



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

**“Efecto de las vesículas secretadas por *Helicobacter pylori*
sobre las células ductales pancreáticas”**

T E S I S

Que presenta

BIOL. RICARDO GASPAR LINO

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

Directoras de la Tesis:

**Dra. Abigail Betanzos Fernández
Dra. Norma Velázquez Guadarrama**

Ciudad de México

Junio, 2019

INDICE

I.	LISTA DE ABREVIATURAS	3
II.	ABSTRACT	5
III.	RESUMEN	7
IV.	INTRODUCCIÓN	9
1.	Generalidades.....	9
2.	Factores de virulencia de <i>H. pylori</i>	10
3.	Vesículas	20
4.	Biopelícula	21
5.	Enfermedades causadas por <i>H. pylori</i>	22
6.	Características de los epitelios.....	26
V.	ANTECEDENTES.....	33
VI.	JUSTIFICACIÓN.....	38
VII.	HIPÓTESIS.....	38
VIII.	OBJETIVO GENERAL	39
IX.	OBJETIVOS PARTICULARES	39
X.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	39
XI.	METODOLOGÍA.....	40
XII.	RESULTADOS.....	47
XIII.	DISCUSIÓN.....	73
XIV.	CONCLUSIONES	81
XV.	BIBLIOGRAFIA.....	82

I. LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Asociación Americana de Diabetes
BabA	Adhesina de unión al antígeno sanguíneo
CagA	Citotoxina asociada al gen A
CUI	Complejo de Unión Intercelular
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes mellitus Tipo 2
DSM	Desmosoma
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HbA1c	Hemoglobina glicada
HtrA	Proteína A de alto requerimiento de temperatura
IARC	Agencia Internacional de búsqueda de Cáncer
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IF	Inmunofluorescencia OcIn Ocludina
LPS	Lipopolisacárido
OMS	Organización Mundial de la Salud (WHO en inglés)
OipA	Proteína A inflamatoria externa
PAI	isla de patogenicidad
PBS	Buffer de fosfatos
PLC	fosfolipasa C
ROI	Especies reactivas de oxígeno
RPTP	proteína tirosina fosfatasa
RET	Resistencia Eléctrica Transepitelial
SabA	Adhesina de unión a ácido siálico
SST4	Sistema de secreción tipo IV

TRITC Isotiocianato de tetrametil rodamina
UA Unión Adherente
UE Unión Estrecha
UIC Uniones Intercelulares
VacA Citotoxina Vacuolizante
VME Vesículas de Membrana Externa
WB Western Blot
WGO Organización mundial de gastroenterología
ZO Zonula Ocludens

II. ABSTRACT

Helicobacter pylori infection is a global public health problem, affecting 50% of the world population and in Mexico, 90% of adults. This Gram-negative bacterium has the gastric epithelium as a natural niche, where it mainly causes gastritis and peptic ulcers. *Helicobacter pylori* infection is a global public health problem, affecting 50% of the world population and in Mexico, 90% of adults. This Gram-negative bacterium has the gastric epithelium as a natural niche, where it mainly causes gastritis and peptic ulcers. Virulence factors that have been most studied so far are CagA, VacA, HtrA, urease and adhesins, which together induce serious disruption of intercellular junctions and generally in cell morphology. Recently, the presence of this bacterium in other organs has been described, associating with various types of pathologies, including cardiovascular, hematological, neurological, hepatobiliary, autoimmune thyroidism, sideropenic anemia, pancreatitis and diabetes mellitus, among others. CagA, VacA, HtrA, urease and adhesins, which together induce serious alterations in intercellular junctions and in general in cell morphology. Recently, the presence of this bacterium in other organs has been described, associating with various types of pathologies, including cardiovascular, hematological, neurological, hepatobiliary, autoimmune thyroidism, sideropenic anemia, pancreatitis and diabetes mellitus, among others. There is great discussion about the mechanisms of how *H. pylori* becomes extragastric and its participation in the development of these diseases. Among the hypotheses proposed, it is considered that secreted virulence factors are responsible for reaching the different organs. In this regard, it is known that these factors are released in outer membrane vesicles (VME), which contain CagA, VacA, HtrA, urease subunits, outer membrane proteins and adhesins. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of *H. pylori* secreted by VME on BxPC-3 epithelial cells derived from human pancreatic ductal adenocarcinoma and, as a control, AGS cells derived from human gastric adenocarcinoma were used. First, the vesicle isolation protocol was standardized from the bacterial culture in biphasic medium, which gave good performance and degree of purity. By transmission electron microscopy, it was observed that the isolated VMEs presented double membrane and the expected size (96-137 nm). In addition, using SDS-PAGE gels

stained with Coomassie solution, the presence of bacterial proteins in these vesicles was determined. Among these proteins was found the cytotoxin CagA, which by immunogold labeling, was located in the membrane of the vesicles. The BxPC-3 cells incubated with 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of the vesicular fraction, showed significant morphological changes (separation, rounding, elongation and cellular turgor), observed by optical microscopy; although they did not present the hummingbird phenotype, as did the gastric cells. Through immunofluorescence and confocal microscopy assays, it was determined that the phosphorylated CagA protein is able to internalize in pancreatic cells and is probably responsible for rearrangements of the cytoskeleton, observed by staining with phalloidin. Additionally, treatment with VME decreased the transepithelial electrical resistance of BxPC-3 cells by approximately 30%, indicating an increase in epithelial permeability and damage in their barrier function. These results were very similar in the AGS cells. Moreover, these cells incubated with VME increased their secretion of IL-8 to the medium by approximately 5-fold, compared to cells without treatment. Finally, cytopathic assays determined that the vesicles were able to degrade the epithelial monolayers (BxPC-3 and AGS) by almost 80%. In conclusion, the results of this work indicate that the vesicles contain phosphorylated CagA, which is able to phosphorylate and internalize in pancreatic cells, and together with other bacterial factors rearrange the actin cytoskeleton, modify cell morphology, epithelial permeability and finally they cause widespread cellular damage. In addition, these findings offer a possible mechanism of pancreatic damage, originally produced in the stomach.

III. RESUMEN

La infección por *Helicobacter pylori* es un problema de salud pública mundial, afectando al 50% de la población mundial y en México, al 90% de adultos. Esta bacteria Gram-negativa tiene como nicho natural el epitelio gástrico, donde causa principalmente gastritis y úlceras pépticas. Los factores de virulencia que más se han estudiado hasta el momento son CagA, VacA, HtrA, ureasa y adhesinas, los cuales en conjunto inducen alteraciones serias en las uniones intercelulares y en general en la morfología celular. Recientemente, se ha descrito la presencia de esta bacteria en otros órganos, asociándose con diversos tipos de patologías, incluyendo enfermedades cardiovasculares, hematológicas, neurológicas, hepatobiliares, tiroidismo autoinmune, anemia sideropénica, pancreatitis y diabetes mellitus, entre otras. Existe gran discusión sobre los mecanismos de cómo *H. pylori* se vuelve extragástrica y su participación en el desarrollo de estas enfermedades. Entre las hipótesis propuestas, se considera que los factores de virulencia secretados son los responsables de alcanzar los diferentes órganos. Al respecto, se sabe que estos factores son liberados en vesículas de membrana externa (VME), las cuales contienen CagA, VacA, HtrA, subunidades de ureasa, proteínas de membrana externa y adhesinas. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de las VME secretadas por *H. pylori* sobre las células epiteliales BxPC-3 derivadas de adenocarcinoma ductal pancreático humano y, como control se emplearon células AGS, derivadas de adenocarcinoma gástrico humano. En primer lugar, se estandarizó el protocolo de aislamiento de vesículas a partir del cultivo bacteriano en medio bifásico, el cual dio buen rendimiento y grado de pureza. Mediante microscopía electrónica de transmisión, se observó que las VME aisladas presentaron doble membrana y el tamaño esperado (96-137 nm). Además, mediante geles SDS-PAGE teñidos con solución de Coomassie, se determinó la presencia de proteínas bacterianas en estas vesículas. Entre estas proteínas se encontró a la citotoxina CagA, la cual a través de inmunomarcaje con oro coloidal, se localizó en la membrana de las vesículas. Las células BxPC-3 incubadas con 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de la fracción vesicular, mostraron cambios morfológicos significativos (separación, redondeamiento, elongación y turgencia celular), observados mediante microscopía óptica; aunque no presentaron el fenotipo

colibrí, como lo hicieron las células gástricas. A través de ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal, se determinó que la proteína CagA fosforilada es capaz de internalizarse en las células pancreáticas y probablemente sea la responsable de los rearrreglos del citoesqueleto, observados mediante la tinción con faloidina. Adicionalmente, el tratamiento con las VME disminuyó la resistencia eléctrica transepitelial de las células BxPC-3 en aproximadamente 30%, indicando un incremento en la permeabilidad epitelial y daño en su función de barrera. Estos resultados fueron muy similares en las células AGS. Más aún, estas células incubadas con VME incrementaron su secreción de IL-8 al medio en aproximadamente 5 veces, con respecto a las células sin tratamiento. Finalmente, mediante ensayos citopáticos se determinó que las vesículas fueron capaces de degradar las monocapas epiteliales (BxPC-3 y AGS) en casi un 80%. En conclusión, los resultados de este trabajo indican que las vesículas contienen CagA fosforilada, la cual es capaz de fosforilarse e internalizarse en las células pancreáticas, y junto con otros factores bacterianos producen rearrreglos del citoesqueleto de actina, modifican la morfología celular, la permeabilidad epitelial y finalmente producen daño celular generalizado. Además, estos hallazgos ofrecen un posible mecanismo de daño pancreático, producido originalmente en el estómago.

IV. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades

Helicobacter pylori ha infectado a los seres humanos durante más de 58,000 años, siendo la responsable de varias enfermedades como gastritis, úlceras y cáncer gástrico. Sin embargo, su presencia en el hombre había pasado inadvertida, hasta que en 1982 fue cultivada por Marshall y Warren. Anteriormente, la presencia de úlceras gástricas se atribuía al estrés y a la ansiedad, pero, no se había asociado con la infección por *H. pylori* ni con la producción de cáncer. Hoy se sabe que *H. pylori* puede causar cáncer, siendo la primera bacteria descrita como agente causal de esta enfermedad. Así en 1994, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC) la clasificó como un carcinógeno del grupo I (Testerman & Morris, 2014).

H. pylori forma parte de la subdivisión ϵ , clase *Proteobacteria*, orden *Campylobacterales*, familia *Helicobacteraceae* y se reconocen 20 especies de *Helicobacter* subdivididos en dos linajes, *Helicobacter* gástrico y *Helicobacter* entero hepático, los cuales son específicos de órgano (Kusters, van Vliet, & Kuipers, 2006).

H. pylori es un bacilo helicoidal Gram-negativo, pleomórfico, mide entre 2 - 5 μm de longitud, 0.5 - 1 μm de ancho y puede poseer hasta 6 flagelos polares. Crece en condiciones microaerófilas, requiere entre 3 y 5 días de crecimiento a 37°C para su aislamiento primario y forma colonias translúcidas que van de 1 a 2 mm de diámetro (Mendoza-Elizalde et al., 2016).

H. pylori se reconoce como un problema de salud pública mundial. La infección por esta bacteria se adquiere en los primeros años de vida y está relacionada con la ubicación geográfica. *H. pylori* afecta alrededor del 50% de la población mundial, con cifras de prevalencia cercanas al 80-90% en África y Latinoamérica, y siendo inferiores en Europa y Estados Unidos (25-40%) (He, Yang, & Lu, 2014; Molina-infante, Corti, Doweck, Mcnicholl, & Gisbert, 2017).

El curso de la infección es muy variable. Todas las personas infectadas desarrollan gastritis; sin embargo, la mayoría permanecen asintomáticas, con inflamación moderada, detectable solamente por biopsia e histología. No obstante, una minoría importante de

ellos (15-20%) durante su vida desarrollan patologías gastroduodenales severas (úlceras gástricas) y de éstos, menos del 3% desarrollan cáncer gástrico (adenocarcinomas y linfomas) (He et al., 2014; Mendoza-Elizalde et al., 2016; Molina-infante et al., 2017). Se cree que los diferentes resultados de la infección ocurre por una reacción excesiva o inapropiada del huésped, por polimorfismos bacterianos y por factores ambientales (Montecucco C., 2001).

H. pylori se adquiere por la vía fecal-oral, oral o gastro-oral, después coloniza el micronicho hostil del estómago y duodeno, donde se enfrenta al moco que protege al epitelio gástrico y si no se trata efectivamente, persiste toda la vida en el hospedero. La gran mayoría de microorganismos permanecen en un estado no replicativo pero viable, lo que convierte a la bacteria en fenotípicamente resistente. Este estado de resistencia es más frecuente cuando el pH de la cámara gástrica oscila entre 3 y 6. Sin embargo, cuando el pH gástrico se incrementa por encima de 6 ó 7, la bacteria entra en un estado replicativo (He et al., 2014; Molina-infante et al., 2017).

2. Factores de virulencia de *H. pylori*

H. pylori es una bacteria especializada en colonizar el estómago humano, este último se caracteriza por poseer un pH muy ácido, una condición letal para la mayoría de los microorganismos. La adaptación de la bacteria a este ambiente desfavorable desde la primera infección, le permite establecer una infección crónica de por vida (Montecucco C., 2001). Estas capacidades hacen de *H. pylori* sea uno de los parásitos bacterianos más exitosos del ser humano.

La infección por *H. pylori* se logra a través de una combinación de factores o estrategias complejas (Figura 1). Además de evadir el ambiente ácido, la bacteria debe ser capaz de infiltrarse y penetrar la capa de mucosa viscosa, de manera que la actividad enzimática dirigida por *H. pylori* facilita su penetración en el moco. Más aún, la difusión del amoníaco en el estómago permite que *H. pylori* pueda penetrar profundamente, gracias a la propulsión en espiral otorgada por su flagelo (Abadi, 2017). Como estrategia temporal, *H. pylori* puede entrar a las células gástricas para evitar barreras físicas y químicas,

reduciendo su exposición a las condiciones ácidas, evitando la respuesta inmune y en algunos casos hasta los antibióticos. Por lo tanto, se considera que esta bacteria es un organismo intracelular facultativo, en lugar de ser un organismo exclusivamente extracelular (Abadi, 2017).

La mayoría de la infección por *H. pylori* (aproximadamente 80%) se encuentra en la mucosa gástrica. Sin embargo, se considera que hasta que las bacterias hacen contacto con el epitelio subyacente, se produce la enfermedad (Abadi, 2017; Arévalo, Trespacios, & Otero, 2009; Montecucco C., 2001). En estos eventos participan una amplia diversidad de factores de virulencia que se describirán brevemente a continuación (Tabla 1).

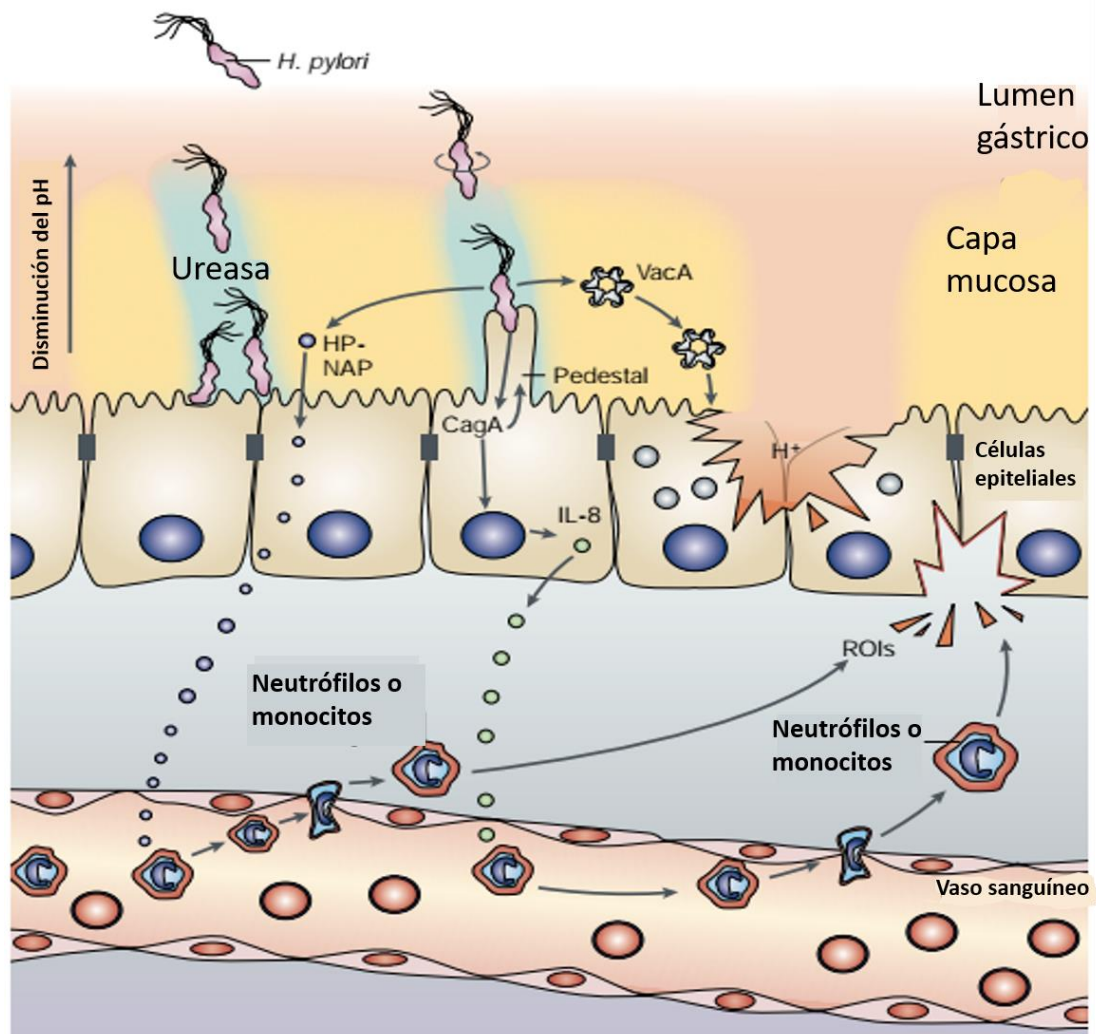


Figura 1. Mucosa estomacal colonizada por *H. pylori*. Representación esquemática de Se muestran los principales factores de virulencia implicados en la colonización y la enfermedad producida por *Helicobacter*

pylori. Durante la infección, la bacteria ingresa al lumen gástrico donde la ureasa permite su supervivencia en el ambiente ácido (el color rojo indica un ambiente fuertemente ácido, el color amarillo indica un ambiente ligeramente ácido). Con la producción de amonio se amortigua el pH del citosol y del periplasma, así como la capa superficial alrededor de la bacteria (azul claro). Los flagelos impulsan a la bacteria dentro de la capa del moco y le permiten llegar al dominio apical de las células epiteliales gástricas, a las cuales se adhiere usando adhesinas. Posteriormente, *H. pylori* inyecta a la proteína CagA en las células del huésped, mediante un sistema de secreción tipo IV y libera otros factores tóxicos, conocidos como proteínas activadoras de neutrófilos de *H. pylori* (PAN-HP) y VacA. VacA induce alteraciones de las uniones estrechas y la formación de grandes vacuolas. PAN-HP cruza el revestimiento epitelial y recluta neutrófilos y monocitos, que extravasan y causan daño tisular al liberar intermediarios de especies reactivas de oxígeno (ROI). CagA inyectada altera el citoesqueleto, induce la formación del pedestal y promueve la señalización hacia el núcleo para liberar citocinas pro-inflamatorias. En consecuencia, se amplifica la reacción inflamatoria, reclutando linfocitos e induciendo la liberación de más ROI. La actividad combinada de VacA y de los ROI, conduce a un daño tisular que aumenta al ser más laxa la capa protectora de moco y la penetración del ácido (Montecucco C., 2001).

Tabla 1. Principales factores de virulencia de *H. pylori* (Abadi, 2017).

Factor de virulencia	Función
Ureasa	Hidroliza la urea a NH ₃ y CO ₂ , crea un microambiente neutro, para que la bacteria sobreviva y se pueda replicar.
CagA	Estimula la vía NF-κB; induce apoptosis; promueve la producción de citocinas proinflamatorias; altera a las uniones estrechas de las células; e incrementa la inflamación mucosal.
VacA	Aumenta la expresión de IL-8 y causa inflamación; contribuye a la colonización a largo plazo, a la proliferación y a la elongación celular; aumenta la señalización de las MAPK.
HtrA	Corta el dominio extracelular de la E-cadherina, fibronectina, claudina 8 y la ocludina, conduciendo a la desintegración del complejo de unión intercelular y a la posterior pérdida de la adhesión intercelular en células AGS (S. Backert, Bernegger, Skórko-Glonek, & Wessler, 2018)
PME	Las Proteínas de Membrana Externa (PME) se encuentran en la membrana externa y su función radica en la adhesión a la célula hospedera para la colonización, la expresión de factores patógenos y la resistencia a antibióticos (Matsuo, Kido, & Yamaoka, 2017).

2.1. Ureasa

H. pylori puede sobrevivir en el estómago, debido a que tiene la capacidad de disminuir la acidez a un pH de 5, debido a que expresa la enzima ureasa. Está actúa de la siguiente manera: la urea gástrica es transportada desde el moco hacia el citosol bacteriano, a través de un canal específico. En el interior bacteriano, la ureasa unida al Ni²⁺ puede hidrolizar a la urea en NH₃ y CO₂, produciendo un considerable aumento del pH en el citosol,

la superficie celular e incluso en el espacio periplásmico. El amoníaco (NH_3) producido se protona para crear amonio (NH_4), lo que crea un micronicho neutro, donde la bacteria puede sobrevivir (Figura 2) (Abadi, 2017; Montecucco C., 2001).

La biosíntesis de la ureasa se rige por un grupo de siete genes, incluidos los genes que codifican para las subunidades UreA (26.5 kDa) y UreB (60.3 kDa) de la enzima y las proteínas accesorias responsables de la captación e inserción de Ni^{2+} . La ureasa es un dodecámero de seis subunidades UreA y seis UreB, dispuestas como un anillo doble de 13 nm de diámetro (Abadi, 2017; Montecucco C., 2001). Además, se ha reportado que ante condiciones ácidas desfavorables, *H. pylori* puede modular la expresión de otros genes asociados con la síntesis de amonio, entre ellos, los que codifican para la arginasa y formamidasa (Abadi, 2017).

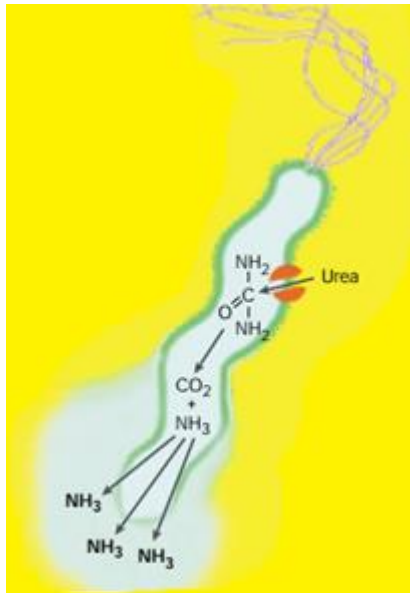


Figura 2. Ureasa de *H. pylori*. Representación esquemática de la bacteria *H. pylori*, mostrando su forma helicoidal y los flagelos polares. También se puede observar, el canal de urea regulado por H^+ y la producción de amoníaco mediada por la ureasa, lo que neutraliza el ambiente ácido (amarillo) del citosol y alrededor de la bacteria (azul claro)(Modificado de Montecucco C., 2001).

2.2. Citotoxina asociada al gen A (CagA)

CagA es uno de los factores de virulencia más estudiados. Esta proteína es codificada por gen *cagA* que pertenece a la isla de patogenicidad (PAI) de 40 kb. En esta PAI también se encuentran genes que codifican para los componentes del sistema de secreción tipo IV (SST4). Este sistema es el encargado de inyectar CagA desde el citoplasma de la bacteria al

interior de la célula blanco. Las cepas de *H. pylori* que codifican para esta proteína se han denominado cepas CagA positivas (CagA+) y son mucho más virulentas que las cepas CagA negativas (CagA-) (Kaper, 2000). El tamaño molecular de CagA es variable (128-144 kDa) y depende del número de secuencias EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) que presente, las cuales se localizan en extremo carboxilo de la proteína. De manera que CagA con una sola secuencia EPIYA tienen un peso molecular de 128 kDa; mientras que cada repetición incrementa el peso de la proteína en 4 kDa, aceptándose un máximo de 4 repeticiones (A, B, C y D) (Arévalo et al., 2009). La presencia de estas secuencias repetidas es de gran importancia, ya que podrían explicar la patogenicidad de distintas cepas de *H. pylori* (S. Backert & Selbach, 2008). Después de que CagA es inyectada a la célula hospedera, ésta se fosforila en los sitios EPIYA por tirosina cinasas de la familia Src, como SFKs. Estas cinasas controlan procesos celulares relacionados con el citoesqueleto, la proliferación celular y la diferenciación. Otras cinasas como Abl, cuyos miembros incluyen a c-Abl y Arg también fosforilan a CagA. Durante la infección por *H. pylori*, se ha descrito que estas cinasas actúan en forma y tiempo específico, Src se activa durante los estadios iniciales de la infección (0.5-2 h) y Abl se activa continuamente por la bacteria. Una vez que CagA es fosforilada, se une y activa a la tirosina fosfatasa SHP-2. CagA desregula a SHP-2, perturbando la vía Erk-MAP cinasa, así como desfosforilando a las FAK cinasas involucradas en la adhesión focal, lo que induce cambios en la morfología celular. De esa forma, la célula hospedera, adopta un fenotipo conocido como efecto colibrí. Este se caracteriza por un redondeamiento celular y la formación de una proyección que asemeja al pico de un colibrí en células de epitelio gástrico (S. Backert & Selbach, 2008).

Otros efectos de CagA independientes de la fosforilación, es el daño de las interacciones célula-célula del epitelio al asociarse con proteínas como E-cadherina, integrina β 1, ZO-1 y catenina p120, y con el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos c-Met, la fosfolipasa C (PLC)- γ , la proteína adaptadora Grb2 y la cinasa Par1. Estas asociaciones inducen la ruptura de las uniones estrechas (UEs) y causa pérdida de la polaridad en las células epiteliales, desestabilizando el complejo E-cadherina/ β -catenina de las uniones adherentes (UAs) (S. Backert & Selbach, 2008; M. Hatakeyama, 2008)

Por otra parte, se ha observado la capacidad de cepas de *H. pylori* CagA+ para inducir la producción de IL-8, debido a la activación de la vía MAPK. Esta vía regula la diferenciación, proliferación, apoptosis y respuestas al estrés e inflamatorias (Audibert, Burucoa, Janvier, & Fauchère, 2001). Además, las cepas CagA+ se asocian con las formas más graves de enfermedad y la expresión de CagA está estrechamente relacionada con la expresión de VacA (Arévalo et al., 2009).

2.3. VacA

La citotoxina inductora de vacuolas (VacA) es la principal proteína secretada por *H. pylori*, sin un homólogo conocido en otras especies bacterianas. Solamente se expresa en 65% de las cepas y se ha reportado que está asociada principalmente a la presencia de úlceras pépticas (Masanori Hatakeyama, 2004). VacA se sintetiza inicialmente como una pro-toxina de 140 kDa, con un péptido señal en el extremo N-terminal, una región central donde radica su función de toxina y, un extremo C-terminal, responsable de la función de transporte. Posterior al procesamiento, la región central (aproximadamente 88 kDa), que es la forma madura de la toxina, se secreta y se procesa en las subunidades A (33 kDa) y B (55 kDa). Ambas subunidades participan en la unión de esta proteína con la célula hospedera y en la formación de vacuolas. El mecanismo de entrada a la célula hospedera todavía no se conoce, aunque se han propuesto varios receptores y la unión con la esfingomielina parece ser crucial. En la célula epitelial, cuando VacA se une al receptor de la proteína tirosina fosfatasa (RPTP) α y β , la toxina se internaliza para formar poros y vacuolas. También se introduce en la mitocondria, donde induce la activación de la caspasa-3, promoviendo así la apoptosis celular. En cambio, cuando CagA se internaliza en los linfocitos, inhibe la proliferación de células Th 0 y la presentación de antígenos producida por los linfocitos B (Yamaoka, 2011).

2.4. Proteína A de alto requerimiento de temperatura (HtrA)

En general, las proteínas de alto requerimiento de temperatura están presentes en mamíferos y procariontes, actúan como chaperonas y serina proteasas, teniendo un

importante papel en el control de calidad de las proteínas. Las proteasas bacterianas están involucradas principalmente en la eliminación de proteínas mal plegadas. Por tal razón, las proteínas HtrA están implicadas en trastornos graves, incluyendo enfermedades como Alzheimer, artritis y cáncer (Hoy et al., 2010). Las HtrAs tienen un dominio serina proteasa de tipo tripsina altamente conservado y al menos un dominio PDZ (PSD-95/Discs-Large/ZO-1) (Hoy et al., 2010).

Estudios recientes han descrito que HtrA es un factor de virulencia de *H. pylori* secretado al espacio extracelular (Hoy et al., 2010). Cuando alcanza las uniones intercelulares de las células epiteliales, su acción radica en cortar el ectodominio de la E-cadherina. Esta proteína de la unión adherente (UA), tiene un papel crítico en la adhesión entre las células epiteliales polarizadas y es considerado un supresor tumoral. De manera, que la acción de HtrA contribuye a que *H. pylori* acceda al espacio intercelular y eventualmente perturbe la barrera (Hoy et al., 2010; Löwer et al., 2008).

2.5 Proteínas β plegadas de la membrana externa (PME)

Las proteínas β plegadas de la membrana externa (PME) se encuentran en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y tienen como funciones la importación de nutrientes y la traducción de señales desde el exterior celular. Además, desempeñan un papel fundamental en la colonización, la expresión de factores patógenos y la resistencia a antibióticos (Figura 3 y Tabla 2) (Matsuo et al., 2017).

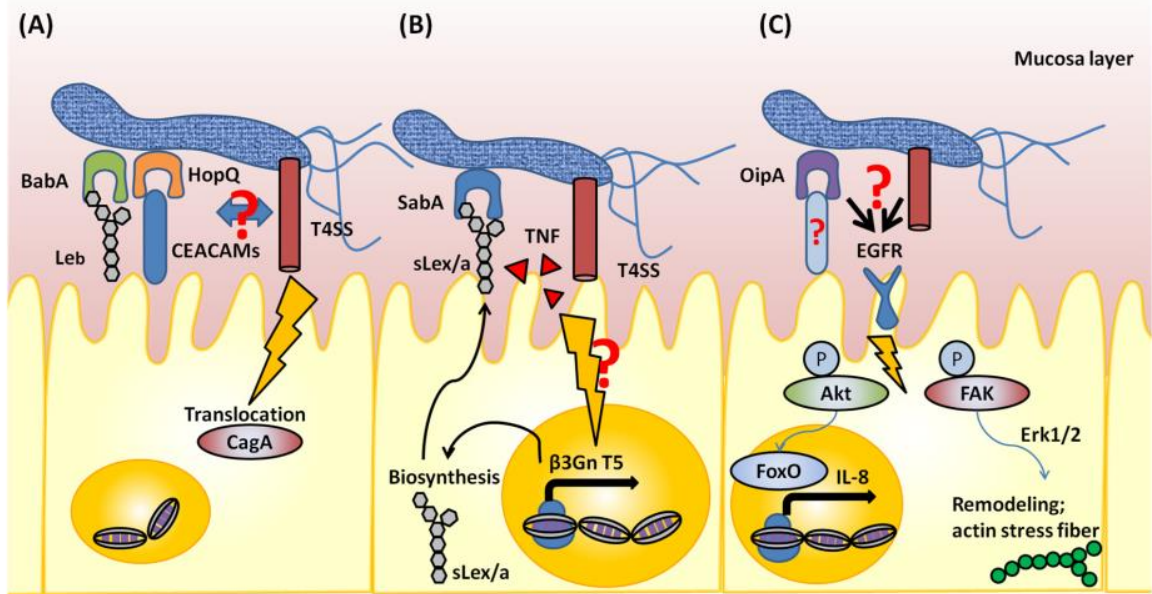


Figura 3. Esquema de la patogénesis de *H. pylori* mediada por PME. (A) BabA interactúa con el antígeno Le^b y mejora la translocación de CagA a través del SST4. HopQ interactúa con las CEACAMs (moléculas de adhesión celular relacionadas al ACE) y también contribuye en la translocación de CagA, BabA y HopQ. Probablemente interactúan con el SST4 en la membrana bacteriana. (B) En el estómago sano, no se expresa el antígeno sLe^x, pero en presencia de *H. pylori*, se sugiere que el sistema SST4 y TNF α inducen en las células epiteliales gástricas, la expresión de β 3Gn T5 y la biosíntesis del antígeno sLe^x, el cual se localiza en la membrana de las células epiteliales. Como resultado, *H. pylori* puede colonizar el epitelio mediante SabA, que también interactúa con el antígeno sLe^x. (C) OipA induce la fosforilación de EGFR, lo que lleva a la activación de la cinasa de adhesión focal (FAK) y la señalización relacionada con Akt. FAK activa induce las rutas de señalización MAPK y Erk1/2 y subsecuentemente la remodelación de fibras de estrés. Adicionalmente, la fosforilación de Akt puede activar factores de transcripción como FoxO e inducir la producción de IL-8 (Matsuo et al., 2017).

Tabla 2. PME de *H. pylori* que interactúan con la célula hospedera (Matsuo et al., 2017).

Proteína bacteriana	Molécula de la célula hospedera con quien interacciona	Función
AlpA/B(HopC/B)	Colágena IV Laminina	Adhesión a la matriz extracelular Inducción de la producción de IL-8
SabA (HopP)	Sialyl lewis X Sialyl lewis A Sewis X	Adhesión a la célula hospedera
BabA (HopS)	Lewis B Globo H hexa-glucosilceramida Globo A hepta-glucosilceramida	Adhesión a la célula hospedera. Promueve la translocación de CagA vía el SST4.
OipA (HopH)	Desconocido	Adhesión celular Inducción de la producción de citocinas inflamatorias

HopQ	CEACAM-1,3,5 y 6	Adhesión a la célula hospedera. Translocación de CagA vía el SST4
------	------------------	--

2.5.1. Lipoproteínas A y B asociadas a la adherencia (AlpA/B)

Los genes que codifican para AlpA/B tienen una alta homología (46.7%). Estas lipoproteínas juegan un papel crucial durante la colonización de la bacteria actuando como adhesinas. Además, aunque no afectan la translocación de CagA, si estimulan importantes vías de señalización como MAPK, c-Fos, c-Jun, CREB, AP-1 y NF- κ B, estas cuales eventualmente inducen la producción de IL-8 (Matsuo et al., 2017).

2.5.2. Adhesina de unión a ácido siálico (SabA)

SabA es importante para la colonización de *H. pylori* e induce inflamación de la mucosa gástrica. El proceso de adhesión de la bacteria mediado por SabA es dinámico e induce, junto con el sistema SST4, la expresión de la glicosiltransferasa β 3 GlcNAcT5 (β 3GnT5) en las células epiteliales gástricas. Además, se ha descrito que el TNF α también contribuye en la expresión de esta enzima. β 3GnT5 es esencial para la biosíntesis de los antígenos de Lewis, los cuales son los receptores de SabA. Estos datos sugieren que SabA contribuye en el proceso de adaptación de *H. pylori* al medio ambiente. Asimismo, la inflamación favorece la colonización bacteriana en las células gástricas (Figura 1) (Matsuo et al., 2017).

2.5.3. BabA

La adhesina de unión al antígeno sanguíneo (BabA) fue la primera adhesina de *H. pylori* en haber sido identificada. Esta proteína se une al antígeno del grupo sanguíneo Lewis B (Le^b). Estudios posteriores demostraron que BabA se ha adaptado a los antígenos del grupo sanguíneo fucosilado, que son más frecuentes en ciertas poblaciones locales. Además, se ha sugerido que BabA mejora la translocación de CagA a las células gástricas (Figura 3). De manera que cuando *H. pylori* es positiva para BabA, VacA, y CagA, puede

colonizar mejor la mucosa e inducir una inflamación severa en la mucosa gástrica (Abadi, 2017; Matsuo et al., 2017).

2.5.4. Proteína A inflamatoria externa (OipA)

OipA se asocia con CagA y VacA y participa en la remodelación de fibras de estrés, mediante la activación de FAK, la cinasa Erk1/2 y la intervención del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). De hecho, las bacterias mutantes de *oipA* no activan la señalización mediada por el EGFR. En esta vía participan la 3-cinasa de fosfatidilinositol (PI3K), la cinasa dependiente de fosfoinositol-1 (PDK1), y Akt. Estas cinasas regulan la actividad del factor de transcripción forkhead (FoxO), lo que conduce a la inducción de la IL-8. Además, recientemente se demostró que la señalización EGFR/FAK, conduce a la fosforilación de paxilina y a la posterior remodelación de actina (Figura 3) (Matsuo et al., 2017).

2.5.5 Proteína Q de membrana externa de *Helicobacter* (HopQ)

HopQ es esencial para la translocación de CagA y para la activación de la señalización dependiente del sistema SST4, la cual involucra la participación de NF-κB, MAPK y la consecuente producción de IL-8 (Figura 3) (Matsuo et al., 2017).

2.6 Factores de virulencia secretados

Las proteínas secretadas (secretoma) de *H. pylori* son de especial interés debido a que pueden ser cruciales para el contacto con los tejidos y se piensa que están implicadas las interacciones patógeno-hospedero (Bumann et al., 2002).

Estudios recientes del secretoma de *H. pylori* han identificado la presencia de aproximadamente 74 proteínas, las cuáles pueden causar alteraciones en la célula hospedera y son blancos potenciales para el desarrollo de vacunas y terapias. Entre estas proteínas se encuentran: CagA, VacA, HtrA, ureasa, GGT, HP1286, enzimas activas redox, componentes del aparato flagelar, γ -glutamina transferasa y diversas proteínas hipotéticas altamente conservadas como las pertenecientes a la familia de proteínas ricas en cisteína,

por ejemplo HcpA (HP0211), HcpC (HP1098) y HcpE (HP0235) (Bumann et al., 2002; Hoy et al., 2010; Matsuo et al., 2017; Ocádiz et al., 2005).

Varios estudios han mostrado que factores solubles de *H. pylori* como VacA o la ureasa, pueden reducir la resistencia eléctrica transepitelial (RET) de las células epiteliales gástricas. La RET es un indicador de la integridad epitelial. De manera que estos factores solubles y secretados pueden alterar directamente la barrera epitelial (Löwer et al., 2008; Wroblewski et al., 2009).

Diversas proteínas liberadas selectivamente causan una respuesta inmune en humanos infectados o son requeridas por *H. pylori* para la colonización del estómago; sin embargo, aún no se ha llevado a cabo un análisis funcional profundo de ellas. De manera que estudios futuros, serían importantes para determinar las funciones de estas proteínas y comprender los mecanismos de su secreción (Ocadiz et al., 2005).

3. Vesículas

Una estrategia que usan las bacterias Gram-negativas para liberar factores de virulencia es la secreción de vesículas, esto permite alcanzar a las células del huésped sin tener un contacto cercano. Estas vesículas se desprenden de la membrana bacteriana externa y varían en tamaño (20-300 nm) (Olofsson et al., 2010a).

Las vesículas de membrana externa (VME) llevan un gran conjunto de sustancias bacterianas y factores de virulencia, como adhesinas, proteasas y toxinas. Las VME pueden promover la infección bacteria, alterar las funciones de las células hospedera y modular sus respuestas, así como activar al sistema inmune. Diversos estudios han descrito la internalización celular de moléculas contenidas en las vesículas bacterianas y su entrada se lleva a cabo por endocitosis mediada principalmente por clatrina y, en menor medida a través de vías independientes de clatrina (Olofsson, Skalman, Obi, Lundmark, & Arnqvist, 2014).

Mediante espectroscopía de masas, se ha demostrado que las VME de *H. pylori* contienen: diferentes subunidades de ureasa, VacA, CagA, GroEL, catalasa, lipopolisacáridos, proteínas metabólicas y ribosómicas, PME como las adhesinas BabA y SabA, fosfatidiletanolamina y cardiolipina (Avila-Calderón et al., 2014; Olofsson et al.,

2010b; Yonezawa et al., 2009). En células epiteliales gástricas AGS tratadas con VME purificadas de *H. pylori* Cag⁻ se observó inhibición del crecimiento, aumento de la toxicidad y producción de IL-8, sugiriendo que otros factores de virulencia diferentes a CagA son los responsables de estos efectos. Por otra parte, VME purificadas de bacterias VacA- indujeron apoptosis de las células AGS, independientemente de la ruta mitocondrial, por la activación de la caspasa 3 y 8. A pesar de que esta cepa bacteriana supone menos patogenicidad, es capaz de producir apoptosis en células gástricas, sugiriendo un mecanismo alternativo de daño epitelial (Yonezawa et al., 2009).

Por lo tanto, las VME juegan un papel crucial para que la bacteria se adhiera de una mejor manera a su sustrato y para que los factores de virulencia lleguen a las células hospederas.

Hace 50 años se descubrió la producción de VME de bacterias Gram-negativas y aunque en los últimos años se ha develado más información sobre estas nano-vesículas, muchas preguntas sobre ellas siguen sin respuesta. Al respecto, aún se desconoce el mecanismo molecular de liberación de las VME, su completa composición y cómo se regula esta composición (Avila-Calderón et al., 2014).

4. Biopelícula

La biopelícula se forma cuando las bacterias pasan de un estado planctónico a un estilo de vida donde los microorganismos se adhieren a superficies bióticas o abióticas. Estas estructuras están implicadas en la virulencia de la bacteria y en su supervivencia ambiental. Existen numerosas bacterias patógenas del humano que forman biopelícula, entre ellas se encuentran a *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* patógena, *Vibrio cholerae*, estafilococos y estreptococos. De manera interesante, se ha observado que *H. pylori* puede formar biopelícula y de esta manera existir en la mucosa gástrica humana. Se ha analizado la composición de la biopelícula y se sabe que consta de una bicapa de proteolípidos con forma principalmente esférica (Figura 4) (Necchi et al., 2007; Yonezawa et al., 2009)

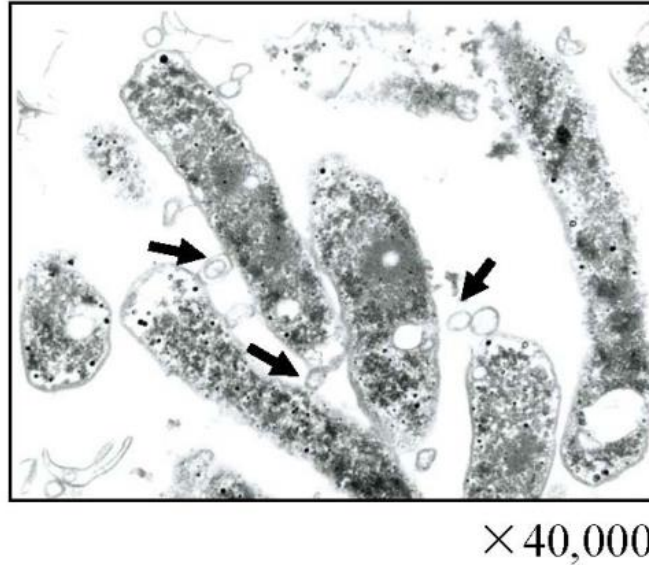


Figura 4. Microscopia electrónica de transmisión (MET). Cepa TK1402 de *H. pylori* formando biopelícula (flechas) (Yonezawa et al., 2009).

Las VME parecen jugar un papel importante en la formación de la matriz extracelular de la biopelícula. La matriz extracelular participa en la unión bacteriana a las superficies abióticas y celulares, en la etapa inicial de la formación de la biopelícula. Así que es posible que proteínas específicas contenidas en las VME participen en la agregación bacteriana y en la formación de biopelículas. En general, se especula que la capacidad de *H. pylori* para formar biopelícula se relaciona con su habilidad de colonización gástrica en humanos y animales (Yonezawa et al., 2009).

En conjunto la biopelícula y las VME ayudan a la bacteria a colonizar eficientemente el epitelio gástrico, y a la vez representan un mecanismo novedoso de invasión.

5. Enfermedades causadas por *H. pylori*

5.1 Enfermedades gástricas

H. pylori causa una de las infecciones crónicas bacterianas más comunes en humanos. Este organismo se relaciona etiológicamente con gastritis crónica, úlcera gástrica, úlcera duodenal, así como a linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa gástrica y cáncer gástrico. La mayoría de los individuos infectados son asintomáticos, a pesar de la presencia de inflamación crónica en la mucosa. El resultado final de la inflamación crónica activa de

larga duración es la pérdida de glándulas, llamada atrofia y en última instancia, un cambio metaplásico intestinal. Esto ocurre particularmente en el antro, menos en el cuerpo, pero también en el cardia (Tytgat & Zuidoost, 2000).

5.2 Enfermedades extragástricas

Estudios recientes han sugerido que la infección por *H. pylori* también está involucrada con enfermedades fuera del estómago, incluidas enfermedades cardiovasculares, hematológicas, neurológicas como Parkinson, hepato biliares, diabetes mellitus (DM), tiroidismo autoinmune y anemia sideropénica, entre otras. Se han propuesto varios mecanismos para explicar la presencia de la bacteria en otros órganos, incluyendo la disfunción endotelial, la inducción de la inflamación sistémica, la producción de mediadores inflamatorios, y la producción de anticuerpos de reacción cruzada que producen mimetismo molecular. Sin embargo, aún queda mucho por elucidar sobre los mecanismos específicos que median los efectos extragástricos de *H. pylori* (Shimoda et al., 2016).

En particular, la infección de *H. pylori* con cepas CagA⁺, se ha asociado con enfermedades coronarias y accidentes cerebrovascular isquémicos (De Bastiani et al., 2008). La preeclamsia, un trastorno relacionado con el embarazo y caracterizado por hipertensión y proteinuria, es otra enfermedad vascular que se relaciona con la infección por *H. pylori* CagA⁺ (De Bastiani et al., 2008). Estos estudios sugieren que CagA, contribuye en el desarrollo de enfermedades extragástricas (Shimoda et al., 2016).

5.2.1. Enfermedades pancreáticas

Recientemente se ha sugerido que la infección por *H. pylori* participa en la patogénesis de la pancreatitis aguda, crónica y autoinmune, así como en la DM y en el síndrome metabólico (Gravina et al., 2018).

5.2.1.1. Pancreatitis aguda (PA)

La pancreatitis aguda (PA) es una enfermedad inflamatoria que además del páncreas, compromete tejidos vecinos y distantes. Aproximadamente el 20% de los

pacientes con PA, adopta un curso evolutivo grave con una tasa de mortalidad de 25% y se caracteriza por el surgimiento de sepsis, síndrome de distrés respiratorio, insuficiencia renal y fallo multiorgánico. La lesión del tejido pancreático se produce tanto por el factor agresor (fármacos, infección o trastorno metabólico), como por la activación secundaria del tripsinógeno, que desencadena la respuesta inflamatoria subsecuente. La respuesta inflamatoria es del tipo Th1, con la participación primordial de las células CD40, linfocitos B, T y monocitos. El progreso del daño pancreático produce isquemia microvascular y obstrucción de los acinos pancreáticos, por lo que se perpetúa el daño ocasionado por las enzimas pancreáticas (Breijo & Prieto, 2014).

5.2.1.2. Pancreatitis crónica (PC)

La pancreatitis crónica (PC) es un proceso fibro-inflamatorio progresivo irreversible, en el cual el parénquima pancreático es reemplazado por el tejido fibrótico, resultado en alteraciones estructurales y en la pérdida de islotes y acinos. Esto eventualmente provoca una mala digestión y diabetes (Peláez-luna, 2016).

5.2.1.3. Pancreatitis autoinmune (PAI)

La pancreatitis autoinmune (PAI), es una forma de PC con características clínicas, histológicas y morfológicas únicas. De acuerdo con su evolución y manifestaciones, se clasifica como 1 ó 2. La PAI se considera la manifestación pancreática de un trastorno fibro-inflamatorio sistémico denominado enfermedad asociada a IgG4. Se conoce poco de su fisiopatología, pero se ha reportado que pacientes con PAI tipo 1 tienen niveles aumentados de linfocitos B reguladores, comparados con pacientes con PC, cáncer de páncreas y sujetos sanos, sugiriendo que estas células están involucradas en la fisiopatología (Peláez-Luna, 2013).

5.2.1.4. Prediabetes

El grado de hiperglucemia varía con base en la progresión de esta enfermedad. La prediabetes por si sola puede causar alteración de la glucosa en ayunas y/o alteración de

la tolerancia a la glucosa. Durante la fase inicial de la patología, es posible el control glucémico a través de la reducción del peso, actividad física y una dieta adecuada. Además, individuos con esta enfermedad no requieren insulina. Sin embargo, la mayoría de los pacientes paulatinamente presentan una disminución en la secreción de insulina, y, por ende, requieren la administración gradual de insulina exógena para un adecuado control de la glucemia. Por otro lado, los pacientes que presentan destrucción total de las células β , requieren insulina para vivir, debido a que no hay secreción de insulina (Diabetes, 2012) (Grieco, Sebastiani, Spagnuolo, Patti, & Dotta, 2012).

5.2.1.5. Síndrome metabólico (SM)

El síndrome metabólico (SM) es una combinación de presión arterial alta, obesidad abdominal, dislipidemias, intolerancia a la glucosa y/o resistencia a la insulina, así como un aumento de moléculas pro-inflamatorias (Elia, Schmieder, Christen, & Fendt, 2015)

5.2.1.6. Diabetes mellitus (DM)

La DM es un grupo de enfermedades metabólicas, caracterizadas por presentar hiperglucemia. Esta es el resultado de la deficiencia relativa o absoluta de la secreción de insulina con grados variables de resistencia a ésta, causada por la falla de las células β pancreáticas (Damasceno et al., 2013; Diabetes, 2012). La hiperglucemia crónica de la diabetes se asocia a disfunción y falla en diferentes órganos, especialmente en ojos, riñones, nervios, corazón, vasos sanguíneos y es fatal si no es tratada (Diabetes, 2012). La base de las anormalidades en carbohidratos, grasas y el metabolismo de las proteínas se debe a la acción deficiente de la insulina en los tejidos diana. La acción disminuida de la insulina resulta de una inadecuada secreción y una respuesta disminuida del tejido a ésta, en uno o más puntos en la compleja vía de acción de la hormona. El deterioro de la secreción de la insulina y los defectos en la acción de la insulina, frecuentemente coexisten en el mismo paciente, aunque a menudo no es claro qué anormalidad es la causa principal de la hiperglucemia (Diabetes, 2012). Datos de la Federación Internacional de la Diabetes (IDF) reportan que, en el año 2015, hubo una prevalencia mundial de la diabetes calculada en

unos 415 millones (8.8%) de personas adultas entre 20-79 años. Alrededor del 75% viven en países en desarrollo y si las tendencias continúan, en el año 2040 unos 642 millones de personas, o uno entre diez adultos, tendrá diabetes (International Diabetes Federation, 2013). De acuerdo con la IDF, en 2015, México ocupó el 6° lugar de incidencia con 11.5 millones de personas adultas entre 20-79 años con diabetes. Para el año 2040, México ocupará el 5° lugar con 20.6 millones de personas con diabetes (International Diabetes Federation, 2013).

La Asociación Americana de Diabetes divide a la DM en tres tipos de DM: diabetes mellitus tipo 1 (DM1), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y diabetes mellitus gestacional (DMG) (Ensanut, 2012).

La DM1: se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células β , lo que conduce a una deficiencia absoluta en la secreción de insulina y representa del 5-10% de los casos de diabetes (Diabetes, 2012).

La DM2: engloba a individuos que presentan resistencia a la insulina y por lo general tienen una relativa deficiencia de insulina a lo largo de su vida (Diabetes, 2012; Gunasekaran & Gannon, 2011). El riesgo de desarrollar esta forma de diabetes aumenta con la edad, la obesidad y la falta de actividad física (Diabetes, 2012).

6. Características de los epitelios

Los epitelios constituyen uno de los cuatro tejidos fundamentales de los animales y, representan en su conjunto, más de 60 % de todas las células del cuerpo humano. Los epitelios recubren superficies corporales internas y externas. Además, los derivados epiteliales son las principales células secretoras del organismo y en algunos casos, como el hígado, forman el propio parénquima de los órganos. Las funciones de los epitelios son muy variadas: protección frente a la desecación o la abrasión, filtración, absorción selectiva, secreción, intercambio de gases y otras moléculas, transporte de sustancias, y además pueden poseer células que actúan como células sensoriales. Algunas de estas funciones son posibles gracias a la presencia de especializaciones celulares, como cilios, flagelos y microvellosidades, en sus superficies libres o apicales. En tanto que otras funciones se

deben a la presencia de estructuras en el espacio intercelular, las cuáles mantienen unidas a las células epiteliales y que son llamadas complejo de unión intercelular (Molist & Pombal, 2016).

6.1. Complejo de unión intercelular (CUI)

Las células epiteliales forman una barrera sellada gracias a que poseen un CUI, que se localiza en el espacio intercelular o conocido también como espacio paracelular. Estas uniones célula-célula generan polaridad en las células, regulan selectivamente el paso de iones, moléculas e incluso de células por la ruta paracelular, permiten la comunicación y señalización celular y, mantienen la integridad física del epitelio. Las uniones intercelulares (UI) o CUI se clasifican en cuatro grupos funcionales: uniones estrechas (UEs), uniones adherentes (UAs), uniones comunicantes (UCs) y desmosomas (Dsm) (Figura 5) (Elia et al., 2015; Salvo Romero, Alonso Cotoner, Pardo Camacho, Casado Bedmar, & Vicario, 2015). La estructura más apical del espacio intercelular son las UEs, quienes mantienen la polaridad y regulan la permeabilidad paracelular de iones, moléculas e incluso de células. Además, estas uniones están constituidas principalmente por claudinas, ocludinas y JAMs, estas últimas se asocian a las proteínas andamio ZOs que conectan con el citoesqueleto (compuesto por actina y miosina). Por debajo de las UEs, se encuentran las UAs que refuerzan la unión entre las células epiteliales y son importantes sitios de señalización. Estas uniones se componen de caderinas, como la E-caderina, la cual se une a las cateninas (α y β), que conectan con el citoesqueleto. En tanto que los Dsm refuerzan aún más los sitios de contacto célula-célula y abundan en epitelios con tensión mecánica constante. Los Dsm se componen de caderinas como la desmocolina y desmogleína, las cuales interaccionan con la desmoplaquina, que está conectada a los filamentos intermedios (Salvo Romero et al., 2015).

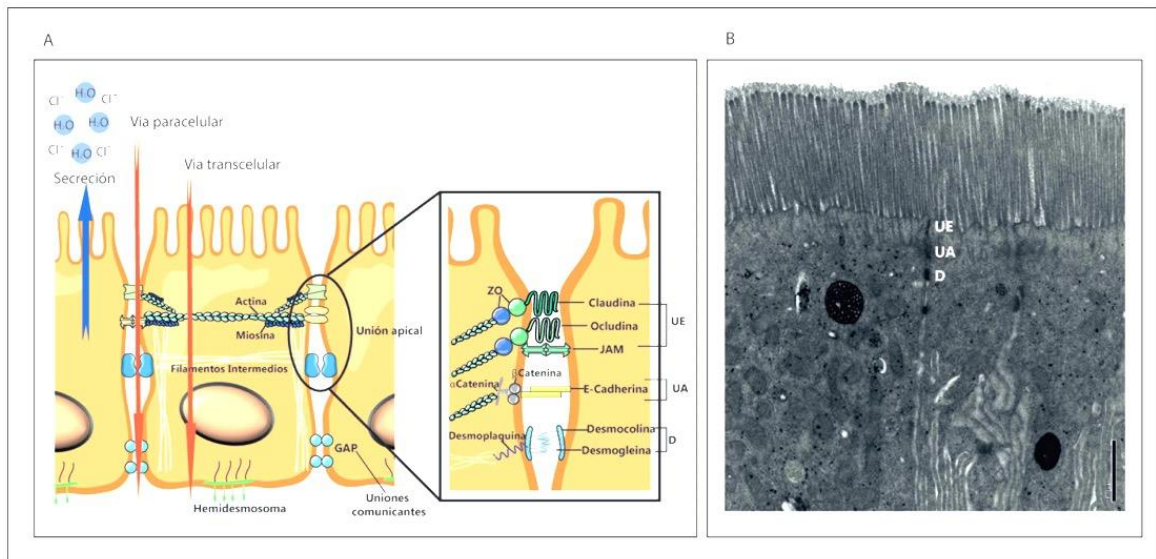


Figura 5. Representación del CUI. A) Esquema de células epiteliales donde se muestra la posición de las UEs, UAs y Dsm, con sus correspondientes proteínas. B) Imagen de MET de enterocitos humanos (Salvo Romero et al., 2015).

6.2 Epitelio gástrico

El epitelio gástrico consiste en una monocapa de células cubiertas por moco, que se invaginan para formar glándulas o fosas gástricas, las cuales pueden ser cardíacas, oxínticas y pilóricas. Las glándulas cardíacas se encuentran más cerca del esófago y están recubiertas principalmente por células secretoras de moco. Las glándulas oxínticas se encuentran en el fondo y el cuerpo del estómago y presentan: (i) células que producen pepsinógeno; (ii) células parietales que liberan ácido clorhídrico y factor intrínseco; y (iii) células similares a las enterocromafines, responsables de la liberación de histamina. Las glándulas pilóricas en el antro contienen células G y D, responsables de la producción de gastrina y somatostatina, respectivamente (Elia et al., 2015).

6.3. Epitelio intestinal

La mucosa intestinal se compone de una capa de moco; una monocapa de células epiteliales columnares polarizadas; una región subepitelial llamada *lámina propia*; el sistema nervioso entérico; el tejido conectivo; y las capas musculares. La capa de moco se divide en dos, la capa de moco no agitada, que contiene glicocálix y, la capa de moco agitada, que contiene la microbiota, IgA secretora, mucinas y péptidos antimicrobianos. En

el epitelio están presentes los enterocitos, las células de Goblet que sintetizan y liberan mucina, las células de Paneth que sintetizan péptidos antimicrobianos, las células enterocromafines que producen hormonas y otras sustancias y, las células madres intestinales. Los linfocitos intraepiteliales se encuentran por encima de la membrana basal, subyacentes a la UE. La *lamina propria* contiene (i) el tejido linfoide difuso compuesto de macrófagos, células dendríticas, células plasmáticas, linfocitos de la *lamina propria* y, en algunos casos, neutrófilos; y (ii) el tejido linfoide organizado, compuesto de estructuras linfoides como la placa de Peyer, que contiene células M, células dendríticas y linfocitos (Figura 6) (Salvo Romero et al., 2015).

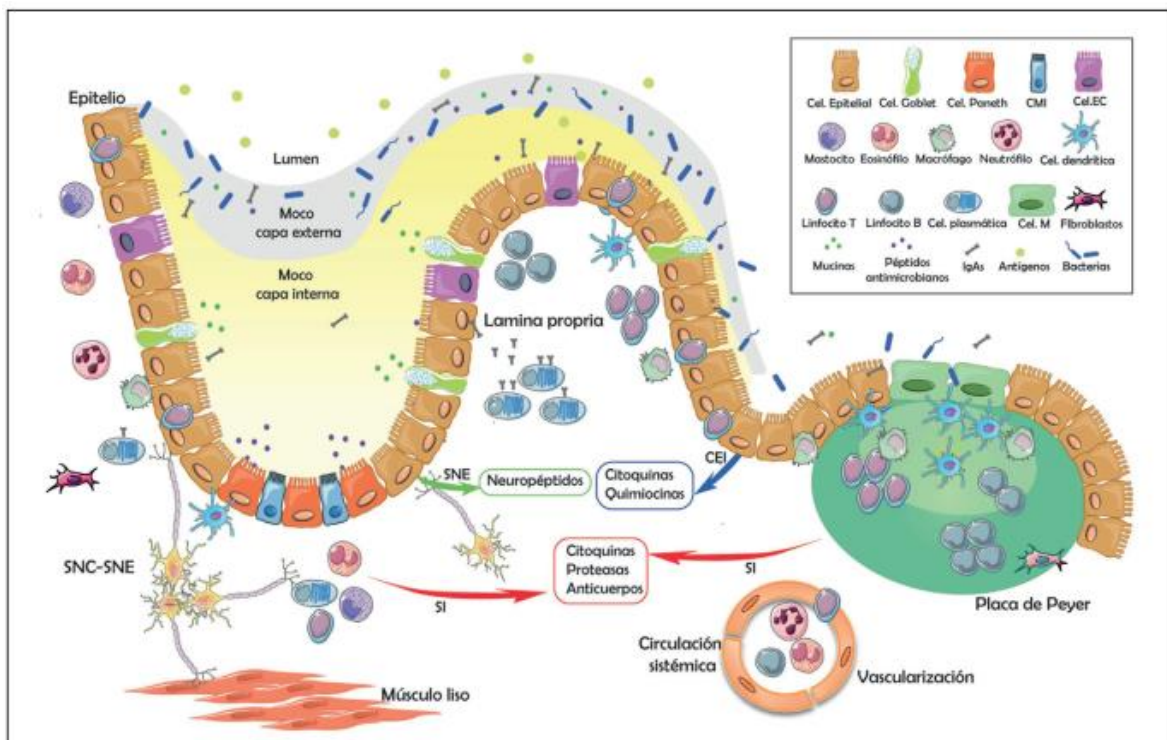


Figura 6. Componentes del epitelio intestinal (Salvo Romero et al., 2015).

6.4. Epitelio pancreático

En el humano, el páncreas se sitúa retroperitonealmente, comenzando en la porción media del duodeno y extendiéndose transversalmente por la pared posterior del abdomen, hacia el bazo. El páncreas es una glándula del aparato digestivo, que está constituida por dos tipos de tejidos glandulares distintos morfológica y funcionalmente que derivan del endodermo. Las células exócrinas, están representadas por ductos y acinos y secretan

enzimas al intestino; en tanto que las células endócrinas, se agregan para formar los islotes de Langerhans, los cuales están entremezclados con los vasos sanguíneos, neuronas y un componente estromal derivado del mesodermo (Figura 7) (Pan & Wright, 2011).

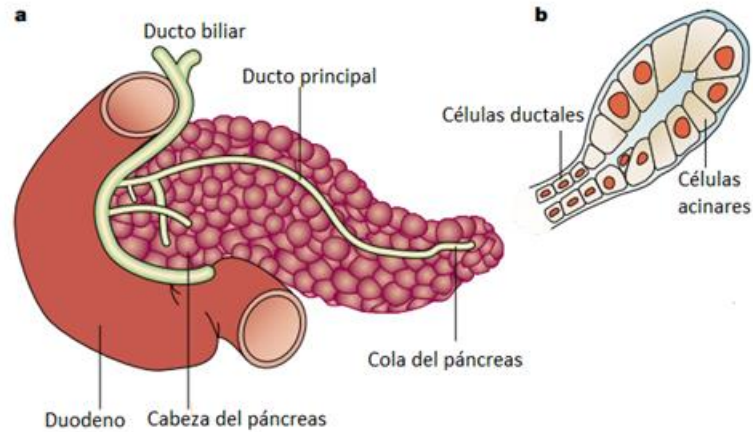


Figura 7. Estructura del páncreas. A) Esquema del páncreas adulto. B) Esquema de un acino pancreático [19].

6.4.1. Páncreas exócrino

El páncreas exócrino es una glándula ramificada y lobulada, donde las células secretoras se agrupan en acinos (Figura 7). Estas células son de forma piramidal, con núcleos basales, conjuntos regulares de retículo endoplásmico rugoso, un prominente complejo de Golgi y numerosos gránulos secretorios que contienen enzimas digestivas, tales como proteasas, lipasas y nucleasas (Edlund, 2002; Edlund H, 2001). La mayoría de las enzimas son secretadas como precursores inactivos (zimógenos) y se activan después de entrar al duodeno. El lumen de los acinos es pequeño y puede ser terminal o intercalar. Los acinos son pequeños ductos que están dotados con un fino tejido conectivo laxo, que se hace más extenso en el conducto más grande (Edlund H, 2001). Otro componente del páncreas exócrino, es el altamente ramificado epitelio ductal. Los ductos transportan las enzimas digestivas y los iones de bicarbonato al intestino, donde contribuyen a la digestión de los alimentos (Edlund, 2002). Los ductos están revestidos con células epiteliales columnares y a lo largo del ducto se encuentran pequeñas células de copa y cepillo, similar a las del intestino. La secreción del jugo pancreático es regulada hormonalmente, principalmente

por secretina, colecistocinina, gastrina y, también por estímulo neural. En la unión de acinos y ductos se encuentran las células centroacinares cuboidales, ricas en mitocondrias (Edlund H, 2001).

6.4.2. Páncreas endócrino

El páncreas endócrino comprende 5 tipos celulares diferentes, que secretan hormonas al torrente sanguíneo: células α que secretan glucagón, células β que secretan insulina, células δ que liberan somatostatina, células ϵ que secretan grelina y, células del polipéptido pancreático (PP) que secretan PP (Edlund H, 2001) (Pan & Wright, 2011) (Edlund, 2002). Las células endócrinas forman agrupaciones llamadas islotes de Langerhans son grupos compactos esferoidales, embebidos en el tejido exócrino (Edlund H, 2001). En humanos, aproximadamente un millón de islotes están distribuidos a través del páncreas adulto, representando de 1-2% de la masa total del órgano. El tamaño de cada islote varía de 100 a 500 μm de diámetro y se compone de 1000-3000 células (Quesada, Tudurí, Ripoll, & Nadal, 2008). La interacción entre células endócrinas y vasculares es esencial para la regulación del metabolismo de los carbohidratos y la homeostasis de la glucosa en el organismo (Edlund H, 2001).

6.5. Alteración de los epitelios por bacterias patógenas

El cuerpo humano hospeda una gran cantidad de bacterias, no obstante, su localización en individuos sanos se restringe a ciertas áreas del cuerpo, como la piel, las mucosas de las cavidades nasal y bucal, la vagina y, la más importante, el tracto gastrointestinal. Sin embargo, los tejidos internos son normalmente estériles. En algunas circunstancias, algunos patógenos oportunistas pueden ingresar al hospedero aprovechando las lesiones o la alteración en una de las diferentes barreras. Esto se debe a que los agentes patógenos han desarrollado mecanismos para atravesar las barreras y llegar a los órganos más profundos, donde proliferan y conducen a enfermedades graves para el hospedero (Ribet & Cossart, 2015).

Existen múltiples factores de virulencia de los patógenos que se pueden dirigir a las proteínas del hospedero, ya sea en las uniones célula-célula de los epitelios o las involucradas en la muerte o en el recambio celular. Por ejemplo, *H. pylori* emplea su citotoxina CagA para interactuar con la proteína de la UE ZO-1 y con Par1, un regulador de la polaridad celular que desencadena alteraciones en las UEs. HtrA también afecta a proteínas de las UAs como la E-cadherina, promoviendo la liberación de β -catenina del complejo de adherencia.

Vibrio cholerae secreta las metaloproteasas HA/P que degradan el dominio extracelular de la ocludina, un componente de las UEs. Las bacterias entero-patogénicas pueden inyectar diferentes efectores en el citoplasma del huésped, como MAP, EspF o EspG, los cuales también afectan a las UEs. *Salmonella typhimurium* tiene un factor llamado AvrA con actividad acetiltransferasa hacia la MAP cinasa que juega un papel importante en la regulación negativa de la respuesta inflamatoria e inducen la muerte de células epiteliales. *E. coli* patógena expresa Cif, un efector que bloquea el ciclo celular, inactivando las ligasas de ubiquitina E3 Cullin-RING conjugadas con Nedd8 (CRL) (Ribet & Cossart, 2015).

V. ANTECEDENTES

La DM es una enfermedad crónica que requiere atención médica de por vida. En la actualidad existe una alta incidencia y prevalencia de esta enfermedad a nivel mundial, y en nuestro país es un serio problema de salud pública (International Diabetes Federation, 2013).

La relación entre la infección por *H. pylori* y la diabetes proviene de recientes hallazgos donde existe una mayor prevalencia de la infección en personas diabéticas, en comparación con personas no infectadas (62% vs 21%). En otro estudio se observó que la seropositividad a *H. pylori* se asocia con altos niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c), esta se usa para diagnosticar prediabetes y diabetes, así como para determinar su prevalencia e incidencia. La asociación de la bacteria fue más evidente en adultos mayores de 18 años. Además, se observó un efecto sinérgico de *H. pylori* y el índice de masa corporal con niveles incrementados de HbA1c; indicando la participación de esta bacteria en la alteración de la tolerancia de la glucosa en adultos, que puede ser potenciada por un índice alto de masa corporal (He et al., 2014). De manera similar, otro estudio se demostró que la infección a largo plazo por *H. pylori* se asocia con niveles altos de HbA1c, una disminución de la secreción de insulina y una alta prevalencia de DM2 en personas de Taiwan (Hsieh et al., 2013).

Los mecanismos subyacentes de la DM son complejos e involucran resistencia a la insulina, inflamación crónica, glucotoxicidad, lipotoxicidad y deficiencia en la secreción de insulina, como resultado de una disfunción de las células β del páncreas. Además, durante el desarrollo de la DM, la función de la barrera gastrointestinal se ve comprometida, facilitando el acceso de agentes infecciosos como *H. pylori* y de antígenos provenientes de la dieta (Elia et al., 2015; He et al., 2014).

La infección por *H. pylori* del epitelio gastrointestinal altera la barrera epitelial, reflejándose en una reducción de la RET y en un incremento en la permeabilidad paracelular dependiente del tiempo. La viabilidad de estas células no se ve alterada, pero si se presentan un concomitante incremento en la producción de citosinas como IL-8, IL-6, IFN- γ , IL-1 β , TNF- α e IL-10. La disfunción de la barrera se acompaña de la reorganización de ZO-

1, JAM-A y claudina-1, así como de la disminución de las claudinas-11 y -18 y un incremento de la claudina-2 (Caron, Scott, Fox, & Hagen, 2015). Por otra parte, se ha descrito que CagA interacciona con E-cadherina e induce la disrupción de las UAs, así como la acumulación de β -catenina en el citoplasma y en el núcleo, donde probablemente se une a factores de transcripción para regular positivamente la transcripción de genes blanco como *anexina*, *ciclina* y *myc* (Tohidpour, 2016).

De manera que el incremento en la permeabilidad gastrointestinal causada por *H. pylori* podría facilitar la exposición a antígenos que conducirían a una destrucción autoinmune de las células β del páncreas productoras de insulina. *H. pylori* también podría alterar el epitelio pancreático, directamente o a través de las citosinas pro-inflamatorias circulantes, dañando los componentes moleculares del CUI, los cuales son cruciales para una adecuada secreción de la insulina (Figura 8)(De Kort, Keszthelyi, & Masclee, 2011).

Por otra parte, se ha demostrado que la vía activada de la proteína zonulina puede desempeñar un papel importante en la patogenia de la diabetes mellitus a través de la permeabilidad intestinal (De Kort et al., 2011). La zonulina es una proteína que regula las UEs para modular el paso al interior de la célula. La gliadina y las bacterias inducen la secreción de esta proteína, que aumenta la permeabilidad intestinal, introduciendo antígenos extraños en el sistema inmunológico e induciendo inflamación (Demir, Ozkan, Seckin, Sahtiyanci, & Demir, n.d.). Se ha encontrado que la expresión de esta proteína aumenta en ratas con diabetes y se correlaciona con una mayor permeabilidad. No obstante, cuando se administra un antagonista de la zonulina se reduce la gravedad de la diabetes tipo 1, en ratas (De Kort et al., 2011).

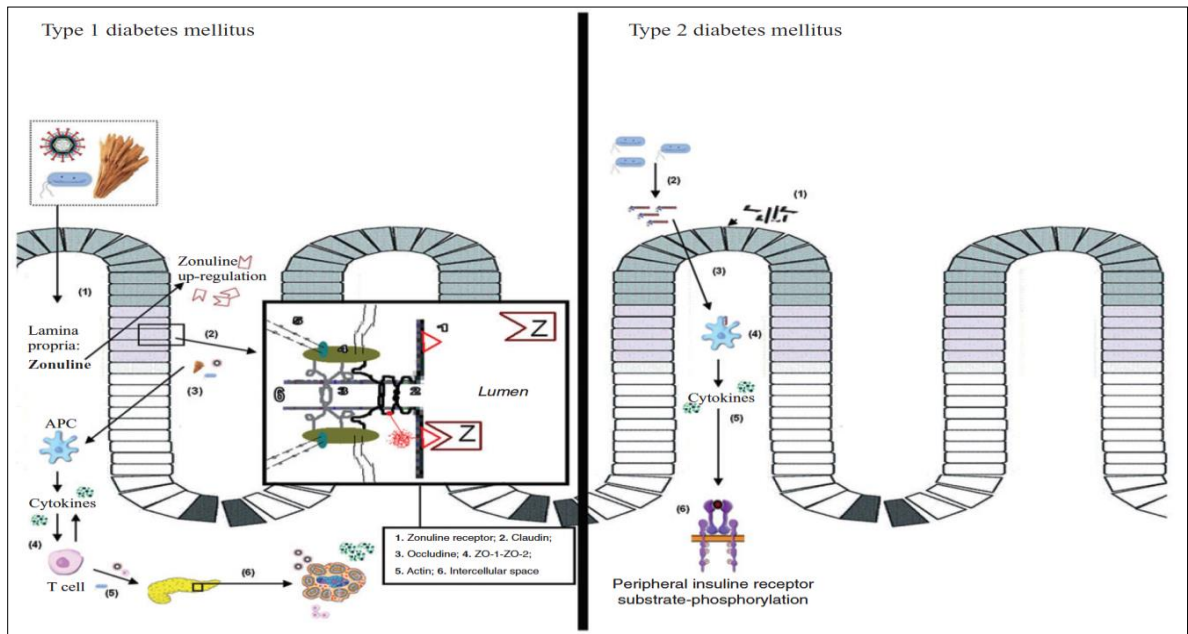


Figura 8. Modelo del incremento en la permeabilidad de la barrera gastrointestinal en el desarrollo de la diabetes. DM1: (1) infecciones virales, bacterianas, la microbiota o gliadina desencadenan una inflamación subclínica y la vía de la zonulina; (2) proteínas de las UEs se fosforilan y el intestino se vuelve permeable; (3) transporte de antígenos luminales; (4) activación de células T; (5) nodos pancreáticos (transporte viral, activación local de células T, activación autoinmune de células β y CD8+); (6) inflamación de los isletos pancreáticos y destrucción de las células β por daño viral, bacteriano, reacción autoinmune y destrucción mediada por citosinas. DM2: (1) los ácidos grasos incrementan la permeabilidad intestinal; (2) bacterias Gram-negativas producen LPS; (3) los LPS atraviesan la barrera intestinal; (4) los LPS se unen a receptores tipo toll-4 en los macrófagos; (5) los macrófagos producen citosinas; (6) fosforilación del sustrato al receptor de insulina y la consecuente resistencia a la insulina (De Kort et al., 2011).

Varios estudios y datos clínicos sugieren que la alteración de las UEs intestinales, la disminución de claudina-1 y el incremento en la permeabilidad epitelial, preceden al inicio de la insulinitis y a la DM1. También, se ha observado un incremento de la permeabilidad intestinal en personas diabéticas, en diferentes estadios de la enfermedad. En ratones diabéticos, las UEs de las células intestinales están seriamente dañadas y presentan una expresión reducida de ZO-1 y occludina, en la cual participa la vía Notch/Hes1 (Figura 9)(Min et al., 2014).

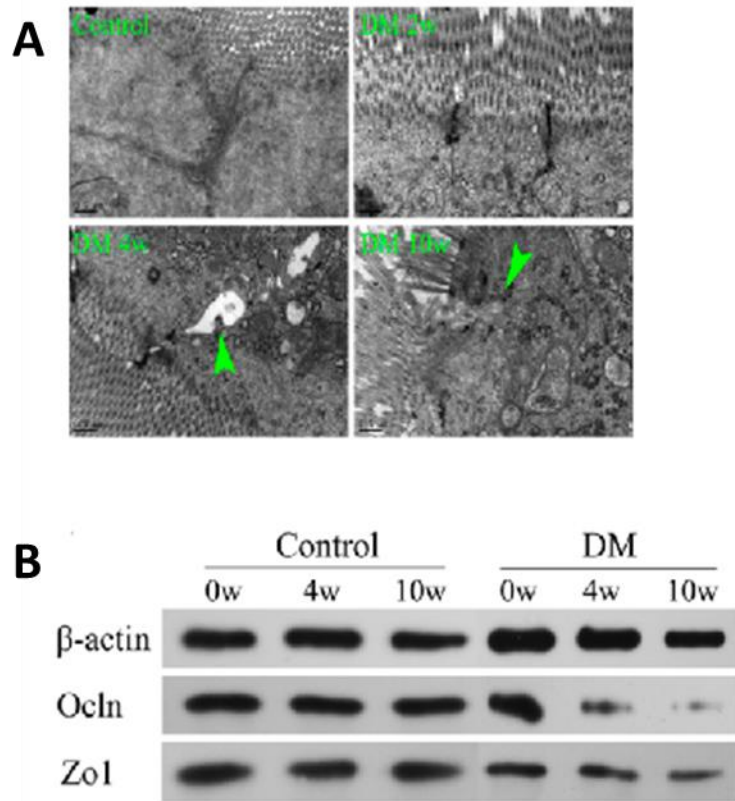


Figura 9. Disfunción de la barrera intestinal en ratones diabéticos. (A) Las UEs analizadas por MET, se observan significativamente dañadas en ratones diabéticos de 4 y 10 semanas (DM 4w y DM 10w) y el espacio intercelular (cabezas de flecha verdes) es mayor que en los animales control. (B) La cantidad de ocludina (Ocln) y ZO-1, analizada por Western blot (WB) fue significativamente menor en el intestino de ratones diabéticos, que en animales control (Min et al., 2014).

En el caso de los ductos pancreáticos, se ha reportado que la disrupción de las UEs es un evento temprano en diferentes tipos de pancreatitis (Kojima et al., 2013). Además, en la DM2 se ha observado la producción de citosinas proinflamatorias (interleucinas, TNF- α) y de la proteína reactiva C. Estas citosinas inducen resistencia a la insulina, activando las vías JNK1 y NF- κ B, que eventualmente conducen a la fosforilación en serina del substrato 1 del receptor a insulina (Hotamisligil & Erbay, 2008). Al respecto, se sabe que la activación de la cinasa JNK participa en el desensamble de las UEs y UAs de queratinocitos y células epiteliales del colon de humanos (Naydenov, Hopkins, & Ivanov, 2009). En tanto que, en células pancreáticas hTERT-HPDE cultivadas sin suero, donde no está activa la PKC y no hay UJs funcionales, el inhibidor SP600125 de JNK, restablece la morfología epitelial, produce un incremento en los niveles de claudina-1, -4, ocludina y marvelD3 y la función de barrera

aumenta de una manera dependiente del tiempo (Figura 10)(Kojima et al., 2013). Estos datos sugieren que en la regulación de la barrera epitelial pancreática participan las vías PKC y JNK.

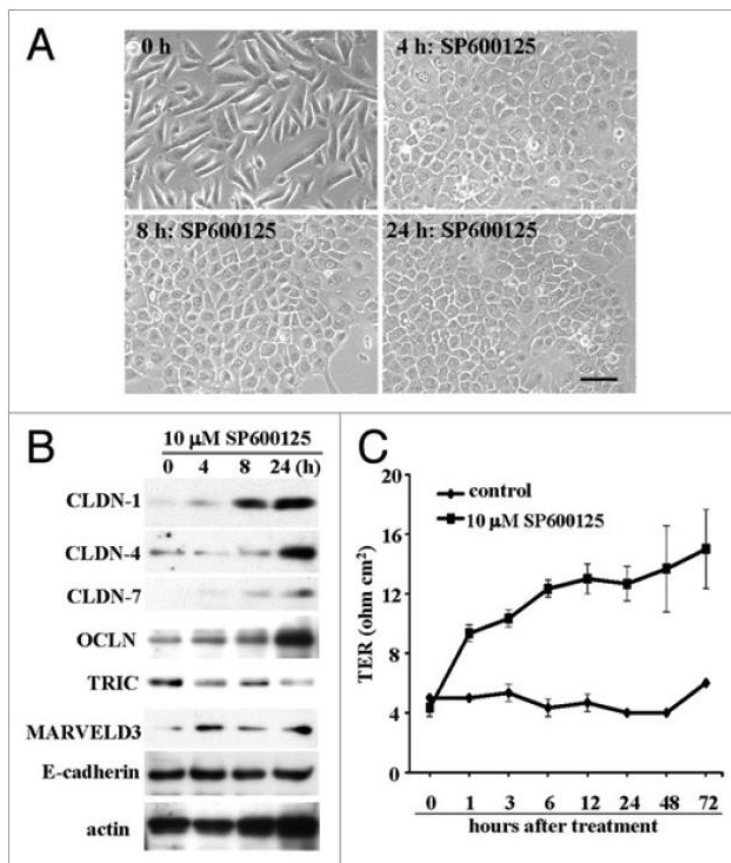


Figura 10. Regulación de la función de barrera de las células hTERT-HPDE por el inhibidor de JNK. (A) Imágenes de contraste de fases de células tratadas con 10 μM SP600925. Barra: 40 μm. **(B)** WB de diferentes proteínas de las uniones intercelulares. **(C)** Valores de RET de células tratadas con el inhibidor [38].

VI. JUSTIFICACIÓN

Estudios recientes relacionan la infección de *H. pylori* con el desarrollo de la diabetes mellitus (DM), la cual en 2016 fue considerada como emergencia epidemiológica en México. Se sabe que *H. pylori* posee diversos factores de virulencia como CagA, VacA, HtrA y ureasa, los cuales dañan al epitelio gástrico.

H. pylori secreta factores de virulencia en vesículas que podrían alcanzar el epitelio pancreático, afectando sus funciones secretoras y contribuyendo al desarrollo de la DM.

Sin embargo, hasta el momento no se ha caracterizado el efecto de estos factores de virulencia de *H. pylori* sobre células pancreáticas.

VII. HIPÓTESIS

Las vesículas secretadas por *H. pylori* dañan a las células pancreáticas y su permeabilidad epitelial.

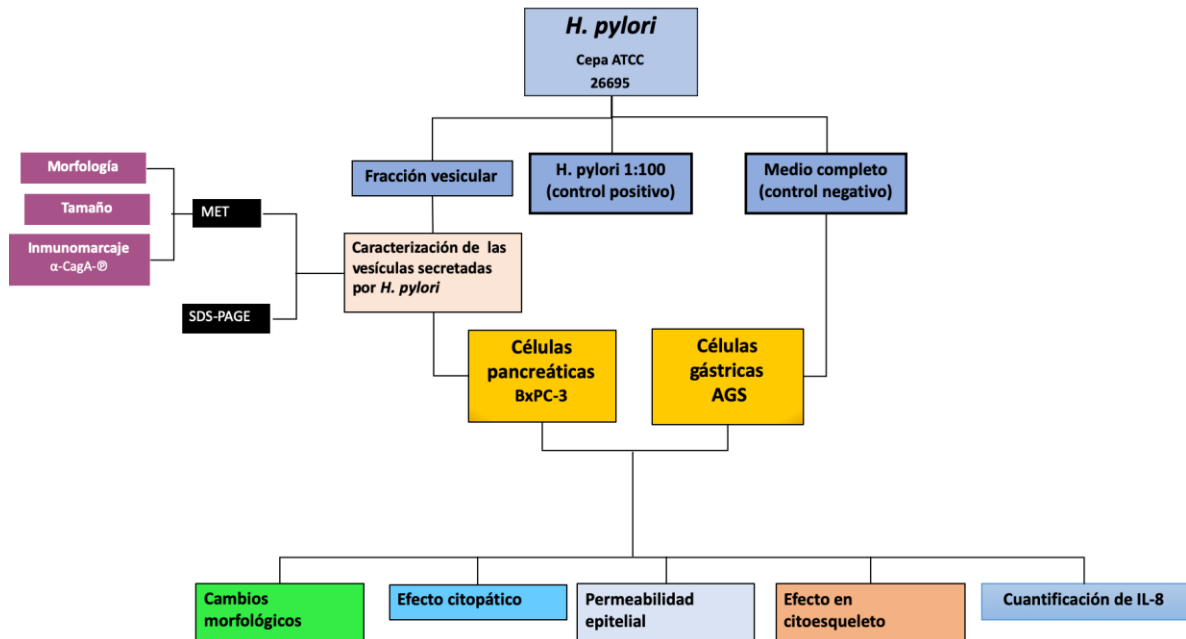
VIII. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de las vesículas secretadas por *H. pylori* sobre células epiteliales derivadas de ductos pancreáticos.

IX. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar las vesículas secretadas por *H. pylori*
2. Evaluar los cambios morfológicos de células gástricas y pancreáticas producidos por las vesículas secretadas por *H. pylori*
3. Analizar el efecto de las vesículas secretadas por *H. pylori* sobre la permeabilidad de células epiteliales pancreáticas y gástricas
4. Determinar las alteraciones producidas por las vesículas de *H. pylori* sobre el citoesqueleto de actina de las células epiteliales
5. Evaluar la producción de IL-8 por células pancreáticas y gástricas tratadas con vesículas de *H. pylori*

X. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



XI. METODOLOGÍA

Cultivo de *H. pylori*

La cepa de referencia 26695 de *H. pylori* CagA⁺, fue proporcionada por el Laboratorio de Infectología del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Las bacterias se descongelaron, se crecieron por 72 h en medio base Casman suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 5% y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente, se hizo una resiembra en medio sólido Casman por 48 h para que todas las bacterias se sincronizaran en la fase logarítmica.

Del cultivo bacteriano se tomó una alícuota de 5 µl, se resuspendió en 1 mL de medio Müeller Hinton. La absorbancia de la muestra se midió a $\lambda = 550$ nm y se determinó empleando la siguiente fórmula (Isabel & Alvarez, n.d.):

$$UFC = \frac{Abs}{8 \times 10^{-10}}$$

UFC: unidades formadoras de colonias

Las bacterias se almacenaron en caldo Brucella (43g/L) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 50% de glicerol, y se mantuvieron a -70° C.

Re-identificación de cepas bacterianas

La identidad de las cepas se realizó por pruebas bioquímicas de ureasa, catalasa, oxidasa y tinción de Gram (GI, BM, JE, & MJ, 1988).

La prueba de ureasa consistió en inocular un cultivo de *H. pylori* en medio con urea agar base (20 g/l) o medio Christensen e indicador (rojo fenol, 0.012 g/l) (DIBICO S.A de C.V.), el cual cambia de color cuando el pH del medio se modifica, debido a la hidrólisis de urea que resulta en CO₂ y NH₃.

Para la prueba de catalasa se colocó un inóculo del cultivo de las bacterias en una gota de H₂O₂, el cual se descompone en H₂O y O₂; de manera que, la producción de burbujas procedentes del oxígeno indicó que la prueba fue positiva.

En la prueba de la oxidasa se tomó un inóculo del cultivo bacteriano y se colocó en papel filtro impregnado con tetrametil-p-fenilendiamina al 1% (reactivo de Kovacs). Este reactivo funciona como un aceptor artificial de electrones, que sustituye al O₂ usado por la

bacteria. De manera, que el reactivo cambia a un color morado, debido a que la tetrametil-p-fenilendiamina es una amina aromática y su oxidación produce quinolonas de color morado-azulado.

También se lisaron a las bacterias con solución reguladora 4X (40% de glicerol, 240 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 0.04% azul de bromofenol y 5% de β mercaptoetanol e inhibidores de proteasas Complete™) al 1:1 v/v y se analizó la presencia de la proteína CagA, mediante ensayos tipo Western blot, los cuales se describirán en detalle más adelante. Como control se emplearon lisados de cepas clínicas de *H. pylori* CagA-.

Revisión de micrografías de microscopía electrónica de transmisión (MET) y microscopia de barrido electrónico (MEB)

El laboratorio de Infectología del Hospital Infantil de México, Federico Gómez cuenta con acervo de micrografías de MET y MEB sobre diferentes cepas de *H. pylori*. De manera que, se llevó a cabo una revisión de estas fotografías con la finalidad de determinar si existía evidencia de desprendimiento de vesicular de la membrana externa de estas bacterias.

Aislamiento de vesículas secretadas por *H. pylori* cultivadas en medio líquido y bifásico

Un cultivo bacteriano de 48 h se resuspendió homogéneamente en 25 ml de caldo de Brucella suplementado con ciclodextrina al 1%, evitando la formación de grumos.

Para el cultivo en medio líquido, 25 ml de la suspensión bacteriana se colocaron en una botella de cultivo de 25 cm² y se incubaron por 72 h. Posteriormente, se recolectó el medio y las bacterias adheridas al fondo de la botella se recogieron con un raspador de células, en tubos estériles diferentes.

Para el cultivo en medio bifásico, 5 ml de la suspensión bacteriana se colocaron en una caja Petri con medio Casman y se incubaron durante 72 h. A continuación, el medio se recolectó en un tubo; en tanto que las bacterias adheridas se rasparon del medio Casman y se colocaron en otro tubo.

De ambas condiciones de cultivo (medio líquido y bifásico) se obtuvieron las diferentes fracciones (soluble, vesicular y adherida). Los tubos con medio de cultivo se centrifugaron a 13,000 rpm durante 20 min a 4°C y solo se recuperó el sobrenadante (SN), el cual se filtró en una membrana de 0.22 µm (Durapore, Millipore) y se consideró como la fracción soluble. El 90% de esta fracción se volvió a centrifugar a 40,000 rpm durante 2 h y la pastilla se resuspendió en 200 µl de caldo Brucella y se almacenó a -70°C, considerándose como la fracción vesicular. A los tubos con las bacterias adheridas se les añadió 1 ml de caldo Brucella, se resuspendieron homogéneamente las bacterias y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 20 min. Los SN se filtraron como se mencionó anteriormente y se consideraron como la fracción adherida.

Caracterización morfológica de la fracción vesicular a través de MET

La fracción vesicular de ambos medios de cultivo (líquido y bifásico) se procesó para MET sola y con inmunomarcaje, empleando el anticuerpo α -CagA-®.

Una muestra de 10 µl de la fracción vesicular se fijó con 10 µl de paraformaldehído (PFA) al 4% durante 30 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, la muestra se colocó en rejillas de Cu²⁺recubiertas con Formvar al 0.25% durante 10 min. El exceso de líquido se retiró con papel filtro y se lavó tres veces con agua estéril. A continuación, se adicionaron 10 µl de ácido fosfotungstico al 2.5% durante 10 seg, se retiró el exceso con papel filtro, la muestra se lavó 3 veces con agua estéril y se dejó secar. La muestra se colocó en un portaobjetos y las preparaciones se analizaron en el microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011.

En algunos casos, la muestra se procesó para MET con inmunomarcaje. La fracción vesicular se fijó con PFA/glutaraldehído al 4%/0.5% v/v durante 1 h a TA. Posteriormente, la muestra se deshidrató mediante concentraciones crecientes de etanol (50-100%) y se embebió en resina acrílica (London Resin Co), esta se polimerizó con radiación UV a 4°C durante 48 h. Se obtuvieron secciones 70 nm del bloque de resina y se montaron en rejillas de Ni²⁺ cubiertas en Formvar. A continuación, las muestras se incubaron en solución reguladora de fosfatos (PBS; 137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ y 1.8

mM de KH₂PO₄) con SFB al 10% por 1 h, para bloquear uniones inespecíficas. Después, se incubaron toda la noche (ON) a 4°C con el anticuerpo de ratón α -CagA- $\text{\textcircled{P}}$ sin diluir o con suero pre-inmune de ratón, se lavaron tres veces con PBS y se incubaron a TA por 1 h con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón (dilución 1:40) conjugado a partículas de oro coloidal de 20 nm (Ted Pella Inc., Redding). Las preparaciones se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se analizaron en el microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011.

Ensayos tipo Western blot

Las proteínas totales derivadas de cultivo puro y de la fracción de las vesículas se lisaron en solución reguladora de lisis (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 300 mM de NaCl e inhibidores de proteasas CompleteTM) y se sonicaron a 80% de intensidad (4 ciclos de 1 min cada uno). Las muestras se cuantificaron mediante el método de Lowry y empleando el reactivo DC Assay (Bio-Rad). Las proteínas se separaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 % y posteriormente se electrotransferieron a membranas de PVDF durante 1 h a 20 mA. Las membranas se bloquearon en leche baja en grasa al 5% durante 1 h a TA y, después se incubaron durante ON a 4°C con el anticuerpo de ratón α -CagA (1:500). Al día siguiente, las membranas se lavaron 5 veces durante 10 min con TBS (50 mM de Tris-Cl pH 7.5 y 150 mM de NaCl) suplementado con Tween-20 al 0.05%. Después, las membranas se incubaron durante 1 h a TA con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP) (dilución 1:10,000), se lavaron 5 veces como arriba se indicó y las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia, empleando el kit de MILLIPORE ImmobilonTM y el equipo MichroChemi (Thermo Fisher Scientific, invitrogen, iBrightCL1000)

Como control de carga, se realizó la electroforesis de un gel gemelo que no fue procesado para Western blot. El gel se tiñó con solución de Coomassie (metanol 40%, azul de Coomassie 0.2% y ácido acético 10%) durante 12 h en agitación continua. Posteriormente, se incubó una hora en solución desteñidora (ácido acético glacial 5% y metanol 16.5%), se cambió la solución y este paso se repitió tres veces más, hasta que

aparecieron las bandas teñidas en azul y el fondo transparente. El gel se fotografió en el equipo iBrightCL1000.

Cultivo de células epiteliales

Células epiteliales humanas derivadas de adenocarcinoma gástrico (AGS: ATCC CRL-1739) y pancreático (BxPC-3) se crecieron en medio RPMI-1640 suplementado con 0.25 µg/ml de amfotericina B, 100 U/ml de penicilina, 0.1 mg/ml de estreptomicina y 10% de SFB. Los cultivos se mantuvieron a 37°C, en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Incubación de las células epiteliales con *H. pylori* y sus fracciones

Células epiteliales crecidas a confluencia se incubaron durante 24 h con las diferentes fracciones (soluble, vesicular y adherida) obtenidas previamente, con concentraciones de proteína de 0.5 y 1 µg/ml. Como control positivo, las células epiteliales se incubaron durante 24 h con la bacteria completa a una MOI 1:100.

Análisis de los cambios morfológicos y del fenotipo colibrí de células epiteliales

Las células epiteliales crecidas en cubreobjetos e incubadas con las fracciones y la bacteria completa, se fijaron con PFA 4% durante 30 min y se dejaron en PBS. Posteriormente, se agregó violeta de genciana durante un min, la preparación se enjuagó con agua bidestilada, se colocó Lugol durante un min, se volvió a lavar, se agregó alcohol-acetona durante 30 seg y se enjuagó. Por último, se añadió safranina durante un min y se lavó levemente con agua (Gram, 1884). Las muestras se observaron en un microscopio óptico (Zeiss, Axioscop 40) con el objetivo 100x con aceite de inmersión y se registraron los cambios morfológicos, tales como; redondeamiento celular, incremento de volumen, presencia de proyecciones, separación de las células y aparente daño celular. Se consideró fenotipo tipo colibrí, el mostrado por las células redondeadas y con la presencia de una proyección en un polo, que asemeja el pico de un colibrí (Reyes-Leon, Atherton, Argent, Puente, & Torres, 2007).

Efecto citopático

Las células epiteliales crecidas en placas de 48 pozos e incubadas con las fracciones y la bacteria completa, se lavaron 2 veces con PBS, se fijaron con glutaraldehído al 2.5% durante 15 min a TA, se lavaron 2 veces más y se tiñeron durante 10 min a TA con azul de metileno al 1% diluido en solución de boratos al 0.1 M (0.2 M de ácido bórico y 0.2 M de tetraborato de sodio, pH 8.7). Las placas se lavaron tres veces con buffer de boratos al 0.01 M pH 8.7 y se fotografiaron. Para eluir el colorante, se añadieron 200 μ l de HCl al 0.1 N y las placas se incubaron durante 30 min a 37°C. El líquido recuperado de cada pozo se diluyó 1:100 con HCl 0.1 N y se midió su absorbancia a una $\lambda = 660$ nm en un espectrofotómetro (Beckman). Como control negativo, las células epiteliales se trataron solo con medio RPMI incompleto, las cuales se consideraron como monocapas íntegras con 0% de destrucción.

Mediciones de resistencia eléctrica transepitelial (RET)

Una vez que las células epiteliales crecidas a confluencia en filtros Transwell® (poro de 0.4 μ m) desarrollaron RET ($>300 \Omega/\text{cm}^2$), se incubaron con las fracciones y la bacteria completa y la RET se monitoreó durante 24 h con un voltímetro EVOM (Millipore). La RET de cada pozo se normalizó de acuerdo con su valor inicial, previo al tratamiento. Como control negativo, las células epiteliales se incubaron con medio RPMI incompleto.

Inmunofluorescencia (IF) indirecta

Células epiteliales crecidas en cubreobjetos e incubadas con las fracciones o la bacteria completa, se lavaron 3 veces con PBS, se fijaron con PFA al 4% durante 30 min a TA, se lavaron tres veces con PBS y se permeabilizaron con tritón X-100 al 0.2% durante 15 min a TA. Después de tres lavados con PBS, las muestras se bloquearon por 30 min a TA con albúmina sérica bovina (BSA) libre de IgGs al 0.5% y se incubaron ON a 4°C con el anticuerpo de ratón α -CagA sin diluir o con suero pre-inmune de ratón. Al día siguiente, los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a tetrametilrodamina (TRITC) (dilución 1:150). Después de 3 lavados

con PBS, los núcleos se tiñeron con 2.5 µg/ml de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) por 5 min a TA, se lavaron nuevamente con PBS y la fluorescencia se preservó con Vectashield. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos y se analizaron en un microscopio confocal (Leica TCS_SP5_MO), a través de secciones digitales de 0.5 µm de grosor y en los planos xy y zy.

Cuantificación de interleucina (IL-8)

Las células de epitelio gástrico AGS se cultivaron en placas de 96 pozos y se incubaron por 24 h con las fracciones o la bacteria completa. El medio de cada pozo se recuperó y se determinó la cantidad de IL-8 mediante la técnica de ELISA y siguiendo el protocolo del kit comercial de PREPOTECH. Primeramente, se realizó la reconstitución del anticuerpo de captura, el anticuerpo de detección y del estándar de IL-8. A continuación, se dejó toda la noche una placa con el anticuerpo anti-IL-8 en una concentración de 0.50 µg/ml. Al día siguiente, se lavó la placa con solución de lavado y se agregó la solución de bloqueo durante 1 h a TA, se aspiró la solución y se lavó la placa 4 veces. A continuación, se realizó la curva tipo diluyendo el estándar de 1000 pg/ml a cero y se colocó en cada pozo 100 µl por triplicado y 100 µl de muestra en los pozos correspondientes. La placa se incubó durante 2 h. Posteriormente, se lavó la placa y se agregó el anticuerpo de detección en una concentración de 0,50 µg/ml, se agregaron 100 µl a cada pozo y se dejó incubando durante dos h. Luego, se lavó la placa y se agregó 100 µl a cada pozo del conjugado de Avidina-HRP (1:2000), incubando durante 30 min a TA. Se lavó la placa y se añadió 100 µl de solución de sustrato a cada pozo, se supervisó el desarrollo del color con un lector de placas ELISA Epoch (Biotek) a 405 nm.

Análisis estadístico

Se realizaron al menos tres experimentos independientes, cada uno por triplicado. Los datos se analizaron estadísticamente con la prueba ANOVA en el programa Prisma 5 GraphPad. La significancia estadística se tomó como * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Los datos representan la media y el error estándar.

XII. RESULTADOS

Re-identificación de la cepa *H. pylori* CagA⁺

En este trabajo se usó la cepa de referencia 26695 *H. pylori* CagA⁺, con gran capacidad de virulencia y para su re-identificación como control se empleó la cepa clínica *H. pylori* CagA⁻. En la cepa CagA⁺ se evaluó la actividad de las enzimas: ureasa, oxidasa y catalasa. Además, las bacterias se tiñeron mediante la solución de Gram para determinar la presencia de su envoltura celular.

Los resultados muestran que esta cepa convierte la urea presente en el agar en CO₂ y NH₃, produce un cambio de pH, reflejado en el cambio de color del indicador, de transparente a naranja (Figura 11A). Además, las bacterias descompusieron al H₂O₂ en H₂O y O₂, evidenciado en la presencia de burbujas en el agar producidas por el oxígeno (Figura 11B). Por otra parte, se observó que estas bacterias son capaces de oxidar a la tetrametil-p-fenilendiamina del reactivo de Kovacs en quinolonas, las cuales produjeron un color morado-azulado (Figura 11C). En resumen, estos ensayos permitieron concluir que las bacterias *H. pylori* CagA⁺, contienen ureasas, catalasas y oxidasas capaces de manifestar una respuesta catalítica eficiente (Figura 11).

Aunado a estos hallazgos, las bacterias también se tiñeron de color rosado con la solución de Gram, revelando la presencia de su doble membrana, entre las que se localiza la fina pared celular incapaz de retener el colorante durante la tinción y, por lo tanto, considerándose como bacterias Gram-negativas (Figura 11D).

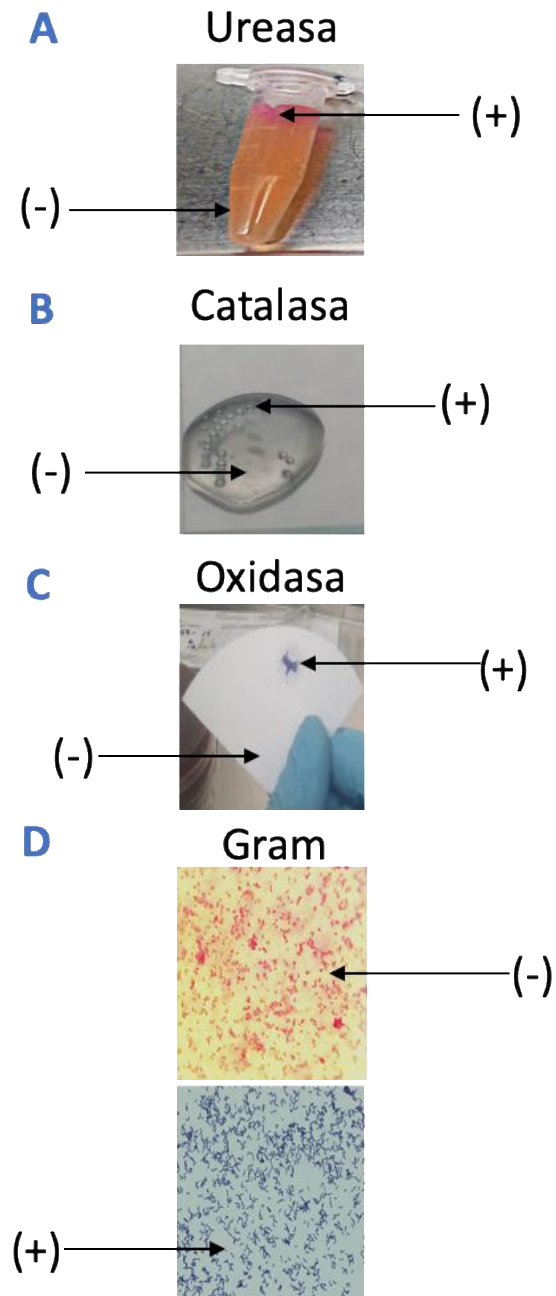


Figura 11. Re-identificación de la cepa *H. pylori* CagA⁺. Las bacterias se caracterizaron por su actividad de ureasa (**A**), catalasa (**B**) y oxidasa (**C**), así como por su tinción con el colorante de Gram (**D**). Las flechas indican si la prueba era positiva (+) o negativa (-).

Finalmente, en esta cepa bacteriana se evaluó la presencia de la proteína CagA mediante ensayos de tipo Western blot y empleando un anticuerpo específico. Como control se empleó la cepa clínica *H. pylori* CagA⁻. A partir de lisados bacterianos

provenientes de ambas cepas, se encontró que las bacterias CagA⁺ expresan una proteína de 136 kDa; sin embargo, la cepa CagA⁻ no expresó esta proteína (Figura 12, panel derecho). Como control de carga, de manera paralela se corrió otro gel con las mismas condiciones y en lugar de ser procesado para Western blot, se tiñó con solución de Coomassie. En la figura 12 se puede observar que el carril correspondiente al lisado bacteriano CagA⁻ presenta una cantidad similar de proteínas que el lisado CagA⁺ (panel izquierdo), demostrando que sólo esta cepa presenta a la proteína CagA⁺.

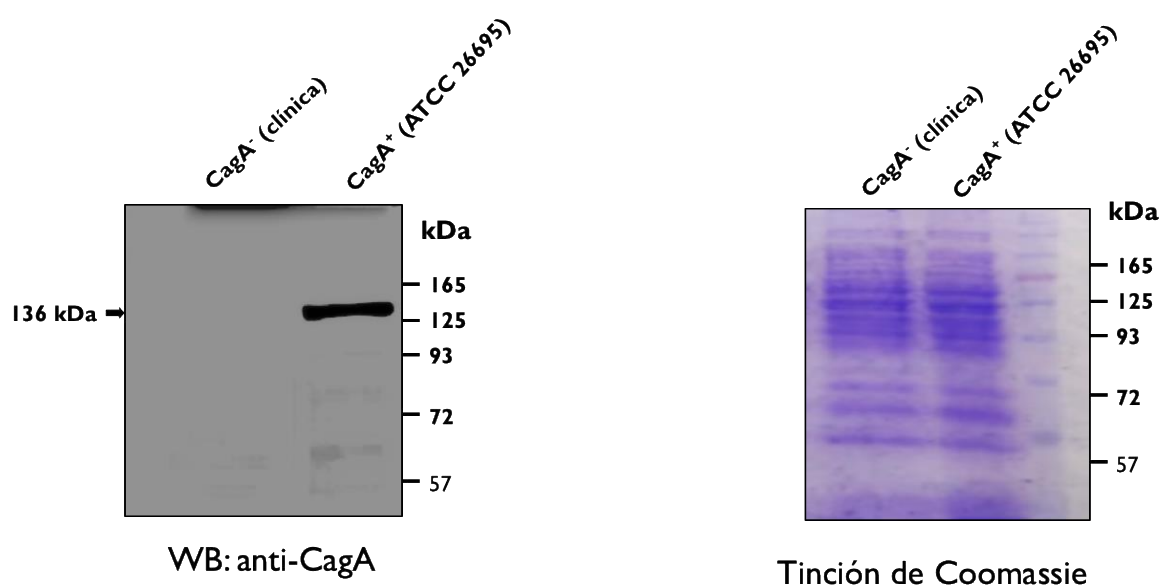


Figura 12. Análisis de la expresión de CagA en dos cepas de *H. pylori*. Las bacterias *H. pylori* CagA⁺ y CagA⁻ se lisaron y las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE. A) El gel se tiñó con solución de Coomassie para corroborar una carga similar de proteínas. B) Un gel gemelo se electrotransfirió a una membrana de PVDF y se procesó para ensayos de Western blot, donde se empleó el anticuerpo α -CagA para determinar la presencia de la proteína. Los números de la derecha indican los marcadores de peso molecular estándar.

A manera de resumen, se realizó una tabla indicando las propiedades bioquímicas y la expresión de CagA en ambas cepas bacterianas (Tabla 3).

Tabla 3. Re-identificación de cepas *H. pylori*

Cepa	Ureasa	Oxidasa	Catalasa	Tinción de Gram	Expresión de CagA
CagA ⁺	+	+	+	+	+
CagA ⁻	+	+	+	+	+

Una vez realizada la re-caracterización de la cepa de referencia 26695 *H. pylori* CagA⁺, se consideró ser la cepa de referencia empleada para realizar este trabajo, por contener los mecanismos y la proteína principal de virulencia para generar un daño en las células hospederas.

Revisión de micrografías de MET y MEB

Debido a que el objetivo principal de este trabajo es analizar el efecto de las vesículas secretadas por *H. pylori* CagA⁺ en células pancreáticas. Como parte del trabajo, fue necesario demostrar que esta cepa es capaz de liberarlas. Dado que el laboratorio de Infectología del Hospital Infantil de México Federico Gómez cuenta con un amplio acervo de micrografías de MET y MEB de diferentes cepas de *H. pylori*, se analizaron varias imágenes con la finalidad de encontrar material que mostrara la posible secreción o liberación de vesículas por estas bacterias. En diversas micrografías de MEB correspondientes a la cepa *H. pylori* CagA⁺, se encontraron pequeñas estructuras con forma esférica desprendiéndose del bacilo, que podrían corresponder a vesículas (Figura 13A). En otro caso, se puede observar que estas estructuras ya han sido liberadas por el bacilo (Figura 13B).

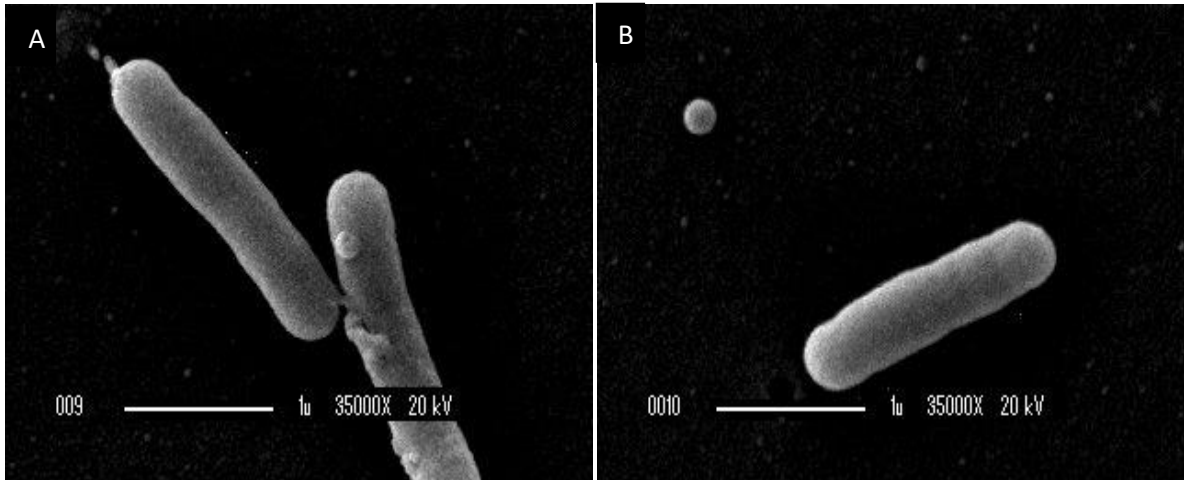


Figura 13. Micrografías de *H. pylori* CagA⁺ procesadas por MEB. Imágenes pertenecientes al acervo fotográfico del laboratorio de Infectología del Hospital Infantil de México Federico Gómez. **A)** Se aprecia una estructura esférica desprendiéndose de la membrana externa de un bacilo. **B)** Estructura esférica afuera del bacilo.

De manera semejante, en micrografías de MET, se observaron estructuras esféricas cercanas a la membrana externa de los bacilos (Figura 14 A,B). Además, las estructuras presentan una doble bicapa lipídica (Figura 14C). Estas imágenes de microscopía electrónica demuestran que la cepa *H. pylori* CagA⁺, produce y secreta vesículas al medio externo.

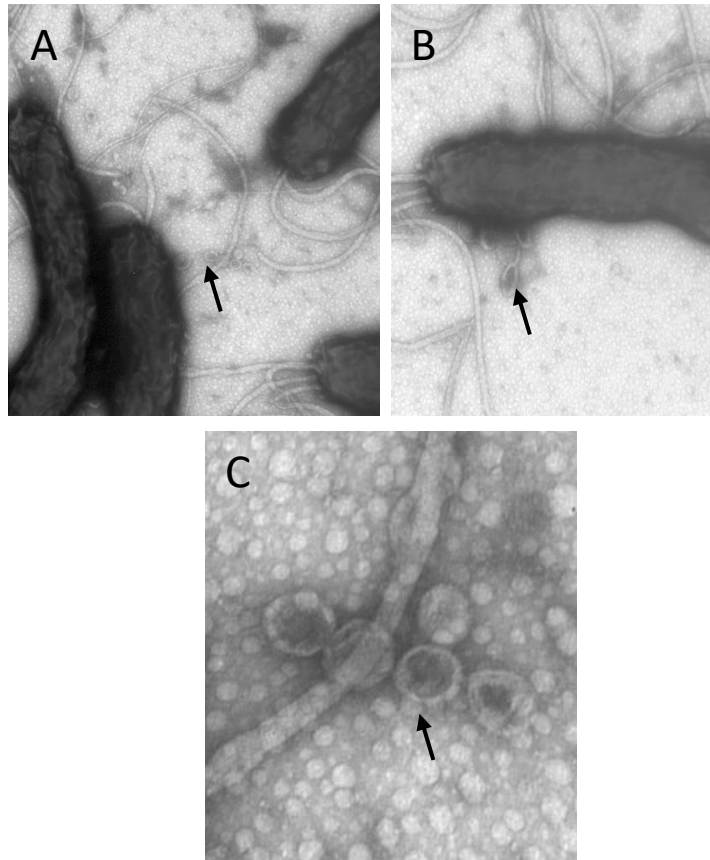


Figura 14. Micrografías de *H. pylori* CagA⁺ procesadas por MET. Imágenes pertenecientes al acervo fotográfico del laboratorio de Infectología del Hospital Infantil de México Federico Gómez. **A,B)** Se aprecian estructuras esféricas desprendiéndose y cercanas a la membrana externa de los bacilos. **C)** Acercamiento de las estructuras esféricas localizadas cerca de los flagelos, donde se puede observar la bicapa lipídica de estas vesículas. Flechas: vesículas.

Estandarización del aislamiento de vesículas secretadas por *H. pylori* CagA⁺

Una vez que se observó la presencia de vesículas secretadas por esta cepa de *H. pylori*, se procedió a aislarlas. Para ello se realizó una revisión bibliográfica, con el objeto de determinar la metodología más adecuada para la obtención de vesículas bacterianas. Al respecto, *Escherichia coli* produce una buena cantidad de vesículas cuando las bacterias se crecen en medio sólido (agar)(Wai et al., 2003). En contraste, en otros trabajos se ha descrito un buen rendimiento de vesículas aisladas de *H. pylori*, cuando las bacterias se crecen en medio líquido (caldo Brucella suplementado con ciclodextrina) y diferentes condiciones de centrifugación (Olofsson et al., 2014). La tabla 4 resume con más detalle el tipo de medio de cultivo y los diferentes procedimientos reportados para obtener vesículas

de estos dos tipos de bacterias, así como las ventajas y desventajas de cada metodología. Estos procedimientos se llevaron a cabo en este trabajo, para encontrar el mejor protocolo de aislamiento de vesículas de la cepa *H. pylori* CagA⁺.

Tabla 4. Metodologías para la obtención de vesículas de bacterias.

Referencia	Bacteria	Medio de cultivo	Técnica	Ventajas	Desventajas
Nyunt, S.W., et al. 2003	<i>Escherichia coli</i>	Agar	<ul style="list-style-type: none"> • 150 000 g, 3h, 4°C 	<ul style="list-style-type: none"> • Evita la resiembra en medio líquido 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere un gran número de cajas de cultivo • Bajo rendimiento
Parker, H., et al. 2010.	<i>H. pylori</i>	Caldo Brucella	<ul style="list-style-type: none"> • 200,000 g, 2 h, 4°C 	<ul style="list-style-type: none"> • No requiere mucho medio • Buen rendimiento 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere múltiples pasos
Yonezawa, H., et al. 2009	<i>H. pylori</i>	Caldo Brucella + 0.2% β-ciclodextrina	<ul style="list-style-type: none"> • 40,000 g, 2 h at 4°C 	<ul style="list-style-type: none"> • No requiere mucho medio • Buen rendimiento 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere múltiples pasos
Olofsson, A., et al. 2010 y 2014	<i>H. pylori</i>	Caldo Brucella + 0.2% β-ciclodextrina	<ul style="list-style-type: none"> • 10,000 g, 20 min • Filtración • 150 000 g, 3h, 4°C • Lavados • 150 000 g, 3h, 4°C 	<ul style="list-style-type: none"> • No requiere mucho medio • Buen rendimiento 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere múltiples pasos
Modificado de Ruiz-Castañeda, et al. 1940	<i>H. pylori</i>	Caldo Brucella + 0.2% β-ciclodextrina+ Agar Casman	<ul style="list-style-type: none"> • 10,000 g, 20 min • 150 000 g, 2h, 4°C 	<ul style="list-style-type: none"> • No requiere mucho medio • Buen rendimiento 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere dos medios de cultivo

La mayoría de los protocolos condensados en la Tabla 4 no produjeron un buen rendimiento de vesículas, excepto la metodología descrita por Olofsson. Sin embargo, se implementó una nueva metodología que consistió en crecer a las bacterias en medio sólido (agar Casman) y líquido (Brucella con β-ciclodextrina al 1%) y se denominó medio bifásico.

Las bacterias crecidas en medio líquido (Olofsson et al) y bifásico (este trabajo) se procesaron por centrifugación como se indicó en la metodología, y se pudo obtener tres fracciones: soluble, adherida y vesicular. El material liberado por las bacterias en el medio se centrifugó y el sobrenadante resultante se consideró como la **fracción soluble**; en tanto que la pastilla se centrifugó nuevamente a alta velocidad y la pastilla nueva se consideró como la **fracción vesicular**. La **fracción adherida** incluyó a las bacterias adheridas a la botella de cultivo o al agar y a la biopelícula formada por las bacterias.

Análisis de las fracciones obtenidas de *H. pylori* por MET

Para analizar la presencia de vesículas, su pureza y abundancia en las diferentes fracciones bacterianas obtenidas, las muestras de cada una de ellas se procesaron para su observación por MET. De las fracciones derivadas de bacterias crecidas en medio líquido, sólo en la fracción vesicular se observaron abundantes estructuras esféricas (Figura 15). Sin embargo, en el medio líquido no se logró observar con buena definición a estas estructuras, de manera que se pudiera resolver si poseían una doble membrana.

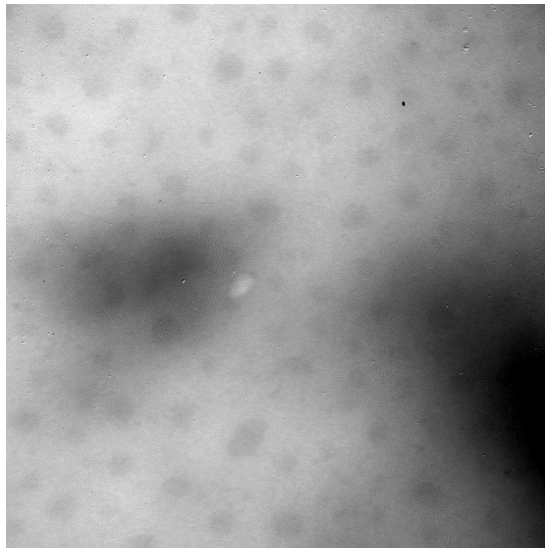


Figura 15. Fracción vesicular obtenida de bacterias *H. pylori* CagA⁺ crecidas en medio líquido y procesadas por MET. Se observan estructuras esféricas, pero no se puede definir si presentan una doble membrana.

En cambio, en bacterias crecidas en medio bifásico la fracción vesicular presentó abundantes estructuras esféricas de diferentes tamaños que poseen una bicapa lipídica

(Figura 16). Cabe resaltar que en la muestra no se encontraron bacterias completas o restos celulares.

También se realizó la medición de estas estructuras esféricas, las cuales presentaron un tamaño de 96 - 137 nm (Figura 17), que se encuentra en el rango de tamaño descrito (20 -150 nm) para vesículas de *H. pylori* (Parker & Keenan, 2012).

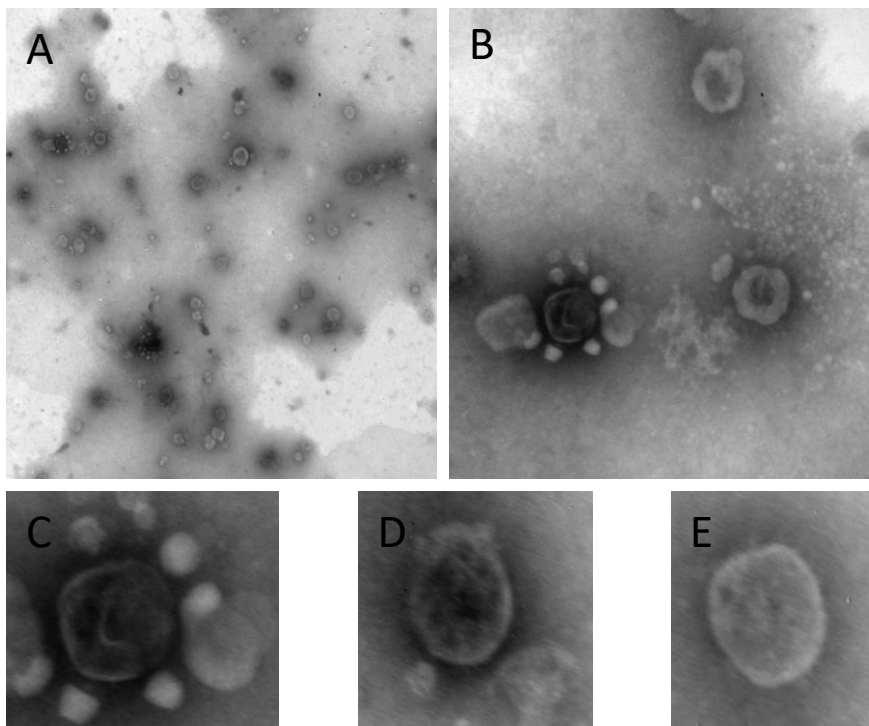


Figura 16. Fracción vesicular obtenida de bacterias *H. pylori* CagA⁺ crecidas en medio bifásico y procesadas por MET. A) Se observan abundantes estructuras esféricas. B-E) Acercamiento de las estructuras donde se puede apreciar claramente la presencia de una doble membrana

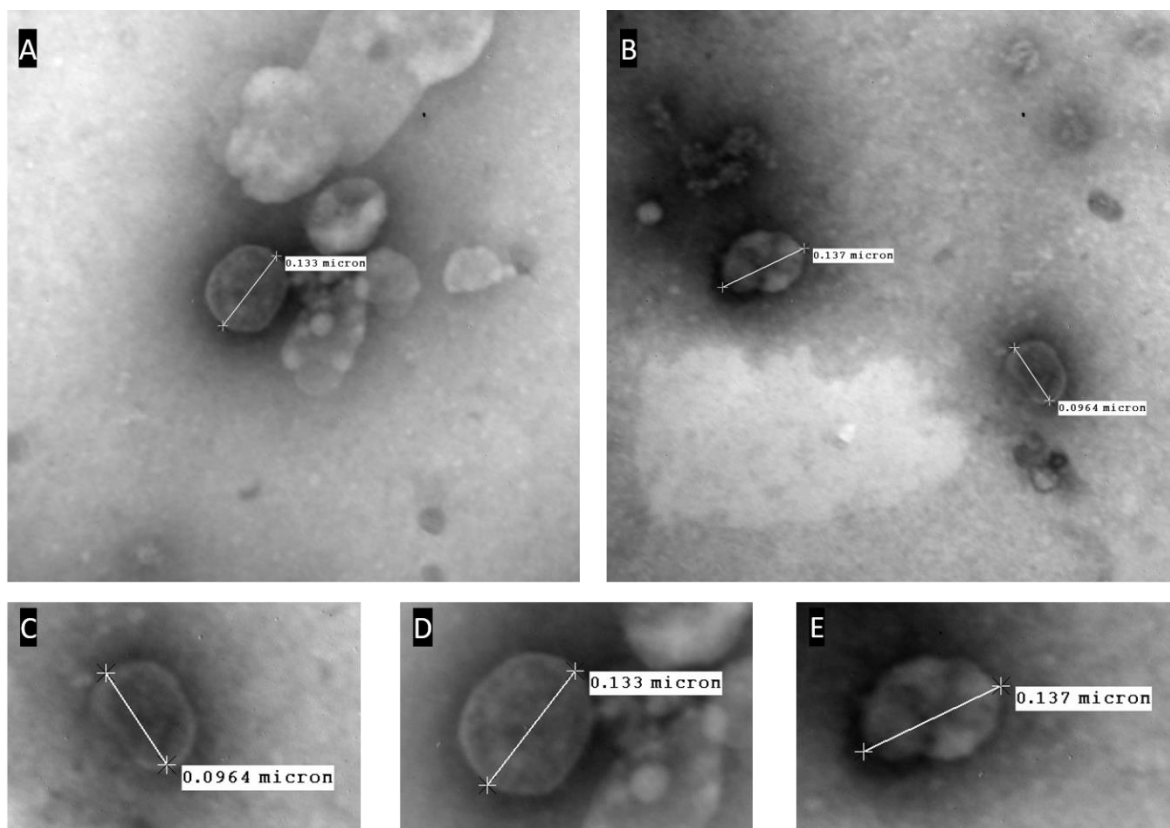


Figura 17. Fracción vesicular obtenida de bacterias *H. pylori* CagA⁺ crecidas en medio bifásico y procesadas por MET. A-E) Se muestra el tamaño de diferentes estructuras esféricas.

Con estos resultados se puede concluir que la fracción vesicular proveniente del cultivo de las bacterias en medio bifásico, a diferencia de las otras fracciones y del medio líquido, contiene estructuras esféricas correspondientes a vesículas; éstas exhiben una bicapa lipídica y presentan un tamaño adecuado. Además, esta fracción presentó una abundante cantidad de vesículas, con un adecuado nivel de pureza (sin bacterias o restos celulares). Por lo tanto, para los ensayos posteriores se decidió cultivar a las bacterias en medio bifásico.

Presencia de la proteína CagA en la fracción vesicular

Una vez que se estandarizó el protocolo de obtención de las vesículas, se caracterizaron bioquímicamente, evaluando la presencia del factor de virulencia CagA. A través de inmunomarcaje con un anticuerpo específico anti-CagA y oro coloidal, mediante MET se observaron vesículas con marca de CagA en su membrana (Figura 18).

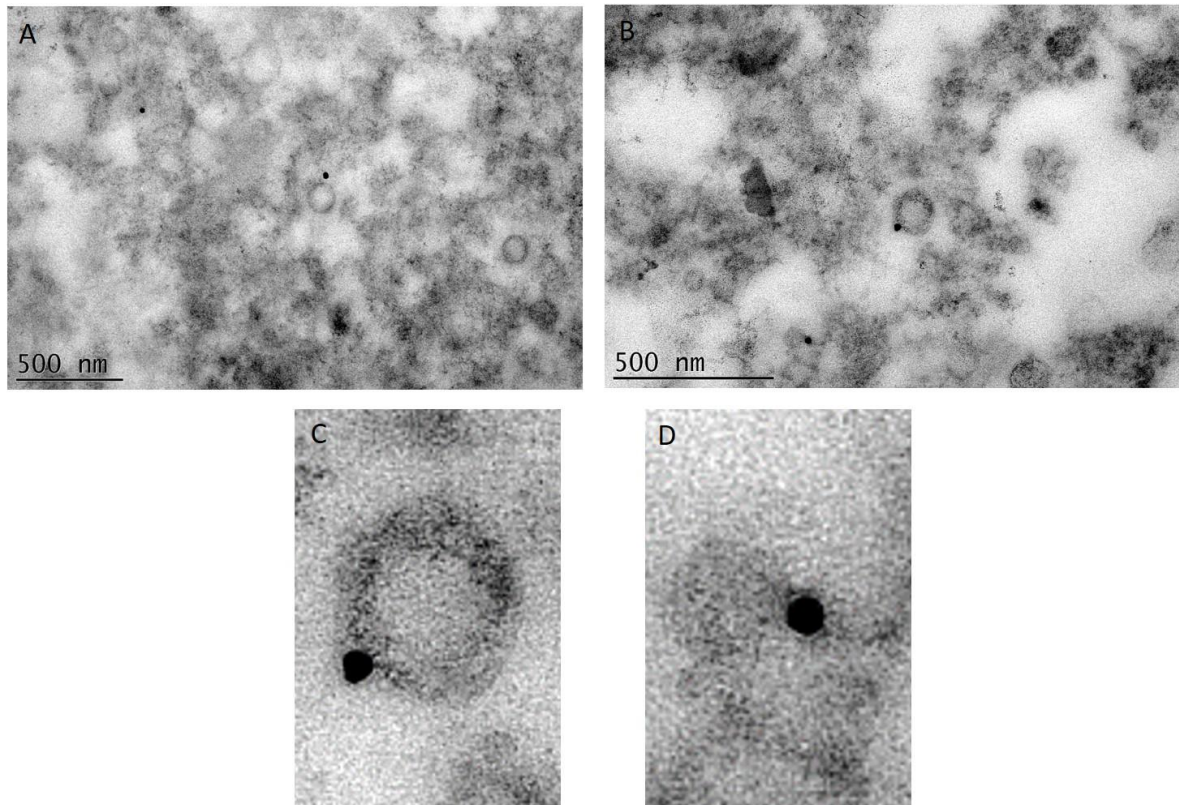


Figura 18. Inmunolocalización de CagA en la fracción vesicular obtenida de bacterias *H. pylori* CagA⁺ crecidas en medio bifásico y procesadas por MET. Una muestra de la fracción vesicular se procesó por MET e inmunomarcaje empleando el anticuerpo anti-CagA, seguido por un anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro coloidal. **A,B)** Se muestra las vesículas con y sin marcas de oro coloidal. **C,D)** Amplificación de vesículas que exhiben en su doble membrana, marca de oro coloidal.

Adicionalmente, la fracción vesicular se lisó y las proteínas obtenidas se separaron por electroforesis en geles SDS-PAGE y se tiñeron con solución de Coomassie. Los resultados mostraron que la fracción vesicular contenía, además de CagA, varias proteínas de diferentes pesos moleculares (Figura 19). Como control del patrón diferencial de proteínas se analizó un lisado completo de las bacterias completas. Los patrones de proteínas provenientes de la bacteria y de la fracción vesicular se observan completamente diferente.

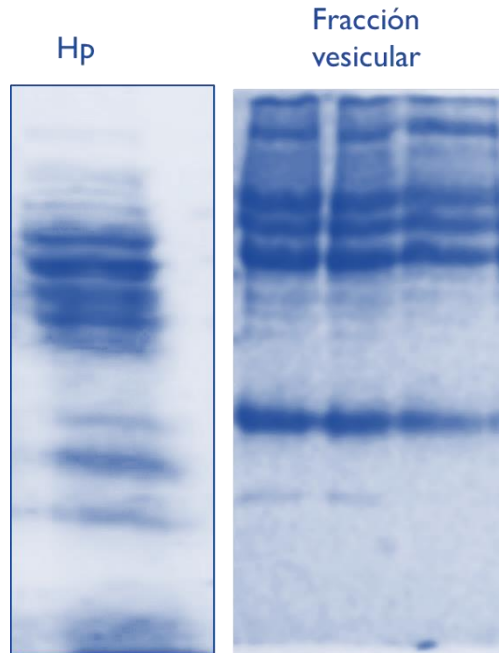


Figura 19. Análisis del patrón de proteínas de la fracción vesicular. La fracción vesicular se lisó, las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE y se tiñeron con solución de Coomassie. Como control, también se corrieron lisados de bacterias completas (Hp).

Con estos resultados se puede afirmar que las vesículas aisladas están asociadas con varias proteínas con diferente peso molecular y una de ellas es el factor de virulencia CagA, el cual además se localiza en la membrana de las vesículas.

Cambios morfológicos de células epiteliales producidos por *H. pylori*

La infección con *H. pylori* en células epiteliales gástricas causa marcados cambios morfológicos, entre los que destaca el llamado efecto o fenotipo colibrí, el cual se caracteriza por un redondeamiento celular y la presencia de una proyección en un polo de la célula, asemejando el pico de un colibrí (Masanori Hatakeyama, 2004). Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado el efecto de esta bacteria en células epiteliales del páncreas.

Como control positivo se analizaron los cambios morfológicos producidos por las bacterias completas en las células gástricas AGS. Las células AGS incubadas durante 24 h con *H. pylori* CagA⁺ a una MOI 1:100, se separaron, incrementaron su volumen, presentaron

redondeamiento celular y en algunos casos exhibieron prolongaciones parecidas al pico de un colibrí. Además, se observó que varias células epiteliales presentaron vesículas en su citoplasma (Figura 20 B). Estos resultados coinciden con lo reportado previamente por otros autores (Quiroga, Huertas, Cómbita, & Bravo, 2010; Reyes-Leon et al., 2007). En cambio, las células no infectadas, formaron una monocapa de células poligonales unidas entre sí (Figura 20 A).

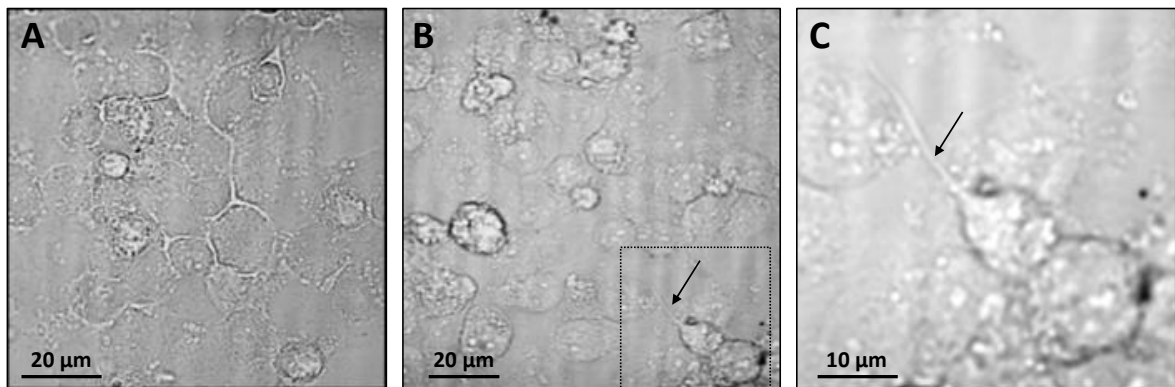


Figura 20. Cambios morfológicos presentados por células AGS infectadas con *H. pylori*. Células epiteliales gástricas AGS se infectaron con bacterias *H. pylori* CagA⁺ a una MOI 1:100 durante 24 h y se observaron al microscopio óptico. **A)** Células sin infección. **B, C)** Células infectadas con las bacterias. **C)** Aumento del recuadro mostrado en B. Flechas: proyecciones celulares.

A continuación, células epiteliales derivadas de ducto pancreático BxPC-3 también fueron incubadas con la misma cepa de bacterias. En este caso, las células se separaron, redondearon, el borde celular fue más evidente, algunas células presentaron mayor turgencia y otras se alargaron (Figura 21 B). El observar con mayor definición el contorno de las células sugiere que las UICs, que mantienen unidas a las células, se encuentran alteradas.

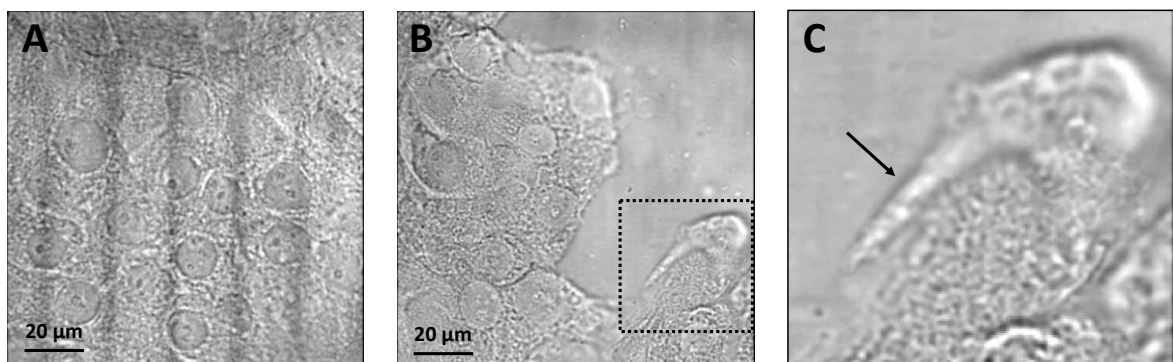


Figura 21. Cambios morfológicos presentados por células BxPC-3 infectadas con *H. pylori*. Células epiteliales pancreáticas se infectaron con bacterias *H. pylori* CagA⁺ a una MOI 1:100 durante 24 h, se fijaron y observaron al microscopio óptico. **A)** Células sin infección. **B, C)** Células infectadas con las bacterias. **C)** Aumento del recuadro mostrado en B. Flecha: proyección celular.

A pesar de que los cambios morfológicos producidos por las bacterias completas en las células pancreáticas no son tan drásticos como los exhibidos por las células gástricas, con estos resultados se puede concluir que *H. pylori* ejerce un efecto en el fenotipo de las células pancreáticas.

Cambios morfológicos de células epiteliales producidos por vesículas secretadas por *H. pylori*

Una vez demostrado el efecto de *H. pylori* sobre las células epiteliales pancreáticas y gástricas, se analizó si las vesículas secretadas por esta bacteria, y que anteriormente demostramos que poseen proteínas y toxinas como CagA, también pueden producir cambios morfológicos en estas células.

Las células AGS se separaron, alargaron y presentaron proyecciones de su membrana, aunque no sólo de un polo (Figura 22 B). Además, en estas células se aprecia claramente el fenotipo colibrí. Por su parte, las células control incubadas sólo con medio RPMI, formaron grupos y presentaron una morfología poligonal, característica de los epitelios (Figura 22 A).

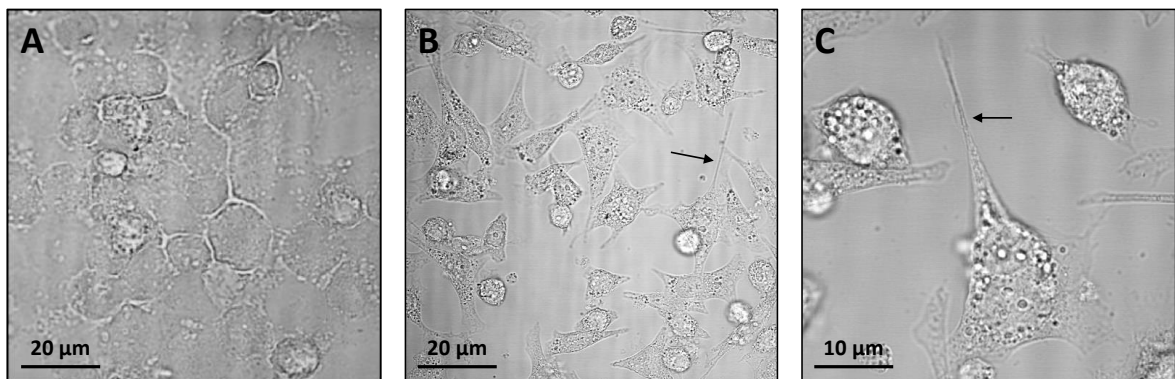


Figura 22. Cambios morfológicos presentados por células AGS tratadas con la fracción vesicular obtenida de bacterias *H. pylori*. Células epiteliales gástricas se incubaron durante 24 h con 1 µg/µl de la fracción vesicular obtenida de bacterias *H. pylori* CagA⁺, se fijaron y observaron al microscopio óptico. **A)** Células sin infección. **B, C)** Células tratadas con la fracción vesicular. **C)** Aumento de células epiteliales con el fenotipo tipo colibrí. Flechas: proyecciones celulares.

Las células pancreáticas BxPC-3 al ser incubadas con las vesículas, presentaron cambios similares a los observados con la bacteria completa, separándose, mayor turgencia y algunas células se alargaron (Figura 23 B). Por su parte, las células control formaron una monocapa y la morfología celular se mantuvo poligonal (Figura 23 A).

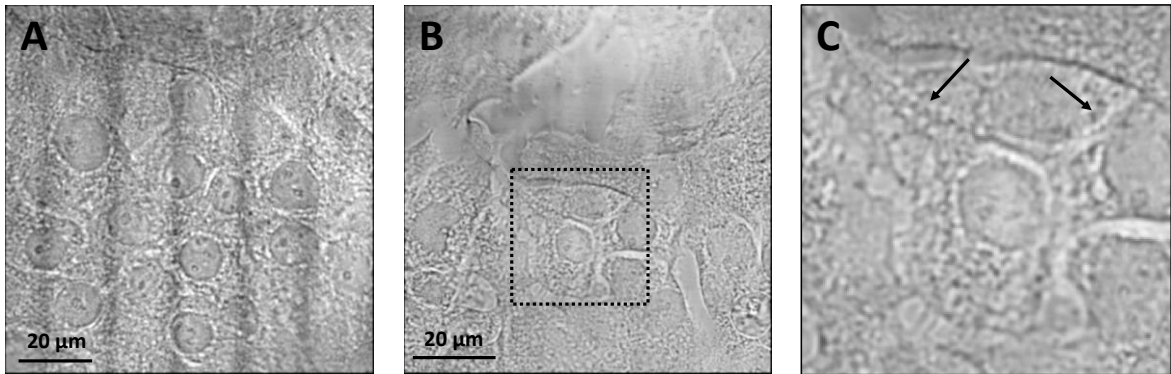


Figura 23. Cambios morfológicos presentados por células BxPC3 tratadas con la fracción vesicular obtenida de bacterias *H. pylori*. Células epiteliales pancreáticas se incubaron durante 24 h con 1 μg/μl de la fracción vesicular obtenida de bacterias *H. pylori* CagA⁺, se fijaron y observaron al microscopio óptico. **A)** Células sin infección. **B, C)** Células tratadas con la fracción vesicular. **C)** Aumento del recuadro mostrado en B. Las flechas indican: proyecciones celulares.

En resumen, los datos obtenidos demuestran que la fracción vesicular aislada del cultivo bifásico contiene factores de virulencia capaces de producir cambios morfológicos en las células pancreáticas y gástricas. Entre estos cambios destaca el fenotipo tipo colibrí, claramente observado en células gástricas incubadas con la bacteria completa, y cambios más sutiles en las células pancreáticas que posiblemente tengan repercusiones funcionales.

Daño citopático producido por las fracciones obtenidas de *H. pylori* CagA⁺ en células epiteliales

Para determinar el daño celular que las diferentes fracciones obtenidas de *H. pylori* CagA⁺ podrían provocar sobre la monocapa de células epiteliales, se llevaron a cabo ensayos citopáticos. Las células AGS y BxPC-3 se sembraron a alta confluencia y se incubaron durante 24 h con diferentes concentraciones de las fracciones soluble, adherida y vesicular, obtenidas de cultivos bacterianos en medio líquido y bifásico. El porcentaje de células que

permanecieron adheridas a la caja de cultivo fue inversamente proporcional al daño producido en las monocapas por las diferentes fracciones. Las células AGS incubadas con medio RPMI completo, como control negativo, no evidenciaron destrucción alguna (Figura 24). En cambio, el control positivo de daño que fueron las células epiteliales incubadas con la bacteria completa mostró un porcentaje de destrucción de aproximadamente 90%, con respecto al control negativo. En tanto que las todas fracciones obtenidas del cultivo líquido dañaron significativamente a las monocapas gástricas, aunque de manera diferencial. Con base a la concentración de proteínas, la fracción vesicular fue la que tuvo mayor efecto citopático, ya que desde una dosis baja de 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ presentó 18% de daño celular y a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, el efecto fue mayor, de 80%. Por su parte, las fracciones soluble y adherida, ni a concentraciones de 3 y 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, produjeron ese daño citopático, solo alcanzaron el 18-20%. La fracción adherida produjo 80% de daño, sólo cuando se empleó una concentración de 16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

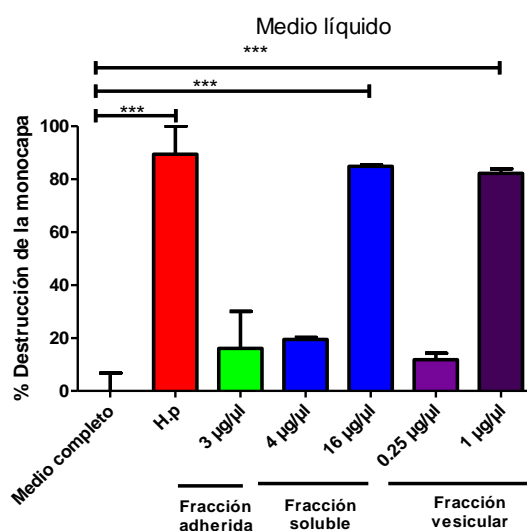


Figura 24. Daño citopático de células AGS producido por las diferentes fracciones obtenidas de bacterias crecidas en medio líquido. Células AGS se incubaron durante 24 h con diferentes concentraciones de las fracciones obtenidas del cultivo de *H. pylori* en medio líquido. Como control positivo, las células se incubaron con las bacterias completas a una MOI 1:100 (H.p) y como control negativo, las células se incubaron sólo con medio completo RPMI. Las monocapas se fijaron, se tiñeron con azul de metileno y el colorante eluido se cuantificó por espectrofotometría. Los valores se graficaron como porcentaje de daño, con respecto a las monocapas control sin infección y sin daño. Los datos representan la media \pm error estándar y se sometieron a análisis estadístico empleando la prueba ANOVA. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$.

A continuación, se evaluó el daño producido por las fracciones obtenidas del cultivo en medio bifásico sobre las células AGS. Los resultados encontrados fueron muy similares a los mostrados para el cultivo líquido, aunque en este caso no fue tan evidente el efecto en la monocapa de la fracción adherida (Figura 25). Aquí también la fracción vesicular produjo más daño que la fracción soluble, presentando una destrucción de 45% y 80% a una dosis de 0.25 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, en tanto que la fracción soluble produjo 15% y 70% de daño a las concentraciones de 4 y 16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, respectivamente. Con esta información se puede concluir que la fracción vesicular derivada del cultivo bifásico, la cual contiene vesículas bien caracterizadas, produce un efecto citopático significativo sobre las monocapas de células gástricas, de forma equivalente al que hacen las bacterias completas.

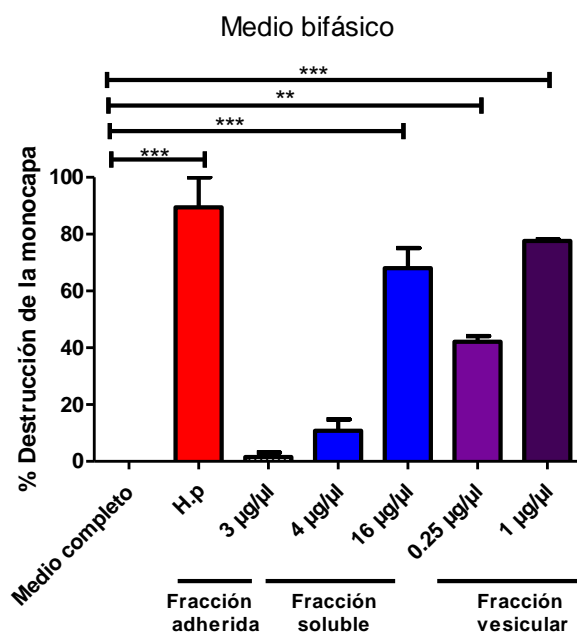


Figura 25. Daño citopático de células AGS producido por las diferentes fracciones obtenidas de bacterias crecidas en medio bifásico. Células AGS se incubaron durante 24 h con diferentes concentraciones de las fracciones obtenidas del cultivo de *H. pylori* en medio bifásico. Como control positivo, las células se incubaron con las bacterias completas a una MOI 1:100 (H.p) y como control negativo, las células se incubaron sólo con medio completo RPMI. Las monocapas se fijaron, se tiñeron con azul de metileno y el colorante eluido se cuantificó por espectrofotometría. Los valores se graficaron como porcentaje de daño, con respecto a las monocapas control sin infección y sin daño. Los datos representan la media \pm error estándar y se sometieron a análisis estadístico empleando la prueba ANOVA. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$.

En el caso de las células pancreáticas BxPC-3, el efecto citopático de la fracción vesicular obtenidas de cultivos bacterianos en medio bifásico fue muy similar al exhibido

por las células gástricas. Sólo las fracciones soluble y vesicular dañaron significativamente a las monocapas, siendo el efecto mayor el presentado por la fracción vesicular (Figura 26). Esta fracción, a dosis de 0.5 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ destruyó en 45% y 80% a las células epiteliales, en tanto, a esas mismas concentraciones, la fracción soluble dañó solo 12% y 70%, respectivamente.

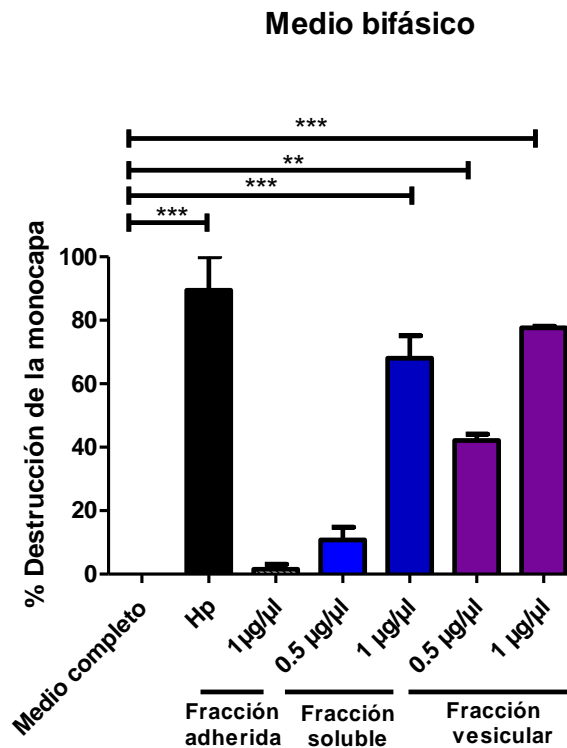


Figura 26. Daño citopático de células BxPC-3 producido por las diferentes fracciones obtenidas de bacterias crecidas en medio bifásico. Células pancreáticas se incubaron durante 24 h con diferentes concentraciones de las fracciones obtenidas del cultivo de *H. pylori* en medio bifásico. Como control positivo, las células se incubaron con las bacterias completas a una MOI 1:100 (Hp) y como control negativo, las células se incubaron sólo con medio completo RPMI. Las monocapas se fijaron, se tiñeron con azul de metileno y el colorante eluido se cuantificó por espectrofotometría. Los valores se graficaron como porcentaje de daño, con respecto a las monocapas control sin infección y sin daño. Los datos representan la media \pm error estándar y se sometieron a análisis estadístico empleando la prueba ANOVA. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$.

Con estos resultados se puede concluir que la fracción vesicular obtenida de bacterias crecidas en medio bifásico produce daño citopático en células pancreáticas, así como lo hace en células gástricas.

Efecto de la fracción vesicular de *H. pylori* sobre la permeabilidad epitelial

La principal función de los epitelios es constituir una barrera selectiva que separe compartimentos celulares y proteja al organismo del medio exterior y de agentes dañinos, incluidos los patógenos como *H. pylori*. Por lo tanto, para evaluar el efecto de las vesículas liberadas por esta bacteria sobre la función de barrera de las células pancreáticas, se midió la R, la cual es inversamente proporcional a la permeabilidad epitelial. En primer lugar, se analizó la RET de células AGS crecidas en filtros Transwells, las cuales desarrollaron valores estables durante 24 h (Figura 27). En cambio, cuando las células se incubaron con la bacteria completa, disminuyeron su RET desde los 5 min en 5%, y a los 30 min la caída fue de 20%, la cual se mantuvo hasta las 24 h de incubación, con respecto a las células control sin infección. Por su parte, la fracción vesicular produjo una caída mayor de la RET en las células AGS, de hasta el 30% y también se mantuvo a las 24 h.

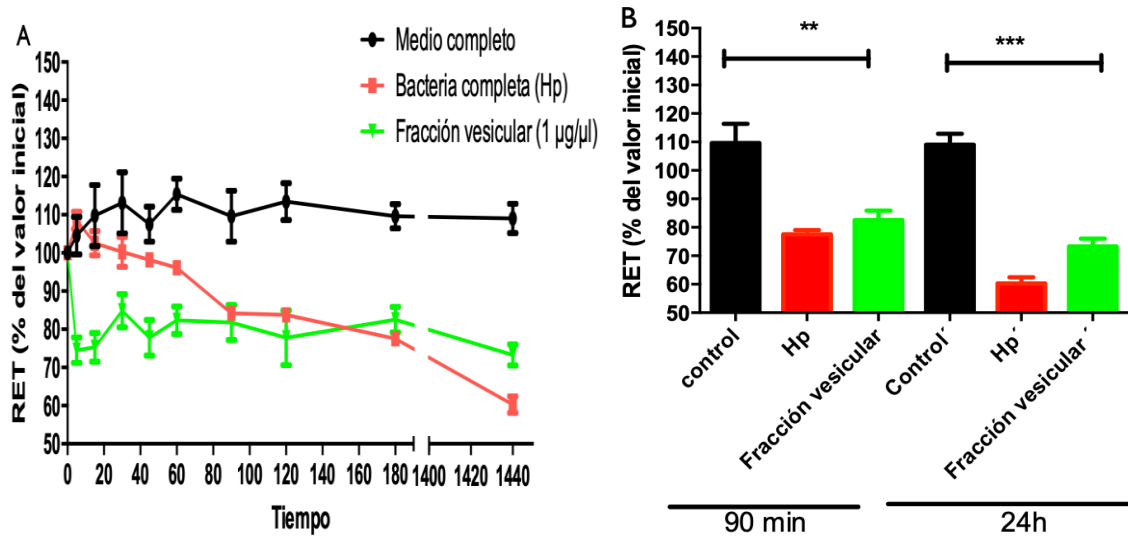


Figura 27. Medición de la RET de células AGS incubadas con la fracción vesicular. Células gástricas crecidas en filtros transwells, se incubaron con 1 µg/µl de la fracción vesicular y la RET se monitoreo por 24 h. Como control positivo, las células se infectaron con *H. pylori* a una MOI de 1:100 y como control negativo, las células solo se incubaron con medio completo RPMI. **A)** Gráfica de puntos y líneas de los valores de RET registrados durante 24 h. **B)** Gráfica de barras de los valores de RET a los 90 min y 24 h, para observar mejor las diferencias. Los valores fueron normalizados con respecto al valor inicial de RET de cada pozo. Los datos representan la media ± el error estándar. Las diferencias estadísticas se analizaron con la prueba ANOVA. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$.

Por su parte, las células BxPC-3 incubadas con la bacteria completa disminuyeron significativamente su RET a partir de los 30 min de incubación con la bacteria completa, en

aproximadamente 10% y a las 24 h bajó hasta un 30%. Estos datos son congruentes con los reportados por Hurtado, 2018. En estas células, la fracción vesicular disminuyó significativamente la RET en 10% a partir de las 2 h de incubación, siendo de 30% la caída de la RET a las 24 h (Figura 28).

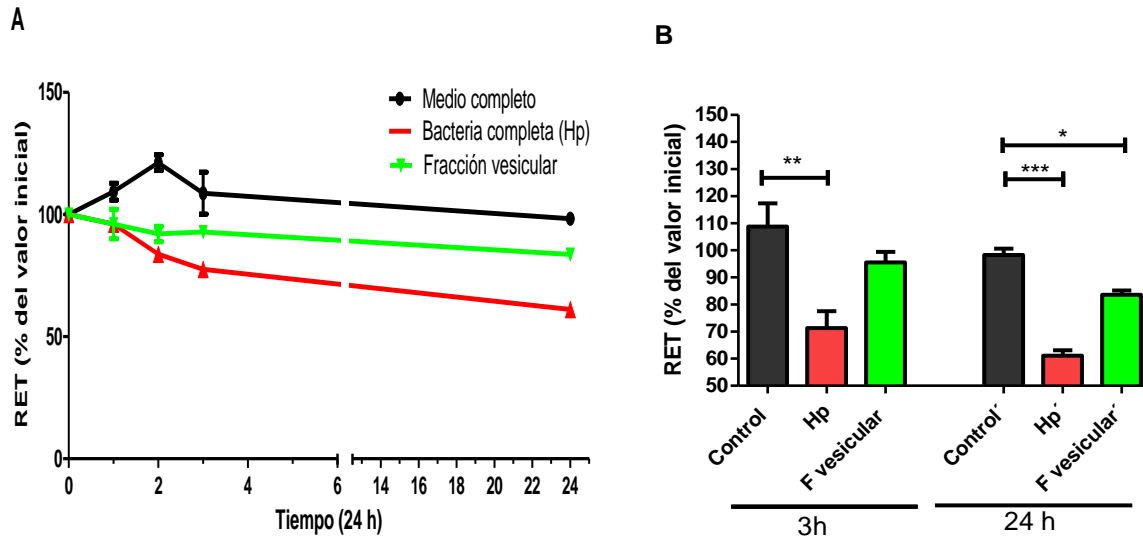


Figura 28. Medición de la RET de células BxPC-3 incubadas con la fracción vesicular. Células pancreáticas crecidas en filtros transwells, se incubaron con 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de la fracción vesicular y la RET se monitoreo por 24 h. Como control positivo, las células se infectaron con *H. pylori* a una MOI de 1:100 y como control negativo, las células solo se incubaron con medio completo RPMI. **A)** Gráfica de puntos y líneas de los valores de RET registrados durante 24 h. **B)** Gráfica de barras de los valores de RET a las 3 y 24 h, para observar mejor las diferencias. Los valores fueron normalizados con respecto al valor inicial de RET de cada pozo. Los datos representan la media \pm el error estándar. Las diferencias estadísticas se analizaron con la prueba ANOVA. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$.

Con esta información se puede afirmar que las vesículas secretas por *H. pylori* incrementan la permeabilidad de las células ductales pancreáticas, aunque ligeramente en menor medida que a las células gástricas, sugiriendo que los factores bacterianos contenidos en estas vesículas modifican la función de barrera de estos epitelios.

Alteraciones producidas por las vesículas de *H. pylori* sobre el citoesqueleto de actina de las células epiteliales

El daño en la barrera epitelial producido por las vesículas secretadas por *H. pylori* sugieren que las moléculas de las células epiteliales se encuentran alteradas. Al respecto, se ha reportado que la infección con *H. pylori* produce cambios en el citoesqueleto de actina

de células gástricas (S. Backert & Selbach, 2008). Por lo tanto, se analizó el efecto de las vesículas en el citoesqueleto de actina de estas células. Para teñir a la actina, se utilizó el reactivo faloidina-rodaminada, la cual es altamente afín a la actina filamentosa y además está conjugada al fluorocromo rojo-naranja. En las células control, incubadas solo con medio de cultivo, la actina se distribuyó de manera difusa en el citoplasma y en algunas fibras de estrés (Figura 29). En cambio, en las células incubadas con la bacteria se observó disminución de la tinción y la actina se concentró en puntos en el citoplasma. Por su parte, la fracción vesicular, también disminuyó la cantidad de actina y de fibras y el patrón también fue puntual.

Los rearrreglos del citoesqueleto de actina producidos, sugieren la participación de factores bacterianos contenidos en las vesículas. Por lo que, se analizó si la proteína CagA, presente en las vesículas, era capaz de internalizarse en estas células. Ensayos de inmunofluorescencia e imágenes de microscopía confocal permitieron observar la presencia de CagA en el interior de las células AGS tratadas con la fracción vesicular (Figura 28). Para corroborar la presencia de CagA en el interior celular, las preparaciones se analizaron en el plano xz, donde se apreció claramente que la marca puntal está dentro de las células. Células gástricas tratadas con la bacteria completa también mostraron una distribución de CagA en grumos citoplásmicos.

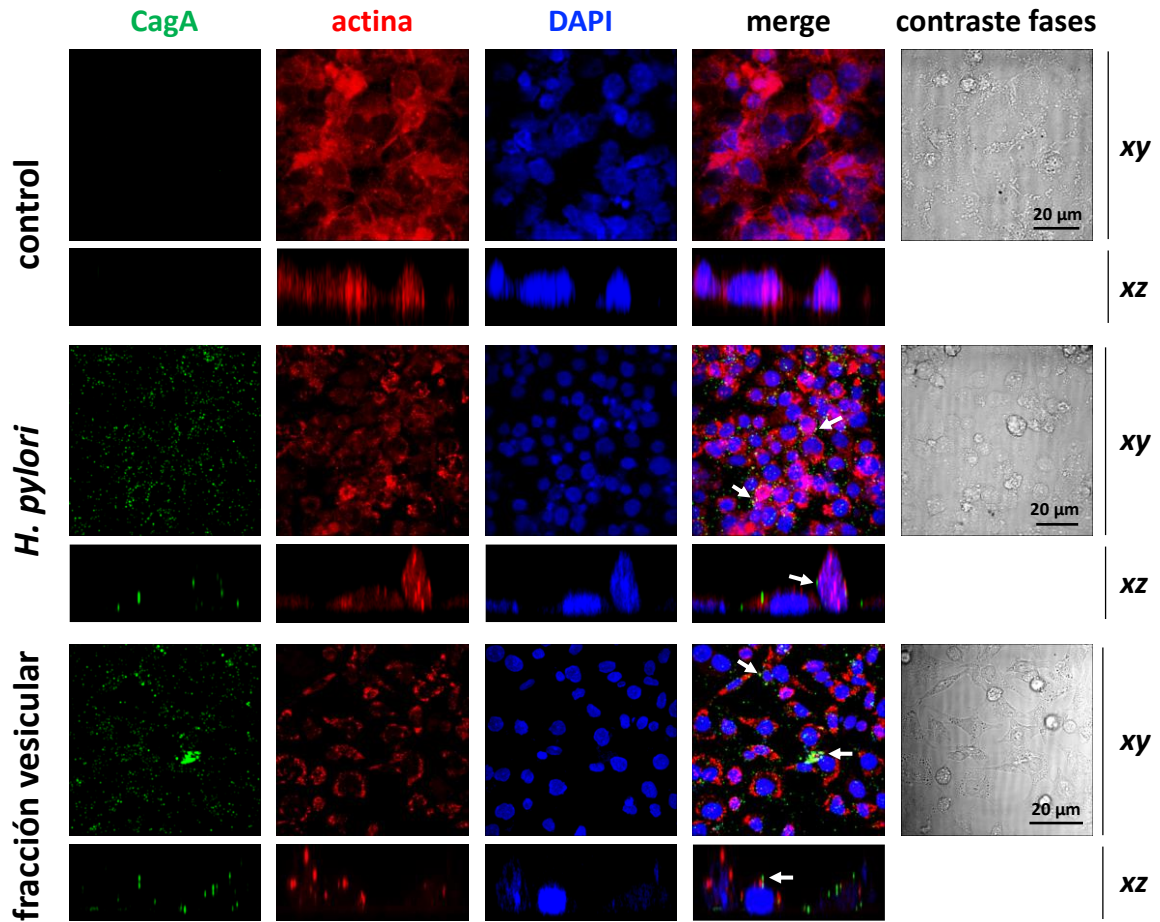


Figura 29. Localización de actina y CagA en células AGS tratadas con la fracción vesicular obtenida de *H. pylori*. Células gástricas se trataron con 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de vesículas durante 24 h. Como control negativo, las células se incubaron solo con medio RPMI completo; y como control positivo, las células se infectaron con *H. pylori* a una MOI 1:100. Las preparaciones se fijaron, se incubaron con un anticuerpo anti-CagA y después con un anticuerpo secundario acoplado a FITC (verde). Posteriormente, se incubaron con faloidina-rodaminada (rojo) y los núcleos se contra-tiñeron con DAPI (azul). Las muestras se analizaron por microscopía confocal en los planos xy y xz. Flechas: localización de CagA en el interior celular.

Una vez demostrado el efecto de las vesículas sobre el citoesqueleto de las células AGS, se procedió a analizar los cambios producidas por ellas en las células pancreáticas. En las imágenes de microscopía confocal lo primero que saltó a la vista fue una clara disminución de la actina en las células tratadas con la fracción vesicular, así como de las fibras de estrés (Figura 30). En el plano xz también se aprecia una desorganización del citoesqueleto, lo que probablemente produjo cambios en la morfología epitelial, observándose a las células más aplanadas, separadas y encimadas unas sobre otras. En tanto que las células control, incubadas solo con medio de cultivo, mostraron una

distribución homogénea de la actina, morfología epitelial cuboide, y se organizan en monocapas. En el control positivo de células BxPC-3 infectadas con la bacteria completa, los cambios en el citoesqueleto y morfológicos son muy similares a los observados en las células tratadas con las vesículas.

Además, se determinó la presencia de CagA en el interior de las células BxPC-3 tratadas con la fracción vesicular (Figura 30). El patrón de distribución fue puntual en el citoplasma e incluso algunos núcleos se tiñeron con estos puntos correspondientes a la citotoxina. Las imágenes de los planos xz, confirman la marca de CagA dentro de las células tratadas con las vesículas, al igual que las células infectadas con la bacteria.

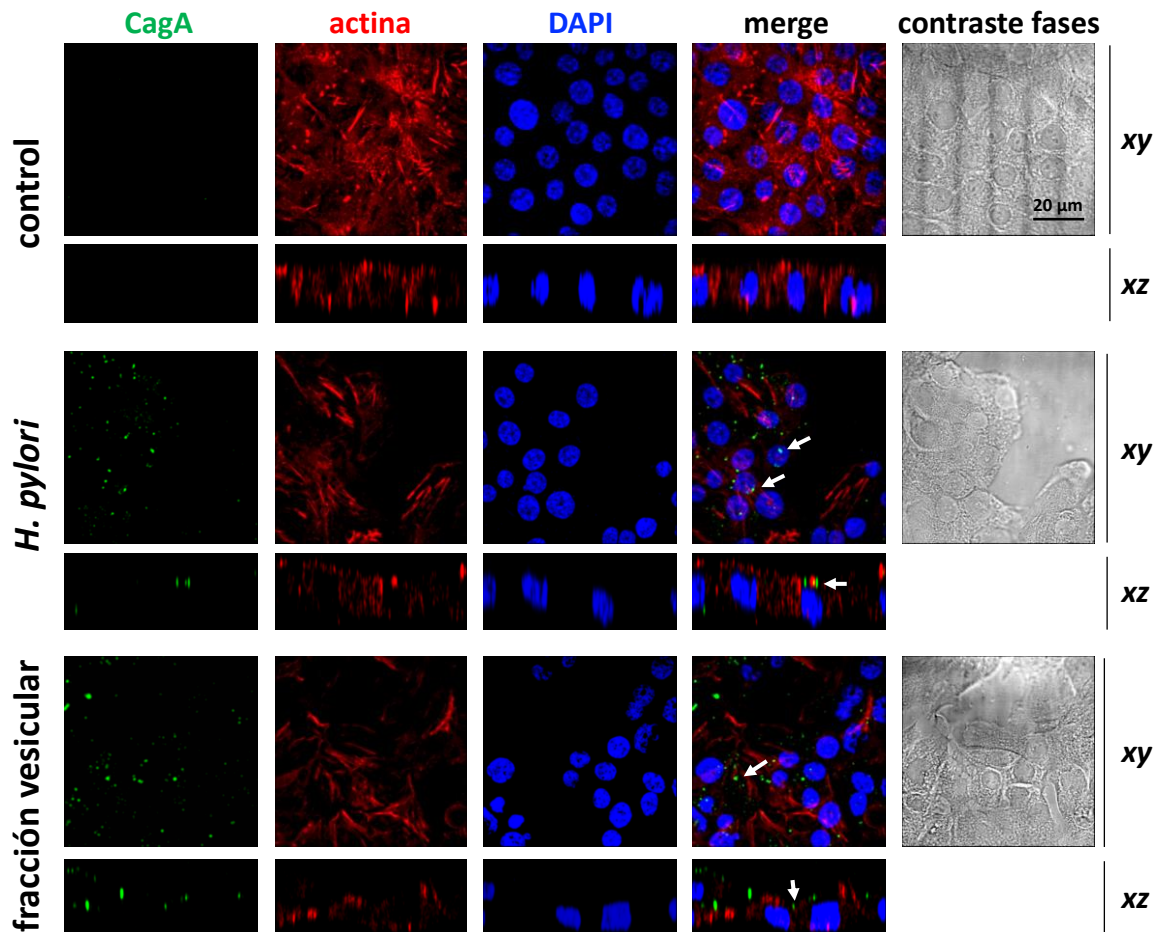


Figura 30. Localización de actina y CagA en células BxPC-3 tratadas con la fracción vesicular obtenida de *H. pylori*. Células pancreáticas se trataron con 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de vesículas durante 24 h. Como control negativo, las células se incubaron solo con medio RPMI completo; y como control positivo, las células se infectaron con *H. pylori* a una MOI 1:100. Las preparaciones se fijaron, se incubaron con un anticuerpo anti-CagA y después con un anticuerpo secundario acoplado a FITC (verde). Posteriormente, se incubaron con faloidina-rodaminada

(rojo) y los núcleos se contra-tiñeron con DAPI (azul). Las muestras se analizaron por microscopía confocal en los planos xy y xz. Flechas: localización de CagA en el interior celular.

Estos resultados sugieren que las vesículas llevan CagA, la cual es capaz de internalizarse en las células pancreáticas, y una vez dentro, induce rearrreglos del citoesqueleto de actina y eventualmente cambios morfológicos, como el denominado fenotipo tipo colibrí.

Producción de IL-8 por células AGS tratadas con vesículas de *H. pylori*

La interleucina-8 (IL-8) se sobreexpresa y secreta por la mucosa gástrica expuesta a *H. pylori* (Reyes-Leon et al., 2007). Por lo tanto, en este trabajo se cuantificó la cantidad de esta citocina presente en el medio de células AGS expuestas a las fracciones soluble y vesicular, obtenidas de bacterias *H. pylori* CagA⁺ cultivadas en medio líquido y bifásico. El medio de cultivo de células gástricas control, presentó un nivel basal de IL-8 de 89 pg/mL; en cambio los medios de las células incubadas con las diferentes fracciones bacterianas presentaron un incremento de esta citocina desde 5 hasta 21 veces (Figura 31). En particular, la fracción soluble de bacterias crecidas en medio líquido fue la que indujo la mayor producción de IL-8 con un valor de 1894 pg/mL. Aunque la fracción vesicular del medio bifásico, que fue usada a lo largo de este trabajo, solo indujo la presencia de 506 pg/mL de IL-8, con respecto al control, el incremento de 5 veces en los niveles basales fue significativo.

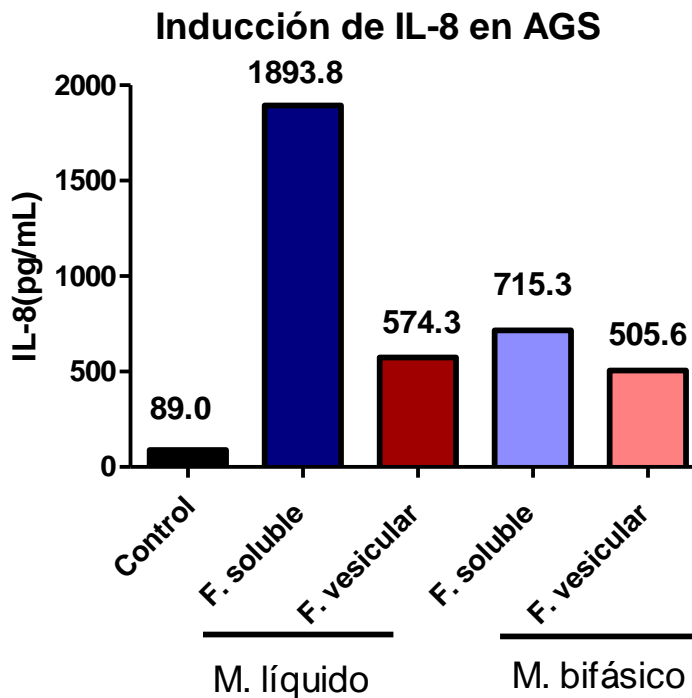


Figura 31. Cantidad de IL-8 presente en el medio de cultivo de células AGS incubadas con las fracciones de *H. pylori*. Células gástricas se incubaron con las fracciones soluble y vesicular obtenidas de bacterias crecidas en medio líquido y bifásico. Como control, las células AGS solo se incubaron con el medio RPMI. La cantidad de IL-8 presente en el medio de cultivo de las células epiteliales se cuantificó mediante el kit de PREPOTECH.

Los datos anteriores sugieren que la fracción vesicular es capaz de inducir la secreción de la IL-8 por parte de las células AGS. En futuros trabajos se analizará si esta fracción bacteriana produce un efecto similar en las células pancreáticas.

Con todos los resultados de este trabajo, se puede concluir que estandarizamos una metodología eficaz para aislar vesículas producidas por *H. pylori* cepa CagA⁺, a partir de un cultivo bacteriano en medio bifásico. Estas vesículas, presentaron a CagA en su membrana, la cual fue capaz de internalizarse en células pancreáticas, donde probablemente produjo rearrreglos en el citoesqueleto de actina y el encendido de cascadas de señalización que incrementaron la secreción de IL-8 al medio. Las vesículas presentaron otras proteínas, que en conjunto con CagA, probablemente afectaron proteínas de las UICs, induciendo así el incremento de la permeabilidad epitelial. En conjunto, estos cambios moleculares y

funcionales produjeron cambios morfológicos y eventualmente daño citopático de las células pancreáticas.

XIII. DISCUSIÓN

H. pylori está adaptada para colonizar de manera específica el estómago y lo hace con ayuda de factores de virulencia; neutraliza el microambiente ácido a través de la ureasa, permitiéndole sobrevivir y atravesar la capa de mucosa viscosa, la cual se vuelve laxa. Además, debido a la propulsión en espiral que le otorgan sus flagelos, puede ingresar al dominio apical de las células epiteliales gástricas, a las cuales se adhiere a través de adhesinas (Abadi, 2017; Arévalo et al., 2009; Montecucco C., 2001). Una vez adherida la bacteria, mediante el SST4 inyecta CagA en las células del huésped, alterando al citoesqueleto, induciendo la formación de pedestal y promoviendo la señalización al núcleo; en consecuencia, se liberan citosinas proinflamatorias y ROIs, lo que conduce al daño tisular (Montecucco C., 2001). Además de CagA, que es la proteína que más se ha estudiado de *H. pylori*, existen otros factores que inducen daño celular. Ejemplos de estos factores son, ureasa, VacA y HtrA, que en conjunto inducen alteraciones serias en las UICs, uniones focales y en general en la morfología celular (M. Hatakeyama, 2008; Hoy et al., 2010).

El daño se ha estudiado principalmente en el tejido gástrico; sin embargo, se ha identificado asociación de esta bacteria con otros órganos (Testerman & Morris, 2014). Las técnicas de detección en estos tejidos incluyeron cultivo bacteriano, PCR, histología y prueba de la ureasa (Testerman & Morris, 2014). Al mismo tiempo, se ha asociado la infección de *H. pylori* con enfermedades fuera del estómago (Shimoda et al., 2016).

Varias teorías se han propuesto para elucidar el mecanismo de infección de *H. pylori* a los diferentes órganos, en uno de ellos, se sugiere que son los factores de virulencia los responsables de producir un efecto citopático en los tejidos (Konishi, Ishibashi, Morshed, & Nakazawa, 1992; Marie et al., 2014). Estos factores son secretados por la bacteria y su liberación depende en gran medida de las interacciones patógeno-hospedero (Bumann et al., 2002; Olofsson et al., 2010a). *H. pylori* secreta entre otras cosas, vesículas de membrana externa (VME), las cuales contienen moléculas de naturaleza proteica, lipídica, carbohidratos e incluso ácidos nucleicos. Entre ellas, CagA, VacA, HtrA, SST4, subunidades de la ureasa, proteínas de membrana externa y adhesinas (Avila-Calderón et al., 2014;

Bumann et al., 2002; Hoy et al., 2010; Matsuo, Kido, & Yamaoka, 2017; Ocadiz et al., 2005; Olofsson, Skalman, Obi, Lundmark, & Arnqvist, 2014; Olofsson et al., 2010b; Yonezawa et al., 2009).

El páncreas es uno de los órganos donde se detectó *H. pylori* mediante estudios de metaanálisis (Zhou, Zhang, Wu, & Zhang, 2013). La infección por esta bacteria se ha relacionado con enfermedades como pancreatitis, síndrome metabólico y DM (Elia et al., 2015; He et al., 2014).

El páncreas es una glándula del aparato digestivo, constituida de tejido endócrino y exócrino (Pan & Wright, 2011) y está encargada principalmente de regular la homeostasis de la glucosa (Edlund H, 2001).

En nuestro grupo de trabajo se ha caracterizado el efecto de *H. pylori* en una línea celular derivada de ductos pancreáticos (BxPC-3). Se observaron cambios morfológicos, disminución de la viabilidad celular, daño citopático y alteraciones de la barrera epitelial (Hurtado, 2018). Actualmente, Hurtado E. estudia en un modelo animal, el efecto que tendría la bacteria si llega al tejido. Sin embargo, aún se desconoce el efecto de las VME secretadas por esta bacteria en cultivo de células pancreáticas.

La cepa de referencia de *H. pylori* 26695 CagA⁺, VacA s1m1 y BabA2, que es sumamente virulenta, es ideal en este tipo de estudios. Las características de virulencia de esta cepa se confirmaron por pruebas bioquímicas de ureasa positiva en menos de 1 min, oxidasa y catalasa positivas. Además, se confirmó la presencia de la proteína CagA, mediante ensayos de Western blot. Cag A presentó un peso molecular de 136 kDa, el cual corresponde al reportado de 128-144 kDa, dependiendo del número de secuencias EPIYA (Arévalo et al., 2009; S. Backert & Selbach, 2008). Además, mediante una revisión de micrografías de MET y MEB del acervo que posee el laboratorio de Investigación en Infectología del Hospital Infantil de México Federico Gómez, se identificó que esta cepa bacteriana secretaba vesículas. Las micrografías mostraron claramente que de los bacilos se desprenden VME, y estas son liberadas al medio. Además, estas estructuras poseen doble membrana y coinciden con el tamaño descrito para las VME (Olofsson et al., 2010a).

Existen diversas metodologías para aislar las VME, algunas de ellas se han descrito para *H. pylori* y otras bacterias como: *Escherichia coli* y *Brucella melitensis*. En estas últimas bacterias, el cultivo implica la resiembra en medio sólido, requiere de una gran cantidad de biomasa y de mucho agar (Avila-Caldern et al., 2012; Wai et al., 2003). Sin embargo, al reproducirla para *H. pylori*, no se obtuvo un rendimiento y pureza aceptable. Parker & Keenan en 2012, describieron un protocolo para obtener VME a partir del cultivo en medio líquido, involucrando varios pasos, requiere de poca biomasa y evita la resiembra en medio sólido. Nuevamente, al reproducir la técnica no fue del todo exitosa. Por su parte, otros investigadores emplearon la misma metodología adicionando ciclodextrina al 0.2%, (Olofsson et al., 2014, 2010a). Sin embargo, la presencia de ciclodextrina en el medio provocó que la bacteria produjera gran cantidad de polisacárido y evitó que las VME pudieran observarse por MET. De esta forma, se implementó una metodología que combinó medio sólido y medio líquido, denominado cultivo en medio bifásico, descrito previamente por Ruiz Castañeda y colaboradores (1940), cuyo objetivo en su momento fue lograr que las bacterias exigentes tuvieran una fase sólida donde adherirse y obtener nutriente, y la humedad necesaria para su desarrollo. Para nuestro trabajo, considerando que *H. pylori* es un microorganismo exigente que requiere de humedad y microaerofilia, la fase sólida (agar Casman) permitió su adhesión, en tanto que la fase líquida (caldo Brucella) evitó la resequedad del medio (Bannatyne, Jackson, & Memish, 1997; Grahl, 2007).

A pesar de que ambas metodologías (medio líquido y bifásico) tuvieron un buen rendimiento, al analizar por MET la fracción denominada vesicular, las estructuras esféricas provenientes del medio líquido no se observaron nítidas. De manera que no fue posible discriminar si estas estructuras presentaban una doble membrana, quizá debido al exceso de estas esferas o la presencia de polisacáridos de la biopelícula. En cambio, en las formas redondas observadas en la fracción vesicular del cultivo bifásico, se apreció con claridad la bicapa lipídica y los tamaños de 96-137 nm correspondieron a los descritos previamente de 20-300 nm (Avila-Caldern et al., 2012; Olofsson et al., 2010a). Adicionalmente, al lisar estas estructuras y analizar su contenido, se observó que poseen proteínas de distintos pesos moleculares, como lo revelaron los geles SDS-PAGE teñidos con solución de Coomassie,

coincidiendo con lo descrito en otros trabajos (Avila-Calderón et al., 2014; Olofsson et al., 2010b; Yonezawa et al., 2009). Entre estas proteínas se identificó a la citotoxina CagA, mediante inmunomarcaje con oro y MET en la membrana de las vesículas. De manera, que el medio bifásico resultó tener un buen rendimiento de VME con las características esperadas para estas estructuras y alto contenido de factores de virulencia, como CagA. Cabe mencionar que la CagA presente en las vesículas está fosforilada, ya que el anticuerpo empleado en estos ensayos solo reconoce esta forma postraducciona. Se ha descrito que la forma fosforilada de CagA desregula la tirosina fosfatasa SHP-2 y perturba la vía Erk-MAP cinasa, afectando así las adhesiones focales, el citoesqueleto de actina, las UICs, y eventualmente induciendo cambios importantes en la morfología celular (S. Backert & Selbach, 2008; Degennaro et al., 2013; Yonezawa et al., 2009). Por lo tanto, es posible que esta proteína, junto con otros factores de virulencia presentes en las VME, puedan ser internalizados a la célula blanco, que ya ha sido descrito en estas vesículas, mediante endocitosis mediada por clatrina o a través de otras vías (Olofsson et al., 2014). Esto explicaría el daño en órganos alejados del sitio inicial de la infección, como es el caso del páncreas.

Con la finalidad de demostrar el efecto de las VME en el páncreas, empleamos como modelo de estudio *in vitro* a las células pancreáticas BxPC-3 y lo comparamos con el daño producido en las células gástricas AGS, las cuales han sido ampliamente empleadas como modelo de infección por *H. pylori* (Alzahrani et al., 2014). En las células gástricas, *H. pylori* produce serios rearrreglos del citoesqueleto y desarreglo de las UICs, que producen un cambio morfológico típico conocido como fenotipo colibrí (S. Backert & Selbach, 2008). En este trabajo se corroboró que la infección por la bacteria indujo en células AGS el fenotipo colibrí, y se observó que la fracción vesicular produjo cambios morfológicos significativos, similares al efecto colibrí. Los efectos producidos por las VME confirman la presencia de la proteína CagA fosforilada, principal responsable de los rearrreglos del citoesqueleto de actina que promueven el redondeamiento y alargamiento de un polo celular (S. Backert & Selbach, 2008). Por su parte, en la línea celular BxPC-3 se observó que estas células infectadas con *H. pylori* se separan, aumentan de tamaño, se redondean, y alargan; sin

embargo, no presentaron el fenotipo colibrí. Algo muy similar les sucedió a las células tratadas con las VME. En este caso la participación de CagA fosforilada quizá sea menor y otros factores bacterianos sean los responsables de la pérdida de contacto entre las células y de su forma poligonal. Al respecto, se sabe que en el epitelio gástrico VacA y HtrA, inducen la apertura de las UEs y rompen las UAs, respectivamente (S. Backert & Selbach, 2008; M. Hatakeyama, 2008). Así que en el páncreas estas proteínas bacterianas contenidas en las VME, podrían ejercer un efecto similar.

La fracción vesicular afectó la forma de las células epiteliales pancreáticas y gástricas, y provocó daño citopático importante del 80% a una dosis de 1 µg/µl. Al respecto se sabe que la proteína vacuolizante VacA cuando se secreta, produce un efecto citotóxico en diversas líneas celulares (Marie et al., 2014). Además, se ha reportado que cultivos en caldo Brucella de cepas clínicas y de referencia de *H. pylori* NCTC 11637 (ATCC 43504) que han sido filtrados, provocan vacuolización en las líneas celulares AGS, Sf1Ep y HEP-2, debido a la presencia de factores como la ureasa y otras moléculas citotóxicas (Konishi et al., 1992). Estos filtrados corresponderían a la fracción soluble obtenida con nuestra metodología y también provocó un daño citopático significativo, aunque no tan marcado como la fracción vesicular. Asimismo, se ha demostrado que las vesículas secretadas por *H. pylori* causan apoptosis en células AGS (Yonezawa et al., 2009), esto sugiere que las VME también podrían inducir este tipo de muerte celular programada en las células pancreáticas, aunque eso tendría que explorarse en futuros estudios. Cabe mencionar que la bacteria completa produjo 90% de daño citopático en ambos tipos celulares, indicando que las VME secretadas por la bacteria, poseen los suficientes factores para degradar la monocapa epitelial pancreática.

Al existir perturbación de la monocapa epitelial su función de barrera se ve alterada, como consecuencia de un desarreglo de las UICs (Posselt, Backert, & Wessler, 2013). En congruencia, la RET de células BxPC-3 y AGS disminuyó hasta 30% después de 24 h de incubación con las VMEs. La caída en la RET refleja una alteración directa en las UEs, siendo una de sus funciones el regular el flujo de iones por la ruta paracelular (o también llamada intercelular); específicamente, esta función es controlada directamente por las claudinas

(Yu, 2018), y de manera indirecta por otras proteínas de las UEs como ocludina, ZO-1 y el citoesqueleto de acto-miosina. Así que alteraciones en la cantidad, deslocalización o degradación de alguna de estas proteínas, repercutirá en la funcionalidad de las UEs (N. T. S. Backert, 2017; Löwer et al., 2008; Wroblewski et al., 2009). El control de la bacteria completa también disminuyó la RET, como se describió previamente (Hurtado, 2018). Tanto la bacteria completa como las VMEs, poseen factores solubles como ureasa, VacA y HtrA, los cuales han demostrado su efecto en las UEs, disminuyendo la RET (Löwer et al., 2008; Wroblewski et al., 2009). En particular, HtrA degrada a ocludina, en etapas tempranas de la infección (Wessler & Backert, 2017).

Al ser alteradas las UEs se induce la disgregación celular y la pérdida de la polaridad producidas por las vesículas, esto sugiere que las UAs y los DSMs también son perturbados. Al respecto, se sabe que VacA, HtrA y ureasa, producen modificaciones en las proteínas de las UICs y en otras moléculas relacionadas a estas uniones, como: ZO-1, E-cadherina, p120-catenina, integrina β 1, PLC- γ , Grb2 y Par1 (S. Backert & Selbach, 2008; M. Hatakeyama, 2008). Estas modificaciones eventualmente desestabilizan los complejos de las UEs y UAs, provocando una pérdida de la polaridad, apoptosis e incluso autofagia, así como una clara disminución de la viabilidad celular (Degennaro et al., 2013).

Las funciones de las UICs dependen en gran medida de un citoesqueleto robusto y finamente regulado (Ricci, Romano, & Boquet, 2011), es por esto, que la citotoxina CagA al inducir rearrreglos de la actina filamentosa modifica la morfología celular, y afecta drásticamente la función de barrera del epitelio (N. T. S. Backert, 2017; Löwer et al., 2008; Wroblewski et al., 2009). Mediante ensayos de inmunofluorescencia, claramente se observó que la fracción vesicular produjo rearrreglos del citoesqueleto de actina en las células pancreáticas. Estos cambios incluyeron una disminución de la cantidad de F-actina y en particular la presencia de menos estructuras tipo fibras de estrés. Debido a que CagA se localizó en el interior celular, se le puede atribuir a esta citotoxina una participación importante en el efecto observado al citoesqueleto.

En la búsqueda de patrones de respuesta del huésped frente a la infección por *H. pylori*, se ha observado que existe una amplia gama de factores que participan en la defensa

del organismo frente a la bacteria, los cuales pueden generar distintas respuestas. Entre ellos se encuentra la IL-8, una citocina perteneciente a la familia C-X-C, que actúa como un quimioatrayente en la inmunopatogénesis de la gastritis, induciendo la migración de células polimorfonucleares para hacer frente a la infección por *H. pylori* (Cervantes García & García-González, 2015). La producción de IL-8 también está relacionada con la respuesta inmune innata y adaptativa producida por la infección bacteriana, esto aumenta la permeabilidad celular, recluta y activa neutrófilos; asimismo, aumenta la interacción de la bacteria con células de la lámina propia, incluyendo macrófagos y células pertenecientes al linaje linfoide (Cervantes García & García-González, 2015). Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la cantidad de IL-8 liberada por las células AGS tratadas con las VME. La producción de IL-8 en estas células fue significativamente mayor respecto a las células control de aproximadamente 5 veces; en cambio la fracción soluble produjo un incremento de hasta 21 veces, indicando que esta muestra probablemente contenga una mayor cantidad de factores de virulencia, capaces de afectar al epitelio para que produzca más IL-8. Queda pendiente elucidar si las vesículas también producen un incremento de la secreción de citosina IL-8 por parte de las células pancreáticas, como lo hacen las células gástricas. Sin embargo, con estos resultados se puede afirmar que las VME son capaces de inducir una producción significativa de IL-8, de manera similar a la generada por bacterias completas en células AGS (Uotani et al., 2019).

En resumen, se estableció un nuevo protocolo de obtención de vesículas producidas por *H. pylori* cepa CagA⁺, a partir de un cultivo bacteriano en medio bifásico, con un alto rendimiento y grado de pureza. Las VME exhibieron CagA fosforilada en su membrana, la cual fue capaz de internalizarse en células pancreáticas. Es probable que esta citotoxina en conjunto con otros factores bacterianos haya producido rearrreglos en el citoesqueleto de actina, así como el encendido de cascadas de señalización que incrementaron la secreción de IL-8 al medio. Además, estas proteínas bacterianas probablemente también afectaron a moléculas de las UICs, provocando el incremento de la permeabilidad epitelial observado

en este trabajo. En conjunto, estos cambios moleculares y funcionales produjeron cambios morfológicos y eventualmente daño citopático de las células pancreáticas.

Aún queda por explorar que otras moléculas, además de CagA presentan las VME, su mecanismo de entrada en las células pancreáticas y su efecto en el epitelio, ya sea a nivel del citoesqueleto, de las UICs, de la señalización nuclear y la liberación de citocinas, entre otras.

Asimismo, este trabajo ofrece un posible mecanismo del daño producido por *H. pylori* en órganos alejados del sitio inicial de la infección (estómago), mediado por las vesículas liberadas por los bacilos, las cuales posiblemente viajen a través de los tejidos o del torrente sanguíneo, para alcanzar órganos como el objeto de estudio de esta tesis, el páncreas. La importancia de analizar los mecanismos que llevan a esta bacteria a alcanzar otros órganos, permitirá entender su correlación con enfermedades como: pancreatitis aguda, crónica y autoinmune, cáncer pancreático, síndrome metabólico, DM, cáncer colorectal, cáncer de laringe/faringe, anemia, púrpura trombocitopénica idiopática, prúrigo crónico, pólipos nasales, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, retinopatía central cerosa, enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y autoinmunes, entre otras (Zhou et al., 2013). En particular, llama la atención el caso de la DM, la cual, de acuerdo con la IDF en 2017, se presentó en 12 millones de personas adultas entre 20-79 años, ubicando a México en el 5° lugar de países con DM. Para el año 2045 ocupara el 4° lugar con 21.8 millones de personas. Además, si se considera que los individuos con diabetes deben ser tratados durante el resto de su vida, la derrama económica es considerable. Anualmente el gobierno gasta 3,430 millones de dólares para el tratamiento de la enfermedad, lo que hace de esta enfermedad un serio problema de salud pública (Alta Consejería Distrital TIC, 2018; Cho et al., 2017; Hernández-Ávila, Gutiérrez, & Reynoso-Noverón, 2013)

XIV.CONCLUSIONES

1. Se estandarizó una metodología eficaz para aislar vesículas (VME) de *H. pylori* con un buen rendimiento y grado de pureza.
2. Las vesículas aisladas de *H. pylori* cepa 23504, poseen doble membrana, tienen un tamaño de 96-137 nm y contienen CagA⁺ fosforilada en su membrana.
3. Las VME produjeron cambios morfológicos en las células pancreáticas BxPC-3, aunque no indujeron el fenotipo colibrí como lo hacen en las células control AGS.
4. El citoesqueleto de actina de células BxPC-3 tratadas con VME, sufrió rearrreglos importantes y una disminución significativa.
5. CagA proveniente de la fracción vesicular de *H. pylori* se internaliza en las células pancreáticas, y probablemente es responsable de los rearrreglos del citoesqueleto de actina observados en este trabajo, como se ha demostrado para células AGS.
6. Los factores de virulencia contenidos en estas vesículas incrementaron la permeabilidad epitelial de las células BxPC-3, la producción de IL-8 y también un daño citopático significativo.

XV. BIBLIOGRAFIA

- Abadi, A. T. B. (2017). Strategies used by helicobacter pylori to establish persistent infection. *World Journal of Gastroenterology*, 23(16), 2870–2882.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i16.2870>
- Alta Consejería Distrital TIC. (2018). Informe Final de Resultados Prototipo Blockchain, 2016, 45. Retrieved from <http://ticbogota.gov.co/documentos/informe-final-resultados-prototipo-blockchain>
- Alzahrani, S., Lina, T. T., Gonzalez, J., Pinchuk, I. V., Beswick, E. J., & Reyes, V. E. (2014). Effect of Helicobacter pylori on gastric epithelial cells. *World Journal of Gastroenterology*, 20(36), 12767–12780. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.12767>
- Arévalo, A., Trespacios, A. A., & Otero, W. (2009). Importancia de la proteína CagA en infección por Helicobacter pylori. *Rev. Col. Gastroenterol*, 24(4), 388–395.
- Audibert, C., Burucoa, C., Janvier, B., & Fauchère, J. L. (2001). Implication of the structure of the Helicobacter pylori cag pathogenicity island in induction of interleukin-8 secretion. *Infection and Immunity*, 69(3), 1625–1629.
<https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1625-1629.2001>
- Avila-Caldern, E. D., Lopez-Merino, A., Jain, N., Peralta, H., Lpez-Villegas, E. O., Sriranganathan, N., ... Contreras-Rodríguez, A. (2012). Characterization of outer membrane vesicles from Brucella melitensis and protection induced in mice. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/352493>
- Avila-Calderón, E. D., Araiza-Villanueva, M. G., Cancino-Diaz, J. C., López-Villegas, E. O., Sriranganathan, N., Boyle, S. M., & Contreras-Rodríguez, A. (2014). Roles of bacterial membrane vesicles. *Archives of Microbiology*, 197(1).
<https://doi.org/10.1007/s00203-014-1042-7>
- Backert, N. T. S. (2017). *Molecular Pathogenesis and Signal Transduction by Helicobacter pylori Volumen 400 de Current Topics in Microbiology and Immunology*.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-50520-6>
- Backert, S., Bernegger, S., Skórko-Glonek, J., & Wessler, S. (2018). Extracellular HtrA serine proteases: An emerging new strategy in bacterial pathogenesis. *Cellular*

- Microbiology*, 20(6), 1–9. <https://doi.org/10.1111/cmi.12845>
- Backert, S., & Selbach, M. (2008). Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 10(8), 1573–1581. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01156.x>
- Bannatyne, R. M., Jackson, M. C., & Memish, Z. (1997). Rapid diagnosis of *Brucella* bacteremia by using the BACTEC 9240 system. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(10), 2673–2674.
- Breijo, A., & Prieto, J. (2014). Pancreatitis Aguda. Artículo de Revisión. *IntraMed*, 3(2), 1–14. Retrieved from http://journal.intramed.net/index.php/Intramed_Journal/article/view/332
- Bumann, D., Aksu, S., Wendland, M., Zimny-Arndt, U., Sabarth, N., Thomas, F. M., & Jungblut, P. R. (2002). Proteome Analysis of Secreted Proteins of the Gastric Pathogen *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, 70(7), 3396–3403. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3396>
- Caron, T. J., Scott, K. E., Fox, J. G., & Hagen, S. J. (2015). Tight junction disruption: *Helicobacter pylori* and dysregulation of the gastric mucosal barrier. *World Journal of Gastroenterology*, 21(40), 11411–11427. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i40.11411>
- Cervantes García, E., & García-González, R. (2015). *Helicobacter pylori* y la respuesta inmune. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*, 62(2), 112–118. Retrieved from www.medigraphic.com/patologiaclinica
- Cho, N. H., Kirigia, J., Mbanya, J. C., Ogurustova, K., Guariguata, L., Rathmann, W., ... Reja, A. (2017). *Diabetes Atlas de la FID. Diabetes India and Jaslok Hospital President-Elect International Diabetes Federation* (Vol. 8). <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.09.002>
- Damasceno, D. C., Sinzato, Y. K., Bueno, A., Netto, A. O., Dallaqua, B., Gallego, F. Q., ... Rudge, M. V. C. (2013). Mild diabetes models and their maternal-fetal repercussions. *Journal of Diabetes Research*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/473575>
- De Bastiani, R., Gabrielli, M., Ubaldi, E., Benedetto, E., Sanna, G., Cottone, C., ... Gasbarrini,

- A. (2008). High prevalence of cag-A positive *H. pylori* Strains in ischemic stroke: A primary care multicenter study. *Helicobacter*, *13*(4), 274–277.
<https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2008.00610.x>
- De Kort, S., Keszthelyi, D., & Masclee, A. A. M. (2011). Leaky gut and diabetes mellitus: What is the link? *Obesity Reviews*, *12*(6), 449–458. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2010.00845.x>
- Degennaro, M., Hurd, T. R., Siekhaus, D. E., Biteau, B., Jasper, H., & Lehmann, R. (2013). Vacuolating Cytotoxin and Variants in Atg16L1 that Disrupt Autophagy Promote *Helicobacter Pylori* Infection in Humans. *Gastroenterology*, *20*(2), 233–243.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.12.007>. Peroxiredoxin
- Demir, E., Ozkan, H., Seckin, K. D., Sahtiyanci, B., & Demir, B. (n.d.). Plasma Zonulin Levels as a Non-Invasive Biomarker of Intestinal Permeability in Women with Gestational Diabetes Mellitus, 1–8. <https://doi.org/10.3390/biom9010024>
- Diabetes, D. O. F. (2012). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, *35 Suppl 1*, S64–71. <https://doi.org/10.2337/dc12-s064>
- Edlund, H. (2002). Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy. *Nature Reviews. Genetics*, *3*(July), 524–532.
<https://doi.org/10.1038/nrg841>
- Edlund H. (2001). Developmental biology of the pancreas. *Diabetes* *50. Suppl 1*, 1580(Suppl 1), S5–S9.
- Elia, I., Schmieder, R., Christen, S., & Fendt, S.-M. (2015). Organ-Specific Cancer Metabolism and Its Potential for Therapy. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (January), 251–263. <https://doi.org/10.1007/164>
- Ensanut. (2012). Ensanut 2012. *Instituto Nacional de Salud Pública*.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- GI, P.-P., BM, D., JE, C., & MJ, B. (1988). *Campylobacter pylori* antibodies in humans. *Annals of Internal Medicine*, *109*(1), 11–17. Retrieved from
<http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-109-1-11>
- Grahl, J. (2007). Review Article. *International Review of Applied Economics*, *17*(1), 121–

124. <https://doi.org/10.1080/714891067>
- Gram, C. (1884). The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *General Microbiology*, 2, 185–189. Retrieved from <https://www.asm.org/ccLibraryFiles/FILENAME/0000000235/1884p215.pdf>
- Gravina, A. G., Zagari, R. M., Musis, C. De, Romano, L., Loguercio, C., Gravina, A. G., ... Mediche, S. (2018). Helicobacter pylori and extragastric diseases : A review, 24(29), 3204–3221. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i29.3204>
- Grieco, F. A., Sebastiani, G., Spagnuolo, I., Patti, A., & Dotta, F. (2012). Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: How viral infections modulate beta cell function. *Clinical and Experimental Immunology*, 168(1), 24–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04556.x>
- Gunasekaran, U., & Gannon, M. (2011). Type 2 Diabetes and the Aging Pancreatic Beta Cell. *Aging-U.S.*, 3(6), 565–575.
- Hatakeyama, M. (2008). Linking epithelial polarity and carcinogenesis by multitasking Helicobacter pylori virulence factor CagA. *Oncogene*, 27(55), 7047–7054. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.353>
- Hatakeyama, Masanori. (2004). Oncogenic mechanisms of the Helicobacter pylori CagA protein. *Nature Reviews Cancer*, 4(9), 688–694. <https://doi.org/10.1038/nrc1433>
- He, C., Yang, Z., & Lu, N. H. (2014). Helicobacter pylori infection and diabetes: Is it a myth or fact? *World Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i16.4607>
- Hernández-Ávila, M., Gutiérrez, J. P. J., & Reynoso-Noverón, N. (2013). Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud Pública de México*, 55(1), 129–136.
- Hotamisligil, G. S., & Erbay, E. (2008). Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 923–934. <https://doi.org/10.1038/nri2449>
- Hoy, B., Löwer, M., Weydig, C., Carra, G., Tegtmeyer, N., Geppert, T., ... Wessler, S. (2010). Helicobacter pylori HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion. *EMBO Reports*, 11(10), 798–804.

- <https://doi.org/10.1038/embor.2010.114>
- Hsieh, M.-C., Wang, S. S. W., Hsieh, Y.-T., Kuo, F.-C., Soon, M.-S., & Wu, D.-C. (2013). *Helicobacter pylori* infection associated with high HbA1c and type 2 diabetes. *European Journal of Clinical Investigation*, 43(9), 949–956.
<https://doi.org/10.1111/eci.12124>
- Hurtado. (2018). *Ciudad de México Julio 2018*. CINVESTAV.
- International Diabetes Federation. (2013). *Atlas de la diabetes de la FID*. International Diabetes Federation. <https://doi.org/2-930229-80-2>
- Isabel, P., & Alvarez, A. (n.d.). “ Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 β sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS ” A :
- Kaper, J. B. (2000). OF MICROBES.
- Kojima, T., Yamaguchi, H., Ito, T., Kyuno, D., Kono, T., Konno, T., & Sawada, N. (2013). Tight junctions in human pancreatic duct epithelial cells. *Tissue Barriers*, 1(4), e24894.
<https://doi.org/10.4161/tisb.24894>
- Konishi, H., Ishibashi, M., Morshed, M. G., & Nakazawa, T. (1992). Cytopathic effects of *Helicobacter pylori* on cultured mammalian cells. *Journal of Medical Microbiology*, 37(2), 118–122. <https://doi.org/10.1099/00222615-37-2-118>
- 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>
- Löwer, M., Weydig, C., Metzler, D., Reuter, A., Starinzki-Powitz, A., Wessler, S., & Schneider, G. (2008). Prediction of extracellular proteases of the human pathogen *Helicobacter pylori* reveals proteolytic activity of the Hp1018/19 protein HtrA. *PLoS ONE*, 3(10), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003510>
- Marie, M. A., Pradeep, C. S., Sangeetha, G., Gowda, K. L., John, J., & Homoud, K. (2014). Cytopathic effects of toxogenic strains of *Helicobacter pylori* on different cell lines. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 57(2), 187.
<https://doi.org/10.4103/0377-4929.134660>
- Matsuo, Y., Kido, Y., & Yamaoka, Y. (2017). *Helicobacter pylori* outer membrane


protein-related pathogenesis. *Toxins*, 9(3), 1–9.

<https://doi.org/10.3390/toxins9030101>

Mendoza-Elizalde, S., Olivares-Cervantes, A., Zuñiga, G., Valencia-Mayoral, P., Viguera-Galindo, J., Velázquez-Guadarrama, N., ... N, V.-G. (2016). Microevolutionary History of *Helicobacter pylori* During Infection: A Review. *Journal of Genetics and Genome Research*, 3(1). <https://doi.org/10.23937/2378-3648/1410022>

Min, X. H., Yu, T., Qing, Q., Yuan, Y. H., Zhong, W., Chen, G. C., ... Chen, Q. K. (2014). Abnormal differentiation of intestinal epithelium and intestinal barrier dysfunction in diabetic mice associated with depressed Notch/NICD transduction in Notch/Hes1 signal pathway. *Cell Biology International*, 38(10), 1194–1204.

<https://doi.org/10.1002/cbin.10323>

Molina-infante, J., Corti, R., Doweck, J., Mcnicholl, A. G., & Gisbert, J. P. (2017).  REVISIÓN Avances recientes en el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*, 47(1), 75–85.

Molist, P., & Pombal, M. A. (2016). Epitelios de REVESTIMIENTO.

Montecucco C., R. R. (2001). How *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(June), 457–466.

<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Naydenov, N. G., Hopkins, A. M., & Ivanov, A. I. (2009). c-Jun N-terminal kinase mediates disassembly of apical junctions in model intestinal epithelia. *Cell Cycle*, 8(13), 2110–2121. <https://doi.org/10.4161/cc.8.13.8928>

Necchi, V., Candusso, M. E., Tava, F., Luinetti, O., Ventura, U., Fiocca, R., ... Solcia, E. (2007). Intracellular, Intercellular, and Stromal Invasion of Gastric Mucosa, Preneoplastic Lesions, and Cancer by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 132(3), 1009–1023. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.01.049>

Oc??diz, R., Orozco, E., Carrillo, E., Quintas, L. I., Ortega-L??pez, J., Garc??a-P??rez, R. M., ... Rodr??guez, M. A. (2005). EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cellular Microbiology*, 7(2), 221–232. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00453.x>

- Olofsson, A., Skalman, L. N., Obi, I., Lundmark, R., & Arnqvist, A. (2014). Uptake of Helicobacter pylori Vesicles Is Facilitated by Clathrin- Dependent and Clathrin- Independent Endocytic Pathways, *5*(3), 1–12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00979-14>.Invited
- Olofsson, A., Vallström, A., Petzold, K., Tegtmeyer, N., Schleucher, J., Carlsson, S., ... Arnqvist, A. (2010a). Biochemical and functional characterization of Helicobacter pylori vesicles, *77*(August), 1539–1555. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07307.x>
- Olofsson, A., Vallström, A., Petzold, K., Tegtmeyer, N., Schleucher, J., Carlsson, S., ... Arnqvist, A. (2010b). Biochemical and functional characterization of Helicobacter pylori vesicles. *Molecular Microbiology*, *77*(6), 1539–1555. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07307.x>
- Pan, F. C., & Wright, C. (2011). Pancreas organogenesis: From bud to plexus to gland. *Developmental Dynamics*, *240*(3), 530–565. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22584>
- Parker, H., & Keenan, J. I. (2012). Composition and function of Helicobacter pylori outer membrane vesicles. *Microbes and Infection*, *14*(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.08.007>
- Peláez-luna, D. G. M. (2016). Pancreatitis crónica, *81*(15), 77–79. [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(15\)72802-3](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(15)72802-3)
- Peláez-Luna, M. (2013). Pancreatitis crónica y pancreatitis autoinmune. *Revista de Gastroenterología de México*, *78 Suppl 1*(Supl 1), 42–44. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2013.06.023>
- Posselt, G., Backert, S., & Wessler, S. (2013). The functional interplay of Helicobacter pylori factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell Communication and Signaling*, *11*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-77>
- Quesada, I., Tudurí, E., Ripoll, C., & Nadal, A. (2008). Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *The Journal of Endocrinology*, *199*(1), 5–19. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0290>
- Quiroga, A. J., Huertas, A., Cómbita, A. L., & Bravo, M. M. (2010). Variation in the number

- of EPIYA-C repeats in CagA protein from Colombian *Helicobacter pylori* strains and its ability to induce hummingbird phenotype in gastric epithelial cells, 251–258.
- Reyes-Leon, A., Atherton, J. C., Argent, R. H., Puente, J. L., & Torres, J. (2007). Heterogeneity in the activity of Mexican *Helicobacter pylori* strains in gastric epithelial cells and its association with diversity in the *cagA* gene. *Infection and Immunity*, *75*(7), 3445–3454. <https://doi.org/10.1128/IAI.01951-06>
- Ribet, D., & Cossart, P. (2015). How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes and Infection*, *17*(3), 173–183. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.01.004>
- Ricci, V., Romano, M., & Boquet, P. (2011). Molecular cross-talk between *Helicobacter pylori* and human gastric mucosa. *World Journal of Gastroenterology*, *17*(11), 1383–1399. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i11.1383>
- Salvo Romero, E., Alonso Cotoner, C., Pardo Camacho, C., Casado Bedmar, M., & Vicario, M. (2015). The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas : Organo Oficial de La Sociedad Espanola de Patologia Digestiva*, *107*(11), 686–696. <https://doi.org/10.17235/reed.2015.3846/2015>
- Shimoda, A., Ueda, K., Nishiumi, S., Murata-Kamiya, N., Mukai, S. A., Sawada, S. I., ... Akiyoshi, K. (2016). Exosomes as nanocarriers for systemic delivery of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep18346>
- Testerman, T. L., & Morris, J. (2014). Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(36), 12781–12808. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.12781>
- Tohidpour, A. (2016). CagA-mediated pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Microbial Pathogenesis*, *93*, 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.01.005>
- Tytgat, G. N. J., & Zuidoost, A. (2000). STATE-OF-THE-ART LECTURE *Helicobacter pylori* : Past , present and future ORGANISM, 30–33.
- Uotani, T., Murakami, K., Uchida, T., Tanaka, S., Nagashima, H., Zeng, X. L., ... Yamaoka, Y.

- (2019). Changes of tight junction and interleukin-8 expression using a human gastroid monolayer model of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, (January), 1–12.
<https://doi.org/10.1111/hel.12583>
- Wai, S. N., Lindmark, B., Söderblom, T., Takade, A., Westermark, M., Oscarsson, J., ... Uhlin, B. E. (2003). Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell*, *115*(1), 25–35.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00754-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00754-2)
- Wessler, S., & Backert, S. (2017). A novel basolateral type IV secretion model for the CagA oncoprotein of *Helicobacter pylori*. *Microbial Cell*, *5*(1), 60–62.
<https://doi.org/10.15698/mic2018.01.611>
- Wroblewski, L. E., Shen, L., Ogden, S., Romero-Gallo, J., Lapierre, L. A., Israel, D. A., ... Peek, R. M. (2009). *Helicobacter pylori* Dysregulation of Gastric Epithelial Tight Junctions by Urease-Mediated Myosin II Activation. *Gastroenterology*, *136*(1), 236–246.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.011>
- Yamaoka, Y. (2011). Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nature Review Gastroenterology Hepatology*, *7*(11), 629–641.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.154.Mechanisms>
- Yonezawa, H., Osaki, T., Kurata, S., Fukuda, M., Kawakami, H., Ochiai, K., ... Kamiya, S. (2009). Outer Membrane Vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are Involved in Biofilm Formation. *BMC Microbiology*, *9*(1), 197. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-197>
- Yu, A. S. L. (2018). pore, *219*(2), 521–536. <https://doi.org/10.1111/apha.12742>. Claudin-2-mediated
- Zhou, X., Zhang, C., Wu, J., & Zhang, G. (2013). Association between *Helicobacter pylori* infection and diabetes mellitus: A meta-analysis of observational studies. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *99*(2), 200–208.
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2012.11.012>