-3p

miRNA Programa	Posición	Sitio de reconocimiento del miRNA	sitio	Porcentaje	Score*
microRNA		<b>PRKCA</b> 5' .ccaucaguaaucaugcCACUACU <b>miRNA</b> 3' .agguauuucauccuuuGUGAUGu	7mer-A1	69	-0.05
miR-142-3p	2200-2226	<b>PRKCA</b> 5' g CcT g AAGTtcac AGaAcACACa ACc <b>miRNA</b> 3' agGuAuUUCA-----UCcUuUGUGaUGu	-	-	131
	2770-2793	<b>PRKCA</b> 5' gaCA-gggGTgccAgcACACTg Cc <b>miRNA</b> 3' agGUauuuCAuccuU--UGUGAuGu	-	-	126
	6639 - 6661	<b>PRKCA</b> 5' tacgctt tGT ta GAAACA tTAat <b>miRNA</b> 3' agguauuuCAucCUUUGUgAUgu	-	-	123
miR-24-3p	4534-4541	<b>PRKCA</b> 5' ..aucacaaaacagacaCUGAGCCA <b>miRNA</b> 3' gacaaggacgacuuGACUCGGu	8 mer	57	-0.03
	4953-4959	<b>PRKCA</b> 5' .cugggauuacaggcaUGAGCCAc <b>miRNA</b> 3' gacaaggacgacuuGACUCGGU	7 mer-A1	25	-0.02
	4066-4085	<b>PRKCA</b> 5' ta GT TCT—CTGggCaGAGCCa <b>miRNA</b> 3' gaCAAGGacGACuuGaCUCGGu	-	-	136
	3124-3143	<b>PRKCA</b> 5' aaGTcCt TGC—ccCTGAGCac <b>miRNA</b> 3' .gaCAaGgACGacuuGACUCGGu	-	-	132

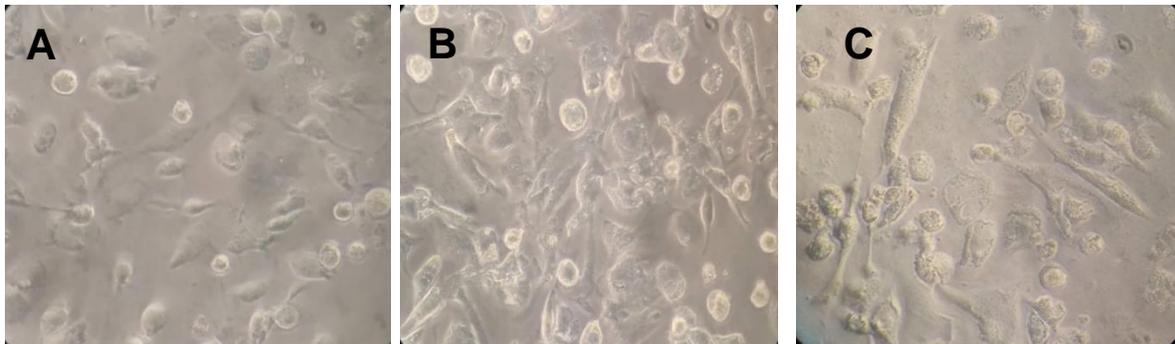
\*Score de acuerdo a cada programa de análisis bioinformático

- Dato no obtenido en el programa

Los sitios resaltados indican la complementariedad entre mRNA y miRNA

### Diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos

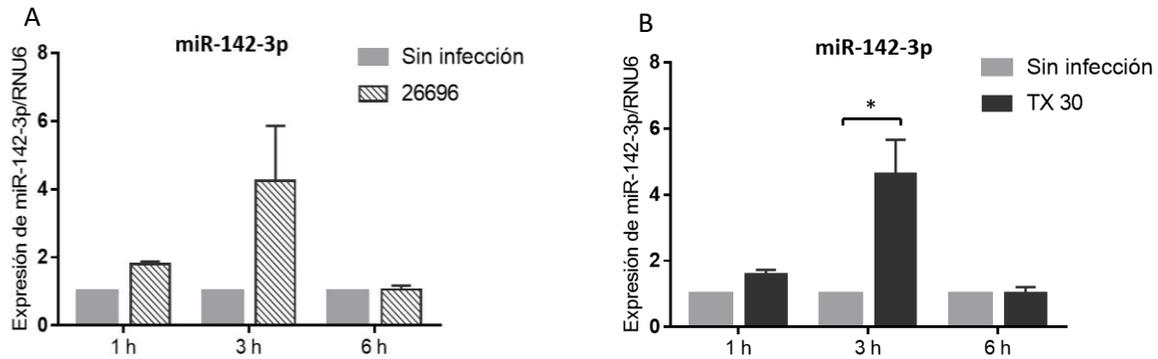
Para inducir la diferenciación de monocitos a macrófagos, se probaron diferentes concentraciones de PMA; y se verificó la morfología celular después de 72 h del estímulo, para experimentos posteriores se utilizó la concentración de 20 ng/mL de PMA, en donde se observó morfología celular característica de macrófagos: células alargadas y adherentes, figura 6-B.



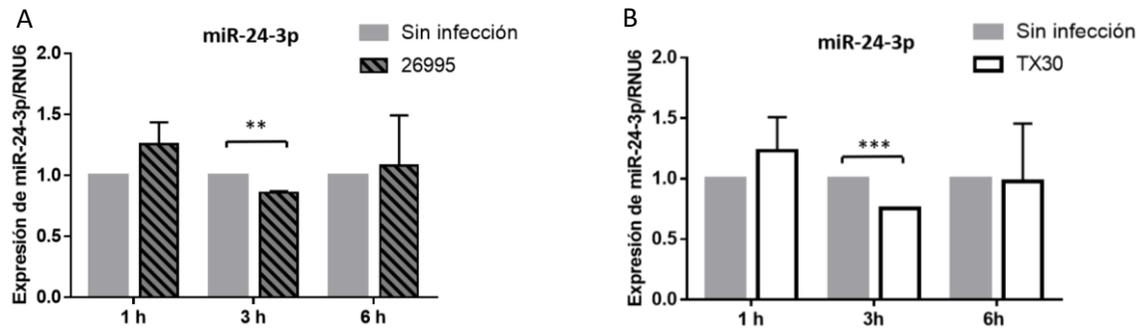
**Figura 6. Diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos después de 72 h de estimulación con PMA.** A)  $2 \times 10^5$  monocitos THP-1 diferenciados a macrófagos a una concentración de PMA de 10 ng/mL. B)  $2 \times 10^5$  monocitos THP-1 diferenciados a macrófagos estimulados con 20 ng/mL de PMA C)  $2 \times 10^5$  monocitos THP-1 diferenciados a macrófagos con 50 ng/mL de PMA. Microscopio invertido 20X.

### Expresión de miR-24-3p y miR-142-3p en respuesta a la infección por *H. pylori*

Para verificar si miR-24-3p y miR-142-3p modifican su expresión durante la infección por *H. pylori*, se evaluó la expresión de los miRNAs en macrófagos humanos infectados con la bacteria a diferentes tiempos. La expresión de miR-142-3p incrementó a las 3 h post-infección en macrófagos infectados con el genotipo virulento y avirulento de *H. pylori*. Los niveles de miR-142-3p regresaron a niveles basales a las 6 h post infección, figura 7. Por otra parte, en macrófagos infectados con las cepas 26695 y TX30 de *H. pylori* la expresión de miR-24-3p aumenta a 1 h post-infección y disminuye su expresión de manera significativa a las 3 h post infección en comparación al control, figura 8.



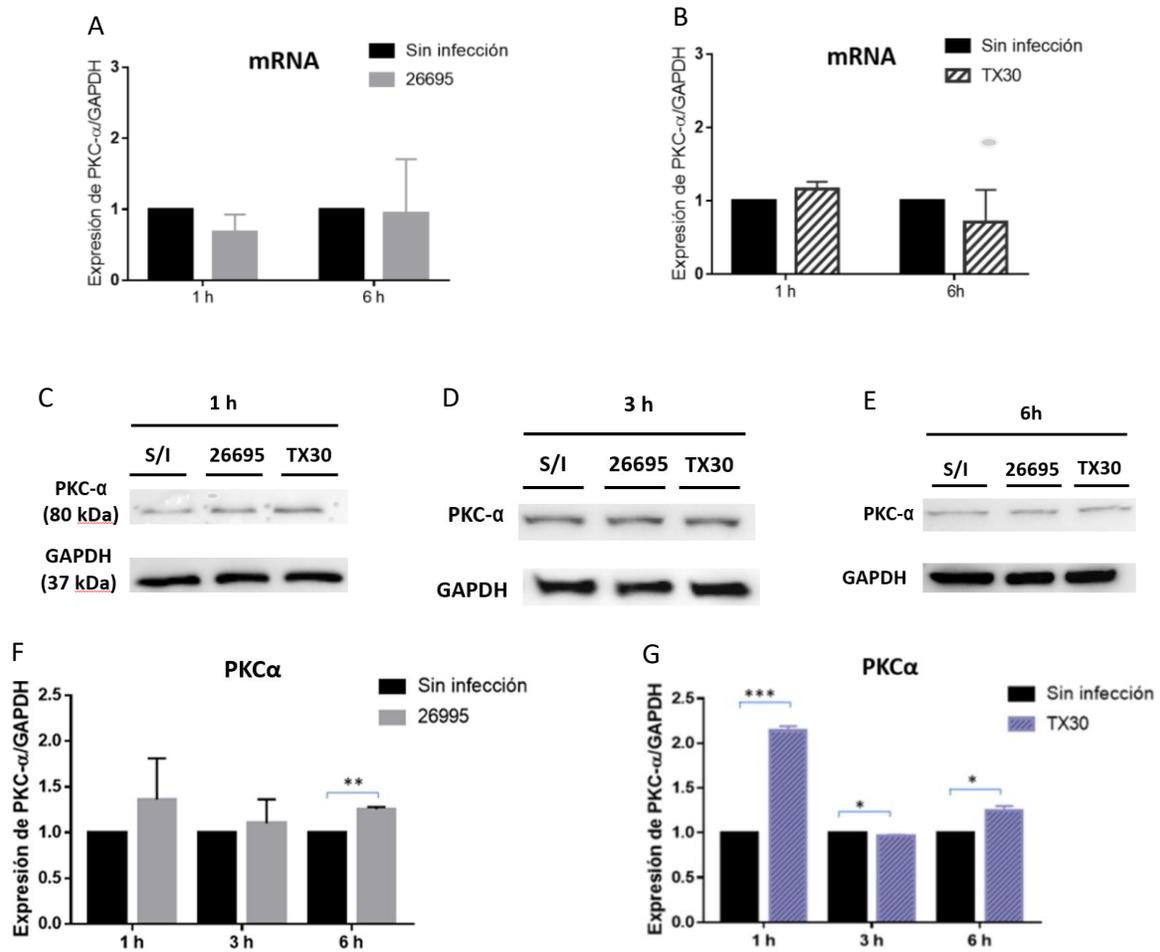
**Figura 7. Expresión de miR-142-3p en macrófagos humanos infectados con *H. pylori*.** Los resultados muestran la expresión de miR-142-3p post infección a una MOI 100:1, A) macrófagos infectados con la cepa 26695 de *H. pylori* y B) macrófagos infectados con la cepa TX30 de *H. pylori*. La expresión de miR-142-3p se normalizó con RNU6. La expresión se determinó por el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ( $p < 0.05$ ).



**Figura 8. Expresión de miR-24-3p en macrófagos humanos infectados con *H. pylori*.** Los resultados muestran la expresión de miR-24-3p post infección a una MOI 100:1, A) macrófagos infectados con la cepa 26695 de *H. pylori* y B) macrófagos infectados con la cepa TX30 de *H. pylori*. La expresión de miR-24-3p se normalizó con RNU6. La expresión se determinó por el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.0001$ ).

### Expresión de PKC $\alpha$ en respuesta a la infección por *H. pylori*

Se evaluó la expresión de PKC $\alpha$  a nivel de mRNA y proteína en macrófagos humanos infectados con *H. pylori*. La expresión del mRNA de PKC $\alpha$  disminuye en macrófagos después de una hora de infección con el genotipo virulento de la bacteria y aumenta en células infectadas con el genotipo avirulento, figura 9 A-B. La expresión de la proteína de PKC $\alpha$  aumenta tanto en macrófagos infectados con la cepa 26695 como en los infectados con la cepa TX30 ( $p < 0.0001$ ) en comparación al control y se observa una disminución gradual de la expresión de la proteína de PKC $\alpha$  a las 3 h y 6 h post infección con el genotipo virulento y avirulento de la bacteria, figura C-E.

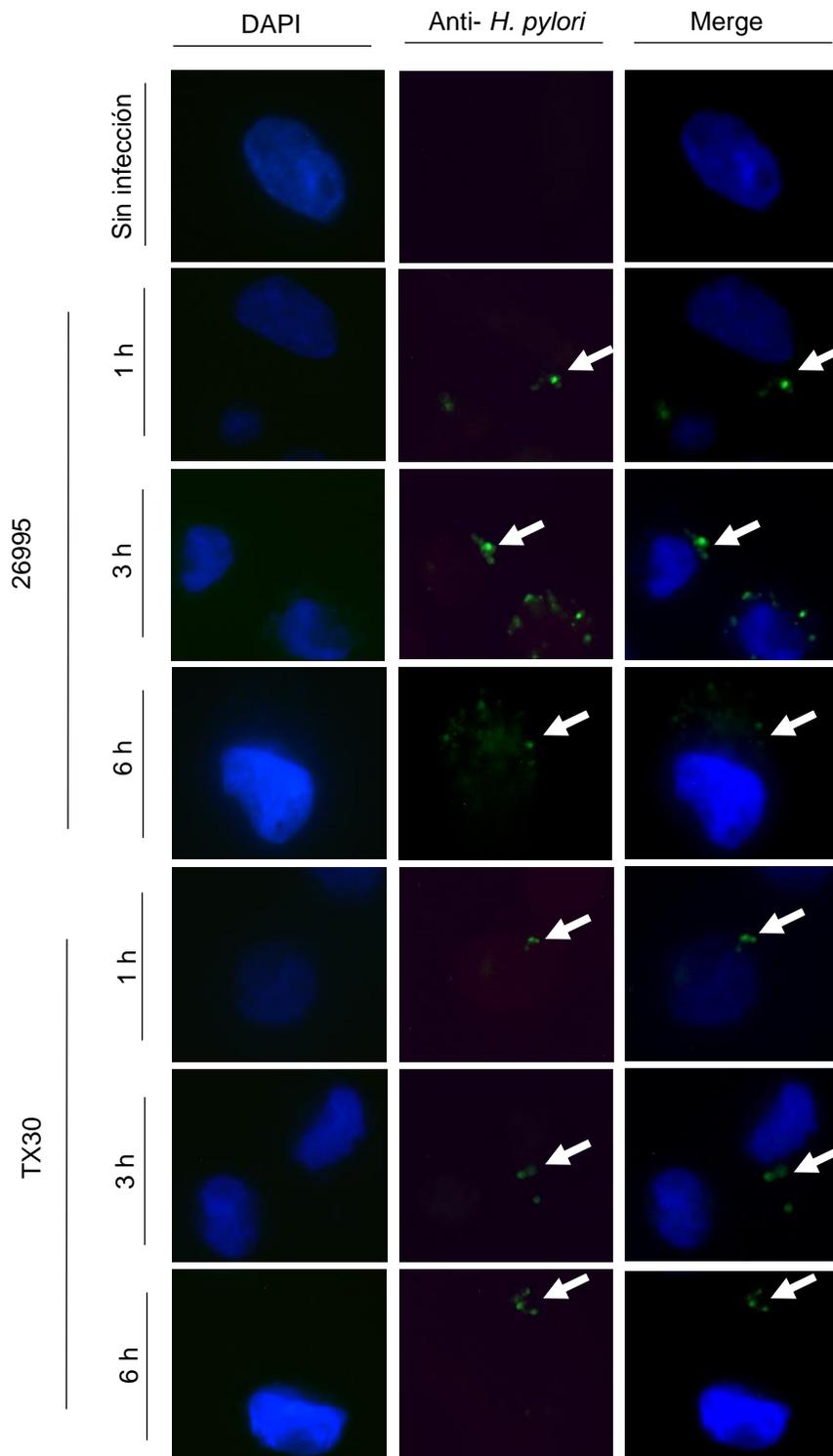


**Figura 9. Expresión de PKCα en macrófagos humanos infectados con *H. pylori*.** Expresión de PKCα a diferentes tiempos de infección con *H. pylori* a una MOI 100:1, A, B expresión de mRNA de PKCα en macrófagos infectados con el genotipo 26695 y TX30 de *H. pylori*, respectivamente. C-E Nivel de PKCα determinado por Western Blot en macrófagos infectados por 1, 3 y 6 h con el genotipo 26695 y TX30. F-G Análisis densitométrico de la expresión de PKCα en macrófagos infectados con *H. pylori*. La expresión del mRNA y de la proteína de PKCα se normalizó con GAPDH.

### Internalización de *H. pylori* en macrófagos humanos

Para comprobar si los macrófagos humanos llevan a cabo el proceso de fagocitosis de *H. pylori in vitro*, se marcó a la bacteria con anticuerpos anti-*H. pylori* y el anticuerpo primario se detectó con IgG marcada con FITC. El mayor número de bacterias intracelulares se encontró en los macrófagos infectados con el genotipo virulento de *H. pylori*, en comparación con los macrófagos infectados con el genotipo avirulento, figura 10.

**Figura 10. Internalización de *H. pylori* en macrófagos humanos.** Macrófagos humanos infectados por 1, 3 y 6 h con los genotipos 26695 y TX30 de *H. pylori*. Las imágenes representan las bacterias intracelulares (verde) y los núcleos (azul), las flechas indican las bacterias intracelulares observadas en un microscopio de epifluorescencia 100X.



## VI. DISCUSIÓN

Existen sellos distintivos del cáncer como la inflamación que favorece un microambiente tumoral y evasión de la destrucción de las células transformadas por células de la respuesta inmune, como linfocitos T, macrófagos y células NK (Hanahan, *et al.*, 2011). La infección persistente por *H. pylori* induce inflamación en la mucosa gástrica, promueve el desarrollo de gastritis crónica y cáncer gástrico (Sampieri and Mora, 2014). En cáncer gástrico se han encontrado modificaciones en el perfil de expresión de miRNAs que regulan la inflamación inducida por *H. pylori* (Cadamuro, *et al.*, 2014; Libanio *et al.*, 2015). Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo por el que los miRNAs contribuyen a mantener la infección persistente por *H. pylori* y, en consecuencia, la inflamación crónica que promueve la aparición de cáncer. En este trabajo, se evaluó la expresión de miR-24-3p y miR-142-3p en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico, así como, en macrófagos humanos; y su relación con la infección por *H. pylori*.

Se encontró mayor expresión de miR-24-3p y miR-142-3p en biopsias de pacientes con gastritis crónica en comparación con el grupo de cáncer gástrico. La gastritis crónica es un proceso inflamatorio persistente en la mucosa gástrica. miR-24 promueve la producción de IFN- $\gamma$  e IL-17 en linfocitos T, a través de la disminución de la expresión de TCF1, un factor de transcripción que restringe las respuestas Th1 y Th17 (Cho *et al.*, 2017). Wang *et al.*, en 2016, en sobrenadante de células dendrítica transfectadas con miR-142-3p observaron un aumento de quimiocinas CCL2, CCL5 y CCL8, y citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6, y mediante análisis de enriquecimiento funcional indican que los genes blanco para el miRNA son enriquecidos de manera significativa en la vía Jak-STAT, importante para la producción de citocinas (Wang, *et al.*, 2016). Por tanto, miR-24-3p y miR-142-3p pueden contribuir a la regulación de la inflamación en gastritis crónica. Duan *et al.*, en 2014 observan en la línea celular de cáncer gástrico SGC-7901 que al transfectar las células con miR-24-3p disminuye la expresión de Reg IV, gen que promueve los procesos de proliferación celular, migración, invasión así como la capacidad de formar tumores, los autores sugieren que miR-24-3p tiene función como supresor

de tumor en cáncer gástrico, (Duan *et al.*, 2014). Por otra parte, la sobreexpresión de miR-142-3p en líneas celulares de cáncer gástrico induce disminución de CCTN2, proteína que modula la actividad de la cinasa dependiente de ciclina (CDK9) y como resultado se observa disminución en la migración y crecimiento de las células (Wang *et al.*, 2018).

Se clasificó a los diferentes tipos de gastritis crónica en gastritis crónica folicular, gastritis crónica química y gastritis química con metaplasia intestinal, y se analizó la expresión de miR-24-3p y miR-142-3p en estos pacientes. El nivel de expresión de miR-24-3p fue menor en pacientes que presentan diagnóstico de metaplasia intestinal en comparación con los demás grupos, Li *et al.*, en 2016, relacionan la expresión de miR-24-3p con la progresión de lesiones gástricas, la metaplasia intestinal predispone la aparición de cáncer gástrico debido a que existe una transformación del epitelio de tipo gástrico a epitelio de tipo intestinal.

En pacientes con gastritis crónica infectados por *H. pylori* se observa disminución en la expresión de miR-24-3p en comparación con los pacientes no infectados, además, hay disminución en la expresión de miR-24-3p y miR-142-3p en pacientes con cáncer gástrico infectados y sin infección por *H. pylori*. Li *et al.*, en 2016, sugieren que la infección por *H. pylori* contribuye a la disminución de la expresión de miR-24-3p en pacientes con gastritis superficial crónica, gastritis crónica atrófica y metaplasia intestinal, los autores concluyen que miR-24-3p regula el desarrollo y progresión de lesiones gástricas asociadas a la infección por *H. pylori* al regular negativamente a Prdx-6, proteína encargada de catalizar la reducción de peróxido en mucosa gástrica, favoreciendo el daño al epitelio gástrico por ROS. No hay reportes de la expresión de miR-142-3p en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico asociada a la infección por *H. pylori*

miR-24-3p y miR-142-3p se expresan en células de la respuesta inmune innata como monocitos, macrófagos y células dendríticas, se sabe que estas células pueden infiltrar la mucosa gástrica de pacientes infectados con *H. pylori* (Fordham, *et al.*, 2015). En este trabajo se realizó un análisis bioinformático para buscar mRNAs blanco de miR-24-3p y miR-142-3p, el análisis *in silico* predijo en total 9

mRNAs blanco que codifican para proteínas involucradas en el proceso de fagocitosis, se seleccionó el mRNA de PKC- $\alpha$  el cual, tiene secuencias complementarias para miR-24-3p y miR-142-3p en su región 3'UTR. PKC- $\alpha$  es una proteína que participa en la remodelación de F-actina durante la fagocitosis y maduración del fagosoma en macrófagos (Holm, *et al.*, 2003). Los macrófagos son fagocitos profesionales que tienen un papel clave en la activación de la respuesta inmune frente a patógenos como *H. pylori*, eliminan bacterias por fagocitosis y llevan a cabo la presentación de antígenos que da lugar a una respuesta adaptativa.

Para elucidar el papel de miR-142-3p durante la fagocitosis de *H. pylori*, se infectaron macrófagos derivados de monocitos humanos (hMDM) con las cepas 26695 y TX30 de *H. pylori*, a diferentes tiempos. La expresión de miR-142-3p aumenta a las 3 h post infección en macrófagos infectados con el genotipo virulento y avirulento en comparación con el grupo control. El lipopolisacárido, la lipoproteína y la flagelina reconocidos por receptores tipo toll (TLR's) así como las citocinas IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 participan en la inducción de miRNAs durante la infección activando factores de transcripción clave como NF- $\kappa$ B (Na *et al.*, 2012; Pachathundikandi *et al.*, 2019). Dado que, la expresión de miR-142-3p aumenta en las primeras horas de infección, es probable que este miRNA contribuya a la modulación de mRNAs que codifican para proteínas involucradas en la fagocitosis de *H. pylori* o en alguna otra función efectora de los macrófagos. La sobre expresión de miR-24 y miR-142-3p en macrófagos humanos disminuye la fagocitosis de *E. coli* y *S. aureus*, y el aumento en la expresión de miR-142-3p se relaciona con la disminución el mRNA de PKC- $\alpha$ , proteína clave involucrada en el proceso de fagocitosis (Naqvi and Nares, 2015). En este estudio al evaluar la expresión del mRNA de PKC $\alpha$  en macrófagos infectados por *H. pylori* se observa un decremento a 1 h post infección con el genotipo virulento y un aumento en la expresión con el genotipo avirulento. Por otra parte, la expresión de la proteína de PKC $\alpha$  aumenta de manera significativa después de 1 h post infección con el genotipo virulento y avirulento de la bacteria y regresa a niveles basales a las 3 h. Allen and Allgood en 2002, sugieren que el genotipo virulento de *H. pylori* modula la expresión de PKC $\alpha$  en macrófagos murinos y como resultado un retraso en el proceso de fagocitosis de

la bacteria. Se ha observado que *H. pylori* tiene la capacidad de residir en megasomas dentro de los macrófagos y esto es asociado al genotipo virulento de la bacteria (Borlace, +., 2012). En este trabajo al evaluar por inmunofluorescencia la internalización de la bacteria en macrófagos humanos, se observa una mayor cantidad de *H. pylori* en aquellas células infectadas con el genotipo 26695 sugiriendo que estas bacterias pueden estar residiendo dentro de megasomas.

La alteración de la expresión de miRNAs puede ser un mecanismo utilizado por *H. pylori* para modular la fagocitosis, la producción de citocinas, quimiocinas y el tipo de respuesta inmune adaptativa específica que predomina en las infecciones crónicas de la mucosa gástrica humana.

## VII. CONCLUSIÓN

- El nivel de expresión de miR-24-3p y miR-142-3p significativamente mayor en pacientes con gastritis crónica que en pacientes con cáncer gástrico sugiere que estos miRNAs son supresores de tumor y que pueden ser biomarcadores de diagnóstico temprano para cáncer gástrico.
- La infección por *H. pylori* contribuye a la modulación de la expresión de miR-24-3p y miR-142-3p en pacientes con gastritis crónica.
- En macrófagos humanos la infección por *H. pylori* aumenta la expresión de miR-24-3p y miR-142-3p a 1 y 3 h post infección respectivamente, pero es independiente del genotipo de la bacteria.
- En macrófagos humanos la expresión de la proteína de PKC $\alpha$  aumenta a 1 h post infección y el incremento es independiente del genotipo de la bacteria.
- Se observa mayor cantidad de bacterias intracelulares en macrófagos infectados con el genotipo virulento de *H. pylori*, esto sugiere una modulación en el proceso de endocitosis y permanencia de la bacteria dentro de la célula.

## VIII. REFERENCIAS

- Abadi, A. T. B. (2017). Strategies used by *Helicobacter pylori* to establish persistent infection. *World Journal of Gastroenterology*. 23, 2870–2882.
- Allen, L. A. (2007). Phagocytosis and persistence of *Helicobacter pylori*. *Cellular Microbiology*. 9, 817-828.
- Allen, L. A., Schlesinger, L. S. and Kang, B. (2002). Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. *The Journal of experimental medicine*. 115-128.
- Anauatea, A., Ferreira, F., Wisnieskia, F., Caires, L., Oliveira, C., Suchi, E. *et al.* (2017). Identification of suitable reference genes for miRNA expression normalization in gastric cancer. *Gene*. 621, 59-68.
- Atrisco, M.J. (2017). Relación entre genotipos virulentos de *Helicobacter pylori* con el perfil de miRNAs y citocinas expresados por células mononucleares humanas, Tesis de maestría no publicada, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo de los Bravos, México, 19-24.
- Bettencourt, P., Marion, S., Pires, D., Santos, L., Lastrucci, C., Carmo, N. (2013). Actin-binding protein regulation by microRNAs as a novel microbial strategy to modulate phagocytosis by host cells: the case of N-Wasp and miR-142-3p. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 19-24.
- Borlace, G., Keep, S., Prodoehl, M., Jones, H., Butler, Brooks D. (2012). A role for altered phagosome maturation in the long-term persistence of *Helicobacter pylori* infection. *Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*. 303, 169-179.
- Blaser, M. and Atherton, J. (2004). *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *Science in Medicine*. 18, 258–266.
- Burucoa, C. and Axon, A. (2017). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 22, 1–5.
- Cadamuro, A. C. T., Rossi, A., Maniezzo, N. and Silva, A. (2014). *Helicobacter pylori* infection: Host immune response, implications on gene expression and MicroRNAs. *World Journal of Gastroenterology*. 20, 1424–1437.
- Chang, H., Kim, N., Park, J., Nam, R., Choi, Y., Lee, H., *et al.* (2015). Different MicroRNA Expression Levels in Gastric Cancer Depending on *Helicobacter pylori* Infection. *Gut and Liver*. 9, 188-196.
- Chung, J., Jeong, S., Lee, S., Pak, J., Lee, G., Jeong J., *et al.* (2017). Expression of microRNA in host cells infected with *Helicobacter pylori*. *Gut and Liver*. 11, 392-400.
- Cho, S., Wu, C., Nguyen, D., Lin, L., Chen, M., Khan, A., *et al.*, (2017). A novel miR-24-TCF1 axis modulantly effector T cell responses. *Journal Immunology*. 1-9.

Cortés-Márquez, A., Mendoza-Elizalde, S., Arenas-Huertero, F., Trillo-Tinoco, J., Valencia-Mayoral, P., Consuelo-Sánchez A., *et al.* (2018). Differential expression of miRNA-146a and miRNA-155 in gastritis induced by *Helicobacter pylori* infection in pediatric patients, adults, and an animal model. *BMC Infectious Diseases*. 18, 1–9.

Duan, Y. Hu, B., Liu, B., Yu, B., Li, J., Yan, M., *et al.* (2014). Tumor suppressor miR-24 restrains gastric cancer progression by downregulating RegIV. *Molecular Cancer*. 13 1–13.

Fernández, C., Bellosillo, B., Ferraro, M., Seoane, A., Sánchez-González, B., Pairet S., *et al.* (2017). MicroRNAs 142-3p, miR-155 and miR-203 are deregulated in gastric MALT lymphomas compared to chronic gastritis. *Cancer Genomics and Proteomics*, 14, 75–82.

Fordham, J. B., Naqvi, A. R. and Nares, S. (2015). Regulation of miR-24, miR-30b, and miR-142-3p during macrophage and dendritic cell differentiation potentiates innate immunity. *Journal of leukocyte biology*. 2, 195-207.

Geng, Y., Lu, X., Wu, X., Xue, L., Wang, X., Xu, J. (2016). MicroRNA-27b suppresses *Helicobacter pylori* induced gastric tumorigenesis through negatively regulating. *Oncology Reporter* 35, 2441–2450.

Guzmán-Beltrán, S., Rubio-Badillo, M., Juárez, E., Hernández-Sánchez, M. (2015). Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and  $\alpha$ -mangostin inhibit the growth of *Mycobacterium tuberculosis* by inducing autophagy. *International Immunopharmacology*. 31, 149-157.

Hanahan D. and Weinberg R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 57, 646–674.

Johnson, K. S. and Otteman, K. M. (2018). Colonization, localization, and inflammation: the roles of *Helicobacter pylori* chemotaxis in vivo. *Current Opinion in Microbiology*. 41, 51-57.

Kalali, B., Mejías-Luque, R., Javaheri A., Gerhard M. (2014). *Helicobacter pylori* virulence factors: Influence on immune system and pathology. *Mediators of Inflammation*. 1-9.

Kao, C. Y., Sheu, B. S., Wu, J. (2016). *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomedical Journal*. 39, 14-23.

Kawamura, Y., Funakia, T., Yoshimine, T., Tamuraa, Y., Sayuri Y., Shinya I., *et al.* (2019). Characteristics and Predictive Factor of *Helicobacter pylori* -Associated Functional Dyspepsia in Japanese Patients. *Digestion*. 1-9.

Kusters, J., van Vliet, A., and Kuipers, E. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology*. 19, 449-490.

Lee, J., Kim, N., Park, J., Kim, H., Chang, H., Kim, J. (2017). Differential MicroRNA Expression Between Gastric Cancer Tissue and Non-cancerous Gastric Mucosa According to *Helicobacter pylori* Status. *Journal of cancer prevention*. 22, 33-39.

Liao, W., Huang, M., Wang, M., Lin, C., Lu, T., Lo, H., *et al.* (2017). Statin decreases *Helicobacter pylori* burden in macrophages by promoting autophagy. *Frontier Cell. Infectology Microbiology*. 6, 1-11.

Libanio, D., Dinis-Ribeiro, M., Pimentel- Nunes, P. (2015). *Helicobacter pylori* and microRNAs: Relation with innate immunity and progression of preneoplastic conditions. *Clinical Oncology*. 6, 111-132.

Liu, Z., Wang, D., Hu, Y., Zhou G., Zhu, C., Qi, Yu., *et al.* (2013). MicroRNA-146a negatively regulates PTGS2 expression induced by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells. *Journal Gastroenterology*. 48, 86-92.

Lu, Y., Gao, J., Zhang, S., Gu, J., Lu, H., Xia, Y. *et al.* (2018). miR-142-3p regulates autophagy by targeting ATG16L1 in thymic-derived regulatory T cell (tTreg). *Cell Death & Disease*. 9, 1-10.

Li, Q. Wang, N., Wei, H., Li, C., Wu, J., Yang, G. (2016). miR-24-3p Regulates Progression of Gastric Mucosal Lesions and Suppresses Proliferation and Invasiveness of N87 Via Peroxiredoxin 6. *Digestive Diseases and Sciences*. 12, 3486–3497.

Martínez-Carrillo, D. N., Atrisco-Morales, J., Hernández-Pando R., Reyes-Navarrete, S., Betancourt-Linares, R., Cruz-del Carmen I., *et al.* (2014). *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotype diversity and interferon gamma expression in patients with chronic gastritis and patients with gastric cancer. *Revista de Gastroenterología de México*. 79, 220–228

Na L., Xiang X., Bin X., En-Dong Z., Bo-sheng L., Zhen L., *et al.* (2012). *Helicobacter pylori* related proinflammatory cytokines contribute to the induction of miR-146a in human gastric epithelial cells. *Molecular Biology Reports*. 39, 4655-4661.

Naqvi, A. R., Fordham, J. B. and Nares, S. (2015). miR-24, miR-30b, and miR-142-3p Regulate Phagocytosis in Myeloid Inflammatory Cells. *The Journal of Immunology*. 194, 1916-1927.

Pachathundikandi, S. and Backert, S. (2018). *Helicobacter pylori* controls NLRP3 expression by regulating hsa-miR-223-3p and IL-10 in cultured and primary human immune cells. *Innate Immunity*. 24, 11-23.

Pachathundikandi S., Blaser N. and Backert S. (2019). Mechanisms of Inflammasome Signaling, microRNA Induction and Resolution of Inflammation by *Helicobacter pylori*. *Curr Top Microbiology Immunology*. 421: 267-302

Peleteiro, B., Bastos, A., Ferro, A., Lunet, N. (2014). Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection Worldwide: A Systematic Review of Studies with National Coverage. *Digestives Diseases Science*. 59 (8): 1698-709.

Quach, D. T., Vilaichoine, R. and Vu, K. (2018). *Helicobacter pylori* infection and related gastrointestinal diseases in Southeast Asian Countries: An expert opinion Survey. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19, 3565-3569.

Román-Román, A., Martínez-Carrillo, D. N., Atrisco-Morales, J., Azúcar-Heziquio, J. C., Cuevas-Caballero, A., Castañón-Sánchez, *et al.* (2017). *Helicobacter pylori* vacA s1m1 genotype but not cagA or babA2 increase the risk of ulcer and gastric cancer in patients from Southern Mexico. *Gut Pathogens*. 9, 1-12.

Rossi, A., Cadamuro, A., Biselli-Périco, J., Leite, K., Severino, F., Reis, P., Cordeiro, J., Silva, A. (2016). Interaction between inflammatory mediators and miRNAs in *Helicobacter pylori* infection. *Cellular Microbiology*. 18, 1444-1458.

Sampieri, C. L. and Mora, M. (2014). Gastric cancer research in Mexico: A public health priority. *World Journal of Gastroenterology*. 20, 4491–4502.

Shiotani, A., Uedo, N., Iishi, H., Murao, T., Kanzaki, T., Kimura, *et al.* (2012) *Helicobacter pylori* eradication did not improve dysregulation of specific oncogenic miRNAs in intestinal metaplastic glands. *Journal Gastroenterology* 47, 988–998.

Tavares, R. and Pathank S. (2017). *Helicobacter pylori* secreted protein HP1286 triggers apoptosis in macrophages via TNF-independent and ERK MAPK-dependent Pathways. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 7, 1-16.

Vannarath, S., Vilaichone R., Rasachak B., Mairiang P., Yamaoka Y., Shiota S., *et al.* (2014). Virulence Genes of *Helicobacter pylori* in Gastritis , Peptic Ulcer and Gastric Cancer in Laos. *Asian Pac Journal Cancer Prevention*. 15, 9027-9031.

Wang, Y., Cao, Z., Wang, L., Liu S., Cai, J. (2018). Downregulation of microRNA-142-3p and its tumor suppressor role in gastric cancer. *Oncology Letters*. 15, 8172-8180.

Xu, G. Zhang, Z., Wei, J., Zhang, Y., Guo, L. and Liu, X. (2013). MicroR-142-3p down-regulates IRAK-1 in response to Mycobacterium bovis BCG infection in macrophages. *Tuberculosis*. 606–611.

Wang, Y., Liang, J., Qin, H., Ge Y., Du, J., Lin, J., *et al.* (2016). Elevated expression of miR-142-3p is related to the pro-inflammatory function of monocyte-derived dendritic cells in SLE. *Arthritis research & therapy*. 18, 263.

Yao, Y., Li, G., Wu, J., Zhang, X., Wang J. (2015). Inflammatory response of macrophages cultured with *Helicobacter pylori* strains was regulated by miR-155. *International Journal Clinical Exp Pathology*. 8, 4545-4554.

Zheng, P. Y. and Jones, N. L. (2003). *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. *Cellular Microbiology*. 5, 25-40.