



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CONTRIBUCIÓN DE *HELICOBACTER PYLORI* A LA INFECCIÓN DE EPITELIO GÁSTRICO
POR EL VIRUS DE EPSTEIN-BARR EN UN MODELO *IN VITRO***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

FONTES LEMUS JOSÉ IGNACIO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS

DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO "FEDERICO GÓMEZ"

COMITÉ TUTOR:

DRA. CAROLINA MARÍA ANTONIETA ROMO GONZÁLEZ

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

DRA. ROCÍO ANGELES GARCÍA BECERRA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.

MAYO 2024.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CONTRIBUCIÓN DE *HELICOBACTER PYLORI* A LA INFECCIÓN DE EPITELIO GÁSTRICO
POR EL VIRUS DE EPSTEIN-BARR EN UN MODELO *IN VITRO***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

FONTES LEMUS JOSE IGNACIO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS

DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO "FEDERICO GÓMEZ"

COMITÉ TUTOR:

DRA. CAROLINA MARÍA ANTONIETA ROMO GONZÁLEZ

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

DRA. ROCÍO ANGELES GARCÍA BECERRA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.

MAYO 2024.

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD (FACULTAD DE MEDICINA)
OFICIO: CGEP/CPCB/FMED/0267/2024
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **29 de enero de 2024** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **FONTES LEMUS JOSÉ IGNACIO** con número de cuenta **313262159** con la tesis titulada **“CONTRIBUCIÓN DE *HELICOBACTER PYLORI* A LA INFECCIÓN DE EPITELIO GÁSTRICO POR EL VIRUS DE EPSTEIN-BARR EN UN MODELO *IN VITRO*”**, realizada bajo la dirección del **DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
Vocal: DR. GONZALO CASTILLO ROJAS
Vocal: DRA. YESENNIA SÁNCHEZ PÉREZ
Vocal: DRA. ELIZABETH ORTIZ SÁNCHEZ
Secretario: DRA. CAROLINA MARÍA ANTONIETA ROMO GONZÁLEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 02 de abril de 2024

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO

c. c. p. Expediente del alumno

ACBB/RCHT/EARR/rcht



Agradecimientos institucionales

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por darme las oportunidades y herramientas para mi formación profesional.

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada durante el periodo 2021-2023 (CVU 1025658).

Agradezco al proyecto –CONACyT “FORDECYT-PRONACES” (número de proyecto 303044) “PRONAI-7-VIRUS Y CÁNCER”, por aportar los fondos para esta investigación.

Agradezco al proyecto FPIS2023-HIM-6359 “Infecciones emergentes por especies de Helicobacter no pylori y el virus de Epstein-Barr como riesgo de inflamación gástrica severa en población pediátrica con dolor abdominal crónico y recurrente” por aportar los fondos para esta investigación.

Agradezco al Hospital Infantil de México “Federico Gómez” y a los proyectos Fondo de Apoyo a la Investigación HIM-2017-074, SSA 1403 y HIM-2023-016 por aportar los fondos para esta investigación.

Agradezco a mi tutor principal, Dr. Ezequiel Moisés Fuentes Pananá.

Agradezco a los miembros de mi Comité Tutor, Dra. Carolina Romo González y Dra. Rocío García Becerra.

Agradecimientos personales

A mi mamá, Carmen. Gracias por enseñarme qué es la justicia y la lealtad.

A mi papá, Nacho. Gracias por enseñarme qué es la bondad y la sencillez.

Gracias infinitas a los dos por enseñarme qué es el amor incondicional, los amo hasta el infinito y más allá.

A mis hermanos, Pedro y Abril. Gracias por enseñarme qué es la fraternidad (y ayudarme muy de vez en cuando a practicar la tolerancia :p)

A mis adorados, mis *ride or die*, Gina y Octavio. Gracias por enseñarme qué es la amistad.

A mis íntimos de toda la vida. Brenda, Fridi, Rebe, Adri, Viris, Tlalito, Lú, León y todos los demás que son incontables y que no termino de listar. Gracias por su cariño, paciencia y gratitud. Los adoro, siempre.

A mi tutor, Dr. Ezequiel. Gracias por su compromiso, por seguir enseñándome qué es el profesionalismo y por ayudarme a explotar todas mis habilidades y aptitudes. Gracias, gracias, gracias.

A toda la UIVC. Gracias por su solidaridad y por su aprecio. Gracias infinitas al equipo de trabajo de cáncer gástrico de la UIVC: Dra. Diana Domínguez, Dr. Alejandro García, Dr. Ángel Juárez, Dr. Edson Rubio y Biól. Azalea Rivera.

Mis amiguitos personales, los pollos José. Gracias por su sentido de pertenencia. ¡Con ustedes me he divertido y he aprendido como nunca! Los quiero mucho, mucho.

Gracias a todos aquellos que estuvieron involucrados en este camino. Sin ustedes, nada de esto hubiera sido posible.

“What I’ve learned is so vital
more than just survival, this is a revival.
This is my revival
This is my revival.”

Índice

Índice de figuras y Tablas

Resumen	1
Abstract	2
Introducción.....	3
Cáncer gástrico.....	3
Clasificación del cáncer gástrico.....	4
Factores de riesgo	5
<i>Helicobacter pylori</i>	6
CagA.....	7
Virus de Epstein-Barr.....	8
Mecanismos oncogénicos de EBV	11
Cáncer Gástrico asociado a EBV	12
Evidencia de interacciones cooperadoras entre EBV y <i>H. pylori</i>	13
Justificación y planteamiento del problema	14
Hipótesis	15
Objetivos	15
<i>General</i>	15
<i>Particulares</i>	15
Metodología.....	16
Líneas celulares y cultivos bacterianos	16
Purificación de linfocitos B de sangre periférica	18
Infección de células epiteliales gástricas con <i>H. pylori</i> y obtención de medios condicionados.....	18
Cuantificación de IL-8	19
Ensayos de quimioatracción: migración e invasión	19
Transfección de CagA en células AGS.....	20
Inmunofluorescencias	20
Western Blot	21
PCRs en tiempo real.....	21
Knockdown de IL-8	23
Análisis bioinformático	23
Análisis estadístico	23
Resultados	24
Discusión.....	40
Conclusiones.....	45
Referencias bibliográficas.	46

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Células AGS infectadas con <i>H. pylori</i>	25
Figura 2. Producción de IL-8 por células AGS infectadas por varias cepas de <i>H. pylori</i>	25
Figura 3. Producción de IL-8 por células KATO-III y NCI-N87 infectadas por <i>H. pylori</i>	26
Figura 4. Quimioatracción de células Akata por medios condicionados obtenidos por la infección de <i>H. pylori</i>	27
Figura 5. Quimioatracción de células Hs445 por medios condicionados obtenidos por la infección de <i>H. pylori</i>	27
Figura 6. Quimioatracción de células B95-8 por medios condicionados obtenidos por la infección de <i>H. pylori</i>	28
Figura 7. Invasión de células Akata por medios condicionados obtenidos por la infección de <i>H. pylori</i> pre-tratada con gentamicina.....	29
Figura 8. Sobreexpresión de CagA en células AGS.....	30
Figura 9. Invasión de células Akata por medios condicionados obtenidos por la sobreexpresión de CagA en células AGS.....	30
Figura 10. Migración de células Ramos por medios condicionados obtenidos por la infección de <i>H. pylori</i>	31
Figura 11. Migración de linfocitos B de sangre periférica por medios condicionados obtenidos por la infección de <i>H. pylori</i>	32
Figura 12. Análisis de sobrerrepresentación de vías.....	33
Figura 13. Score de Enriquecimiento Normalizado de la firma de citocinas y receptores en pacientes con CGaEBV.....	34
Figura 14. Quimioatracción de células Akata por rIL-8.....	35
Figura 15. Quimioatracción de células Ramos por rIL-8.....	35
Figura 16. Producción de IL-8 por células AGS tras silenciamiento de IL-8.....	36
Figura 17. Quimioatracción de células Akata tras el silenciamiento de IL-8.....	36
Figura 18. Expresión de CXCR1 y CXCR2 en linfocitos B naïve tras la infección por EBV.....	37
Figura 19. Expresión relativa de CXCR2 en células Akata y Ramos.....	37
Figura 20. Quimioatracción de células Akata tratadas con inhibidores de CXCR2.....	38
Figura 21. Activación de ERK1/2 y p38 en células Akata tratadas con rIL-8 e inhibidores de CXCR2.....	39

Figura 22. Activación de ERK1/2 y p38 en células Ramos tratadas con rIL-8 e inhibidores de CXCR2..... 39

Tabla 1. Líneas celulares utilizadas..... 17

Tabla 2. Cepas de *H. pylori* utilizadas..... 18

Tabla 3. Primers utilizados para los análisis de expresión por qPCR..... 22

Tabla 4. Quimiocinas y receptores acuñados para los análisis bioinformáticos..... 33

Resumen

Helicobacter pylori (*H. pylori*) y el Virus de Epstein-Barr (EBV) se consideran los principales factores de riesgo en el desarrollo del cáncer gástrico. Ambos patógenos establecen infecciones de por vida y ambos se consideran cancerígenos en humanos. *H. pylori* es una bacteria residente del estómago, mientras EBV es un virus linfotrópico que persiste en las células B de memoria. Si bien existen diferentes líneas de evidencia que apoyan que ambos patógenos cooperan para dañar la mucosa gástrica en etapas tempranas del proceso de carcinogénesis en el estómago, el mecanismo por el que el EBV alcanza, infecta y persiste en el epitelio gástrico no está del todo claro. En este trabajo, se encontró que la infección por *H. pylori* en células de epitelio gástrico induce la producción de IL-8 y otras moléculas que permiten el reclutamiento de linfocitos B infectados por EBV, este fenómeno también es facilitado por EBV, pues su infección aumenta la expresión del receptor CXCR2 en linfocitos B. Finalmente, se observó que el silenciamiento de IL-8 en células epiteliales y la inhibición de CXCR2 en linfocitos B EBV positivos disminuyen el proceso de quimioatracción y la activación de las vías ERK1/2 y p38MAPK. Con estos resultados, se propone que la IL-8 producida por las células epiteliales como respuesta a la infección por *H. pylori* es una molécula quimioatrayente de linfocitos B EBV positivos.

Abstract

Helicobacter pylori (*H. pylori*) and Epstein-Barr Virus (EBV) are considered the main risk factors in the development of gastric cancer. Both pathogens establish lifelong infections, and both are considered carcinogenic in humans. *H. pylori* is a resident bacterium of the stomach, while EBV is a lymphotropic virus that persists in memory B cells. While there are different lines of evidence supporting that both pathogens cooperate to damage the gastric mucosa in early stages of the carcinogenesis process in the stomach, the mechanism by which EBV reaches, infects, and persists in the gastric epithelium is not entirely clear. In this work, we found that *H. pylori* infection in gastric epithelial cells induces the production of IL-8 and other molecules that allow the recruitment of EBV-infected B lymphocytes; this phenomenon is also facilitated by EBV, since its infection increases the expression of the CXCR2 receptor in B lymphocytes. Finally, it was observed that IL-8 silencing in epithelial cells and CXCR2 inhibition in EBV-positive B lymphocytes decrease the chemoattraction process and the activation of the ERK1/2 and p38MAPK pathways. With these results, it is proposed that IL-8 produced by epithelial cells in response to *H. pylori* infection is a chemoattractant molecule of EBV-positive B lymphocytes.

Introducción

Cáncer gástrico

El cáncer es una enfermedad donde células transformadas proliferan de manera descontrolada y pueden invadir otras regiones anatómicas del cuerpo (Brown et al., 2023). Se estima que en el 2020 más de 9 millones de personas en todo el mundo fallecieron a causa de esta enfermedad, siendo la segunda causa de muerte por enfermedades no transmisibles, solo detrás de las enfermedades cardiovasculares (Sung et al., 2021; World Health Organization, 2023).

Dentro de los tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad se encuentra el cáncer gástrico (CG). A nivel mundial es el quinto cáncer más incidente y mortal, con más de 900 mil de casos nuevos y poco más de 600 mil muertes al año en todo el mundo. A nivel nacional ocupa el sexto lugar tanto en incidencia como en mortalidad por cáncer, con casi 9 mil casos nuevos y más de 7 mil defunciones al año (Ferlay et al., s. f.; Sung et al., 2021). La supervivencia de los pacientes con CG depende del estadio en el que se haga el diagnóstico. Se estima que los pacientes diagnosticados antes de que el cáncer se extienda a otras regiones del cuerpo tienen una tasa de supervivencia poco mayor al 70%. Sin embargo, una vez que el cáncer se ha extendido a tejidos circundantes o a los ganglios linfáticos, la tasa de supervivencia disminuye a 32% y 5%, respectivamente (Huang et al., 2020). Estas altas tasas de mortalidad se deben a la falta de signos clínicos específicos en las etapas tempranas del desarrollo del tumor. La sintomatología que usualmente lo acompaña, como el dolor abdominal, náuseas, pérdida del apetito, vómitos y disfagia son también síntomas de otros padecimientos gástricos benignos y comunes, lo que conlleva a una detección del CG en estadios tardíos. (Y. Lin et al., 2020).

El adenocarcinoma gástrico es el tumor estomacal más común, representando hasta el 95% de los tumores que surgen en el estómago. Esta malignidad surge a partir de glándulas productoras de moco. Otros tipos de tumores en el estómago incluyen tumores mesenquimales, neuroendocrinos y linfoproliferativos (Ajani et al., 2017). En general, cuando se habla de CG, se hace referencia al adenocarcinoma

gástrico, debido a su alta representatividad y en este trabajo CG lo utilizaremos para representar al adenocarcinoma gástrico.

Clasificación del cáncer gástrico

Se han propuesto diversas clasificaciones del CG. La clasificación histológica establecida por Lauren en 1965 es la más usada, y divide al cáncer gástrico en dos subtipos principales: Intestinal y difuso (Laurén, 1965). El cáncer gástrico intestinal se caracteriza por la formación de glándulas productoras de moco que asemejan las glándulas de la mucosa intestinal. En estas glándulas, las células tumorales mantienen la cohesión intracelular. Por otro lado, el CG de tipo difuso carece de cohesión entre las células tumorales, por lo cual histológicamente no se observan las glándulas y las células tumorales se observan difusas sobre el tejido. Este tipo de CG es más invasivo (Correa, 2013). La progresión del CG intestinal está descrita por la secuencia de Correa, que es un modelo de carcinogénesis que establece que estos tumores son el resultado de cambios inflamatorios progresivos en la mucosa gástrica. En esta secuencia, la lesión inicial es una gastritis crónica no atrófica, que frecuentemente está asociada a la infección por *H. pylori*. Esta gastritis no atrófica tiene el riesgo de progresar a una gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia y finalmente adenocarcinoma gástrico (Correa & Piazuelo, 2012). Aunque el CG de tipo difuso no presenta lesiones preneoplásicas intermedias, también se origina a partir de lesiones inflamatorias en el estómago (Correa, 2013). Esta y otras clasificaciones propuestas del CG se basan en la histología, aunque la heterogeneidad intertumoral e intratumoral dificulta el agrupamiento de los tumores por su morfología.

Con el objetivo de establecer una clasificación con sustento molecular, además de identificar vías de señalización y procesos biológicos que pudieran ser blancos terapéuticos, el consorcio “El Atlas del Genoma del Cáncer” (TCGA, por sus siglas en inglés) caracterizó muestras de tejido primario de CG usando seis plataformas moleculares: el transcriptoma, el epigenoma, el proteoma, la secuenciación de miRNAs, la determinación de mutaciones puntuales y de regiones extensas por secuenciación de última generación y la determinación de cambios estructurales.

Este consorcio propuso que el CG puede dividirse en 4 categorías: asociado al EBV (CGaEBV), que corresponden al 8% del total de casos de CG y se caracterizan por tener células tumorales positivas a la infección por EBV, además de tener mutaciones en *PIK3CA*, sobreexpresión de PD-L1/PD-L2 y tener un fenotipo metilador de las islas CpG; CG con inestabilidad cromosomal, que comprenden el 50% de los casos, suelen mostrar aneuploidías, mutaciones en *TP53* y activación de la vía RTK-RAS; CG genómicamente estable, que comprende alrededor del 20% de los casos de CG y presenta mutaciones en genes que codifican proteínas que están relacionadas con la motilidad y adhesión celular; y CG con inestabilidad microsatelital, que incluye el 22% restante y muestran altas tasas de mutación incluyendo en genes que codifican proteínas de señalización oncogénica y también están hipermetilados en las islas CpG (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014).

Factores de riesgo

El CG es una enfermedad multifactorial. Se considera que tiene un origen inflamatorio, aunque la infección por *H. pylori* se considera el factor de riesgo principal del proceso inflamatorio, el desarrollo de esta neoplasia está también influenciado por factores propios del hospedero y factores ambientales y asociados al estilo de vida (Machlowska et al., 2020).

Dentro de los factores propios del hospedero se encuentran la edad y el sexo, se ha visto que el riesgo de padecer CG es mayor en hombres y aumenta con la edad (Shah & Bentrem, 2022). También se ha reportado que mutaciones en el gen *CDH1* (Pinheiro et al., 2014) y polimorfismos en genes relacionados a la respuesta inflamatoria, como los que codifican a IL-8, IL-1 β y TNF- α (Felipe et al., 2012; Loh et al., 2009; Yang et al., 2014) aumentan el riesgo de desarrollar CG. Sin embargo, se estima que menos del 10% de los casos muestra una agregación familiar, y solo en el 3% de los casos se ha encontrado una causa hereditaria (Setia et al., 2015), lo que sugiere que los factores de riesgo ambientales tienen un papel importante en el establecimiento de esta enfermedad. Los factores de riesgo ambientales y asociados al estilo de vida engloban el consumo de tabaco, alcohol y dietas altas

en sal y alimentos procesados, además de un consumo pobre de frutas y verduras (Correa, 2013; IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2004; Joossens et al., 1996; Moy et al., 2010). La infección por *H. pylori* se ha considerado como el principal factor de riesgo para desarrollar CG (Correa, 2013). Además, la infección por EBV también está asociada con el desarrollo de CG (Machlowska et al., 2020).

Helicobacter pylori

H. pylori es una bacteria gramnegativa, microaerófila, flagelada y con forma de espiral que puede colonizar el epitelio estomacal. Generalmente es adquirida en la infancia y puede persistir durante toda la vida del hospedero si no se erradica mediante un tratamiento con antibióticos. Como resultado, la infección por *H. pylori* puede dañar la mucosa gástrica, lo que causa varias enfermedades del tracto superior del sistema digestivo, tales como gastritis crónica, úlcera péptica y eventualmente neoplasias gástricas, por lo que es considerado como un agente carcinógeno tipo I según la IARC (International Agency for Research on Cancer, 1994; Kamangar et al., 2011; Marshall & Warren, 1984). Aproximadamente el 50% de la población global está infectada por *H. pylori*, sin embargo, solo una fracción menor al 5% de las personas infectadas desarrolla CG (Conteduca et al., 2013; Herrera & Parsonnet, 2009; Li et al., 2023; Parkin, 2006; Zamani et al., 2018).

H. pylori posee varios factores de virulencia que están involucrados en la colonización de un nicho ecológico tan único como lo es el estómago. Esta bacteria tiene de 4 a 6 flagelos que aunado a su forma helicoidal, le permiten penetrar y moverse a través de la capa de moco gástrico (Cheek et al., 2021). Las proteínas bacterianas externas de membrana HopS y HopT, también conocidas como BabA y BabB facilitan la adhesión de *H. pylori* a las células epiteliales (Oleastro & Ménard, 2013). Además, *H. pylori* sintetiza ureasa, una enzima que hidroliza la urea en amoníaco y dióxido de carbono, esto neutraliza el pH del estómago, además de que disminuye la viscosidad del moco gástrico, lo que facilita la motilidad de *H. pylori* y (Su et al., 2018).

Un componente importante de la virulencia de *H. pylori* está dado por la presencia de una isla de patogenicidad *cag* (*cag*-PAI), que es un locus de 40 kb que codifica alrededor de 30 genes que ensamblan un sistema de secreción tipo IV (T4SS), que ayuda a translocar moléculas bacterianas efectoras a las células infectadas, además de la proteína oncogénica CagA (Del inglés *cytotoxin-associated gene A*) (Cheok et al., 2021). Las cepas de *H. pylori* pueden clasificarse como positivas o negativas a la *cag*-PAI. Las cepas *cag*-PAI negativas no tienen una copia funcional de la *cag*-PAI debido a que no codifican todos o alguno de los genes de la isla de patogenicidad. Las cepas *cag*-PAI negativas generalmente no se asocian con enfermedades gástricas severas (Park et al., 2018).

CagA

CagA es una proteína de 120-145 kDa codificada al final de la isla de patogenicidad que posee una región polimórfica en el extremo c-terminal que les da identidad a las diferentes cepas de *H. pylori*. Esta región tiene motivos repetidos de los aminoácidos Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA). Estos motivos EPIYA se pueden repetir *in tandem* en la secuencia de la proteína. Se pueden encontrar cuatro tipos distintos de EPIYA: A, B, C y D, clasificados según la secuencia de aminoácidos que rodean al motivo (Hatakeyama, 2004). Los EPIYA A, B y C se encuentran generalmente en las cepas que circulan en países occidentales, mientras que los EPIYA A, B y D se encuentran en los países orientales (Naito et al., 2006).

Una vez que CagA es translocada al citoplasma de las células epiteliales mediante el T4SS, es susceptible a fosforilación en las tirosinas de los motivos EPIYA por cinasas de las familias Src o Abl. La proteína CagA fosforilada puede unirse a la proteína SHP2, formando el complejo CagA-P-SHP2, lo que puede alterar diversas vías de señalización, como la vía de las MAP cinasas (MAPK), JAK/STAT y ERK, desregulando la polaridad celular y promoviendo una proliferación celular anormal, además de inducir un cambio morfológico conocido como fenotipo colibrí. Los EPIYA D son más afines a la unión con la proteína SHP2, por lo que las cepas asiáticas tienen un mayor potencial oncogénico (Zhao et al., 2020). La proteína CagA también puede interactuar con el complejo E-Cadherina- β -Catenina,

induciendo la acumulación nuclear de β -Catenina, permitiendo la transcripción de genes asociados con el proceso de carcinogénesis (Murata-Kamiya et al., 2007). También hay una activación del factor de transcripción NF- κ B, lo que lleva a la expresión de IL-8. Esta inducción de IL-8 mediada por la proteína CagA y la *cag*-PAI es dependiente de la cepa de *H. pylori*, de modo que las cepas con motivos EPIYA D inducen una mayor expresión de IL-8 que aquellas con EPIYA A, B o C (Argent et al., 2008; Zhao et al., 2020). De manera independiente a la traslocación de CagA, la IL-8 puede ser inducida por otros componente bacterianos, como el LPS, la flagelina o DNA bacteriano que puede ser liberado y reconocido por las células gástricas (Sánchez-Zauco et al., 2010).

La infección por *H. pylori* se considera un ejemplo de carcinógeno indirecto, ya que genera una inflamación gástrica crónica que favorece el desarrollo de CG. *H. pylori* estimula la secreción de IL-8 por el epitelio gástrico, lo que atrae y activa neutrófilos, favoreciendo el establecimiento de un microambiente inflamatorio con un gran infiltrado de leucocitos y una alta concentración de citocinas pro-inflamatorias, como IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-12 y TNF- α . Los neutrófilos reclutados, a su vez, liberan especies reactivas de oxígeno y óxidos de nitrógeno que pueden inducir mutaciones en las células del epitelio gástrico (Hatakeyama, 2004; Kusters et al., 2006; Morales-Sanchez & Fuentes-Panana, 2017).

Virus de Epstein-Barr

EBV es un virus de la familia *Herpesviridae*, caracterizada por ser virus envueltos con un genoma lineal de DNA de doble cadena. Su genoma es de alrededor de 172 kb y codifica alrededor de 100 proteínas distintas. EBV tiene un ciclo de replicación bifásico, alternando entre estadios de infección latente e infección lítica. Durante la infección latente se reprime la expresión de proteínas virales, por lo que el virus permanece oculto ante la respuesta inmune del hospedero, mientras que en la infección lítica hay una expresión abundante de proteínas virales y se sintetizan nuevas partículas virales, lo que le permite al virus diseminarse a nuevos hospederos. EBV se transmite de forma oral e infecta principalmente linfocitos B, aunque se ha visto que también puede infectar células epiteliales. La infección por

EBV está asociada con diferentes neoplasias, como linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, cáncer nasofaríngeo, CG, entre otros, por lo que es considerado como un agente carcinogénico tipo I según la IARC (International Agency for Research on Cancer, 1997; Yin et al., 2019). Se estima que más del 90% de la población mundial está infectada por EBV, sin que esta infección esté asociada a alguna enfermedad. Esto sugiere que EBV es un patobionte, es decir, un agente potencialmente dañino únicamente bajo condiciones de disbiosis (Sánchez-Ponce & Fuentes-Pananá, 2021). La infección primaria por EBV suele ocurrir en la infancia y usualmente es asintomática, aunque en países en desarrollo se ha observado que la primoinfección ocurre en la adolescencia, y esta infección tardía suele ocasionar cuadros de mononucleosis infecciosa (Balfour et al., 2015).

EBV ha evolucionado de tal manera que sus genes le permiten iniciar, establecer y mantener una infección persistente al explotar la maquinaria de diferenciación de los linfocitos B. Este fenómeno se explica con el modelo de centro germinal. En condiciones normales, los antígenos entran vía oral en la saliva, atraviesan el anillo de Waldeyer y son presentados a linfocitos B naïve. Cuando uno de estos linfocitos reconoce a su antígeno cognado se activa, convirtiéndose en un linfoblasto activado. Estos linfoblastos activados migran a los folículos de los órganos linfoides secundarios para iniciar la reacción del centro germinal, donde ocurren los procesos de hipermutación somática, recombinación de cambio de clase y diferenciación a linfocito B de memoria o linfocito B plasmático. Durante este proceso, los linfocitos requieren las señales proporcionadas por linfocitos T *helper* foliculares mediante la interacción de CD40 y CD40L, además de la señalización dada por el receptor de antígeno del linfocito B (BCR). De manera similar, las partículas virales de EBV logran atravesar el epitelio de la cavidad oral, infectando a los linfocitos B naïve, gracias a la interacción entre CD21 y las glicoproteínas virales gp350/220. Los linfocitos B naïve infectados también se convierten en linfoblastos activados que migran y proliferan en el folículo de los órganos linforides secundarios donde comienzan la reacción del centro germinal. Durante esta etapa, las proteínas virales LMP1 y LMP2 tienen un papel importante, ya que mimetizan las señales de CD40 y el BCR, respectivamente. La reacción del centro germinal permite que el virus

induzca una diferenciación hacia linfocitos B de memoria de larga vida. En estos linfocitos, el virus apaga su maquinaria de expresión, lo que le permite mantenerse oculto ante la vigilancia inmunológica del hospedero. La proliferación de los linfocitos B de memoria infectados no depende de mecanismos virales, sino que está mediada por los mecanismos normales de homeostasis. Cuando esto sucede, únicamente se expresa la proteína viral EBNA1, que mantiene unido al episoma viral con el genoma de la célula infectada, lo que permite que el genoma viral se replique junto con el genoma celular y la correcta segregación del genoma viral a ambas células hijas (Thorley-Lawson, 2015).

Durante este proceso de diferenciación, EBV expresa diferentes conjuntos de genes, cada programa transcripcional es considerado como un estado de latencia diferente (III, II, I y 0). Durante la latencia III se expresan seis antígenos nucleares o EBNA: EBNA1, EBNA2, EBNA3a, EBNA3b, EBNA3c y EBNA-LP (leader protein), además de tres proteínas latentes de membrana, LMP1, LMP2A y LMP2B. En la latencia II se expresan EBNA1, LMP1 y LMP2A; la latencia I se caracteriza por la expresión de EBNA1 y en la latencia 0 se suprime por completo la expresión de proteínas virales (Murata et al., 2021; Thorley-Lawson, 2015). Además, EBV expresa varios RNAs no codificantes. Durante todas las latencias se expresan los EBER1 y EBER2 (Del inglés *Epstein-Barr Virus-encoded small RNAs*). EBV puede expresar más de 40 miRNAs provenientes de las regiones BART1 y BHRF1, que también son expresados en todas las latencias (De Re et al., 2020; Knipe & Howley, 2013). El cambio de ciclo latente a ciclo lítico se conoce como reactivación viral, y está mediado por la expresión del factor de transcripción viral Zta, que activa al factor Rta y de manera sinérgica activan la transcripción de genes líticos que codifican proteínas necesarias para la replicación del DNA viral. De manera paradójica, Zta se une a secuencias promotoras que contienen citocinas metiladas, por lo que la metilación de las regiones promotoras de los genes virales es esencial para su expresión (Bergbauer et al., 2010; Knipe & Howley, 2013).

Aunque EBV también infecta células epiteliales se tiene menos caracterizado como lo hace. Se cree que en el hospedero primero se infectan los linfocitos B y que el epitelio se infecta a partir de linfocitos B reactivados y por la cara basolateral del

epitelio, la cual concentra los receptores virales. La infección del epitelio de la orofaringe le sirve al virus para amplificar el número de partículas virales liberadas hacia el exterior (Thorley-Lawson, 2015).

Mecanismos oncogénicos de EBV

La infección por EBV puede asociarse con diversas enfermedades neoplásicas y no-neoplásicas, tales como la mononucleosis infecciosa, desórdenes linfoproliferativos post-transplante, infección crónica activa por EBV, leucoplasia vellosa oral, además de enfermedades malignas como linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfoma asociado a SIDA, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de células NK/T, cáncer nasofaríngeo y CG; además de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple y el lupus eritematoso sistémico (Abusalah et al., 2020). Se estima que la infección por EBV está asociada a casi el 2% del total de casos de cáncer en todo el mundo (Wong et al., 2022).

Las proteínas virales de latencia LMP1 y LMP2A son consideradas como oncogénicas, ya que pueden participar en el proceso oncogénico mediado por EBV, principalmente activando diferentes vías de señalización (Morales-Sanchez & Fuentes-Panana, 2017; Shair et al., 2008). LMP1 es una proteína transmembranal con dominios CTAR, que puede activar las vías JAK/STAT1, ERK/MAPK, PI3K/Akt, PCL/PKC, NF- κ B y JNK/AP-1. Estas vías pueden suprimir la apoptosis y promover la proliferación celular y la sobreexpresión de metaloproteasas, además, la activación de STAT y NF- κ B permiten la expresión de citocinas proinflamatorias que pudieran participar en el establecimiento de un microambiente inflamatorio (Morales-Sanchez & Fuentes-Panana, 2017; Shair et al., 2008).

LMP2A es otra proteína transmembranal con un dominio ITAM que puede ser fosforilado por cinasas de la familia Src, mimetizando la señal de activación del BCR, lo que activa varias vías de señalización, como PI3K/Akt, PCL/PKC, NF- κ B y la vía de las MAPK, que pueden regular la supervivencia, metabolismo, proliferación y migración celular (Morales-Sanchez & Fuentes-Panana, 2017).

Cáncer gástrico asociado a EBV

Si bien, los casos de CGaEBV comprenden solo entre el 8 y 10% del total de los casos de CG, este tipo de cáncer es la enfermedad maligna asociada a EBV más numerosa a nivel mundial (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014; Cohen et al., 2011). La principal característica de los tumores de CGaEBV es que todas o la mayoría de las células tumorales están infectadas por el virus, mientras que el tejido adyacente no, además, el genoma del virus se encuentra presente en forma monoclonal en las células tumorales, lo que indica que la infección precede a la transformación (Morales-Sanchez & Fuentes-Panana, 2017). Anatómicamente, estos tumores suelen encontrarse en el cuerpo del estómago. También presentan hipermetilación del DNA y tienen grandes infiltrados de células inmunes. Estos tumores también presentan mutaciones en los genes PIK3CA y ARID1A y amplificaciones de los genes JAK2, PD-L1 y PD-L2 (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014; Zhao et al., 2020).

La expresión de genes virales de EBV en tumores gástricos no corresponde a ninguna de las latencias ya establecidas en linfocitos B. Algunos grupos de trabajo han encontrado la expresión de EBNA1 y en algunos casos ha sido posible detectar a LMP2A (Zhao et al., 2020). Además de proteínas virales se expresan los EBERs y miRNAs de la región BART, estos miRNAs pueden ayudar con el control de la latencia y reactivación viral, evasión de la respuesta inmune, resistencia a la apoptosis y pueden intervenir con diversas vías de señalización relacionadas con la oncogénesis (Morales-Sanchez & Fuentes-Panana, 2017; Zhao et al., 2020).

A pesar de toda esta evidencia de la asociación de EBV con el CG y el carcinoma nasofaríngeo, todavía no se entiende como llega, infecta y persiste EBV en el epitelio. Mientras que la infección e inmortalización de los linfocitos B es muy eficiente, la entrada de EBV a la célula epitelial solo se da en condiciones experimentales muy específicas y es altamente ineficiente. Además, en todos los modelos experimentales, EBV no persiste, activa el ciclo lítico y mata a la célula hospedero. La oro-naso-faringe es el sitio en el que EBV replica, liberando partículas infectivas en la saliva, que sirven para transmitirse a otros hospederos. Estudios realizados en muestras obtenidas por amigdalectomía han permitido observar a

EBV en esta región. Por el contrario, no hay mecanismos conocidos que lleven a EBV al estómago. El estómago no contiene tejido linfoide asociado a mucosas, y si hay linfocitos B infectados por EBV circulando la región, también se desconoce cuáles son las señales que inducen la reactivación viral. Dado que la infección de los linfocitos B antecede la del epitelio, este paso de reactivación se considera necesario para que el virus infecte el epitelio y pueda ejercer su capacidad oncogénica.

Evidencia de interacciones cooperadoras entre EBV y *H. pylori*

Existe evidencia que sugiere que EBV está involucrado en el desarrollo de lesiones premalignas muy tempranas, y que podría estar actuando de manera sinérgica con *H. pylori* para desarrollar estas lesiones. En diversas cohortes se ha encontrado que EBV aumenta el riesgo de desarrollar cáncer gástrico e incluso lesiones premalignas, tanto en adultos como en pacientes pediátricos (Cárdenas-Mondragón et al., 2013, 2015; Del Moral-Hernández et al., 2019; Martínez-López et al., 2014). Particularmente, se ha encontrado una asociación entre la coinfección entre *H. pylori* y EBV y lesiones inflamatorias severas, mientras que las monoinfecciones por ambos patógenos están asociadas a lesiones con inflamación leve o moderada, lo que sugiere una cooperación desde lesiones muy tempranas (Cárdenas-Mondragón et al., 2013). Estudios serológicos muestran que los pacientes con CGaEBV, pacientes con CG agnóstico a su estatus de infección por EBV y pacientes con lesiones premalignas avanzadas tienen títulos altos de anticuerpos IgG contra la proteína viral VCA, que es un marcador de reactivación viral, lo que sugiere un papel importante de la reactivación viral en el desarrollo de CG (Fontes-Lemus et al., 2023).

Algunos grupos de trabajo han comenzado a dilucidar la posible sinergia entre ambos patógenos. La reactivación viral en el estómago podría darse gracias a la monocloramina, un metabolito del amonio formado por la interacción del amonio y el ácido hipocloroso en el estómago. Este metabolito es producido localmente en el estómago infectado por *H. pylori*. Se ha visto que este compuesto puede reactivar a EBV en linfocitos B y células de epitelio infectadas (Minoura-Etoh et al., 2006).

También se ha encontrado que la fosfatasa SHP1 puede unirse a la proteína CagA-fosforilada, disminuyendo su actividad. Sin embargo, esta regulación negativa de CagA puede ser afectada por EBV, ya que el virus induce la hipermetilación de la región promotora de SHP1, de modo que EBV puede potenciar de manera indirecta la actividad oncogénica de CagA (Saju et al., 2016).

Los primeros modelos *in vitro* de coinfección entre *H. pylori* y EBV revelan que la infección por *H. pylori* facilita la infección por EBV en epitelio gástrico, esto debido a la sobreexpresión de los receptores EPHA2 y NMHC-IIA y metilación aberrante de genes supresores de tumores, ambos inducidos por la infección por *H. pylori* (Fekadu et al., 2021; Pandey et al., 2018).

Justificación y planteamiento del problema

El CG es un problema de salud público a nivel mundial y en nuestro país. Si bien, su incidencia ha ido a la baja en los últimos años, este tipo de cáncer se sigue asociando con altas tasas de mortalidad, que oscilan alrededor del 70% antes de que logre diseminarse a otros sitios y pueden disminuir hasta un 30% si ya hubo diseminación. Estas altas tasas de mortalidad van de la mano de detecciones tardías, debido a la falta de síntomas específicos, lo que resalta la importancia de estrategias de prevención primarias. Dentro de los factores de riesgo del CG se encuentran las infecciones por *H. pylori* y por EBV. La infección crónica por *H. pylori* causa un ambiente inflamatorio que favorece el desarrollo de CG, aunque la traslocación de la proteína CagA a las células epiteliales gástricas también desregula vías de señalización que están involucradas en cáncer. Por su parte, se desconoce cómo, cuándo y cuáles son los estímulos que llevan a EBV al estómago. EBV es un virus que persiste en linfocitos B y que replica en el epitelio de la nasofaringe durante su transmisión a nuevos hospederos. En ese sentido, el estómago pareciera no brindar ventajas a su persistencia individual o poblacional al virus y por lo tanto pudiera ser un accidente que ocurre en respuesta a la infección por *H. pylori*. Diferentes líneas de evidencia apoyan una coparticipación de ambos patógenos en el desarrollo de CG y de la inflamación crónica que guía la progresión de las lesiones gástricas. Debido a que *H. pylori* es el residente normal del estómago

y que EBV persiste principalmente en linfocitos B en nódulos linfáticos, en este proyecto se plantea hacer un modelo donde la infección por *H. pylori* facilita el reclutamiento de linfocitos B infectados por EBV, además de caracterizar señales inducidas por la infección con la bacteria que faciliten la quimioatracción de los linfocitos B infectados por EBV.

Hipótesis

La infección por *H. pylori* en células de epitelio gástrico induce la secreción de moléculas que promueven la quimioatracción de linfocitos B infectados por EBV a la mucosa del estómago.

Objetivos

General

Modelar *in vitro* cómo *H. pylori* facilita la quimioatracción de los linfocitos B infectados por EBV, identificando posibles moléculas involucradas en este fenómeno.

Particulares

1. Analizar la quimioatracción de linfocitos B infectados por EBV a células de epitelio gástrico infectado por *H. pylori*.
2. Encontrar moléculas responsables del fenómeno de quimioatracción de linfocitos B infectados por EBV.
3. Encontrar qué vías de señalización pueden estar participando en el fenómeno de quimioatracción de linfocitos B infectados por EBV.

Metodología

Líneas celulares y cultivos bacterianos

Se utilizaron las líneas celulares AGS (Cat. CRL-1739), NCI-N87 (Cat. CRL-5822), Kato-III (Cat. HTB-103), Hs445 (Cat. HTB-146), B95-8, Ramos (Cat. CRL-1596) y Akata (Tabla 1). Todas las líneas celulares, excepto Akata, se obtuvieron de la ATCC. La línea celular Akata fue donada por el Dr. Kenzo Takada (Maruo et al., 2001). Las líneas celulares NCI-N87, Hs445, B95-8, Ramos y Akata fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Life Technologies); la línea AGS fue cultivada en medio F12 (Life Technologies) y la línea celular KATO-III fue cultivada en medio IMDM (ATCC). Todos los cultivos se suplementaron con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco). Adicionalmente, los cultivos de células Akata se seleccionaron con 700 µg/ml de G418 (Sigma-Aldrich) para mantener el báculo de EBV. Todos los cultivos celulares se mantuvieron en una atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂.

Tabla 1. Líneas celulares utilizadas.

Línea celular	Características
AGS	Línea celular de epitelio gástrico obtenida de una paciente con adenocarcinoma gástrico. Negativa a la infección por EBV.
NCI-N87	Línea celular de epitelio gástrico obtenida de un paciente con adenocarcinoma gástrico. Negativa a la infección por EBV.
KATO-III	Línea celular de epitelio gástrico obtenida de un paciente con adenocarcinoma gástrico. Negativa a la infección por EBV.
Hs445	Línea celular de linfocitos B obtenida de un paciente con linfoma de Hodgkin. Positiva a la infección por EBV (Latencia II).
B95-8	Línea celular de linfocitos B de mono tití (<i>Saguinus oedipus</i>), positivos a la infección por EBV (Latencia III).
Akata	Línea celular de linfocitos B obtenida a partir de un paciente con linfoma de Burkitt. Contiene un bácido con el genoma de EBV, acoplado a la proteína GFP (Latencia I).
Ramos	Línea celular de linfocitos B obtenida a partir de un paciente con linfoma de Burkitt. Negativa a la infección por EBV.

Se utilizaron dos cepas de *H. pylori* CagA positivas: la cepa NCTC11637 (ATCC), con un EPIYA ABCCC y la cepa NY02-149, donada por el Dr. Guillermo Perez-Perez, que tiene un EPIYA ABD. También se utilizaron dos cepas CagA negativas: La cepa 365A3, que carece de la proteína CagA, y la cepa 254A3, que contiene una

isla de patogenicidad *cag* no funcional, ambas cepas fueron donadas por el Dr. Javier Torres y la Dra. Margarita Camorlinga y son aislados clínicos de pacientes mexicanos (Tabla 2). Todos los cultivos de *H. pylori* se crecieron en agar sangre y se mantuvieron en un ambiente húmedo a 37°C y 9% de CO₂.

Tabla 2. Cepas de *H. pylori* utilizadas.

Cepa	EPIYA	Enfermedad asociada
365a3	CagA-	Dolor abdominal crónico en paciente pediátrico
254a3	<i>cag</i> -PAI-. Isla de patogenicidad <i>cag</i> -PAI no funcional	Síntomas de indigestión no asociada a úlcera en paciente adulto
11637	ABCCC	Desconocido
NY02-149	ABD	Desconocido

Purificación de linfocitos B de sangre periférica

Se purificaron linfocitos B a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés) de 3 donadores sanos. Las PBMCs fueron aisladas por un gradiente de densidad usando Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich) y los linfocitos B fueron obtenidos mediante selección negativa usando el kit B Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Infección de células epiteliales gástricas con *H. pylori* y obtención de medios condicionados

Se cultivaron las diferentes líneas celulares de epitelio gástrico a una densidad de 1.5×10^5 cels/ml en placas de 12 pozos (Corning) en su respectivo medio. Se cosecharon cultivos de *H. pylori* con una antigüedad no mayor a 12 horas y se resuspendieron en PBS 1x (Life Technologies) y se cuantificaron por densidad óptica a 550 nm. Se tomó el volumen suficiente de cada suspensión bacteriana para

infectar las células epiteliales a una multiplicidad de infección (MOI) de 100 y se infectaron las células durante 6 horas a 37°C y 5% de CO₂ en medio base libre de suplementos. Pasadas las 6 horas, las células fueron tratadas con 300 ng/ml de Gentamicina (Sigma-Aldrich) durante una hora, posteriormente se lavaron con PBS 1x dos veces y se mantuvieron por 17 horas en medio base libre de suplementos, para completar 24 horas de infección. Finalmente, se colectaron los sobrenadantes, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos y se usaron en ensayos de invasión y cuantificación de IL-8. En algunos casos las bacterias fueron tratadas con 300 ng/ml de gentamicina durante 1 hora a 37°C previo a la infección de células epiteliales.

Cuantificación de IL-8

Se midió la concentración de IL-8 de los sobrenadantes obtenidos a partir de la infección de células epiteliales gástricas mediante ELISA, usando el kit OptEIA human IL-8 (BD Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ensayos de quimioatracción: migración e invasión

Para los ensayos de quimioatracción se usaron 1.5×10^5 linfocitos B por cada condición experimental. Se utilizaron insertos Transwell de 6.5 mm de diámetro y poro de 5 μ m (Corning); para los ensayos de invasión, los Transwell se recubrieron con 50 μ l de matrigel (Corning) diluido 1:3 en medio F12 sin suero; para los ensayos de migración los Transwell no fueron recubiertos con Matrigel. Los insertos se colocaron en placas de 24 pozos, en la cámara superior se colocaron los linfocitos B y en la cámara inferior se colocaron 800 μ l de medio condicionado. Los ensayos de migración se mantuvieron a 37°C por 24 horas, mientras que los ensayos de invasión se mantuvieron 48 horas. Después de este tiempo, se observaron las células que lograron atravesar el inserto Transwell, se tomaron fotos del fondo de cada pozo y se contaron 5 campos aleatorios de cada condición experimental. Como control positivo se usó medio suplementado con 6% de SFB, como control negativo se usó medio F12 sin suplementar. Para los ensayos con linfocitos B de sangre periférica se usaron linfocitos B pretratados con 100 ng/ml de Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) por 4 horas como control positivo de migración. En

algunas condiciones se utilizó medio F12 suplementado con 2200 pg/ml de IL-8 recombinante (rIL-8). Para cada ensayo se hicieron tres replicas biológicas independientes.

Transfección de CagA en células AGS

Los plásmidos que codifican a la proteína CagA acoplada a la proteína GFP (GFP-CagA1-1216) o solo a la proteína CagA (CagA1-1216) fueron donados por el Dr. Manuel R. Amieva. Se cultivaron células AGS en placas de 6 pozos hasta tener un 70% de confluencia y se transfectaron con Lipofectamina 3000 (Invitrogen) y 2.5 µg de plásmido por pozo, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se mantuvieron en medio F12 sin suero a 37°C. Después de 48 horas, se colectaron los medios donde las células crecieron, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos y se usaron en ensayos de invasión y cuantificación de IL-8. Como control de estos experimentos se utilizó la transfección de las células con el vector vacío.

Inmunofluorescencia

Las células AGS transfectadas con los plásmidos CagA fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 20 minutos. Las células transfectadas con el plásmido CagA1-1216 fueron bloqueadas con 1% de BSA por 30 minutos, se incubaron con anticuerpo mouse anti-CagA (Santa Cruz, Sc-28368) por 1 hora a 37°C, se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-mouse Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch, 715-605-150) por 40 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron montadas en portaobjetos con Vectashield (Vector Laboratories). Las células transfectadas con el plásmido GFP-CagA1-1216 únicamente se montaron en portaobjetos con Vectashield. Las células se observaron en un microscopio confocal y se tomaron fotos representativas.

Western Blot

Se utilizaron los anticuerpos mouse-anti phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2, Thr202/tyr204) (Genetex, GTX01452), rabbit anti-ERK1/2 (ERK1/2, Genetex, GTX59618), rabbit anti-phospho-p38 MAPK (p-p38, Thr180/Tyr183) (Genetex, GTX33599) y rabbit anti-p38 MAPK (p-38, Genetex, GTX33621). Se usaron los anticuerpos secundarios β -Actin-HRP (Abcam, ab49900), HRP-linked goat anti-mouse (ThermoFisher Scientific, 626520) y HRP-linked goat anti-rabbit (ThermoFisher Scientific, 31460).

Se sembraron 3×10^6 células Ramos o Akata, se privaron de suero por 18 horas y se trataron con 2200 pg/ml de rIL-8. Algunas células fueron tratadas con 400 nM de SB225002 (Tocris Bioscience) o reparixin (Sigma-Aldrich) por 4 horas previo al tratamiento con rIL-8. Las proteínas se extrajeron con buffer RIPA (20-188, Millipore) suplementado con fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (Sigma-Aldrich) coctél de inhibidor de proteasas 1x e inhibidores de fosfatasa (Sigma-Aldrich).

Se usó el kit 2-D Quant (Sigma-Aldrich) para cuantificar las proteínas extraídas. Las muestras se mezclaron con buffer Laemmli 4x (3:1) y se incubaron a 90°C por 5 minutos. Se cargaron 30 μ g de cada muestra en geles de poliacrilamida al 10% y se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore). La membrana se bloqueó con buffer TBS (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, leche en polvo al 5% y 0.05% de Tween-20) por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana fue incubada con su anticuerpo primario correspondiente por 2 horas a temperatura ambiente, seguido del anticuerpo secundario correspondiente conjugado a HRP. Los anticuerpos HRP se detectaron con Immobilon Forte (Millipore). Finalmente, las membranas se visualizaron usando el sistema ChemiDoc MP (Bio-Rad).

PCR en tiempo real

Se extrajo RNA total de células Akata, Ramos y AGS en condiciones basales o experimentales, usando el kit RNeasy mini kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sintetizó cDNA usando el kit qMax First Strand cDNA Synthesis Flex (Accuris Instruments) a partir de 1 μ g de RNA, siguiendo las instrucciones del

fabricante. Para las qPCR se utilizó Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix 2x (Thermo Fisher). Los iniciadores utilizados se muestran en la tabla 2. Las condiciones de amplificación iniciaron con un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 10 minutos, seguido de 50 ciclos a 95°C por 15 segundos y 65°C por 1 minuto. La expresión relativa de los genes de interés se calculó con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizado a la expresión de GAPDH.

Tabla 3. Iniciadores utilizados para los análisis de expresión por qPCR.

Gen	Secuencia	Tamaño del producto esperado
CXCR2	Forward 5'-GCTCTGACTACCACCCAACCTTGA-3' Reverse 5'-AGAAGAGCAGCTGTGACCTGCTGT-3'	81 pb
CXCR1	Forward 5'-CCTGGCCGGTGCTTCAGTTA-3' Reverse 5'-ATCAAATCCCACATCTGTGGATCT-3'	89 pb
IL-8	Forward 5'-CACCGGAAGGAACCATCTCACTGT-3' Reverse 5'-TCCTTGGCAAACTGCACCTTCA-3'	118 pb
GAPDH	Forward 5'-CTTCACCACCATGGAGAAGGC-3' Reverse 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'	238 pb

Silenciamiento de IL-8

Se usaron siRNAs contra IL-8 y un siRNA scramble (Santa Cruz). Se transfectaron células con cada siRNA a una concentración final de 6 nM, usando lipofectamina 3000, siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la transfección, las células AGS fueron infectadas con *H. pylori* y los medios condicionados obtenidos se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos y se usaron en ensayos de quimioatracción y cuantificación de IL-8.

Análisis bioinformático

Los datos de expresión génica de RNAseq de pacientes con CG del TCGA se recuperaron a través de la plataforma XENA de la Universidad de Santa Cruz California. Se obtuvieron un total de 240 muestras, 218 EBV negativas y 22 EBV positivas. Se hizo un análisis de expresión diferencial entre muestras EBV positivas y EBV negativas usando edgeR tool, con los parámetros default (Chen et al., 2016). Aquellos genes con un fold-change de al menos 2.5 y FDR menor a 1×10^{-4} fueron sometidos a un análisis de sobre representación de vías basado en Gene Ontology, mediante la herramienta WebGestalt (Wang et al., 2013). Se hizo un análisis de enriquecimiento de genes normalizado (NES) con el paquete Phenotest, usando los datos de expresión normalizados y una lista de genes de interés (Planet, 2022).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se hicieron en el software GraphPad Prism v8.0.1 (GraphPad). Se evaluó la normalidad de los datos, y aquellos en donde más de dos grupos tuvieron una distribución normal fueron sometidos a ANOVA de una o dos vías. Los datos con distribuciones no normales se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis, y se hizo la prueba de Dunn como post hoc.

Resultados

Para evaluar si la infección por *H. pylori* facilita la quimioatracción de linfocitos B infectados por EBV, se infectaron diferentes líneas celulares de epitelio gástrico con cepas CagA positivas y negativas de *H. pylori* y se probaron los medios condicionados obtenidos como posible quimioattractor de los linfocitos B infectados por EBV.

Se infectó la línea celular AGS con las 4 cepas disponibles de *H. pylori*, debido a que esta línea celular es de las más caracterizadas y en la cual se han realizado importantes descubrimientos sobre *H. pylori*, como la caracterización molecular del fenotipo colibrí y la producción de IL-8. A las 24 horas post-infección se observó que las células infectadas con cepas CagA+ presentaron daño citopático, formando vacuolas y aquellas infectadas con la cepa ABD adquirieron el fenotipo colibrí (Figura 1). Además, se cuantificó la producción de IL-8 en los sobrenadantes para confirmar la infección por *H. pylori* (Figura 2). Las líneas celulares KATO-III y NCI-N87 fueron infectadas únicamente con las cepas CagA- y ABD, y estas infecciones también se confirmaron cuantificando la producción de IL-8 (Figura 3). En ambas líneas celulares se observó que la infección con la cepa ABD aumentó de manera significativa la producción de IL-8.

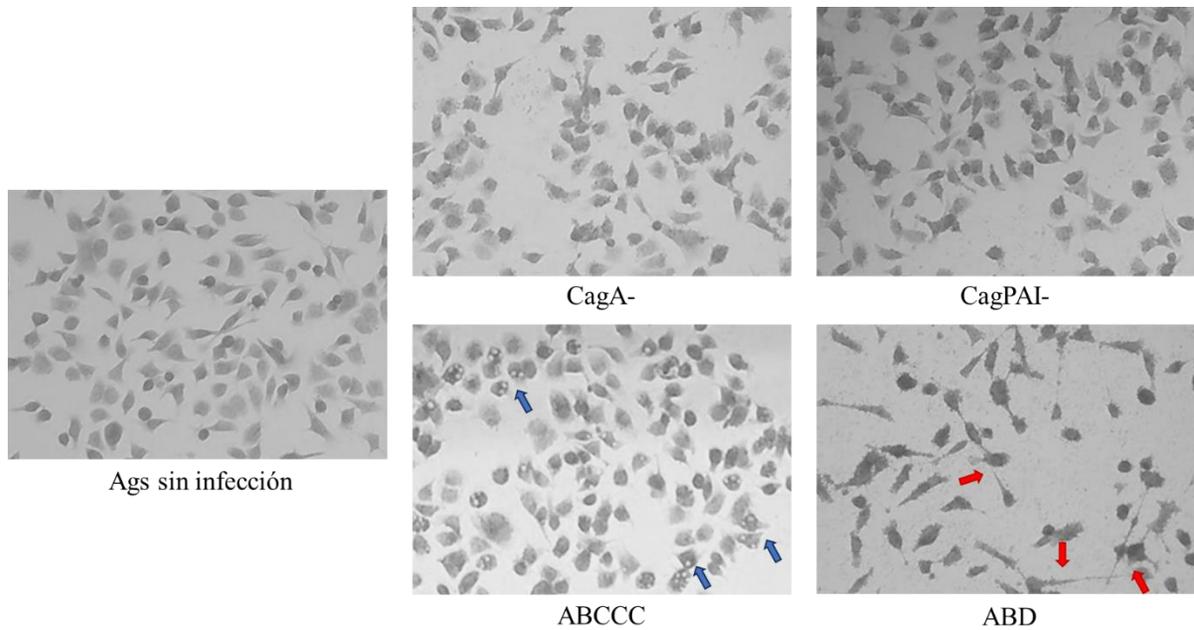


Figura 1. Células AGS infectadas con *H. pylori*. Micrografías representativas de células AGS (20x) infectadas con diferentes cepas de *H. pylori*. La infección con cepas de *H. pylori* CagA+ indujeron la formación de vacuolas (flechas azules) o el fenotipo colibrí (flechas rojas).

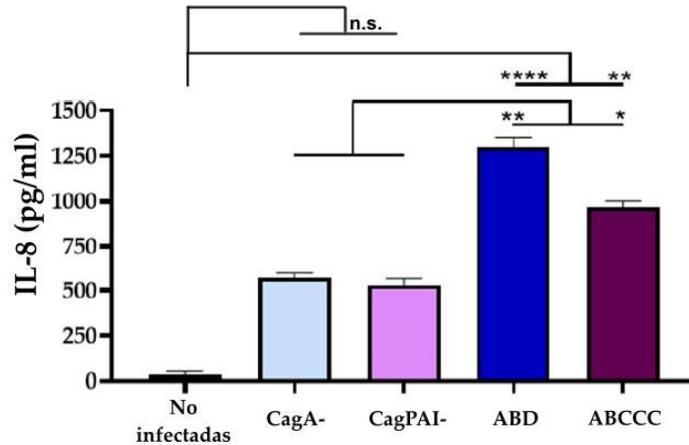


Figura 2. Producción de IL-8 por células AGS infectadas por varias cepas de *H. pylori*. Se usaron las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn como pruebas estadísticas, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

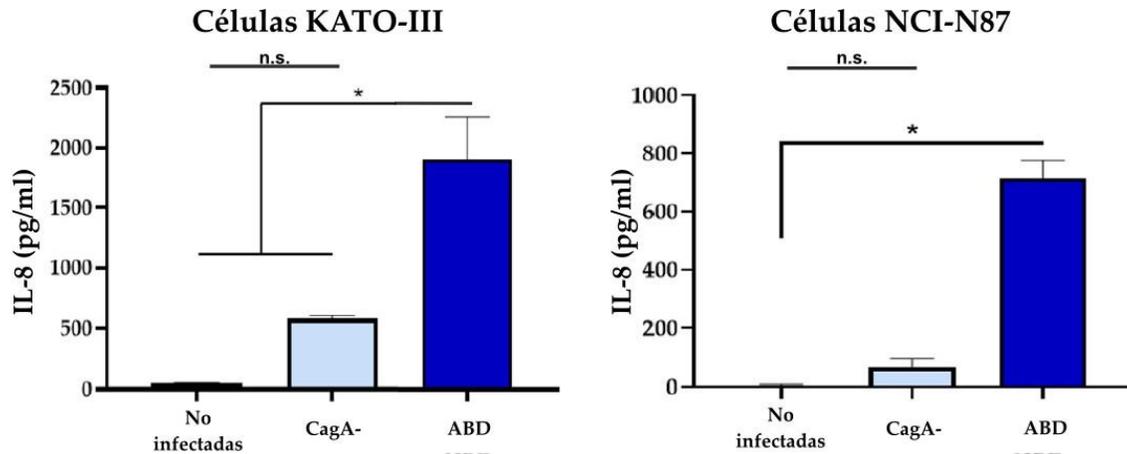


Figura 3. Producción de IL-8 por células KATO-III (izquierda) y NCI-N87 (derecha) infectadas por *H. pylori*. Se usaron las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn como pruebas estadísticas, * $p < 0.05$.

Los medios condicionados de células AGS infectadas con *H. pylori* se usaron para evaluar la capacidad de migración e invasión de linfocitos B EBV positivos. Se evaluaron las líneas celulares Akata (latencia I) (Figura 4), Hs445, (latencia II) (Figura 5) y B95-8 (latencia III) (Figura 6). En general, se encontró que los medios condicionados inducen tanto la migración como la invasión de los linfocitos B infectados por EBV en todas las latencias. Ambos fenómenos fueron dependientes de las cepas de *H. pylori*, de modo que los medios condicionados obtenidos a partir de las cepas CagA+ indujeron una mayor quimioatracción que los medios condicionados obtenidos a partir de las cepas CagA-. Particularmente, la cepa ABD fue la que indujo un mayor reclutamiento de linfocitos B.

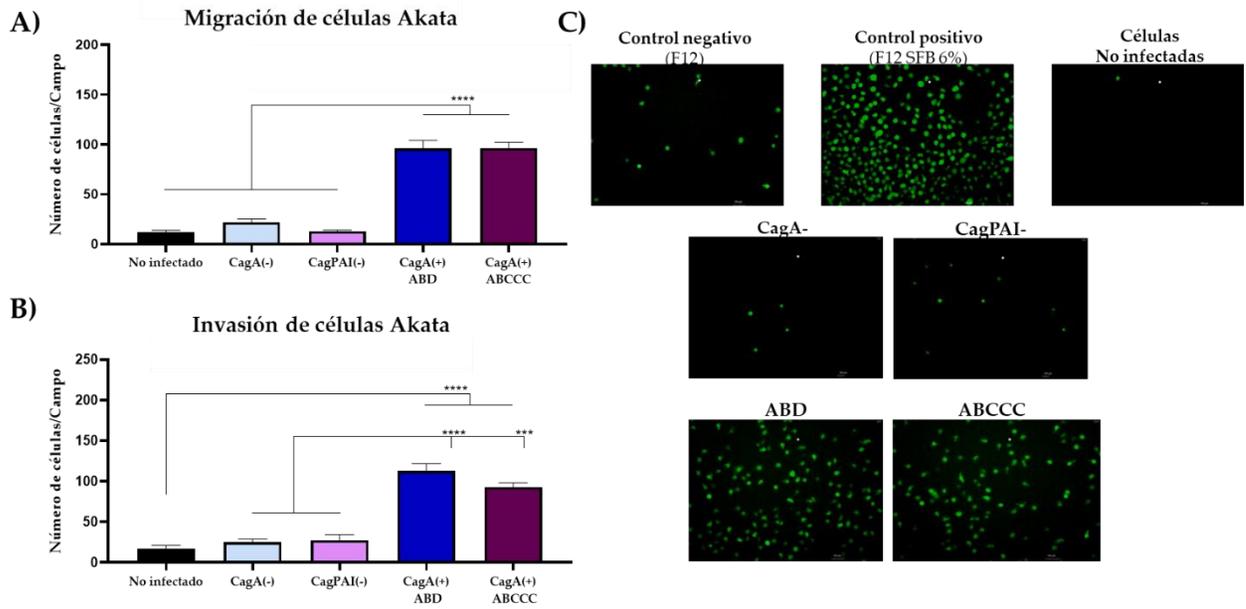


Figura 4. Quimioatracción de células Akata por medios condicionados obtenidos por la infección de *H. pylori*. A) Conteo de células que lograron atravesar el inserto Transwell en los ensayos de migración. B) Conteo de células que lograron atravesar el inserto Transwell recubierto con matrigel en los ensayos de invasión. C) Fotos representativas de las células Akata quimioatraídas a los medios condicionados. Las gráficas muestran la media \pm error estándar del conteo de 5 campos aleatorios del microscopio, de tres experimentos independientes. Se usaron las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn como pruebas estadísticas, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

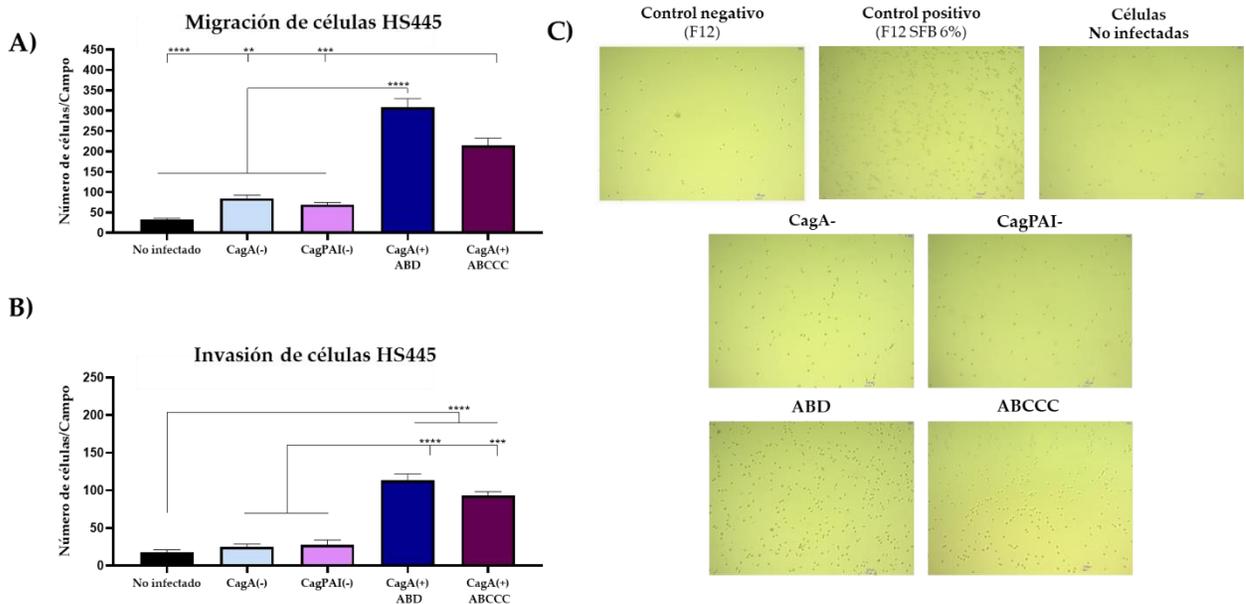


Figura 5. Quimioatracción de células Hs445 por medios condicionados obtenidos por la infección de *H. pylori*. A) Conteo de células que lograron atravesar el inserto Transwell en los ensayos de migración. B) Conteo de células que lograron atravesar el inserto Transwell recubierto con matrigel en los ensayos de invasión. C) Fotos representativas de las células Hs445 quimioatraídas a los medios condicionados. Las gráficas muestran la media \pm error estándar del conteo de 5 campos aleatorios del microscopio, de tres experimentos independientes. Se usaron las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn como pruebas estadísticas, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

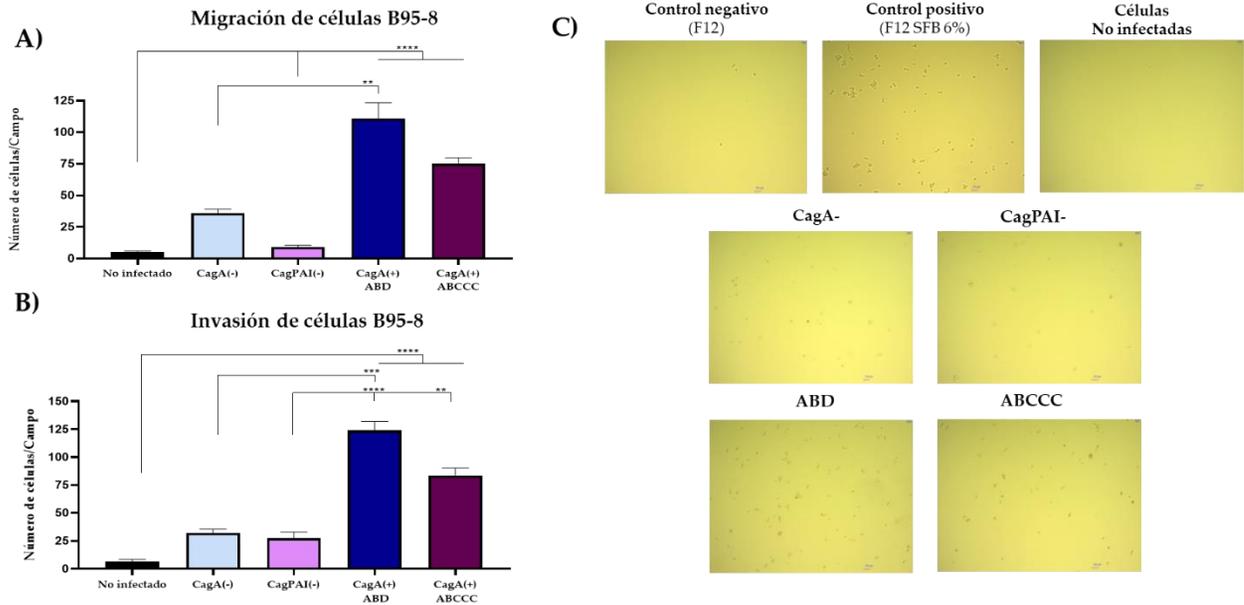


Figura 6. Quimioatracción de células B95-8 por medios condicionados obtenidos por la infección de *H. pylori*. A) Conteo de células que lograron atravesar el inserto Transwell en los ensayos de migración. B) Conteo de células que lograron atravesar el inserto Transwell recubierto con matrigel en los ensayos de invasión. C) Fotos representativas de las células B95-8 quimioatraídas a los medios condicionados. Las gráficas muestran la media \pm error estándar del conteo de 5 campos aleatorios del microscopio, de tres experimentos independientes. Se usaron las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn como pruebas estadísticas, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Para evaluar si este fenómeno de quimioatracción se debe a la infección activa por *H. pylori*, se trató a la bacteria con antibiótico previo a la infección de células AGS. Los ensayos de invasión montados con estos medios condicionados obtenidos a partir de bacteria muerta revelaron que estos medios condicionados no son capaces de inducir la quimioatracción de linfocitos B EBV positivos (Figura 7). Estas observaciones sugieren que es necesaria una infección activa de *H. pylori* al epitelio

gástrico para que se secreten las moléculas responsables de la quimioatracción de los linfocitos B, y que la presencia de DAMPs y PAMPs en el medio condicionado tienen un papel menor en el proceso de reclutamiento de linfocitos B infectador por EBV.

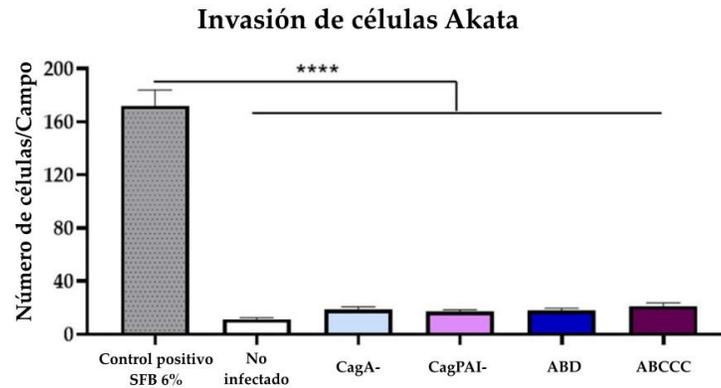


Figura 7. Invasión de células Akata por medios condicionados obtenidos por la infección de *H. pylori* pretratada con gentamicina. La gráfica muestra la media \pm error estándar del conteo de 5 campos aleatorios del microscopio, de tres experimentos independientes. Se usaron las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn como pruebas estadísticas, **** $p < 0.0001$

Debido a que los primeros ensayos de quimioatracción indican que los medios condicionados de infecciones con cepas CagA+ inducen una mayor quimioatracción de linfocitos B EBV+ se decidió evaluar si la sobreexpresión de esta molécula induce la secreción de moléculas quimioatrayentes por las células epiteliales, para esto se transfectaron células AGS con un plásmido que codifica a la proteína CagA (CagA1-1216) o un plásmido que codifica a la proteína CagA acoplado a la proteína GFP (GFP-CagA1-1216) (Figura 8A). Se cuantificó la producción de IL-8 por las células transfectadas, se observó un aumento en la cantidad de IL-8 secretada por las células transfectadas, respectivo a las células sin transfectar o transfectadas con el vector vacío (Figura 8B).

28 horas post-transfección se montaron ensayos de invasión usando los medios condicionados obtenidos a partir de las células AGS transfectadas (Figura 9), se encontró que estos medios promovieron la invasión de células Akata, lo que sugiere que la proteína CagA es un factor importante para mediar la quimioatracción de

linfocitos B infectados por EBV. Si bien hubo reclutamiento de linfocitos B, el número de linfocitos fue menor que los que fueron quimioatraídos por los medios condicionados, lo que sugiere que algún otro componente celular o bacteriano secretado durante la infección del epitelio gástrico puede estar contribuyendo a la quimioatracción de linfocitos B infectados por EBV.

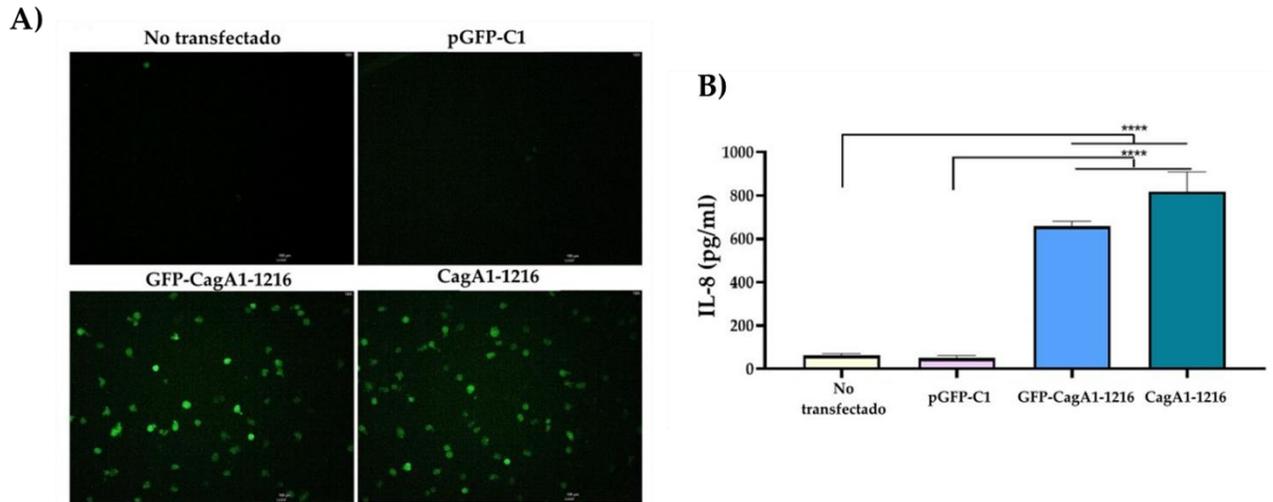


Figura 8. Transfección de células AGS con plásmidos que expresan CagA. A) Fotos representativas de las células transfectadas con los plásmidos GFP-CagA1-1216, CagA1-1216, el vector vacío pGFP-C1 y sin transfectar. Las células transfectadas con el plásmido CagA1-1216 fueron teñidas con anticuerpo contra CagA y Alexa Fluor 647 como anticuerpo secundario. B) Producción de IL-8 por células transfectadas a las 28 horas post transfección. Se usó un ANOVA de dos vías y la prueba de Tukey como pruebas estadísticas, **** p < 0.0001.

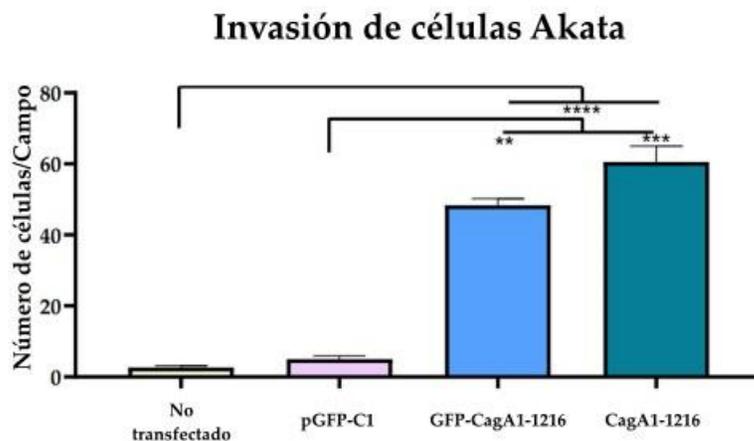


Figura 9. Invasión de células Akata por medios condicionados obtenidos por la sobreexpresión de CagA en células AGS. La gráfica muestra la media \pm error estándar del conteo de 5 campos aleatorios del microscopio, de tres experimentos independientes. Se usaron las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn como pruebas estadísticas, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Para evaluar si la infección por EBV favorece la quimioatracción de los linfocitos B, se montaron ensayos de migración usando la línea celular Ramos, una línea celular de linfocitos B negativos a la infección por EBV. De manera interesante, se encontró que los medios condicionados obtenidos de la infección por *H. pylori* no indujeron la quimioatracción de estas células (Figura 10). Para confirmar esta observación, se purificaron linfocitos B de sangre periférica de donadores sanos y se usaron en ensayos de migración (Figura 11). Se observó que los linfocitos B de sangre periférica tampoco son quimioatraídos por los medios condicionados obtenidos a partir de la infección por *H. pylori*. Se pretrataron los linfocitos B de sangre periférica con PMA, para simular la activación por antígeno, debido a que es aceptado que la infección por EBV mimetiza la activación por antígeno de los linfocitos B naïve. Se encontró que los linfocitos B pretratados con PMA fueron capaces de migrar ante el estímulo de suero fetal bovino. Estos datos sugieren que las infecciones activas por ambos patógenos son necesarias para el fenómeno de quimioatracción, de modo que las infecciones con cepas CagA+ facilitan el reclutamiento de linfocitos B infectados por EBV.

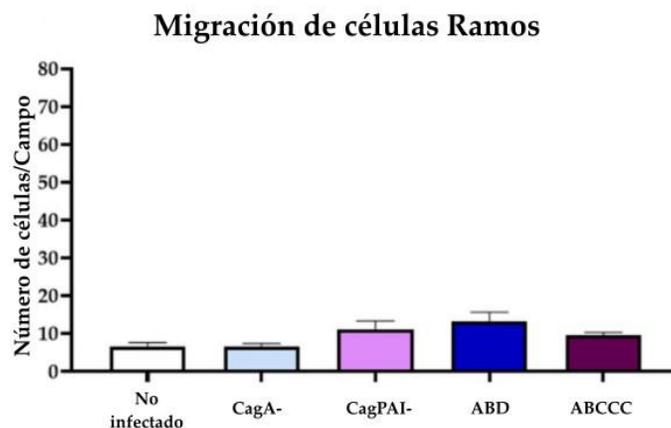


Figura 10. Migración de células Ramos por medios condicionados obtenidos por la infección de *H. pylori*. La gráfica muestra la media \pm error estándar del conteo de 5 campos aleatorios del microscopio, de tres experimentos independientes. Se usaron las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn como pruebas estadísticas.

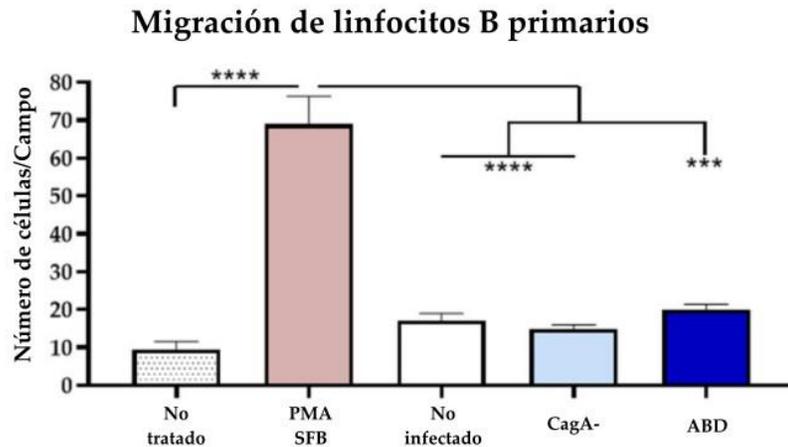


Figura 11. Migración de linfocitos B de sangre periférica por medios condicionados obtenidos por la infección de *H. pylori*. La gráfica muestra la media \pm error estándar del conteo de 5 campos aleatorios del microscopio, de tres experimentos independientes. Se usaron las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn como pruebas estadísticas, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Para identificar moléculas que pudieran ser responsables del fenómeno de quimioatracción, se realizó un análisis de expresión diferencial en los datos transcriptómicos generados por el TCGA, comparando a los pacientes con CGaEBV con los CGnEBV, se seleccionaron los genes con un fold change igual o mayor a 2.5 y False Discovery Rate (FDR) igual o menor a 1×10^{-4} para hacer un análisis de enriquecimiento de vías basado en Gene Ontology (Figura 12). Se encontró que en aquellos pacientes con CGaEBV hay un enriquecimiento de vías relacionadas con respuesta a quimiocinas, respuesta inmune humoral, unión a receptores de citocinas, entre otras, por lo que se acuñó una firma de quimiocinas y receptores involucrados en la migración de linfocitos B y que se sobreexpresan durante la infección por *H. pylori* (Tabla 4) y se estimó el Score de Enriquecimiento Normalizado (NES, por sus siglas en inglés) de esta firma en los datos transcriptómicos del TCGA. Se encontró que la firma acuñada de citocinas está

enriquecida en los pacientes con CGaEBV (Figura 13), y dentro de las moléculas enriquecidas en este grupo se encontró a IL-8.

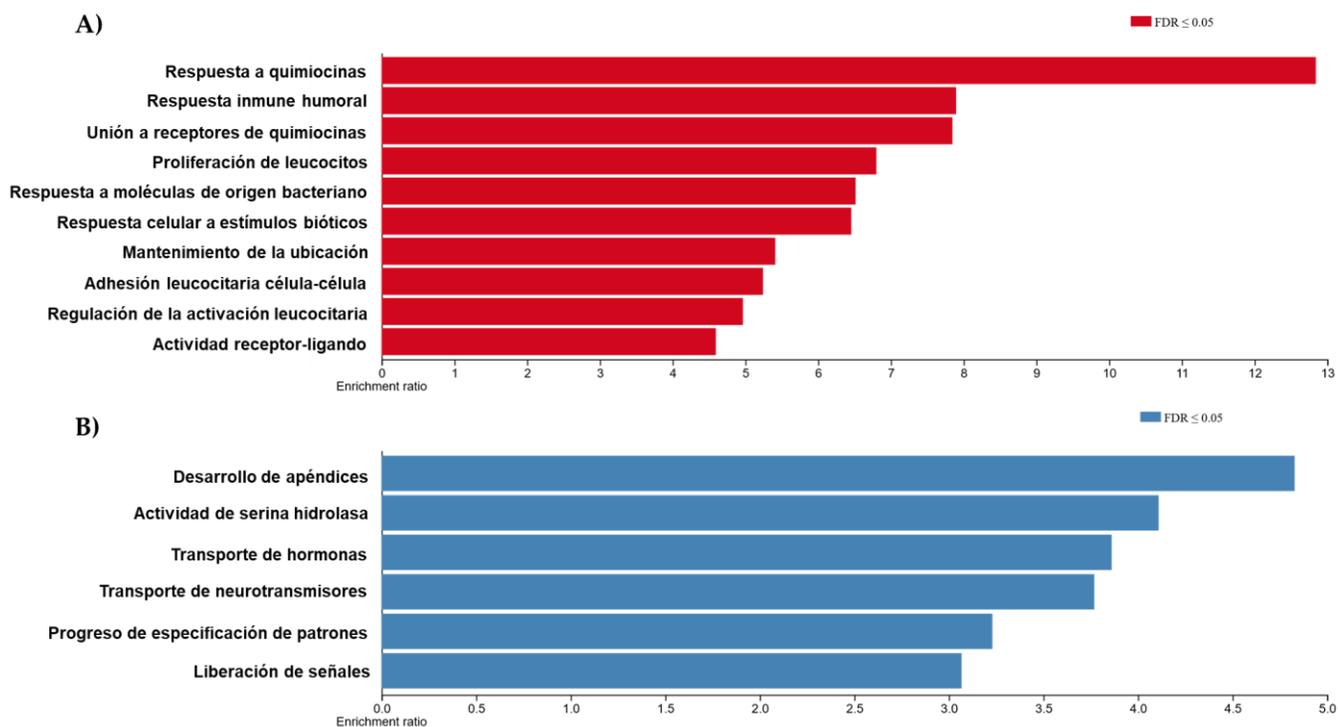


Figura 12. Análisis de sobre representación de vías de Gene Ontology. A. Vías de señalización reguladas a la alta en pacientes con CGaEBV. B. Vías de señalización reguladas a la baja en pacientes con CGaEBV.

Tabla 4. Quimiocinas y receptores acuñados para los análisis bioinformáticos

Ligando	Receptor
CXCL8	CXCR1, CXCR2
CXCL9	CXCR3
CXCL10	CXCR3
CXCL11	CXCR3
CXCL12	CXCR4, CXCR7
CXCL13	CXCR5
CCL19	CCR7
CCL20	CCR6
CCL21	CCR7
CCL25	CCR9

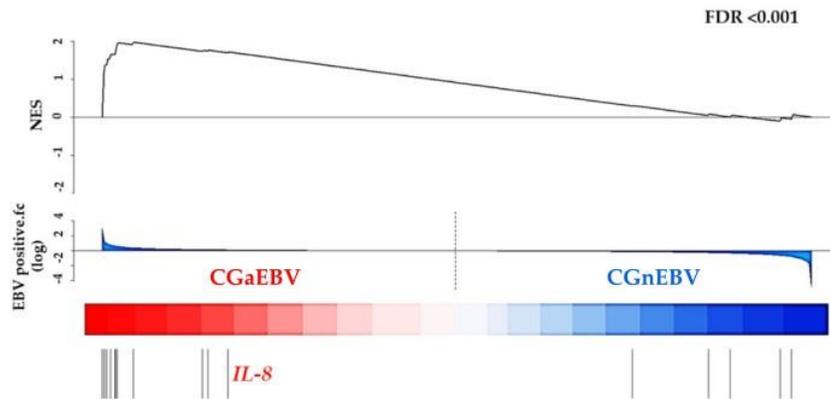


Figura 13. Score de Enriquecimiento Normalizado de la firma de citocinas y receptores en pacientes con CGaEBV. IL-8 aparece dentro de las quimiocinas enriquecidas en pacientes con CGaEBV.

Debido a que IL-8 es la citocina que más se ha estudiado durante la infección por *H. pylori* por su importancia durante el establecimiento de las lesiones inflamatorias y a que es una de las citocinas enriquecidas preferencialmente en el CGaEBV, nos preguntamos si IL-8 pudiera ser responsable de la quimioatracción de los linfocitos EBV positivos. Para esto se hicieron ensayos de invasión usando diferentes cantidades de IL-8 humana recombinante (rIL-8) (Figura 14). Se observó que la rIL-8 promovió la invasión de células Akata, y que esta capacidad de invasión fue dependiente de la cantidad de rIL-8, esto indica que la IL-8 es una molécula que pudiera participar en la quimioatracción de linfocitos B. Si bien, hubo quimioatracción de células Akata, es importante destacar que la rIL-8 reclutó menos células que los medios condicionados de infecciones por *H. pylori*, lo que sugiere que además de IL-8, existen otros compuestos en los medios condicionados que son responsables de la quimioatracción de linfocitos B infectados por EBV. También se evaluó la quimioatracción de la línea celular Ramos mediada por rIL-8, y al igual que con los medios condicionados de la infección por *H. pylori*, se encontró que estas células no fueron quimioatraídas por la rIL-8 (Figura 15).

Invasión de células Akata

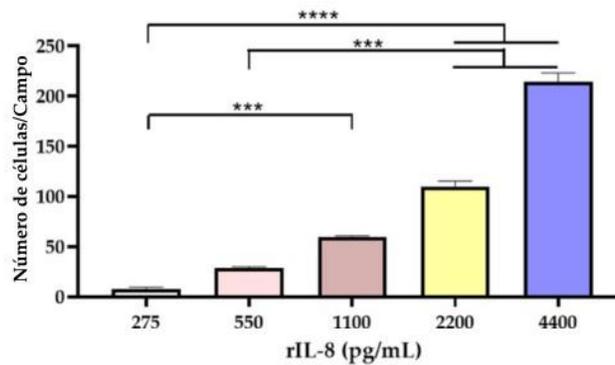


Figura 14. Quimioatracción de células Akata por rIL-8. La gráfica muestra la media \pm error estándar del conteo de 5 campos aleatorios del microscopio, de tres experimentos independientes. Se usaron ANOVA de dos vías y la prueba de Dunnett como pruebas estadísticas, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Migración de células Ramos

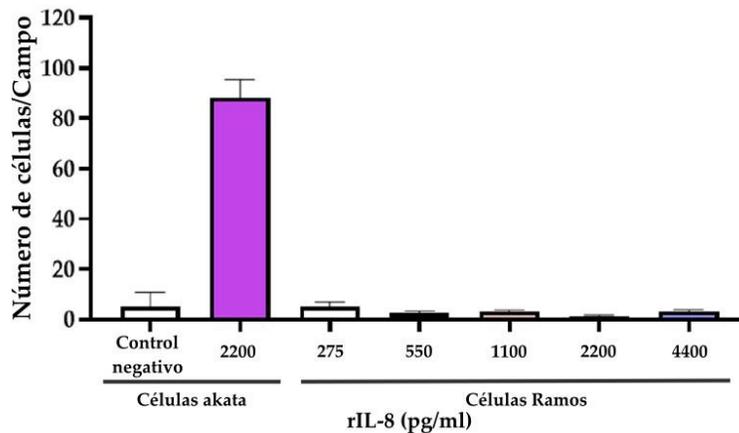


Figura 15. Quimioatracción de células Ramos por rIL-8. La gráfica muestra la media \pm error estándar del conteo de 5 campos aleatorios del microscopio, de tres experimentos independientes. Se usaron las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn como pruebas estadísticas.

El papel de la IL-8 en la quimioatracción de linfocitos B se confirmó mediante un silenciamiento. Se transfectaron células AGS con un siRNA específico dirigido contra el transcrito de IL-8, después se infectaron con *H. pylori* y los medios condicionados obtenidos se usaron en ensayos de quimioatracción. Tras el silenciamiento, se observó una reducción significativa de la producción de IL-8 inducida por la infección por *H. pylori* (Figura 16), además de una disminución del número de células Akata quimioatraídas a los medios condicionados obtenidos por

la infección de estas células (Figura 17). En conjunto, estos resultados sugieren que la IL-8 es un factor quimioatrayente importante de linfocitos B infectados por EBV.

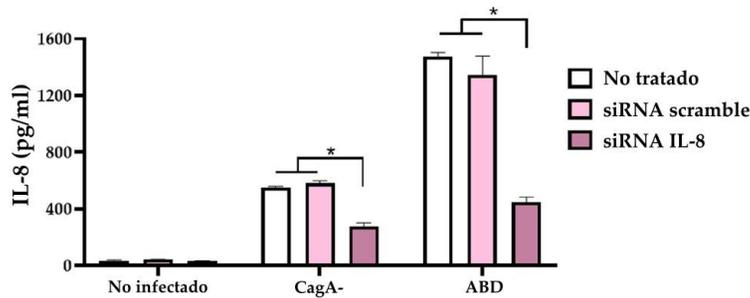


Figura 16. Producción de IL-8 por células AGS tras silenciamiento de *IL-8*. La gráfica muestra la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. Se usaron las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn como pruebas estadísticas * $p < 0.05$.

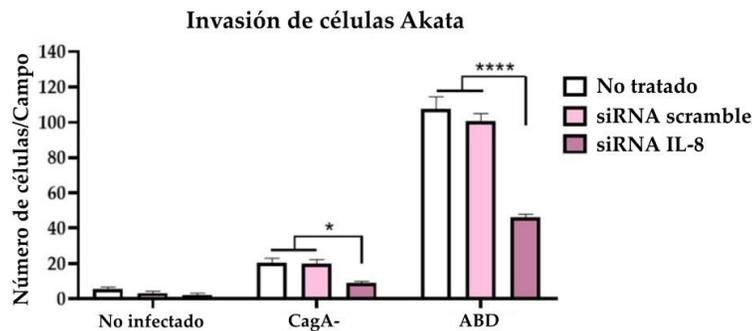


Figura 17. Quimioatracción de células AGS tras el silenciamiento de *IL-8*. La gráfica muestra la media \pm error estándar del conteo de 5 campos aleatorios del microscopio, de tres experimentos independientes. Se usaron ANOVA de dos vías y la prueba de Dunnett como pruebas estadísticas, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

La IL-8 tiene dos receptores, CXCR1 y CXCR2, receptores acoplados a proteínas G. Se evaluó el comportamiento de la expresión de ambos receptores en linfocitos B tras la infección por EBV usando la base de datos en línea publicada por Mrozek-Gorska y colaboradores, (Mrozek-Gorska et al., 2019). La infección por EBV en linfocitos B naïve indujo un aumento en la expresión de CXCR2, mientras que no hubo cambios en la transcripción de CXCR1 (Figura 18). Las diferencias en la

expresión de CXCR2 fueron confirmadas mediante RT-qPCR en las líneas celulares Akata y Ramos (Figura 19).

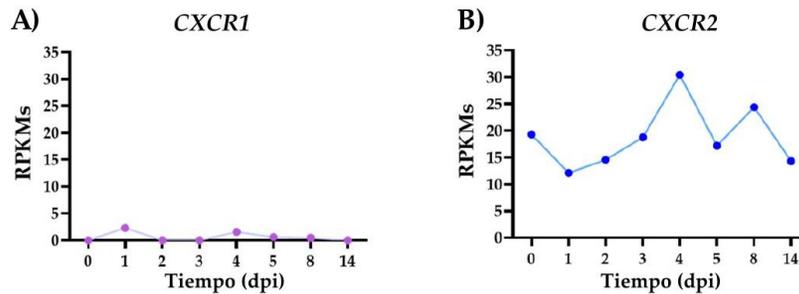


Figura 18. Expresión de CXCR1 y CXCR2 tras la infección por EBV.

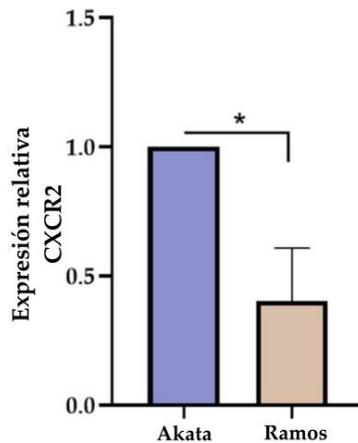


Figura 19. Expresión relativa de CXCR2 en células Akata y Ramos. La gráfica muestra la media \pm error estándar de la expresión relativa en células Akata y Ramos, normalizados con GAPDH. Se usó un t-test como prueba estadística, * $p < 0.05$.

Para evaluar el efecto de la inhibición de CXCR2 en la quimioatracción de linfocitos B EBV positivos se trataron a células Akata con dos inhibidores selectivos de CXCR2, SB225002 y Reparixin, antes de ser sometidas a ensayos de quimioatracción (Figura 20). Se observó que el pretratamiento con ambos inhibidores disminuyó de manera significativa la capacidad de invasión de las células Akata inducida por medios condicionados o por rIL-8. En conjuntos, estos resultados indican que la quimioatracción de linfocitos B en respuesta a la IL-8 es mediada en parte por el receptor CXCR2.

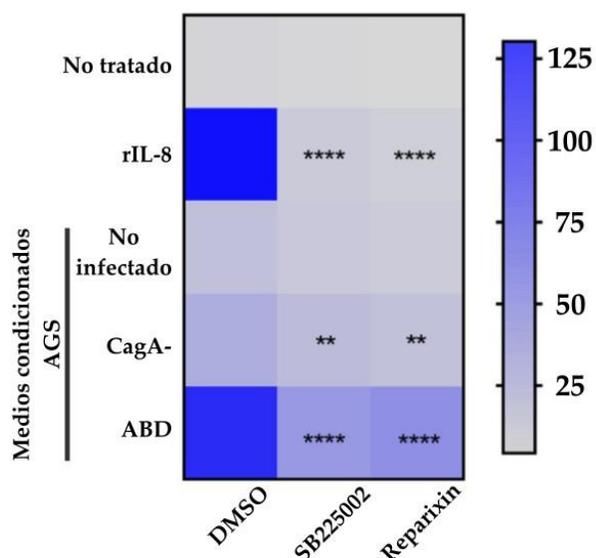


Figura 20. Quimioatracción de células Akata tratadas con inhibidores de CXCR2. El mapa de calor muestra el número de células Akata quimioatraídas por medios condicionados de la infección por *H. pylori*, rIL-8, con o sin pretratamiento con los inhibidores de CXCR2, de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticas se evaluaron comparando los grupos contra el vehículo de los inhibidores (DMSO). Se usó un ANOVA de dos vías con prueba de Tukey como prueba estadística, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Finalmente, debido a que CXCR2 señala mediante la vía de las MAP cinasas (MAPK) se evaluó la activación de ERK1/2 y p38 MAPK en células Akata y Ramos previamente tratadas con rIL-8. En las células Akata (Figura 24) se detectó la fosforilación de ERK1/2 y p38 tras la estimulación con rIL-8. En las células Ramos (Figura 25) no se observó fosforilación de ERK1/2, y se detectó una ligera fosforilación de p38. Se bloqueó a CXCR2 en ambas líneas celulares usando SB225002 y Reparixin y posteriormente se evaluó la activación de las mismas cinasas. Se encontró que en células Akata tras el bloqueo de CXCR2 e inducción con rIL-8 se disminuyó la fosforilación de ERK1/2 y p38, mientras que en las células Ramos se observó una ligera disminución en la fosforilación de p38. Estos resultados sugieren que el reclutamiento de linfocitos B es mediado por CXCR2, que es sobreexpresado tras la infección por EBV, y que CXCR2 activa a las cinasas ERK1/2 y p38.

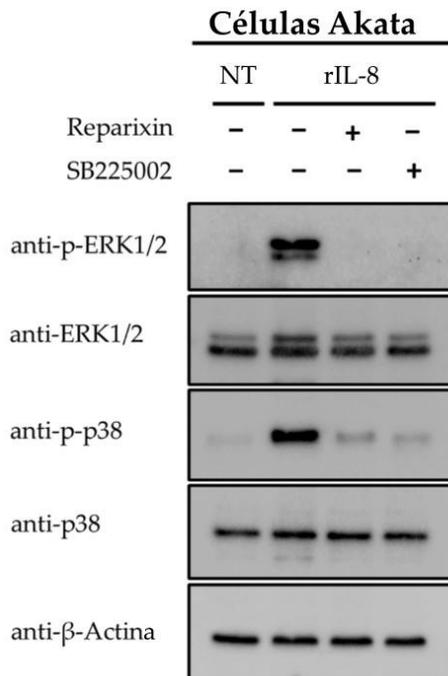


Figura 21. Activación de ERK1/2 y p38 en células Akata tratadas con rIL-8 e inhibidores de CXCR2. Imagen representativa del análisis por western blot de fosforilación de ERK1/2 y MAPKp38 en células Akata estimuladas o no estimuladas con rIL-8 (2200 pg/ml), con o sin pretratamiento con los inhibidores de CXCR2. Se realizaron tres experimentos independientes.

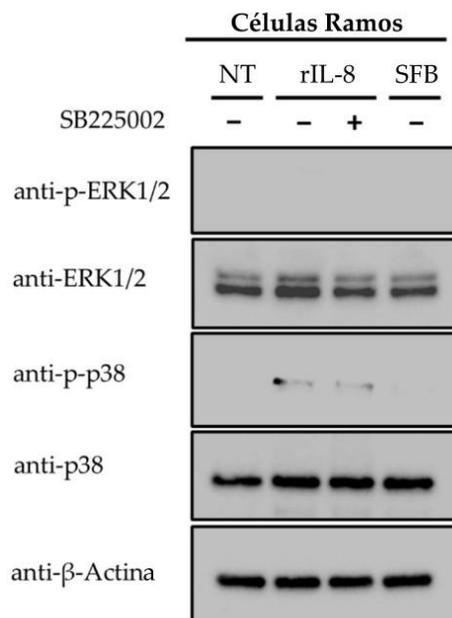


Figura 22. Activación de ERK1/2 y p38 en células Ramos tratadas con rIL-8 e inhibidores de CXCR2. Imagen representativa del análisis por western blot de fosforilación de ERK1/2 y MAPKp38 en células Ramos estimuladas o no estimuladas con rIL-8 (2200 pg/ml) o SFB, con o sin pretratamiento con los inhibidores de CXCR2. Se realizaron tres experimentos independientes.

Todos los resultados obtenidos sugieren que la infección activa por *H. pylori* cepas CagA+ en epitelio gástrico induce una secreción de IL-8, que es capaz de reclutar a linfocitos B infectados por EBV al sitio de la infección. Este reclutamiento de linfocitos está dado por la sobreexpresión de CXCR2 como respuesta a la infección por EBV en los linfocitos B.

Discusión

La infección crónica por *H. pylori* es considerada como el principal factor de riesgo para desarrollar lesiones gástricas inflamatorias que pueden progresar a CG (Thrift et al., 2023). Si bien es clara la asociación entre la infección por *H. pylori* y el desarrollo de CG, es interesante notar que solo una pequeña proporción de personas infectadas por *H. pylori* desarrollan CG, por lo que es importante no perder de vista los demás factores de riesgo involucrados en el desarrollo de esta neoplasia.

Este trabajo describe un mecanismo de quimioatracción de linfocitos B infectados por EBV mediado por la IL-8 producida por el epitelio gástrico como respuesta a la infección por *H. pylori in vitro*. Esta bacteria tiene como sitio de residencia el estómago, mientras que EBV se encuentra principalmente en nodos linfáticos secundarios de la oro-naso-faringe y la médula ósea. Sin embargo, varios estudios han reportado la presencia de ambos patógenos en lesiones gástricas malignas y premalignas (Cárdenas-Mondragón et al., 2013, 2015, 2017; Kim et al., 2017; Martínez-López et al., 2014). La asociación entre ambos patógenos y lesiones inflamatorias severas sugieren que tanto EBV como *H. pylori* están involucrados en el desarrollo y progresión de las lesiones premalignas tempranas.

La infección por *H. pylori* en células AGS (Figura 2), Kato-III y NCI-N87 (Figura 3) aumentó de manera significativa la producción de IL-8, de manera dependiente a la cepa, donde la cepa ABD indujo una mayor producción que la cepa ABCCC, de

acuerdo a lo ya reportado en la literatura (Fazeli et al., 2016; Papadacos et al., 2013). Los sobrenadantes de las infecciones de epitelio gástrico por *H. pylori* fueron usados para ensayos de migración e invasión de linfocitos B infectados por EBV. En general, los medios condicionados obtenidos a partir de las infecciones con cepas *H. pylori* CagA positivas indujeron una mayor migración e invasión de linfocitos B EBV positivos (Figuras 4-6). Para confirmar el papel de la proteína CagA en el proceso de quimioatracción de linfocitos B infectados por EBV, se sobreexpresó esta proteína en las células AGS. Se observó que esta sobreexpresión indujo la producción de IL-8 por las células epiteliales (Figura 8), pero en concentraciones menores a las observadas tras la infección por *H. pylori*. Los medios condicionados de las células transfectadas también promovieron un reclutamiento de células Akata, aunque en una menor proporción que los medios condicionados de las infecciones.

La producción de IL-8 en células gástricas infectadas por *H. pylori* puede darse de manera independiente a la señalización de CagA. Las células epiteliales pueden reconocer los componentes de la pared bacteriana de *H. pylori*, como lipopolisacárido y peptidoglicanos, mediante receptores tipo Toll; además, el TSS4 puede traslocar varios componentes de la pared bacteriana al citoplasma de la célula epitelial, induciendo la expresión de IL-8 (O'Toole & Clyne, 2001; Sánchez-Zauco et al., 2010).

Para descartar que el fenómeno de quimioatracción de linfocitos B se debe a la síntesis de moléculas mediadoras sintetizadas por el epitelio como respuesta a PAMPs y DAMPs, se trató a la bacteria con antibiótico y las bacterias muertas fueron puestas en cocultivo con células AGS. Los medios condicionados de este cocultivo no aumentaron de manera significativa la capacidad de migración de las células Akata (Figura 7), apoyando que la quimioatracción depende de una infección activa y de la secreción de componentes en respuesta a esta infección.

Es importante destacar que las células Ramos y los linfocitos B de sangre periférica no migraron hacia los medios condicionados de la infección por *H. pylori* (Figuras 10-11). En conjunto, estos resultados sugieren que es necesaria una infección activa por *H. pylori* y la traslocación de la proteína bacteriana CagA al citoplasma

de la célula epitelial gástrica para que la célula infectada pueda sintetizar las moléculas mediadoras necesarias para promover la quimioatracción de los linfocitos B. Por otra parte, la infección por EBV promueve en los linfocitos B infectados la expresión de CXCR2, el receptor de IL-8. Esto sugiere que la infección por *H. pylori* va a promover el enriquecimiento de linfocitos infectados por el virus en el estroma del epitelio gástrico lesionado por la bacteria. Hasta el momento, este es el primer mecanismo de quimioatracción de linfocitos B infectados por EBV mediado por *H. pylori*.

Con base en los análisis bioinformáticos realizados (Figuras 12 y 13), se probó el papel de la IL-8 como molécula quimioatrayente de linfocitos B infectados por EBV. Los ensayos de migración con rIL-8 mostraron que la migración de estos linfocitos es dependiente de la concentración de IL-8 usada, sin embargo, el número de células quimioatraídas con rIL-8 fue menor al obtenido usando los medios condicionados de la infección con *H. pylori* (Figura 14). Cuando se silenció IL-8 en células gástricas previo a su infección por *H. pylori* no se suprimió por completo la migración de linfocitos B positivos a EBV (Figura 17). Esto, aunado al enriquecimiento de quimiocinas y receptores en pacientes con CGaEBV y la diferencia entre los números de células quimioatraídas por los medios condicionados y la rIL-8 sugieren que la IL-8 es una molécula que promueve la quimioatracción de los linfocitos B infectados por EBV, pero esta no es la única molécula responsable de este fenómeno.

La IL-8 es una quimiocina que puede ser sintetizada por distintos tipos de células, como linfocitos, neutrófilos, macrófagos, células endoteliales y epiteliales. Típicamente atrae y activa neutrófilos, favoreciendo su extravasación y la fagocitosis en el sitio de inflamación (Matsushima et al., 2022). Durante su proceso de maduración, los linfocitos B tienen que migrar a diferentes nichos especializados definidos por células estromales, que aseguran que los linfocitos B en desarrollo recibirán las señales necesarias para continuar con su diferenciación, este movimiento está mediado por diferentes quimiocinas como CXCL12, CXCL13, CCL19, CCL21 y CXCL10 (Hauser & Höpken, 2015).

Al ser un componente clave de la respuesta inmune innata, la IL-8 también está involucrada en el desarrollo de enfermedades inflamatorias, como psoriasis, artritis reumatoide y asma, además induce la angiogénesis y promueve la progresión de diferentes tipos de cáncer, incluyendo el CG (Ha et al., 2017). Particularmente en el CG, se ha visto que altos niveles de IL-8 correlacionan con una peor prognosis, además de que la IL-8 inhibe a los linfocitos T CD8 induciendo la expresión de PD-L1 en macrófagos (C. Lin et al., 2019). Finalmente, se ha reportado que el polimorfismo -251A/T en la región promotora del gen de IL-8 está asociado con un riesgo mayor de desarrollar CG (Zhang et al., 2015).

La base de datos en línea publicada por Mrozek-Gorska y colaboradores contiene datos transcriptómicos de linfocitos B naïve recién infectados por EBV, en esta base de datos se encontró que los linfocitos B aumentan la expresión de CXCR2 (Figura 18), uno de los receptores de IL-8. Esta observación se confirmó midiendo la expresión de CXCR2 en células Akata y Ramos (Figura 19).

CXCR1 y CXCR2 son dos receptores transmembranales que están unidos a proteínas G, su activación puede prender vías como PLC, MAPK, ERK y PI3K (Matsushima et al., 2022). Se evaluó la activación de ERK1/2 y p38, encontrando que las células Akata pretratadas con rIL-8 mostraron fosforilación de ambas proteínas evaluadas, mientras que en las células Ramos estas proteínas de señalización no se activaron. Esto sugiere que la señalización en linfocitos B positivos a EBV es a través de CXCR2, que activa las vías ERK1/2 y p38, que usualmente están involucradas en procesos como migración, invasión, supervivencia y proliferación celular (Ha et al., 2017).

En conjunto, estos resultados permiten plantear un escenario, en donde la infección por EBV aumenta la expresión de CXCR2 en linfocitos B, lo que le confiere la capacidad de migrar hacia un gradiente de IL-8. Este fenómeno podría explicar la interacción entre EBV y las bacterias *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Ambos patógenos son residentes normales de la boca, pero en condiciones de disbiosis pueden causar periodontitis. Un metaanálisis de herpesvirus en periodontitis encontró que EBV se encuentra en menos del 10% de muestras de periodonto sano, pero en casos de periodontitis crónica y agresiva

puede encontrarse hasta en el 32% y 45% de las muestras (Slots, 2015). Estudios *in vitro* han demostrado que la infección por *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* en células de epitelio oral aumentan la producción de IL-8, lo que podría explicar el reclutamiento de EBV a las bolsas periodontales (Dickinson et al., 2011; Guentsch et al., 2010; Yee et al., 2014).

Este estudio demuestra, por primera vez, un posible mecanismo de reclutamiento de linfocitos B infectados por EBV mediado por IL-8 como respuesta a la infección por *H. pylori*. Este mecanismo podría explicar la llegada de EBV al estómago, sin embargo, hace falta esclarecer el mecanismo específico por el cual el virus se reactiva e infecta a las células epiteliales. Otro aspecto que es importante esclarecer es la participación de EBV en el proceso de carcinogénesis. Si bien se sabe cómo influyen las proteínas virales en este proceso en linfocitos B, la expresión de proteínas virales en CGaEBV es heterogénea, LMP2A se ha detectado en algunos casos de CGaEBV mientras que LMP1 no se ha detectado en la mayoría de los estudios (Morales-Sanchez & Fuentes-Panana, 2017). Dado que la evidencia serológica señala que EBV se reactiva y participa en el establecimiento de lesiones inflamatorias muy tempranas también es necesario explorar el papel de EBV como un agente carcinógeno indirecto, que al igual que *H. pylori*, favorece el establecimiento de una inflamación crónica en el estómago, que también podría estar dañando al epitelio gástrico y promoviendo el desarrollo de lesiones inflamatorias avanzadas.

Conclusiones

Los resultados de este trabajo sugieren que la IL-8 producida por células de epitelio gástrico como respuesta a la infección por *H. pylori* es capaz de quimioatraer linfocitos B infectados por EBV. Esta quimioatracción también se ve favorecida por EBV, ya que al infectar a los linfocitos B aumenta la expresión de CXCR2, receptor de la IL-8. Finalmente, esta señalización se da a través de las vías ERK1/2 y MAPK. Si bien se encontró que la IL-8 es un agente quimiotáctico de linfocitos B EBV positivos, esta quimiocina no es la única responsable de su quimioatracción, por lo que es necesario explorar qué otras citocinas, quimiocinas o moléculas intermediarias están involucradas en este fenómeno.

Referencias bibliográficas

- Abusalah, M. A. H., Gan, S. H., Al-Hatamleh, M. A. I., Irekeola, A. A., Shueb, R. H., & Yean Yean, C. (2020). Recent Advances in Diagnostic Approaches for Epstein–Barr Virus. *Pathogens*, 9(3), 226. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030226>
- Ajani, J. A., Lee, J., Sano, T., Janjigian, Y. Y., Fan, D., & Song, S. (2017). Gastric adenocarcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.36>
- Argent, R. H., Hale, J. L., El-Omar, E. M., & Atherton, J. C. (2008). Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. *Journal of Medical Microbiology*, 57(Pt 9), 1062-1067. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/001818-0>
- Balfour, H. H., Dunmire, S. K., & Hogquist, K. A. (2015). Infectious mononucleosis. *Clinical & Translational Immunology*, 4(2), e33. <https://doi.org/10.1038/cti.2015.1>
- Bergbauer, M., Kalla, M., Schmeinck, A., Göbel, C., Rothbauer, U., Eck, S., Benet-Pagès, A., Strom, T. M., & Hammerschmidt, W. (2010). CpG-methylation regulates a class of Epstein-Barr virus promoters. *PLoS Pathogens*, 6(9), e1001114. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001114>
- Brown, J. S., Amend, S. R., Austin, R. H., Gatenby, R. A., Hammarlund, E. U., & Pienta, K. J. (2023). Updating the Definition of Cancer. *Molecular Cancer Research: MCR*, 21(11), 1142-1147. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0411>
- Cancer Genome Atlas Research Network. (2014). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513(7517), 202-209. <https://doi.org/10.1038/nature13480>
- Cárdenas-Mondragón, M. G., Carreón-Talavera, R., Camorlinga-Ponce, M., Gomez-Delgado, A., Torres, J., & Fuentes-Pananá, E. M. (2013). Epstein Barr Virus and *Helicobacter pylori* Co-Infection Are Positively Associated with Severe

- Gastritis in Pediatric Patients. *PLoS ONE*, 8(4), e62850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062850>
- Cárdenas-Mondragón, M. G., Torres, J., Flores-Luna, L., Camorlinga-Ponce, M., Carreón-Talavera, R., Gomez-Delgado, A., Kasamatsu, E., & Fuentes-Pananá, E. M. (2015). Case–control study of Epstein–Barr virus and *Helicobacter pylori* serology in Latin American patients with gastric disease. *British Journal of Cancer*, 112(12), 1866-1873. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.175>
- Cárdenas-Mondragón, M. G., Torres, J., Sánchez-Zauco, N., Gómez-Delgado, A., Camorlinga-Ponce, M., Maldonado-Bernal, C., & Fuentes-Pananá, E. M. (2017). Elevated Levels of Interferon- γ Are Associated with High Levels of Epstein-Barr Virus Reactivation in Patients with the Intestinal Type of Gastric Cancer. *Journal of Immunology Research*, 2017, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2017/7069242>
- Chen, Y., Lun, A. T. L., & Smyth, G. K. (2016). From reads to genes to pathways: Differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline. *F1000Research*, 5, 1438. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8987.2>
- Cheek, Y. Y., Lee, C. Y. Q., Cheong, H. C., Vadivelu, J., Looi, C. Y., Abdullah, S., & Wong, W. F. (2021). An Overview of *Helicobacter pylori* Survival Tactics in the Hostile Human Stomach Environment. *Microorganisms*, 9(12), 2502. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122502>
- Cohen, J. I., Fauci, A. S., Varmus, H., & Nabel, G. J. (2011). Epstein-Barr Virus: An Important Vaccine Target for Cancer Prevention. *Science translational medicine*, 3(107), 107fs7. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002878>
- Conteduca, V., Sansonno, D., Lauletta, G., Russi, S., Ingravallo, G., & Dammacco, F. (2013). H. pylori infection and gastric cancer: State of the art (review). *International Journal of Oncology*, 42(1), 5-18. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1701>
- Correa, P. (2013). Gastric cancer: Overview. *Gastroenterology Clinics of North America*, 42(2), 211-217. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2013.01.002>

- Correa, P., & Piazuelo, M. B. (2012). The gastric precancerous cascade. *Journal of Digestive Diseases*, 13(1), 2-9. <https://doi.org/10.1111/j.1751-2980.2011.00550.x>
- De Re, V., Caggiari, L., De Zorzi, M., Fanotto, V., Miolo, G., Puglisi, F., Cannizzaro, R., Canzonieri, V., Steffan, A., Farruggia, P., Lopci, E., d'Amore, E. S. G., Burnelli, R., Mussolin, L., & Mascarin, M. (2020). Epstein-Barr virus BART microRNAs in EBV- associated Hodgkin lymphoma and gastric cancer. *Infectious Agents and Cancer*, 15, 42. <https://doi.org/10.1186/s13027-020-00307-6>
- Del Moral-Hernández, O., Castañón-Sánchez, C. A., Reyes-Navarrete, S., Martínez-Carrillo, D. N., Betancourt-Linares, R., Jiménez-Wences, H., de la Peña, S., Román-Román, A., Hernández-Sotelo, D., & Fernández-Tilapa, G. (2019). Multiple infections by EBV, HCMV and *Helicobacter pylori* are highly frequent in patients with chronic gastritis and gastric cancer from Southwest Mexico: An observational study. *Medicine*, 98(3), e14124. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000014124>
- Dickinson, B. C., Moffatt, C. E., Hagerty, D., Whitmore, S. E., Brown, T. A., Graves, D. T., & Lamont, R. J. (2011). Interaction of oral bacteria with gingival epithelial cell multilayers. *Molecular Oral Microbiology*, 26(3), 210-220. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2011.00609.x>
- Fazeli, Z., Alebouyeh, M., Rezaei Tavirani, M., Azimirad, M., & Yadegar, A. (2016). *Helicobacter pylori* CagA induced interleukin-8 secretion in gastric epithelial cells. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, 9(Suppl1), S42-S46.
- Fekadu, S., Kanehiro, Y., Kartika, A. V., Hamada, K., Sakurai, N., Mizote, T., Akada, J., Yamaoka, Y., Iizasa, H., & Yoshiyama, H. (2021). Gastric epithelial attachment of *Helicobacter pylori* induces EphA2 and NMHC-IIA receptors for Epstein-Barr virus. *Cancer Science*, 112(11), 4799-4811. <https://doi.org/10.1111/cas.15121>
- Felipe, A. V., Silva, T. D., Pimenta, C. A., Kassab, P., & Forones, N. M. (2012). Interleukin-8 gene polymorphism and susceptibility to gastric cancer in a

- brazilian population. *Biological Research*, 45(4), 369-374.
<https://doi.org/10.4067/S0716-97602012000400007>
- Ferlay, J., M Ervik, F Lam, M Laversanne, M Colombet, L Mery, M Piñeros, A Znaor, I Soerjomataram, & F Bray. (2024). *Global Cancer Observatory: Cancer Today (Version 1.1)*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Recuperado 15 de marzo de 2024, de <https://gco.iarc.who.int/today>
- Fontes-Lemus, J. I., Zhao, I., Rabkin, C. S., & Fuentes-Pananá, E. M. (2023). Antibodies Against Epstein–Barr Virus as Disease Markers of Gastric Cancer: A Systematic Review. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 22, 153303382311698. <https://doi.org/10.1177/15330338231169875>
- Guentsch, A., Rönnebeck, M., Puklo, M., Preshaw, P. M., Pfister, W., & Eick, S. (2010). Influence of serum on interaction of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 with an epithelial cell line. *Journal of Periodontal Research*, 45(2), 229-238. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2009.01224.x>
- Ha, H., Debnath, B., & Neamati, N. (2017). Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. *Theranostics*, 7(6), 1543-1588. <https://doi.org/10.7150/thno.15625>
- Hatakeyama, M. (2004). Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nature Reviews. Cancer*, 4(9), 688-694. <https://doi.org/10.1038/nrc1433>
- Hauser, A. E., & Höpken, U. E. (2015). Chapter 12—B Cell Localization and Migration in Health and Disease. En F. W. Alt, T. Honjo, A. Radbruch, & M. Reth (Eds.), *Molecular Biology of B Cells (Second Edition)* (pp. 187-214). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397933-9.00012-6>
- Herrera, V., & Parsonnet, J. (2009). *Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(11), 971-976. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03031.x>
- Huang, R. J., Koh, H., Hwang, J. H., & Summit Leaders. (2020). A Summary of the 2020 Gastric Cancer Summit at Stanford University. *Gastroenterology*, 159(4), 1221-1226. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.05.100>

- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2004). Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 83, 1-1438.
- International Agency for Research on Cancer. (1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 61, 1-241.
- International Agency for Research on Cancer. (1997). Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 70, 1-492.
- Joossens, J. V., Hill, M. J., Elliott, P., Stamler, R., Lesaffre, E., Dyer, A., Nichols, R., & Kesteloot, H. (1996). Dietary salt, nitrate and stomach cancer mortality in 24 countries. European Cancer Prevention (ECP) and the INTERSALT Cooperative Research Group. *International Journal of Epidemiology*, 25(3), 494-504. <https://doi.org/10.1093/ije/25.3.494>
- Kamangar, F., Sheikhattari, P., & Mohebtash, M. (2011). *Helicobacter pylori* and its effects on human health and disease. *Archives of Iranian Medicine*, 14(3), 192-199. <https://doi.org/011143/AIM.0010>
- Kim, J. Y., Bae, B.-N., Kang, G., Kim, H.-J., & Park, K. (2017). Cytokine expression associated with *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus infection in gastric carcinogenesis. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 125(9), 808-815. <https://doi.org/10.1111/apm.12725>
- Knipe, D. M., & Howley, P. (2013). *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Kusters, J. G., van Vliet, A. H. M., & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 449-490. <https://doi.org/10.1128/CMR.00054-05>
- Laurén, P. (1965). The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and so-Called Intestinal-Type Carcinoma. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 64(1), 31-49. <https://doi.org/10.1111/apm.1965.64.1.31>
- Li, Y., Choi, H., Leung, K., Jiang, F., Graham, D. Y., & Leung, W. K. (2023). Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection between 1980 and 2022: A

- systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*, 8(6), 553-564. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(23\)00070-5](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(23)00070-5)
- Lin, C., He, H., Liu, H., Li, R., Chen, Y., Qi, Y., Jiang, Q., Chen, L., Zhang, P., Zhang, H., Li, H., Zhang, W., Sun, Y., & Xu, J. (2019). Tumour-associated macrophages-derived CXCL8 determines immune evasion through autonomous PD-L1 expression in gastric cancer. *Gut*, 68(10), 1764-1773. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316324>
- Lin, Y., Docherty, S. L., Porter, L. S., & Bailey, D. E. (2020). Common and Co-Occurring Symptoms Experienced by Patients With Gastric Cancer. *Oncology Nursing Forum*, 47(2), 187-202. <https://doi.org/10.1188/20.ONF.187-202>
- Loh, M., Koh, K. X., Yeo, B. H., Song, C. M., Chia, K. S., Zhu, F., Yeoh, K. G., Hill, J., Iacopetta, B., & Soong, R. (2009). Meta-analysis of genetic polymorphisms and gastric cancer risk: Variability in associations according to race. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 45(14), 2562-2568. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.03.017>
- Machlowska, J., Baj, J., Sitarz, M., Maciejewski, R., & Sitarz, R. (2020). Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), E4012. <https://doi.org/10.3390/ijms21114012>
- Marshall, B. J., & Warren, J. R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet (London, England)*, 1(8390), 1311-1315. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)91816-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)91816-6)
- Martínez-López, J., Torres, J., Camorlinga-Ponce, M., Mantilla, A., Leal, Y., & Fuentes-Pananá, E. (2014). Evidence of Epstein-Barr Virus Association with Gastric Cancer and Non-Atrophic Gastritis. *Viruses*, 6(1), 301-318. <https://doi.org/10.3390/v6010301>
- Maruo, S., Yang, L., & Takada, K. (2001). Roles of Epstein-Barr virus glycoproteins gp350 and gp25 in the infection of human epithelial cells. *The Journal of General Virology*, 82(Pt 10), 2373-2383. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-10-2373>

- Matsushima, K., Yang, D., & Oppenheim, J. J. (2022). Interleukin-8: An evolving chemokine. *Cytokine*, 153, 155828. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155828>
- Minoura-Etoh, J., Gotoh, K., Sato, R., Ogata, M., Kaku, N., Fujioka, T., & Nishizono, A. (2006). *Helicobacter pylori*-associated oxidant monochloramine induces reactivation of Epstein-Barr virus (EBV) in gastric epithelial cells latently infected with EBV. *Journal of Medical Microbiology*, 55(Pt 7), 905-911. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46580-0>
- Morales-Sanchez, A., & Fuentes-Panana, E. M. (2017). Epstein-Barr Virus-associated Gastric Cancer and Potential Mechanisms of Oncogenesis. *Current Cancer Drug Targets*, 17(6), 534-554. <https://doi.org/10.2174/1568009616666160926124923>
- Moy, K. A., Fan, Y., Wang, R., Gao, Y.-T., Yu, M. C., & Yuan, J.-M. (2010). Alcohol and tobacco use in relation to gastric cancer: A prospective study of men in Shanghai, China. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 19(9), 2287-2297. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0362>
- Mrozek-Gorska, P., Buschle, A., Pich, D., Schwarzmayr, T., Fechtner, R., Scialdone, A., & Hammerschmidt, W. (2019). Epstein-Barr virus reprograms human B lymphocytes immediately in the prelatent phase of infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(32), 16046-16055. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901314116>
- Murata, T., Sugimoto, A., Inagaki, T., Yanagi, Y., Watanabe, T., Sato, Y., & Kimura, H. (2021). Molecular Basis of Epstein-Barr Virus Latency Establishment and Lytic Reactivation. *Viruses*, 13(12), 2344. <https://doi.org/10.3390/v13122344>
- Murata-Kamiya, N., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Yamahashi, Y., Saito, Y., Higashi, H., Aburatani, H., Akiyama, T., Peek, R. M., Azuma, T., & Hatakeyama, M. (2007). *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric

- epithelial cells. *Oncogene*, 26(32), 4617-4626.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210251>
- Naito, M., Yamazaki, T., Tsutsumi, R., Higashi, H., Onoe, K., Yamazaki, S., Azuma, T., & Hatakeyama, M. (2006). Influence of EPIYA-Repeat Polymorphism on the Phosphorylation-Dependent Biological Activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology*, 130(4), 1181-1190.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.12.038>
- Oleastro, M., & Ménard, A. (2013). The Role of *Helicobacter pylori* Outer Membrane Proteins in Adherence and Pathogenesis. *Biology*, 2(3), 1110-1134.
<https://doi.org/10.3390/biology2031110>
- O'Toole, P. W., & Clyne, M. (2001). Cell Envelope. En H. L. Mobley, G. L. Mendz, & S. L. Hazell (Eds.), *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. ASM Press.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2462/>
- Pandey, S., Jha, H. C., Shukla, S. K., Shirley, M. K., & Robertson, E. S. (2018). Epigenetic Regulation of Tumor Suppressors by *Helicobacter pylori* Enhances EBV-Induced Proliferation of Gastric Epithelial Cells. *mBio*, 9(2), e00649-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00649-18>
- Papadakos, K. S., Sougleri, I. S., Mentis, A. F., Hatziloukas, E., & Sgouras, D. N. (2013). Presence of terminal EPIYA phosphorylation motifs in *Helicobacter pylori* CagA contributes to IL-8 secretion, irrespective of the number of repeats. *PLoS One*, 8(2), e56291.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056291>
- Park, J. Y., Forman, D., Waskito, L. A., Yamaoka, Y., & Crabtree, J. E. (2018). Epidemiology of *Helicobacter pylori* and CagA-Positive Infections and Global Variations in Gastric Cancer. *Toxins*, 10(4), Article 4.
<https://doi.org/10.3390/toxins10040163>
- Parkin, D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal of Cancer*, 118(12), 3030-3044.
<https://doi.org/10.1002/ijc.21731>
- Pinheiro, H., Oliveira, C., Seruca, R., & Carneiro, F. (2014). Hereditary diffuse gastric cancer—Pathophysiology and clinical management. *Best Practice &*

- Research. Clinical Gastroenterology*, 28(6), 1055-1068.
<https://doi.org/10.1016/j.bpg.2014.09.007>
- Planet, E. (2022). *phenoTest: Tools to test association between gene expression and phenotype in a way that is efficient, structured, fast and scalable. We also provide tools to do GSEA (Gene set enrichment analysis) and copy number variation.* (1.46.0) [Software]. Bioconductor version: Release (3.16).
<https://doi.org/10.18129/B9.bioc.phenoTest>
- Saju, P., Murata-Kamiya, N., Hayashi, T., Senda, Y., Nagase, L., Noda, S., Matsusaka, K., Funata, S., Kunita, A., Urabe, M., Seto, Y., Fukayama, M., Kaneda, A., & Hatakeyama, M. (2016). Host SHP1 phosphatase antagonizes *Helicobacter pylori* CagA and can be downregulated by Epstein-Barr virus. *Nature Microbiology*, 1, 16026. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.26>
- Sánchez-Ponce, Y., & Fuentes-Pananá, E. M. (2021). The Role of Coinfections in the EBV–Host Broken Equilibrium. *Viruses*, 13(7), 1399.
<https://doi.org/10.3390/v13071399>
- Sánchez-Zauco, N. A., Giono-Cerezo, S., & Maldonado-Bernal, C. (2010). Receptores tipo Toll, patogénesis y respuesta inmune a *Helicobacter pylori*. *Salud Pública de México*, 52(5), 447-454.
- Setia, N., Clark, J. W., Duda, D. G., Hong, T. S., Kwak, E. L., Mullen, J. T., & Lauwers, G. Y. (2015). Familial Gastric Cancers. *The Oncologist*, 20(12), 1365-1377. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0205>
- Shah, D., & Bentrem, D. (2022). Environmental and genetic risk factors for gastric cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 125(7), 1096-1103.
<https://doi.org/10.1002/jso.26869>
- Shair, K. H. Y., Schnegg, C. I., & Raab-Traub, N. (2008). EBV Latent Membrane Protein 1 Effects on Plakoglobin, Cell Growth, and Migration. *Cancer Research*, 68(17), 6997-7005. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1178>
- Slots, J. (2015). Periodontal herpesviruses: Prevalence, pathogenicity, systemic risk. *Periodontology 2000*, 69(1), 28-45. <https://doi.org/10.1111/prd.12085>

- Su, C., Padra, M., Constantino, M. A., Sharba, S., Thorell, A., Lindén, S. K., & Bansil, R. (2018). Influence of the viscosity of healthy and diseased human mucins on the motility of *Helicobacter pylori*. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27732-3>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Thorley-Lawson, D. A. (2015). EBV Persistence—Introducing the Virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 390(Pt 1), 151-209. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_8
- Thrift, A. P., Wenker, T. N., & El-Serag, H. B. (2023). Global burden of gastric cancer: Epidemiological trends, risk factors, screening and prevention. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 20(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/s41571-023-00747-0>
- Wang, J., Duncan, D., Shi, Z., & Zhang, B. (2013). WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): Update 2013. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue), W77-83. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt439>
- Wong, Y., Meehan, M. T., Burrows, S. R., Doolan, D. L., & Miles, J. J. (2022). Estimating the global burden of Epstein–Barr virus-related cancers. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 148(1), 31-46. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03824-y>
- World Health Organization. (2023). *World health statistics 2023: Monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals*. World Health Organization.
- Yang, J.-P., Hyun, M.-H., Yoon, J.-M., Park, M.-J., Kim, D., & Park, S. (2014). Association between TNF- α -308 G/A gene polymorphism and gastric cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine*, 70(2), 104-114. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.07.005>
- Yee, M., Kim, S., Sethi, P., Düzgüneş, N., & Konopka, K. (2014). Porphyromonas gingivalis stimulates IL-6 and IL-8 secretion in GSMK-K, HSC-3 and H413

oral epithelial cells. *Anaerobe*, 28, 62-67.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.05.011>

- Yin, H., Qu, J., Peng, Q., & Gan, R. (2019). Molecular mechanisms of EBV-driven cell cycle progression and oncogenesis. *Medical Microbiology and Immunology*, 208(5), 573-583. <https://doi.org/10.1007/s00430-018-0570-1>
- Zamani, M., Ebrahimitabar, F., Zamani, V., Miller, W. H., Alizadeh-Navaei, R., Shokri-Shirvani, J., & Derakhshan, M. H. (2018). Systematic review with meta-analysis: The worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 47(7), 868-876. <https://doi.org/10.1111/apt.14561>
- Zhang, Y., Zeng, X., Lu, H., Li, Y., & Ji, H. (2015). Association between Interleukin-8-251A/T polymorphism and gastric cancer susceptibility: A meta-analysis based on 5286 cases and 8000 controls. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(12), 22393-22402.
- Zhao, Y., Zhang, J., Cheng, A. S. L., Yu, J., To, K. F., & Kang, W. (2020). Gastric cancer: Genome damaged by bugs. *Oncogene*, 39(17), 3427-3442. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1241-4>