

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

“Desarrollo y caracterización de un modelo de infección de
Helicobacter pylori CagA (+) en células B humanas”

T E S I S

Que presenta

M.C. y P. ALEJANDRA MONTAÑEZ BARRAGÁN

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOMEDICINA MOLECULAR

Director de la tesis:
DR. LEOPOLDO SANTOS ARGUMEDO

Ciudad de México

Agosto de 2019

DIRECTOR

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Jefe del Departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV-IPN

ASESORES

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV-IPN

Dr. Francisco Javier Torres López

Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades
Infecciosas y Parasitarias
CMN Siglo XXI- IMSS

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por haberme otorgado una beca por 2 años y así poder realizar mi proyecto de maestría.

Al CINVESTAV y al Departamento de Biomedicina Molecular por permitirme realizar la maestría en esta institución.

Al Dr. Leopoldo Santos Argumedo, por todas sus enseñanzas durante el curso de inmunología y durante el desarrollo del proyecto. Gracias por haberme abierto las puertas de su laboratorio, por su dirección, paciencia y consejos.

Al Dr. Vianney Ortiz Navarrete, por ser uno de los mejores doctores que he conocido. Gracias por dedicarnos tanto tiempo durante sus clases y por hacerlas divertidas e interesantes. Considero que es un buen ejemplo de lo que un investigador-docente debería aspirar a ser.

Al Dr. Francisco Javier Torres López, a la Dra. Margarita Carmorlinga y a su equipo de trabajo por haberme permitido realizar gran parte de mi proyecto en su laboratorio, y por enseñarme todo lo relacionado con la bacteria. Asimismo agradezco su atención por haberme ayudado con los materiales necesarios para el crecimiento y mantenimiento de la misma.

Al Dr. Héctor Romero Ramírez por haberme ayudado desde el primer día que llegué al laboratorio a cómo manejar los equipos, cómo preparar soluciones, y cómo cuidar a las células y haber sido paciente durante ese proceso de “capacitación.” Gracias por siempre facilitarme los reactivos y materiales necesarios para mis ensayos.

Al Dr. José Luis Maravillas y al M. en C. Rodrigo Cervantes por no sólo haberme facilitado el anticuerpo anti-CagA sino por haberme enseñado a cómo hacer las infecciones y estar siempre dispuestos a resolver todas mis dudas.

Al técnico Lenin Estudillo por facilitarme todo el material que utilicé durante todos los ensayos.

Al técnico Jesús Guzmán Campusano por ser un gran apoyo cuando necesité material extra y por su amabilidad y cariño.

Al C. Dr. Daniel Alberto Girón Pérez por haber sido mi mayor apoyo en el laboratorio y haberme enseñado a hacer la mayoría de mis experimentos. Gracias por tu paciencia al explicarme mis dudas y por ser un amigo con el cual pude platicar no sólo de ciencia.

Al M.C. y P. Víctor Andrés Sosa por haber sido un gran amigo durante todo este año, por haberme dado ánimos y consejos y por siempre estar presente cuando más lo necesité.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Zayda, Dianita, Carlitos, David, Erick, Carolina, Diana, Fernanda y Héctor por haber hecho de este año en el laboratorio un año inolvidable. Me llevo de cada uno de ustedes muy bonitos recuerdos y experiencias. Sin duda este año no hubiera sido lo mismo sin ustedes.

A mis compañeros y amigos de la generación: Karina, Armando, Claudia, Mariannela, Mayte, Bere, Marcela, Zule, Adán, Mike, Dave, Rox, Tania, Diana, Lory y Miguel. Cada uno influyó y aportó a su manera a mi formación desde el inicio del propedéutico hasta ahora. Los quiero mucho y agradezco al destino haber convivido con tan excelentes personas.

A mi novio José Ramón Muñoz Torres por ser tan paciente conmigo, por dame ánimos en mis peores momentos. Por animarme a seguir adelante, por todos los momentos que hemos vivido juntos y por permitirme aprender tanto de ti.

A mi mamá Blanca Estela Barragán Huerta y a mi hermana Brenda Montañez Barragán por siempre ser mis consejeras, por haberme dado ánimos en todo momento, por ser las personas que son y por siempre creer en mí.

RESUMEN

Se sabe que el cáncer es un problema grave de salud pública y que los cánceres de etiología infecciosa son más frecuentes en países en vías de desarrollo. Para el año 2012, Globocan reportó que *Helicobacter pylori* ocupa el primer lugar como agente causal infeccioso de cáncer a nivel mundial. Se estima que el 50% de la población presenta una infección crónica por esta bacteria, misma que está relacionada con diversas enfermedades como gastritis, úlcera gástrica, úlcera duodenal, adenocarcinoma gástrico y maltoma gástrico. La infección con cepas portadoras de la isla de patogenicidad *cag* y la proteína CagA está íntimamente relacionada con el desarrollo de estas patologías. Ésta proteína es translocada directamente a la célula blanco por un sistema de transporte bacteriano tipo 4 (T4SS). Una vez translocada, puede ejercer diferentes funciones ya sea en un estado fosforilado o sin fosforilar. En ambas situaciones puede modular diversas vías de señalización que están involucradas en procesos de inflamación, proliferación y supervivencia celular. Se han realizado diversos estudios tanto en modelos animales como en líneas celulares para dilucidar el papel oncogénico que tiene la proteína CagA. Sin embargo, la mayoría de la información disponible se ha realizado en el contexto de adenocarcinoma gástrico y a la fecha pocos son los estudios que se han enfocado en el papel que tiene *H. pylori* y CagA en el desarrollo de maltomas gástricos. Algunos autores han descrito que la expresión transgénica de CagA en un modelo murino fue suficiente para el desarrollo de adenocarcinoma gástrico y linfoma de células B. Asimismo, varios autores han demostrado el efecto que tiene CagA en líneas celulares de linfocitos B como BJAB y MEC1. En este proyecto demostramos que la línea celular Raji es permisiva a la translocación de CagA y que las condiciones utilizadas en este modelo favorecen este evento. Es importante mencionar, que las células Raji derivan de un linfoma de células B por virus de Epstein-Barr. Dado que el 90% de la población mundial está infectada con este virus, resultaría interesante evaluar el efecto de ambos microorganismos en la oncogénesis del maltoma gástrico. Puesto que en nuestro modelo utilizamos una línea celular

transformada, la siguiente etapa es reproducirlo en células B primarias y contribuir al entendimiento del desarrollo de maltoma gástrico.

SUMMARY

It is known that cancer is a serious public health problem and that cancers of infectious etiology are more frequent in developing countries. By 2012, Globocan reported that *Helicobacter pylori* occupied the first place as an infectious causative agent of cancer worldwide. It is estimated that 50% of the population has a chronic infection by this bacterium, which is related to various gastric diseases such as gastritis, gastric ulcer, duodenal ulcer, gastric adenocarcinoma and gastric maltoma. The infection with strains that carry the *cag* pathogenicity island and the CagA protein is intimately related to the development of these pathologies. This protein is translocated directly to the target cell by a type 4 secretion system (T4SS). Once translocated, it can exert different functions either in a phosphorylated or non-phosphorylated state. In both situations, it can modulate various signaling pathways that are involved in diverse processes such as inflammation, proliferation and cell survival. Several studies have been carried out both in animal models and in cell lines to elucidate the oncogenic role of the CagA protein. However, most of the available information has been made in the context of gastric adenocarcinoma and to date there are few studies that have focused on the role of *H. pylori* and CagA in the development of gastric maltomas. Some authors have described that the transgenic expression of CagA in a murine model was sufficient for the development of gastric adenocarcinoma and B-cell lymphoma. Several authors have also demonstrated the effect that CagA has on B cell lines such as BJAB and MEC1. In this project we demonstrate that the Raji cell line is permissive to the translocation of CagA and that the conditions used in this model favor this event. It is important to mention that this cell line is derived from a B cell lymphoma caused by Epstein-Barr virus. Given that 90% of the world population is infected with this virus, it would be interesting to evaluate the effect of both microorganisms on the oncogenesis of gastric maltoma. On the other hand, the next step is to reproduce our model in primary human B cells.

ÍNDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	9
ABREVIATURAS.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
1. Generalidades de <i>Helicobacter pylori</i>	11
2. Curso clínico de la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	12
3. Epidemiología.....	15
4. Factores de colonización y factores de virulencia.....	16
5. CagA, isla de patogenicidad y T4SS.....	18
6. Funciones de CagA.....	22
ANTECEDENTES DIRECTOS.....	25
JUSTIFICACIÓN.....	27
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVOS: GENERAL Y PARTICULARES.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
1. Bacteria.....	28
2. Pruebas bioquímicas.....	28
3. Líneas celulares y cultivo.....	29
4. Infección de células AGS e inducción del fenotipo colibrí.....	29
5. Análisis del fenotipo colibrí.....	29
6. Infección de células Raji.....	30
7. Obtención de proteínas.....	31
8. Ensayo de Western Blot.....	31
9. Evaluación de las células Raji infectadas por microscopia confocal.....	32
10. Estadística.....	32
RESULTADOS.....	33
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIÓN.....	42
PERSPECTIVAS.....	42
BIBLIOGRAFÍA.....	42

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Página

Figura 1. Poblaciones de <i>H. pylori</i> y su distribución mundial.....	12
Figura 2. Linfomagénesis inducida por <i>Helicobacter pylori</i>	14
Figura 3. Agentes infecciosos causantes de cáncer.....	15
Figura 4. Factores de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i>	16
Figura 5. Diversidad de la estructura molecular de la proteína CagA.....	19
Figura 6. Modelo hipotético de la maquinaria del T4SS de <i>H. pylori</i>	21
Figura 7. Vías de señalización activadas por la translocación de CagA en células epiteliales gástricas.	24
Figura 8. Caracterización de la cepa de <i>H. pylori</i> 26695.....	33
Figura 9. Inducción del fenotipo colibrí en células AGS.....	35
Figura 10. Western blot que demuestra que el tratamiento es suficiente para erradicar a la bacteria adherida a las células Raji.....	36
Figura 11. Western blot de la translocación de CagA en células Raji infectadas con <i>H. pylori</i>	38
Figura 12. Inmunofluorescencia de células Raji infectadas con <i>H. pylori</i>	39
Tabla 1. Características morfológicas y bioquímicas de la cepa de <i>H.pylori</i> 26695.....	33

ABREVIATURAS

BabA: Adhesina que reconoce antígenos del grupo sanguíneo del inglés:

“Blood group antigen binding adhesin A.”

Bcl-2: Es una familia de proteínas que regulan procesos de permeabilización mitocondrial, del inglés: “B-cell lymphoma 2.”

Bcl-XL: Proteína antiapoptótica, del inglés: “B-cell lymphoma-extra large.”

C-Abl: Abelson tirosina cinasa.

CagA: Citotoxina asociada al gen A.

Csk: cinasa del C-terminal de Src.

EPIYA: Secuencia de aminoácidos conformada por ácido glutámico, prolina, isoleucina, tirosina y alanina.

FAK: Cinasa de Adhesiones Focales.

GRB2: Proteína adaptadora del inglés: “Growth factor receptor-bound protein 2.”

MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas.

MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógenos

Mcl-1: Proteína anti-apoptótica del inglés: Induced myeloid leukemia cell differentiation protein.

MTOR: del inglés Mammalian target of rapamycin

NFkB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas.

PAR1: Receptor perteneciente a la familia de receptores acoplados a proteínas G, del inglés: “Protease-activated receptor-1.”

SabA: Adhesina de unión al antígeno Lewis

SHP2: del inglés Src homology proteína 2, es una proteína fosfatasa de tirosina.

Src: Abreviatura de Sarcoma, es una proteína tirosina cinasa.

SFKs: Cinasa de tirosinas, del inglés: Src-family-kinases.”

VacA: Citotoxina vacuolizante de H. pylori.

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades de *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo, extracelular, con morfología espiral en forma de sacacorchos. Su tamaño es de 0.5 a 1.0 μm de ancho y 2.5 a 4 μm de largo, asimismo, posee de 2 a 6 flagelos monopolares. Son positivas para las pruebas bioquímicas de oxidasa, ureasa y catalasa. Las condiciones óptimas para su crecimiento es a una temperatura de 37°C, niveles de 5% de O₂ y de 8-10% de CO₂. (Goodwin C.S., et al, 1990).

Se estima que *Helicobacter pylori* ha coexistido con el ser humano desde hace aproximadamente 100,000 años; tiempo suficiente para que la bacteria sufriera modificaciones que le permitieran adaptarse a cada hospedero conforme éste se fue desplazando del continente africano. Esta gran diversidad en las cepas de *H. pylori* ha permitido subdividirla en 6 poblaciones principales: hpEurope, hpAsia2, hpAfrica2, hpNEAfrica, hpAfrica1 (hspWAfrica y hspSAfrica) y hpEastAsia (hspEAsia, hspMaori y hspAmerind) (Suerbaum, S. and Josenhans, C., 2007). (Figura 1).

Desde su descubrimiento en 1984 por el Dr. Barry Marshall y el Dr. Robin Warren, se le ha otorgado un papel muy importante en la fisiopatogenia de distintas patologías gástricas, y ha sido considerada por la OMS como un carcinógeno de tipo I (Vogiatzi, P., 2007). Algunos estudios sugieren que la disrupción en el proceso de coevolución por infección con cepas de origen ancestral distinto al del huésped y la transferencia horizontal de segmentos de genes que no han coevolucionado con sus anfitriones, entre otros factores, participan en la patogenia gástrica (Kodaman, N., 2014; Guevara, A., 2016).

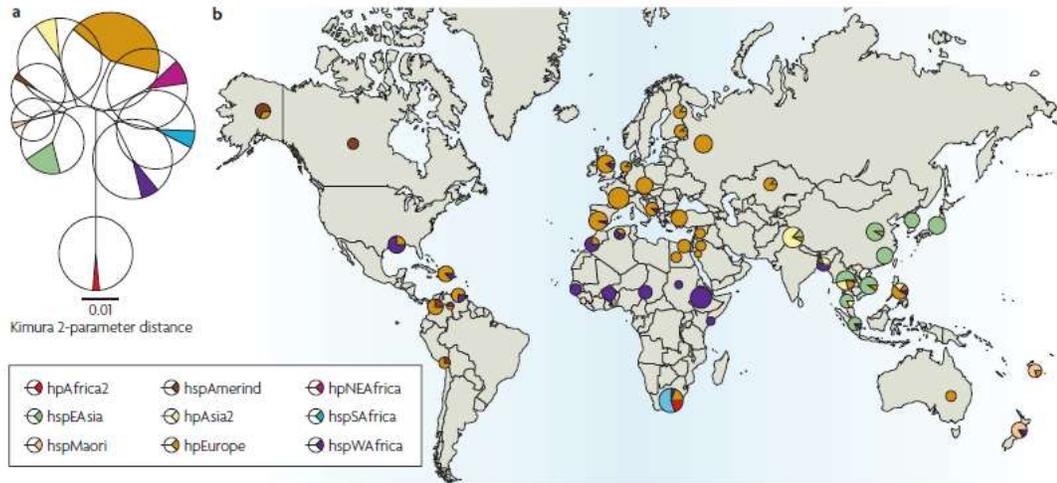


Figura 1. Poblaciones de *Helicobacter pylori* y su distribución mundial. *H. pylori* se puede subdividir en 6 poblaciones principales. Cuatro de estas son relativamente homogéneas (hpEuropa, hpAsia2, hpAfrica2 y hpNEAfrica), y dos subpoblaciones compuestas (hspWAfrica y hspSAfrica juntas conforman a la población hpAfrica1, y hspEAsia, hspMaori y hspAmerind juntas conforman a la población hpEastAsia). (Suerbaum, S., and Josenhans, C., 2007).

2. Curso clínico de la infección por *Helicobacter pylori*

La colonización por *Helicobacter pylori* está presente en más de la mitad de la población mundial, y en cerca del 80% de la población en países en vías de desarrollo. Es adquirida desde etapas tempranas de la vida (generalmente antes de los cinco años) a través de una transmisión oral-oral o fecal-oral (Diaconu S., et al, 2017). Una vez que la bacteria tiene acceso a la mucosa gástrica normal, ésta genera una infección aguda. En México se estima que el 43% de los niños de entre 5 y 9 años tiene una infección crónica por *H. pylori*, y este porcentaje incrementa a un 70-90% en etapa adulta. La infección crónica pasa asintomática en la mayoría de los casos, por lo que el desarrollo de daño en la mucosa gástrica con manifestaciones clínicas dependerá de

diversos factores tanto del hospedero, ambientales y bacterianos (Vaziri, F., et al. 2018).

El fenotipo más común generado por la infección es la gastritis simple o gastritis benigna. Este se caracteriza por pangastritis con mínimas alteraciones en la secreción de ácido gástrico y los pacientes se muestran asintomáticos y no desarrollan patología gastrointestinal severa. El segundo fenotipo más frecuente es la úlcera duodenal. Este fenotipo se desarrolla por una gastritis de predominio antral, con aumento en la secreción de ácido. La hiperclorhidria resulta en un aumento en la carga del ácido en el duodeno por lo que se desarrolla metaplasia protectora. Éste epitelio favorece la colonización de *H. pylori* y aumenta la inflamación y el daño resultando en ulceración del tejido. Finalmente el tercer fenotipo más frecuente es el cáncer gástrico caracterizado por una pangastritis, atrofia gástrica multifocal e hipo- o aclorhidria (Vaziri, F., et al., 2018). De manera fisiológica no existe tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) en estómago. Se sabe que la colonización crónica bacteriana en la mucosa gástrica promueve infiltrado linfocitario y la formación de MALT adquirido. Si esta infección se sostiene, favorece la proliferación de células B activas a través de estimulación inmunológica constante, ya que se promueve la infiltración de células T en el linfoma naciente de células B. Estas células T presentan diversidad de moléculas estimuladoras a los linfocitos B, promoviendo aún más la inflamación local y la proliferación de éstas células (Figura 2).

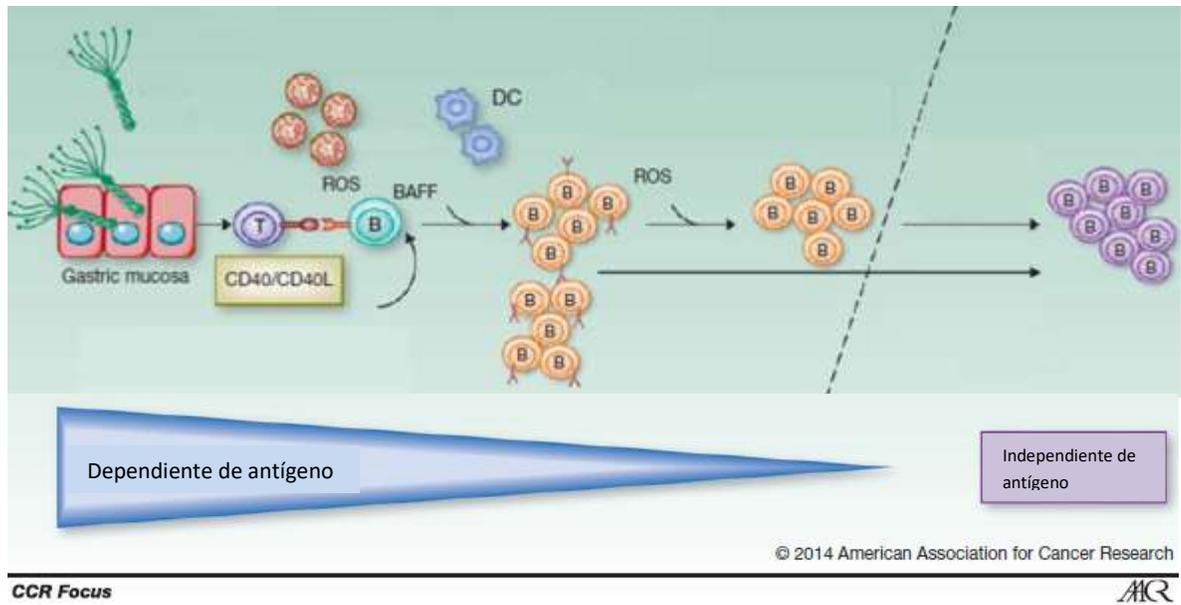


Figura 2. Linfomagénesis inducida por *Helicobacter pylori*. Las células B, células T, neutrófilos, células dendríticas, y macrófagos se acumulan en el sitio de inflamación crónica en la mucosa gástrica. Tanto las células inflamatorias como las células de la mucosa gástrica infectadas por *H. pylori* producen citocinas proinflamatorias y factores que reclutan a las células B, resultando en un MALT adquirido de la mucosa gástrica. (Imagen modificada de Zucca, E., et al, 2014).

El Maltoma gástrico es la variedad más frecuente de maltomas que se desarrollan en el organismo (representando el 30%) (Kahl, et al, 2008). Es una neoplasia de bajo grado y se caracteriza por un infiltrado linfoide denso compuesto principalmente por linfocitos que invaden y destruyen a las glándulas gástricas dando lugar a una lesión linfoepitelial. Pese a sus características benignas, puede evolucionar a un linfoma difuso de células B grandes de mayor malignidad (Zullo, A. et al, 2014).

3. Epidemiología

El cáncer se ha convertido en un problema grave de salud pública, siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. En países en vías de desarrollo, los cánceres de etiología infecciosa son más frecuentes que en el resto del mundo, y *Helicobacter pylori* ocupa el primer lugar como agente causal infeccioso a nivel mundial (Figura 3) (World Health Organization, 2012).

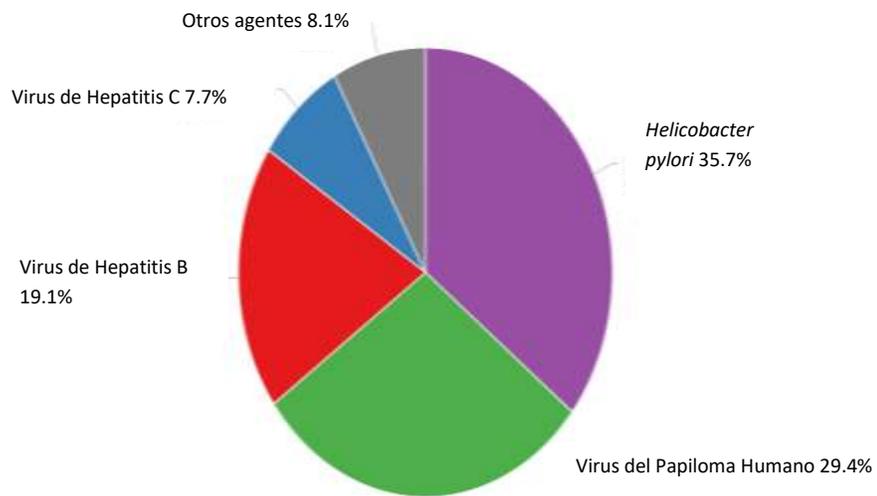


Figura 3. Representación gráfica de los principales agentes infecciosos causantes de cáncer en el año 2012. (Imagen modificada de GLOBOCAN, 2012)

Resulta interesante observar, que una bacteria ocupa el primer lugar como agente causal infeccioso de cáncer. Si bien, estos datos representan los casos reportados de cáncer gástrico, es importante considerar el efecto directo que pudiera tener *H. pylori* sobre las células B.

4. Factores de colonización y factores de virulencia

La colonización de *H. pylori* y su establecimiento en la mucosa gástrica se da gracias a una combinación de factores que le permiten a la bacteria sobrevivir a este microambiente hostil (Figura 4) (Chmiela, M., et al, 2017). Entre los principales factores de colonización se encuentra la enzima ureasa, la cual hidroliza la urea en bióxido de carbono y amonio lo que permite amortiguar el pH del estómago (pH=3). De igual manera, los flagelos le permiten atravesar la capa de moco y colonizar regiones más cercanas a la mucosa, lo cual la protege aún más del ambiente ácido de la luz gástrica (Talebi., B.A.A, 2017).

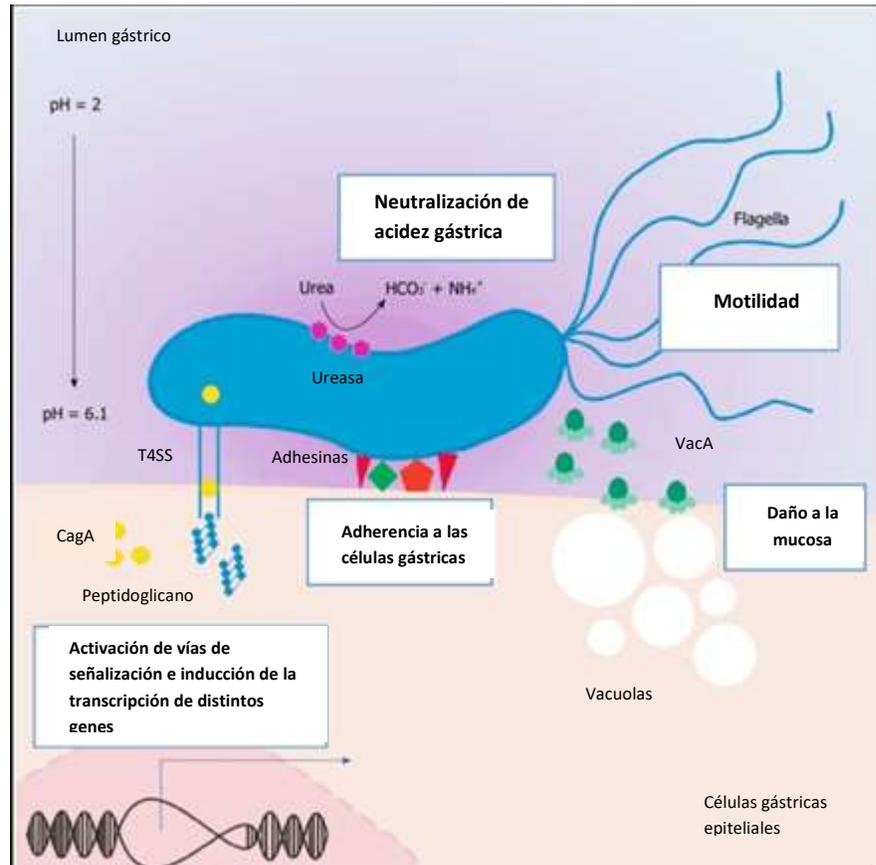


Figura 4. Factores de colonización y factores de virulencia de *H. pylori*. Existen múltiples factores bacterianos que contribuyen a la capacidad de *H. pylori* para colonizar la mucosa gástrica: flagelos, ureasa, proteínas de adhesión (SabA y BabA) y proteínas efectoras (VacA y CagA). (Molina-Castro, et al. 2018).

Una vez que atraviesa la capa de moco, se pueden encontrar bacterias libres, o bien adheridas a la superficie apical de las células del epitelio gástrico a través de diferentes adhesinas como:

- **SabA:** Esta es una proteína de 70 kDa llamada adhesina de unión a ácido siálico. Se une al antígeno sialyl-Lewis^x y sialyl-Lewis^a. Estos antígenos son propios de los grupos sanguíneos, y aunque son raramente expresados en epitelio gástrico sano, su expresión comienza a aumentar en tejido inflamado por efecto del TNF. Esta interacción es muy importante para la colonización durante infecciones crónicas y existen variantes de esta proteína con diferentes afinidades y especificidades para las moléculas antes mencionadas. Esto pudiera ser un mecanismo de adaptación mediante el cual *H. pylori* modula rápidamente sus propiedades adherentes para alcanzar una óptima colonización y evadir las respuestas inmunes del hospedero (Matsuo, Y. et al, 2017).
- **BabA:** Esta proteína fue la primer molécula de adhesión identificada de *H. pylori*. Es una proteína codificada por el gen *babA2* de 78 kDa llamada adhesina de unión al antígeno de grupo sanguíneo. Se encuentra localizada en la membrana externa y se une al antígeno Lewis^b y a los antígenos fucosilados de los grupos sanguíneos (Shamshul Ansari et al, 2017).

Por otro lado, *Helicobacter pylori* cuenta con dos proteínas efectoras principales (VacA y CagA) las cuales participan en el desarrollo de lesiones benignas y neoplásicas:

- **VacA:** Esta citotoxina se encuentra presente en todas las cepas de *Helicobacter pylori*. El gen *vacA* codifica para una preprotoxina de 140 kDa, la cual sufre escisión durante su secreción resultando en monómeros de 88 kDa de citotoxina vacuolante. La toxina es liberada al espacio extracelular y también puede ser retenida en la superficie bacteriana y agregarse en complejos oligoméricos para insertarse en las bicapas

lipídicas y formar canales selectivos de aniones. VacA es polimórfica y está compuesta por 3 regiones que a su vez están clasificadas. La región señal (s) se clasifica como s1 o s2 e incluye al extremo amino terminal y a la secuencia señal. Esta región influye en la formación del canal aniónico. La región mid (m) se encarga del tropismo celular y se clasifica como m1 o m2. La región intermedia determina la actividad vacuolante de la toxina VacA y se clasifica como i1, i2 o i3 (Chauhan, N., et al, 2019). Los polimorfismos entre los alelos de VacA resulta en diferentes niveles de citotoxicidad. Todas las posibles combinaciones de estas regiones se han identificado y de entre todas ellas, la actividad vacuolítica es mayor en cepas s1/m1, menor en s1/m2 y está ausente en cepas s2/m2. Entre las diversas alteraciones celulares están la biogénesis de vacuolas citosólicas, inducción de autofagia, disfunción mitocondrial y depleción de ATP (Kim, I.J., et al., 2018).

5. CagA, Isla de patogenicidad *cag* y T4SS:

Basados en la presencia o ausencia del gen *cagA*, el cual codifica para la proteína CagA, *H. pylori* puede clasificarse como cepas *cagA*-positivas o *cagA*-negativas. El gen *cagA* se encuentra localizado en un extremo de la isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*), misma que se explicará posteriormente.

El extremo amino-terminal de CagA está bien conservado entre todas las variantes de esta proteína. Esta región es necesaria para la asociación de CagA a la cara interna de la membrana plasmática puesto que posee una región que interactúa con la fosfatidilserina (Figura 5a).

Esta proteína tiene un peso que varía entre los 121-145 kDa debido al polimorfismo estructural presente en un segmento de la región carboxilo-terminal, denominado segmento EPIYA (glutamato-prolina-isoleucina-tirosina-alanina) (Figura 5b).

Basados en las secuencias de aminoácidos que flanquean al segmento EPIYA, existen 4 tipos de estos motivos (A, B, C, D), siendo EPIYA-A, EPIYA-

B y EPIYA-C omnipresentes alrededor del mundo, mientras que EPIYA-D se encuentra en cepas casi de manera exclusiva en el oriente asiático (Japón, Corea del Sur y China) (Masanori Hatakeyama, 2011). Debido a esto se realizó una nomenclatura, nombrando a las cepas “Western” cuando los motivos en CagA encontrados son EPIYA-A, EPIYA-B y EPIYA-C (menor patogenicidad) y cepas “Eastern” cuando los motivos encontrados son EPIYA-A, EPIYA-B y EPIYA-D (mayor patogenicidad) (Higashi, H., et al, 2002). Inmediatamente después de este segmento se encuentra una secuencia de multimerización (Cm) de 16 aminoácidos, el cual se encuentra ampliamente conservado. Esta secuencia es muy importante para la dimerización de CagA, evento que le permite interactuar con diferentes proteínas de la célula epitelial gástrica y modular distintas vías de señalización (Masanori Hatakeyama, 2017).

Finalmente el reconocimiento de CagA por el sistema de secreción tipo IV (T4SS) requiere de una secuencia señal rica en arginina en el extremo C-terminal de aproximadamente 20 aminoácidos.

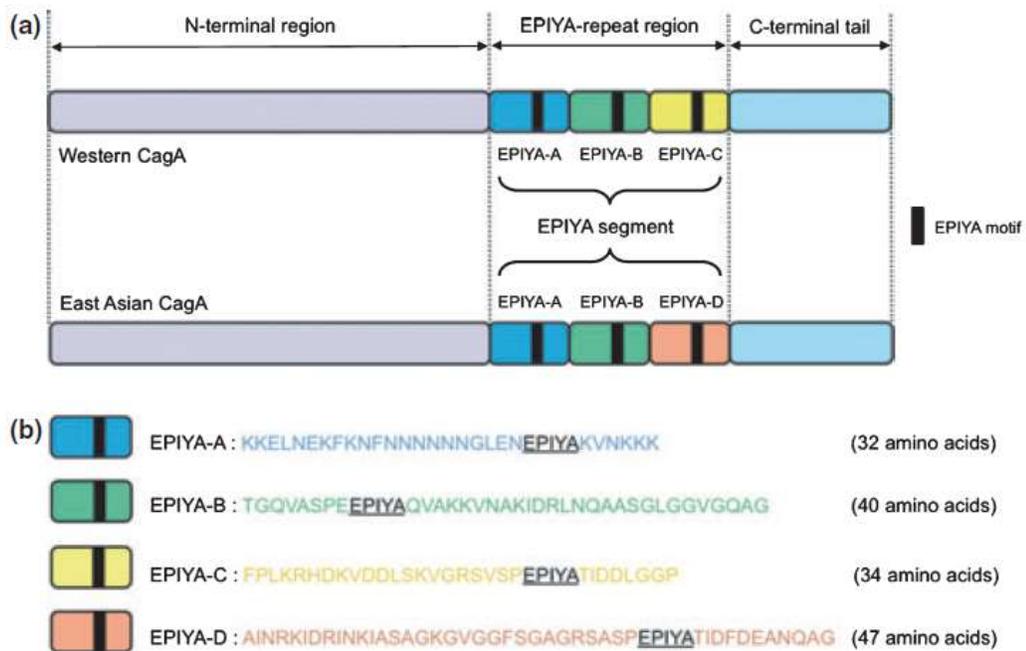


Figura 5. Diversidad de la estructura molecular de la proteína CagA de *H. pylori*.

(a) CagA comprende una región amino terminal conservada, la cual posee 4 dominios una región variable conocida como segmento EPIYA y una cola carboxilo terminal. Con base en la diversidad estructural de la región EPIYA, CagA se subdivide en dos grupos: Eastern y Western. La primera es caracterizada por la presencia de un segmento EPIYA-D, mientras que la segunda se define por la presencia de uno o varios segmentos EPIYA-C. (b) Secuencia de aminoácidos de cada segmento EPIYA. (Imagen de Masanori Hatakeyama, 2011).

Como se mencionó anteriormente, CagA es un marcador de la isla de patogenicidad de *H. pylori*. La isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*) es un segmento de DNA de 40kb que contiene 31 genes, de los cuales la mayoría codifica para componentes de un sistema de secreción bacteriano tipo 4. La *cagPAI* es muy importante en la patogénesis de *H. pylori* y sólo se expresa en aproximadamente el 60% de las cepas “Western” y en el 100% de las cepas “Eastern” (Censini, S., et al, 1996). Las cepas que carecen de la *cagPAI* se encuentran predominantemente en la capa de moco del estómago, mientras que las cepas que sí la poseen se encuentran adyacentes o incluso adheridas a las células epiteliales gástricas (Camorlinga-Ponce M, et al, 2004). Esto indica que el genotipo *cagPAI*+ influye en la topografía de la colonización dentro del estómago. La *cagPAI* está insertada entre los genes que codifican para una proteína contenedora de repetidos Sel-1 y la racemasa de glutamato, respectivamente, y está flanqueada por una secuencia repetida de 31bp.

Para que CagA pueda ejercer sus funciones tiene que ser internalizada en su célula blanco. Esto se logra gracias al sistema de secreción tipo IV (T4SS) codificado por la isla de patogenicidad. Este sistema de secreción actúa como una jeringa molecular que deposita productos bacterianos a la célula hospedera. Los transportadores T4SS son encontrados en diferentes bacterias (*Agrobacterium*, *Brucella spp.*, *Bartonella spp.*, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*) y pueden depositar sustratos como proteínas o nucleoproteínas a las células receptoras. Las células receptoras pueden ser

bacterias de la misma especie o diferente, así como células de organismos de reinos distintos como plantas, hongos y mamíferos. Estos transportadores consisten típicamente en 11 proteínas VirB y una NTPasa VirD4, aunque en *H. pylori* este sistema es mucho más elaborado y contiene más subunidades (Merino, E., et al, 2017). Se cree que las subunidades adicionales representan adaptaciones para optimizar la secreción tipo IV en el ambiente de la mucosa gástrica. Las proteínas VirB se pueden agrupar en 3 clases: componentes del canal (VirB6-10), componentes energéticos (NTPasas VirB4, VirB11) y los componentes asociados a pilus (VirB2, VirB3 y VirB5). El T4SS de *H. pylori* está compuesto por: CagE, CagX, CagY, Cag α , Cag5 (estas proteínas muestran similitudes importantes en su secuencia con componentes de otros T4SS), Cag4, CagC, CagL, CagW, CagT, CagV (estas proteínas no comparten similitudes con componentes de otros T4SS), Cag1, Cag2, CagQ, CagP (no son necesarias para la translocación de CagA ni para la inducción de IL-8), Cag3, CagM, CagU, CagI, CagH (necesarios para la translocación de CagA y la inducción de IL-8) y CagF, CagG y CagZ (indispensables para la translocación de CagA) (Figura 6).

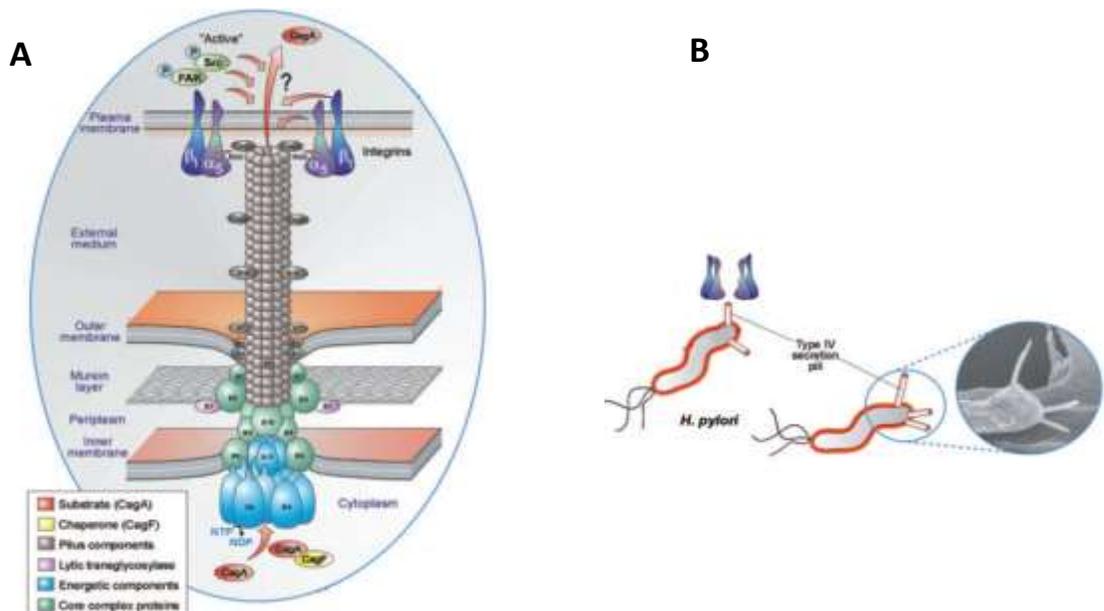


Figura 6. Modelo hipotético de la maquinaria del T4SS de *Helicobacter pylori*. (A) El T4SS es un complejo multiproteico que una vez ensamblado abarca desde la porción citoplasmática de *H. pylori* hasta las membranas interna y externa. El esquema muestra por código de colores la distribución de sus componentes y su función de forma simplificada. (B) Microscopia electrónica que muestra al T4SS de *H. pylori*. (Modificada de Backert, et. al; 2008)

A la fecha no se sabe la función exacta de todos los componentes de este sistema (Tegtmeyer, N., et al., 2011). Lo que sí se sabe es que CagF es una proteína tipo chaperona que se une a un sitio cercano al extremo C-terminal de la señal de secreción de CagA y es indispensable para que CagA sea reconocida por el sistema y depositada a la célula blanco. CagL y CagY son unas proteínas que cubren el pilus a manera de adhesinas que conectan el T4SS a las células receptoras ya que reconocen a la integrina $\alpha 5\beta 1$. Finalmente, la entrega de CagA es dependiente de energía, misma que es proporcionada por las NTPasas VirD4, VirB4 y VirB11 (Backert, et al, 2008).

6. Funciones de CagA

Una vez internalizada, CagA se localiza en la cara interna de la membrana plasmática. Se sabe que CagA ejerce funciones tanto en su estado fosforilado como sin fosforilar. Las fosforilaciones tienen lugar en las tirosinas presentes en los motivos EPIYA, y se llevan a cabo inicialmente por las cinasas de la familia Src (SFks) y posteriormente por la cinasa c-Abl. Ya fosforilada, se une de manera específica a la fosfatasa SHP2 (Src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase-2) en sus dominios SH2, formando un complejo. En un escenario fisiológico, SHP2 se necesita para la activación completa de la vía de las MAP cinasas y está involucrada en procesos como motilidad celular, morfogénesis celular y proliferación celular. Para activarse, SHP2 tiene que unirse a una proteína adaptadora GAB fosforilada. De este modo, se deduce que CagA estaría actuando

como una proteína de andamiaje que imita la función de GAB para activar a SHP2 (Naoko Murata-Kamiya, 2011, Masanori Hatakeyama, 2017). SHP2 activada por CagA, desfosforila a la cinasa FAK (Focal adhesion kinase) en sus sitios activos (Tyr-369,-574,-575). Esta proteína es una tirosina cinasa que regula los puntos focales de adhesión celular. Su inhibición trae como resultado la reorganización en el citoesqueleto y elongación de la célula epitelial gástrica, conocido como fenotipo colibrí, el cual se caracteriza por protrusiones celulares parecidas a agujas (Tsutsumi, R., et al, 2006). Se sabe que los motivos EPIYA-C y EPIYA-D favorecen la interacción CagA-SHP2, y que de estos dos, EPIYA-D es quien lo hace con mayor afinidad (Higashi, et al, 2002). Además de unirse a SHP2, Csk (C-terminal Src kinase) se une de manera específica a CagA a través de los motivos EPIYA-A o EPIYA-B fosforilados. Csk se encarga de fosforilar e inhibir a las SFKs (quienes fosforilan y activan a CagA). Por lo tanto, Csk activada por CagA funciona como un regulador negativo de la interacción CagA-SHP2 (Masanori Hatakeyama, 2004). Finalmente EPIYA-B fosforilado es reconocido por la subunidad p85 de la cinasa PI3K, activándola (Zhang, X.S, et al, 2015).

La función adaptadora de CagA no siempre requiere a la proteína en su estado fosforilado. Como se mencionó anteriormente, la secuencia de multimerización (CM) le permite interactuar con otras proteínas intracelulares, por ejemplo una cinasa de serina-treonina llamada PAR1. De todas las isoformas, Par1b se encuentra de manera predominante en células epiteliales y se distribuye en la parte basolateral de la membrana de células polarizadas, donde juega un papel muy importante en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad apical-basal (Suzuki, et al, 2006). La interacción CagA-PAR1b evita que PAR1b interactúe con y fosfore a sus sustratos naturales, generando defectos en la polaridad celular. Por otro lado, el motivo CM también interactúa con el receptor c-Met, potenciando la respuesta mitogénica dependiente de éste y favoreciendo la activación de la señalización de PI3K-Akt (Yong, X., et al.,

2015). En resumen, todas estas interacciones de CagA ya sea en su estado fosforilado o sin fosforilar, interfieren con las uniones adherentes y las uniones estrechas así como en diferentes vías de señalización, resultando en la pérdida de la polaridad celular e induciendo respuestas inflamatorias y mitogénicas importantes para el desarrollo de cáncer gástrico (Jia Wu, et al, 2013) (Figura 7).

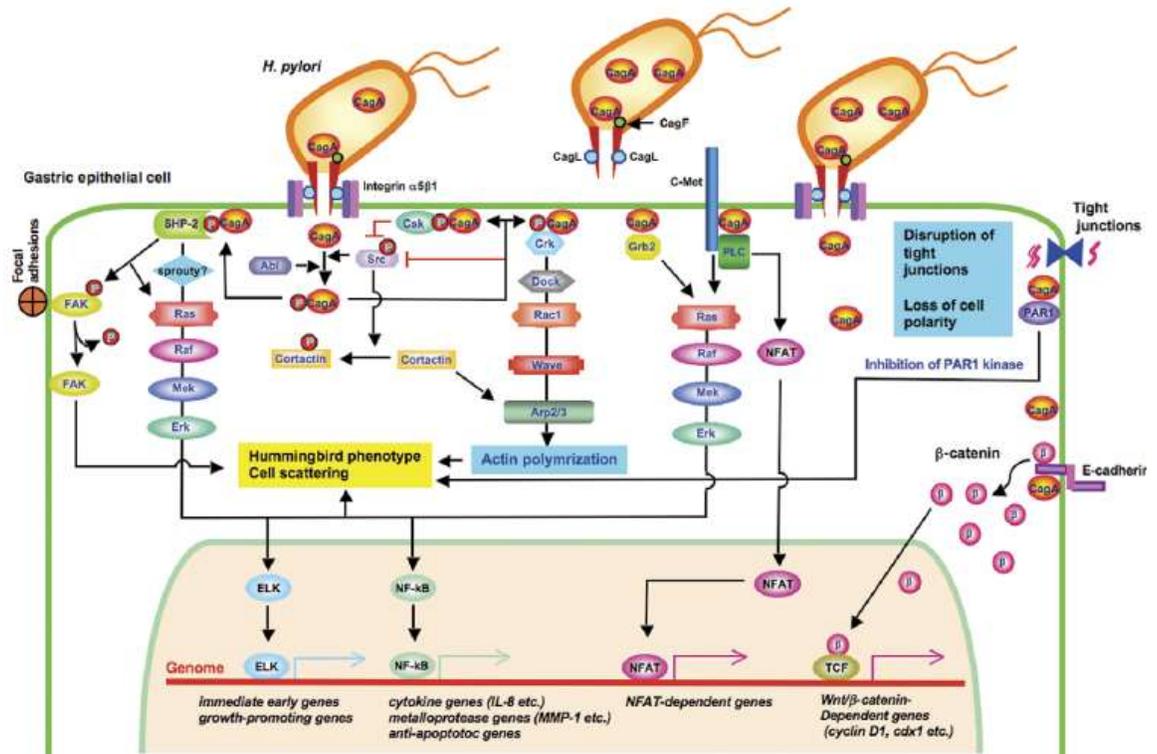


Figura 7. Vías de señalización activadas por la translocación de CagA en células epiteliales gástricas. Una vez internalizada, CagA es fosforilada por las cinasas Src y c-Abl. Ya fosforilada, CagA interactúa con SHP-2, quien por un lado activa a la vía de las MAP quinasas (promoviendo la transcripción de genes involucrados en proliferación) y por otro lado desfosforila a FAK (favoreciendo la elongación de la célula). CagA fosforilada también interactúa con Crk, alterando la polimerización de actina. CagA sin fosforilar interactúa con c-Met y Grb2, activando la transcripción de genes dependiente de las vías de las MAP quinasas y de NFAT. Por otro lado, CagA también se une e inhibe a la cinasa PAR1, resultando en defectos en la polaridad y en las uniones celulares. Además, CagA interactúa con E-cadherina y por ende desestabiliza el complejo E-Cadherina-β catenina para promover la vía de señalización Wnt/β-catenina (Masanori Hatakeyama, 2008).

ANTECEDENTES DIRECTOS

Numerosos estudios se han realizado tanto en modelos animales como en líneas celulares para poder dilucidar el papel oncogénico de *Helicobacter pylori* y sobretodo, de la proteína CagA.

- Desde 1998, Wirth, H.P. y colaboradores, demostraron la utilidad de los jerbos como modelo animal para la infección por *H. pylori*. Al infectar a un grupo de jerbos con una cepa CagA+ aislada de humano, el 100% de los animales se infectó y mostró un patrón similar al que se desarrolla en humanos, caracterizado por infiltrado inflamatorio en tejido gástrico y una respuesta humoral sistémica contra los antígenos de la bacteria. Por otro lado, sólo el 23% de los animales infectados con cepas CagA- mostraron datos de infección. Esto indica la importancia que tiene el tipo de cepa de *H. pylori*, siendo el fenotipo CagA+ muy importante para la patogenia.
- En el 2003, Umehara Shintaro y colaboradores demostraron que al transfectar CagA en una línea celular de ratón de células pro-B-dependientes de IL-3 se prevenía la apoptosis mediada por hidroxurea de éstas células a través de un mecanismo que inhibía la acumulación de p53.
- Por otro lado, en el 2008 Ohnishi Naomi y colaboradores, generaron un ratón transgénico con CagA WT y un ratón que presentaba CagA resistente a la fosforilación (tanto de manera sistémica como específico de tejido gástrico). Observaron que los ratones que expresaban CagA WT de manera sistémica presentaban datos de inflamación, hiperplasia y poliposis gástrica, además del esperado adenocarcinoma gástrico. Sorprendentemente, estos ratones presentaron neoplasias hematopoyéticas de células B. Por otro lado, los ratones con la versión CagA resistente a la fosforilación no presentaron ninguna patología, confirmando que la inducción de estas neoplasias era dependiente de la fosforilación de CagA. En conjunto, estas dos publicaciones demuestran que la proteína CagA y su fosforilación juegan un papel importante en la génesis del maltoma gástrico, sin embargo, ambos son modelos de

transfección y por ende los efectos que se puedan evaluar no toman en cuenta todos los factores de virulencia de la bacteria ni un contexto de infección dado de manera natural.

- Un par de años más tarde, Lin W.C., *et al.* (2010) demostraron que al cocultivar a la línea celular BJAB (linfoma de células B) con una cepa de *Helicobacter pylori*, CagA era translocada y fosforilada. Asimismo, demostraron que en éstas células aumentaba la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL, y que al retar con etopósido a las células que habían sido previamente infectadas con una cepa CagA+, las células presentaban un mayor porcentaje de viabilidad que aquéllas células que habían sido infectadas con una cepa CagA-.
- Kirsch, Linda M, *et al.* (2016) observaron que CagA es internalizada y fosforilada tras la infección con *H. pylori* de la línea celular de células B MEC1 (derivada de leucemia linfocítica crónica de células B). De igual manera demostraron que las cinasas Src y Abl son las responsables de las fosforilaciones que sufre la proteína una vez que se encuentra intracelularmente. Estos dos artículos demuestran que las líneas celulares de células B evaluadas fueron permisivas a la infección por *Helicobacter pylori* y que CagA es translocada y fosforilada, teniendo efectos directos en la proliferación y supervivencia de estas células.

JUSTIFICACIÓN

La mayoría de la evidencia científica se ha enfocado en explicar cómo la infección por *Helicobacter pylori* promueve el desarrollo de gastritis, úlcera péptica y principalmente, carcinoma gástrico. Sin embargo, existe poca información sobre el efecto directo que pudiera tener *Helicobacter pylori* sobre los linfocitos B humanos y los cambios que éstas células pudieran desarrollar tras la internalización de la toxina CagA.

Es por ello que es necesario desarrollar y caracterizar un modelo de infección en células B humanas para contribuir al entendimiento del desarrollo del maltoma gástrico.

HIPÓTESIS

La línea celular Raji (linfocitos B) será permisiva a la infección de la cepa de *Helicobacter pylori* CagA (+) 26695.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y caracterizar un modelo de infección de *Helicobacter pylori* cagA(+) en células B humanas.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Reproducir el modelo de infección en células AGS con una cepa de *Helicobacter pylori* cagA(+)(HP26695).

1.1 Infectar a la línea celular AGS con la cepa de *H.pylori* (HP26695).

1.2 Evaluar el fenotipo colibrí en las células infectadas mediante microscopía de campo claro y microscopía confocal.

2. Implementar un modelo de infección en células Raji con una cepa de *Helicobacter pylori cagA(+)*(HP26695).

2.1 Infectar a la línea celular Raji con la cepa de *H. pylori* (HP26695).

2.2 Detectar mediante “Western Blot” la presencia de CagA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bacteria

La cepa de *Helicobacter pylori* que se utilizó es la 26695 (ATCC®700392™). La toxina CagA de esta bacteria contiene 3 segmentos EPIYA (ABC), correspondiendo a una cepa occidental (Cortes, M.C., et al, 2010). El crecimiento de *H. pylori* se realizó en agar sangre durante 24-48 horas al 9% de CO₂ y 37°C.

Pruebas bioquímicas

Oxidasa: Esta prueba determina la presencia del citocromo C. Para evidenciar esta enzima, se utilizó el kit “BD BBL™ DrySlide™ Oxidase.” Con asa estéril se tomó masa bacteriana y se colocó directamente en el papel. La oxidación se detecta como color azul, la cual se hace evidente en menos de 10 segundos.

Catalasa: La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Para evidenciar esta actividad se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 30% estabilizado (Baker Analyzed® ACS, J.T. Baker®) en un pozo de placa de 96 pozos. Se tomó una asada de masa bacteriana y se colocó directamente en el pozo. La formación de burbujas es resultado positivo para esta prueba.

Ureasa: La ureasa cataliza la hidrólisis de urea a CO₂ y amoníaco, este último incrementa el del pH medio. Sobre un pozo se coloca una solución de urea y se coloca una asada de masa bacteriana, mezclando bien. El cambio de coloración es indicativo de la actividad ureasa de la bacteria.

Líneas celulares y cultivo

La línea celular AGS (ATCC® CRL-1739™) se utilizó para reproducir el modelo de infección. Estas células se mantuvieron en medio DMEM/ F12 + GlutaMAX™-I (Gibco No. 10565-018) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomicina. Se crecieron en frascos de cultivo T75 a 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 90% (aprox. 48 h) y poder ser utilizadas en los distintos ensayos. Para poder ser utilizadas, las células se despegaron de los frascos con 4ml de Tripsina por 5 min. a 37°C y se lavaron 2 veces con medio atemperado, centrifugando a 1500rpm x 5 min en cada ocasión.

La línea celular Raji (ATCC® CCL-86™) se mantuvo en medio RPMI-1640 (Gibco No. 31800089) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de L-glutamina, 2% de aminoácidos no esenciales y 1% de piruvato de sodio. Se crecieron en frascos de cultivo T75 a 37°C y 5% de CO₂ por 48 horas.

Infección de células AGS e inducción del fenotipo colibrí

Se colocaron 1×10^5 células AGS en medio DMEM suplementado sobre cubreobjetos estériles (previamente desengrasados) en placa de 6 pozos a 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 70%. Una vez alcanzada esta condición, se retiró el medio suplementado y se agregó medio DMEM base, así como *H. pylori* a una MOI de 100 y se dejaron en incubación por 24 horas.

Análisis del fenotipo colibrí por microscopia de campo claro y microscopia confocal

Para evidenciar el fenotipo colibrí por microscopia de campo claro se realizó lo siguiente: al terminar las 24 horas de infección, se retiró el medio y se fijaron las células con metanol al 70% durante 5 min y se tiñeron con safranina durante 5 minutos, seguido de 5 lavados con PBS 1X. Se montaron los cubreobjetos y se analizaron al microscopio con objetivo de 40x.

Para analizar el fenotipo por microscopia confocal se realizó la infección de la misma manera y al terminar se fijaron con Paraformaldehído al 4% por 10 min. a temperatura ambiente. Se permeabilizaron las células con Tritón X-100 al 0.25% por 15 min y se bloquearon con una solución de BSA al 10% en tritón X-100 al 0.025% por 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo conjugado anti-CagA-AF488 (A-10, sc-28368 AF488, Santa Cruz Biotech.) se utilizó en una dilución 1:100 y se dejó incubando toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al terminar este tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS1X. Se agregaron 30µl de Faloidina-TRITC (dilución 1:300) por 30 min y DAPI (dilución 1:1000), para marcar citoesqueleto de actina y núcleos, respectivamente. Los cubreobjetos se colocaron sobre medio de montaje vectashield y se almacenaron las laminillas a 4°C cubiertas de la luz. La obtención de las imágenes se realizó en el microscopio confocal “Leica SP8 Lightning” con el objetivo de 40x. El análisis de las imágenes se realizó utilizando el software de “Fiji-ImageJ”.

Infección de células Raji

Para evaluar la translocación de CagA en células Raji, se resuspendieron 1×10^6 células en 2 ml de medio RPMI base en tubos estériles de 15 ml. Posteriormente se agregó la cepa de *Helicobacter pylori* (HP26695) a una MOI de 100. Para favorecer el contacto entre las células y las bacterias, los tubos se centrifugaron a 4500 rpm por 10 min. Ya centrifugados se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por diferentes periodos de tiempo. Al terminar el tiempo de la infección, se decantó el medio con cuidado de no perder el pellet, se agregaron 2 ml de medio RPMI suplementado, se resuspendieron las células y se agregaron 200ng/ml de gentamicina por 2 horas para eliminar a la bacteria. Al concluir, se lavaron dos veces con PBS1X frío y se centrifugaron a 1500rpm por 5 min entre cada lavado.

Obtención de proteínas

Ya lavadas, las células se lisaron con 60µl de buffer de lisis 1x casero compuesto por: 100µl de buffer de lisis 10x (tris base 1.211 g, NaCl 1.5M 8.76 g, NaF 0.2M 0.84g en 100ml de agua MiliQ ph 7.2), Aprotinina (1.8 mg/ml) 2.77µl, Leupeptina (2mg/ml) 2.5 µl, Tritón X-100 (1%) 10µl, Na₃VO₄ (10mM) 5µl y 877µl de agua miliQ. Las proteínas se cuantificaron con el kit “Modified Lowry Protein Assay” [Thermo Fischer, Scientific] y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Ensayo de “Western Blot”

Se preparó un gel separador al 8% [Tris 1.5M pH 8.8, Acrylamix al 30%, H₂O destilada, SDS (dodecilsulfato sódico) al 10%, APS (persulfato de amonio) al 10% y TEMED (tetrametiletilendiamino)] y gel concentrador [Tris 1.0 M-pH 6.8, Acrilamix al 30%, H₂O destilada, SDS (dodecilsulfato sódico) al 10%, APS (persulfato de amonio) al 12.5% y TEMED (tetrametiletilendiamino)]. Se montó el sistema de electroforesis y se agregó en la cámara interna y externa el buffer de corrida (Tris base 3.03g, Glicina 14.4g, SDS 1g y H₂O cbp 1000ml).

Se tomaron 30 µg de proteínas y se adicionó buffer de carga 6x (H₂O 6.9ml, Tris 1M-pH 6.8 1ml, SDS 10% 1ml, Glicerol puro 1ml, B-mercaptoetanol 0.1ml, Bromofenol c.b.p.). Se hirvieron a 96°C por 5 min y se cargaron en carriles independientes. Las condiciones fueron: 80 volts durante 2:30 h.

Una vez concluida la electroforesis se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa con buffer de transferencia frío (Tris base 3.1g, Glicina 14g, Metanol 200ml, H₂O destilada cbp 1000ml) a 100v por 60 min.

Al concluir la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se tiñó con rojo de Ponceau para confirmar la transferencia de las proteínas, ésta se lavó con buffer de TBS-Tween al 0.1% y se prosiguió a bloquear la membrana con leche descremada al 5% en TBS-Tween al 0.1% durante 1h en agitación a temperatura ambiente (en caso de que la detección fuera de proteínas fosforiladas, la membrana se bloqueó con TBS-Tween al 0.1% y 5% de BSA). Al terminar el bloqueo se realizaron dos lavados con TBS-Tween al 0.1%

seguido de la incubación del anticuerpo primario anti-CagA diluido 1:1000 en TBS-Tween al 0.1% y leche al 1% y se incubó toda la noche a 4°C. Al finalizar, se lavó 3 veces durante 5 min c/u con TBS-Tween al 0.1% y se adicionó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (dilución 1:10,000 con TBS-Tween al 0.1% y leche al 1%) dejándolo incubar por 1h en agitación a temperatura ambiente. Al concluir, se lavó 5 veces durante 10 min c/u en agitación con TBS-Tween 0.1% y la membrana se reveló por quimioluminiscencia con KIT “Western Blotting Luminol Reagent” [Santa Cruz, sc 2048] reactivo A y reactivo B mezcla 1:1, agitación manual durante 1 min cubierto de la luz en el equipo de “Chemidoc.”

Evaluación de las células Raji infectadas por microscopia confocal

Para evaluar a las células Raji, en placa de 6 pozos se colocaron cubreobjetos previamente desengrasados y estériles. Sobre ellos se agregaron 200 µl de fibronectina y se incubó 1h a 37°C. Se colocaron 1×10^6 células en medio RPMI base y se dejó 1 h a 37°C para favorecer la adhesión de las células a la fibronectina. Por otro lado, después de leer la densidad óptica de la bacteria, ésta se incubó con carboxifluoresceína por 30 min y al terminar se realizaron dos lavados con PBS1X. Se realizó la infección a diferentes moi por 24 h y al concluir se retiró el medio y se fijó con PFA 4% por 15 min. Se retiró el PFA 4% y se agregaron 35µl de faloidina-TRITC 1:300 y se incubó por 30min en oscuridad, seguido de un lavado con PBS1X. Al finalizar se agregó DAPI (1:1000) y se montó en portaobjetos con vectashield. Las laminillas fueron analizadas en el microscopio confocal y las imágenes analizadas con el programa de “Fiji-ImageJ”.

Estadística

Los datos fueron graficados y analizados con el programa “GraphPad Prism.” El análisis estadístico entre dos variables se determinó con la prueba T de student.

RESULTADOS

Caracterización de la cepa de *H. pylori* 26695

El primer paso antes de iniciar con los modelos de infección fue la caracterización de la cepa de *H. pylori* 26695. Se realizó un análisis morfológico y bioquímico conforme a lo descrito en la metodología. Los resultados se muestran en la tabla 1 y figura 8A. Asimismo, se confirmó mediante “Western Blot” que la cepa fuera portadora de la proteína CagA (Figura 8B).

Tabla 1. Características morfológicas y bioquímicas de la cepa de *H.pylori* 26695.

Cepa de <i>H. pylori</i>	Colonia en gota de rocío	Tinción de Gram	Ureasa	Catalasa	Oxidasa
26695 (ABC)	+	Gram negativa	+	+	+

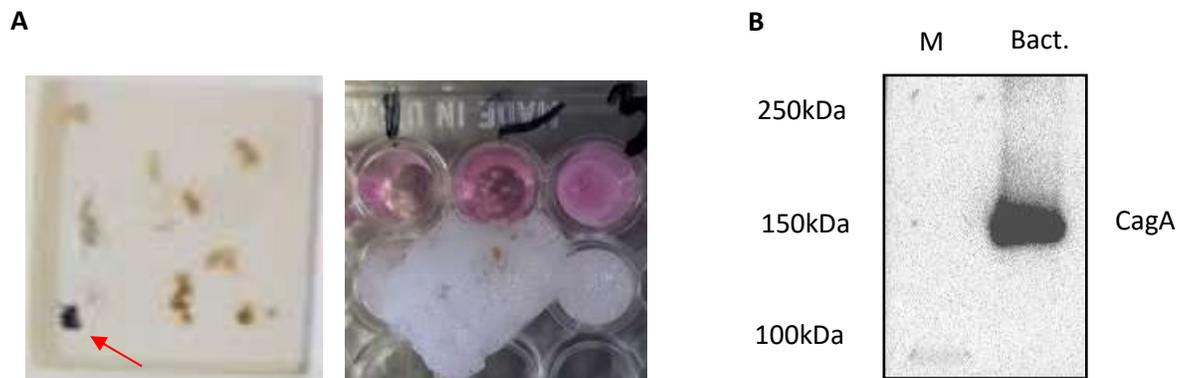


Figura 8. Caracterización de la cepa de *H. pylori* 26695. A) Prueba de Oxidasa (izquierda) donde se aprecia el cambio de coloración al momento de colocar la bacteria (flecha). Prueba de ureasa (derecha, fila superior) donde se pone de manifiesto el cambio de pH por el cambio de color de la muestra. Prueba de catalasa (derecha, fila inferior) donde se aprecia la formación de burbujas por la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. B) “Western blot” que demuestra la presencia de la proteína CagA (145kDa) en los lisados obtenidos de la bacteria.

Las células AGS desarrollan el fenotipo colibrí posterior a la infección con *Helicobacter pylori* (26695)

Helicobacter pylori induce cambios morfológicos importantes en la línea celular AGS conocidos como fenotipo colibrí. Se sabe que este fenómeno es dependiente de la fosforilación de CagA, por lo que este fenotipo se ha utilizado para valorar de manera indirecta la translocación de CagA a la célula (Bin Su, et al. 2003). Dado que uno de los objetivos del proyecto era infectar linfocitos B, decidimos reproducir el modelo de infección y utilizar a las células AGS como punto de referencia. Para inducir el fenotipo colibrí, se infectaron 1×10^5 células a una MOI de 100 por 24 horas y se procesaron las muestras para ser valoradas al microscopio de campo claro y al microscopio confocal de manera independiente. Como se puede observar en la figura 9A y 9B, las células AGS (teñidas con safranina) infectadas presentan una morfología elongada correspondiente al fenotipo mencionado, mientras que las células AGS no infectadas conservan su morfología poligonal normal. Por otro lado, se realizó una infección en células AGS las cuales se fijaron y se prepararon para una inmunotinción para detectar a CagA. En la figura 9C se observan a las células AGS sin infectar, las cuales conservan su morfología normal. En la figura 9D observamos algunas células AGS con fenotipo colibrí, así como la detección de la proteína CagA tanto en el interior como en el exterior de las células. Nosotros creemos que la señal extracelular de CagA se debe a la presencia de algunas bacterias que no pudieron ser eliminadas correctamente por los lavados realizados a la muestra previo a ser fijadas. Con estos resultados nosotros concluimos que la cepa 26695 de *H. pylori* puede inducir el fenotipo colibrí en la línea celular AGS, correspondiendo con lo reportado por la literatura, y por ende, puede ser utilizada en los experimentos posteriores.

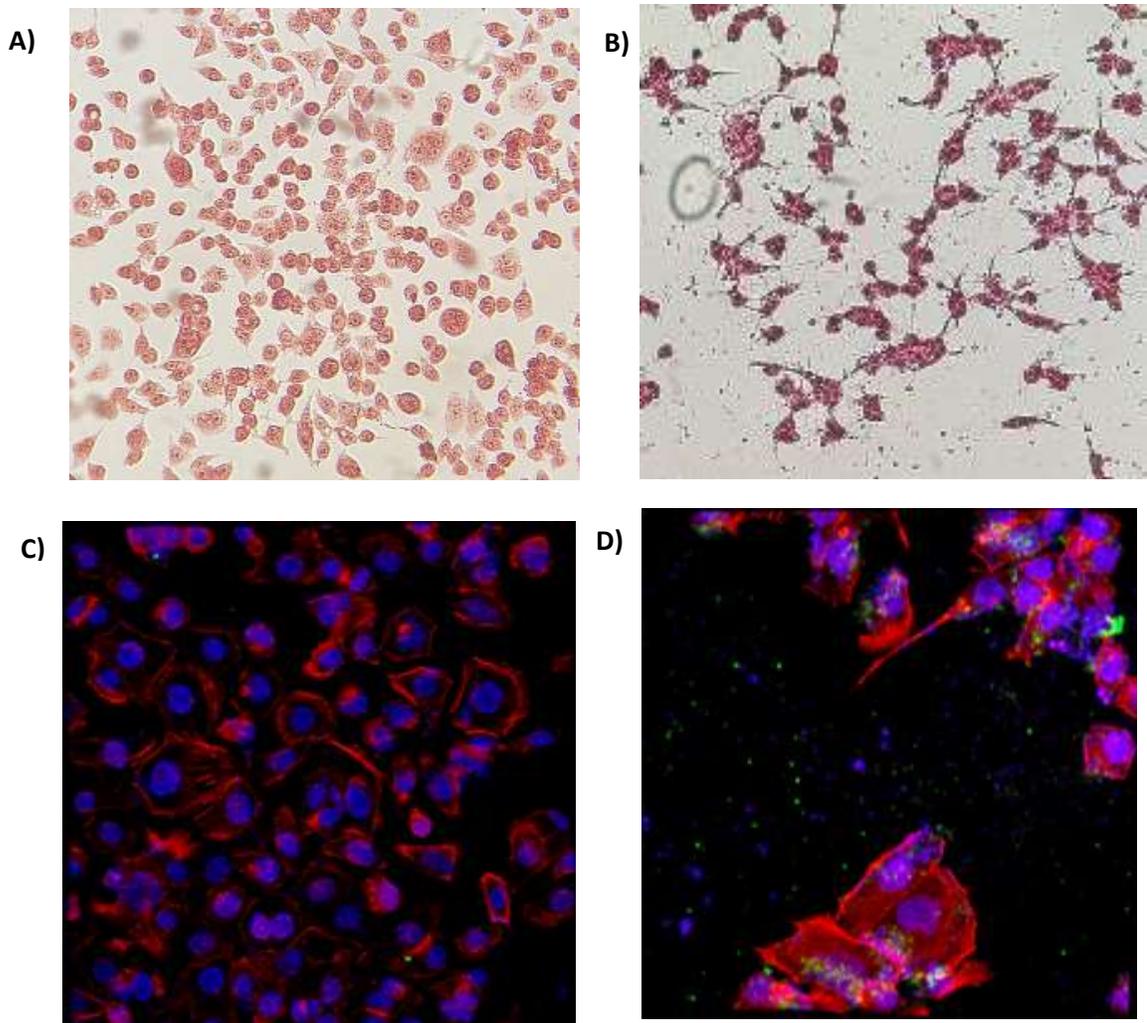


Figura 9. Inducción del fenotipo colibrí en células AGS. A y C) Células no infectadas, B y D) Células infectadas. Imágenes A y B obtenidas con microscopio de campo claro, 40x. Imágenes C y D obtenidas con microscopio confocal, 60x. Estructuras: citoesqueleto de actina (rojo), núcleo (azul) y CagA (verde). Las imágenes son representativas de dos experimentos que se realizaron de manera independiente para cada caso.

La detección de CagA por “Western blot” corresponde a la proteína translocada en las células

Debido a que era nuestro primer acercamiento con un modelo de infección en células B, quisimos asegurarnos de que el tratamiento dado a las muestras (basado en Vallejo-Flores, G. et al. 2015) era suficiente para erradicar a la bacteria adherida a las células y de esta manera cerciorarnos de que la señal de CagA que estaba siendo detectada por “Western Blot” correspondía a la proteína translocada a las células y no a las bacterias que pudieron haber quedado adheridas a ellas. Para ello, infectamos a las células por 1 hora a una MOI de 100 y las sometimos a diferentes tratamientos (Figura 10). Como se puede observar, la señal de CagA va disminuyendo cuando se tratan a las células con antibiótico y conforme se incrementa el número de lavados. Con esto corroboramos que, efectivamente, el tratamiento que le damos a la muestra es suficiente para erradicar a la bacteria adherida y que la señal que observamos de CagA al final del tratamiento completo corresponde a la proteína translocada.

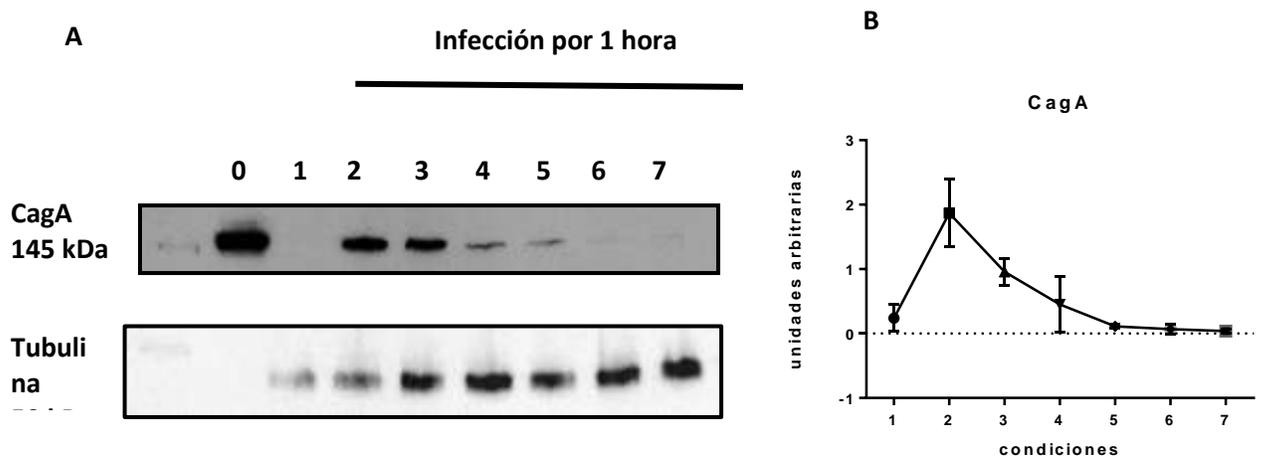


Figura 10. El tratamiento es suficiente para erradicar a la bacteria adherida a las células Raji. A) Western blot que muestra la expresión de CagA en las diferentes condiciones evaluadas. Carriles: 0: Bacteria, 1: mock, 2: sin gentamicina y sin lavar, 3: sin gentamicina y 1 lavado, 4: sin gentamicina y 2 lavados, 5: con gentamicina sin lavar, 6: con gentamicina y 1 lavado y 7: con gentamicina y 2 lavados. B) Densitometría de la infección. Resultados representativos de 2 experimentos realizados de manera independiente.

Las células Raji son permisivas a la infección por *H. pylori*

Nuestro principal objetivo era conocer si la línea celular Raji era permisiva a la infección por *H. pylori* así como determinar cuál era el tiempo necesario para ver la mayor translocación de CagA. Para abordar este cuestionamiento, se infectaron 1×10^6 células a una MOI de 100 por diferentes tiempos (1h, 3h, 6, y 8h). Dado que las células B son células en suspensión, las muestras (células + bacterias) se centrifugaron a 4500rpm por 10min para favorecer la interacción entre las mismas. En la figura 11 se puede observar que existe una tendencia a que cuanto mayor es el tiempo de exposición con la bacteria, mayor es la translocación de CagA en comparación con el mock, sin embargo no se puede observar una cinética clara como se reportan en algunas publicaciones realizadas en células AGS (Liang, et al, 2009) o incluso de células B MEC1 (Krisch, et al, 2016). Cabe mencionar que a las 8 horas es el tiempo donde encontramos la mayor variabilidad en nuestros resultados. Por cuestiones técnicas, la bacteria tenía que ser cultivada en las instalaciones del hospital Siglo XXI y las infecciones se iniciaban ahí. Debido a los tiempos prolongados de la infección y a que se necesitaban 2 horas extras para el tratamiento antibiótico, las muestras tenían que ser transportadas de regreso a CINVESTAV para concluir la infección y el tratamiento. Nosotros creemos que esta variabilidad que observamos en los resultados de las 8 horas, puede deberse a estos factores. Otra hipótesis es que quizás las condiciones a las que se encontraba la bacteria en determinado día no eran las adecuadas para realizar la infección y por eso se observan valores disminuidos de proteína CagA translocada, incluso desde la primera hora de infección. Independientemente de la variabilidad en los resultados, con estos ensayos concluimos que las células Raji son permisivas a la infección por *H. pylori*, y CagA es translocada.

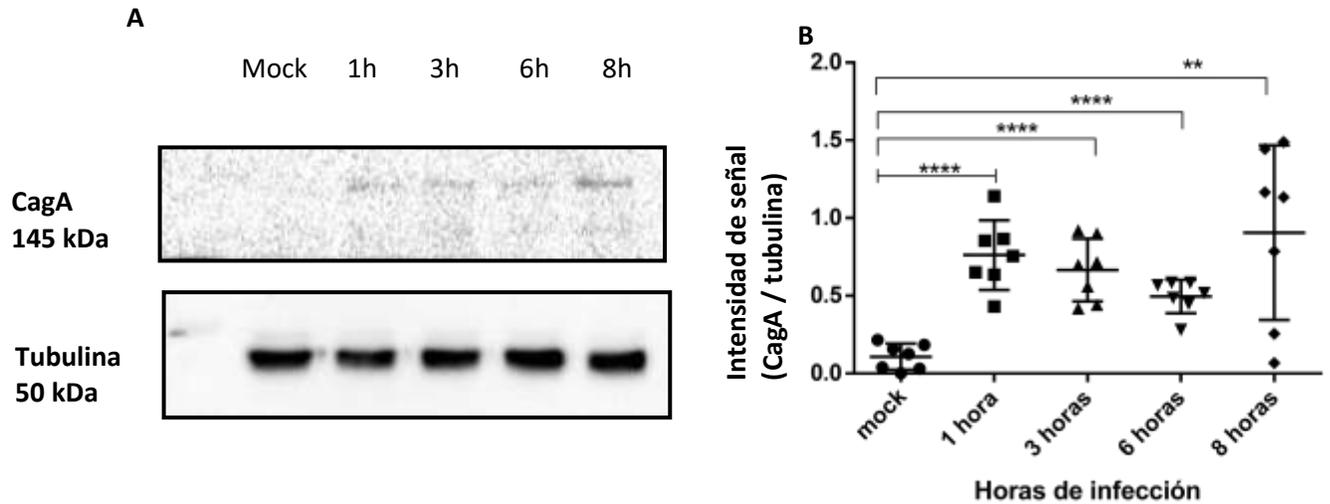


Figura 11. Las células Raji son permisivas a la infección por *H. pylori*. A) Imagen representativa de un *Western Blot* que muestra la presencia de CagA en los lisados de las células Raji a diferentes tiempos de infección. B) Densitometría de la infección de 7 ensayos independientes. t Student. **, $p=0.0029$; ****, $p<0.0001$; $n=7$

***H. pylori* 26695 se encuentra en la superficie de las células Raji y entra en contacto con ellas**

Finalmente nos interesaba ver cómo es que la bacteria interactuaba con las células, y si es que éstas presentaban algunos cambios morfológicos a consecuencia de la infección. Para evaluar esto, nosotros realizamos la infección sobre cubreobjetos estériles y para poder visualizar a la bacteria, ésta se incubó con carboxifluoresceína como se describió en la metodología. Después de 24 h de infección a una MOI de 1000, podemos observar que las bacterias tienden a agruparse y posicionarse alrededor de la célula, entrando en contacto con su superficie (Figura 12).

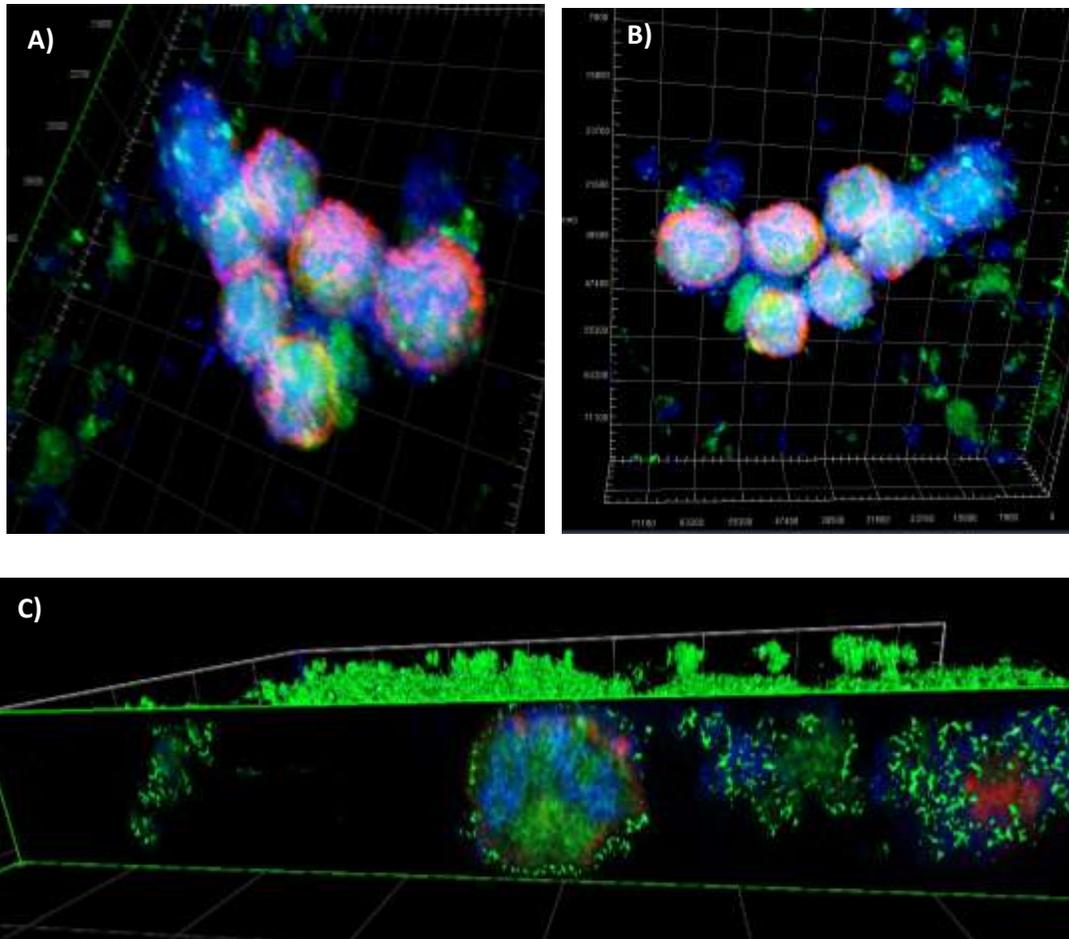


Figura 12. *Helicobacter pylori* entra en contacto con las células Raji. A-C) Inmunofluorescencias de células Raji infectadas por 24 horas a una moi de 1000 con *H. pylori*. A Y B) Imagen representativa de un campo analizado desde dos ángulos diferentes. C) Corte transversal de las células donde se aprecia que las bacterias se colocan alrededor de la superficie celular.
Estructuras: citoesqueleto de actina (rojo), núcleo (azul) y bacteria (verde).

DISCUSIÓN

Helicobacter pylori ha sido sujeto de estudio por el potencial oncogénico que representa. En los últimos años, se ha tratado de dilucidar el papel que tiene *H. pylori* y sobretodo, la proteína CagA en la linfomagénesis del tejido gástrico (Kuo, S.H. et al, 2019). En la clínica se ha observado que un porcentaje considerable (aprox. 50%) de los pacientes con maltoma gástrico expresan CagA en el tejido tumoral y que éstos responden más rápido al tratamiento erradicador que los pacientes CagA (-). Debido a esto, *H. pylori* y la toxina CagA han cobrado gran relevancia clínica y biológica en el contexto de los maltomas gástricos (Kuo, S.H. et al 2013).

A la fecha, se han logrado realizar diversos modelos que estudian el papel de CagA *in vitro* utilizando diversas líneas celulares derivadas de células B (Lin W.C., et al. 2010; Kirsch, Linda M, et al. 2016), así como infecciones realizados en células B primarias, como es el caso de la publicación de Bussiere y colaboradores (2019), quienes demuestran que la infección de esplenocitos murinos con una MOI baja de *H. pylori*, inhibe la apoptosis en comparación con células sin infectar. Por otro lado, infecciones realizadas en linfocitos B primarios humanos, demostraron que *H. pylori* puede activar la vía alternativa de NFkB de manera Cag-independiente (Ohmae, et al, 2005).

Nuestro modelo propuesto ha permitido generar las bases en el laboratorio para poder realizar futuros experimentos utilizando células B primarias y evaluar funciones como proliferación, adherencia y migración, mecanismos que reflejan la activación de los linfocitos B. Como se mencionó anteriormente, la línea celular Raji deriva de un linfoma de células B producido por el virus de Epstein-Barr. Este virus es un herpesvirus clasificado como carcinógeno de tipo 1 ya que se asocia a diferentes neoplasias como linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin y cáncer gástrico. Se sabe que el 90% de la población mundial presenta una infección crónica por EBV y ha logrado ser detectado en el 10% de los cánceres gástricos. Existen reportes en la literatura donde demuestran el papel sinérgico de *H. pylori* y EBV en un escenario de adenocarcinoma

gástrico (Wu, et al, 2016; Saju, et al 2016; Pandey, et al, 2018; Maccormick, et al, 2019), por lo que nuestro modelo de infección podría contribuir a dilucidar la participación de ambos microorganismos en el desarrollo del maltoma gástrico.

Por otro lado, es de reciente observación que la infección con cepas de origen ancestral distinto al del huésped se relaciona directamente con el desarrollo de cáncer gástrico, en comparación con pacientes infectados con cepas del mismo origen ancestral (Kodaman, et al, 2014; Montano, V. et al. 2015; Kodaman, et al, 2014). A pesar de existir evidencia clínica de este fenómeno, no se han realizado los suficientes estudios *in vitro* que diluciden el mecanismo por el cual la incompatibilidad de ancestría entre la bacteria y el humano, resultan en un escenario tan fatal como el cáncer (Sheh, A., et al. 2013).

Con toda esta información, sería importante e innovador validar las consecuencias funcionales que tendrían cepas de distinto origen ancestral sobre linfocitos B purificados de humanos con un origen ancestral determinado.

En el caso de nuestro modelo, la línea celular Raji se estableció a partir de un linfoma de Burkitt de un niño de 11 años de ancestría africana, mientras que la cepa 26695 de *H. pylori* que utilizamos es de origen europeo. De esta manera, “simulamos” una incompatibilidad de ancestrías lo cual podrá permitir una mejor caracterización de este modelo de infección.

CONCLUSIONES

Con base en nuestros resultados se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- Las condiciones utilizadas en este modelo favorecen la infección de las células Raji con la cepa de *Helicobacter pylori* 26695.
- *Helicobacter pylori* entra en contacto con la superficie de las células Raji y Caga es translocada.

PERSPECTIVAS

- Determinar el número de células Raji infectadas por citometría de flujo.
- Reproducir el modelo de infección en células B primarias humanas con *Helicobacter pylori* CagA (+).
- Evaluar el efecto que tiene la translocación de CagA en células B primarias no estimuladas (ej. porcentaje de viabilidad).
- Realizar ensayos de supervivencia, adherencia y motilidad por sustrato en células B primarias posterior a la infección por *Helicobacter pylori* CagA (+) y compararlos con células infectadas por una cepa deficiente de CagA.

BIBLIOGRAFÍA

Backert Steffen and Selbach Matthias. (2008). Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cellular Microbiology*. 10(8), 1573-1581. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01156.x

Bin Su, Peter J.M. Cepoins and Philip M. Sherman. (2003). Cytoskeletal rearrangements in gastric epithelial cells in response to *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Medical Microbiology*. 52: 861-867. doi 10.1099/jmm.0.05229-0.

- Bussiere, F.I., Chaturvedi, R., Asim, M., Hoek, K.L., Cheng, Y., Gainor, J., Scholz, A., Khan, W.N., and Wilson, K.T. (2006). Low multiplicity of infection of *Helicobacter pylori* suppresses apoptosis in B lymphocytes. *Cancer Res.* 66:13. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4197.
- Campo, E., Swerdlow, S.H., Harris, N.L., Pileri, S., Stein, H. and Jaffe, E.S. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood.* 117(19):5019-5032. doi: 10.1182/blood-2011-01-293050.
- Carmorlinga-Ponce, M., Romo, C., González-Valencia, G., Muñoz, O., Torres, J. (2004). Topographical localisation of cagA positive and cagA negative *Helicobacter pylori* strains in the gastric mucosa; an in situ hybridisation study. *J Clin Pathol.* 57:822–828. doi: 10.1136/jcp.2004.017087.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R. and Covacci, A. (1996). Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci.* 93: 14648-14653.
- Chauhan, N., Yen-Tay, A.C., Marshall, B.J., and Jain, U. (2019). *Helicobacter pylori* VacA, a distinct toxin exerts diverse functionalities in numerous cells: An overview. *Helicobacter.* 24(1): e12544. doi: 10.1111/hel.12544.
- Chmiela, M., Karwowska, Z., Gonciarz, W., Allushi, B. and Pawel, S. (2017). Host pathogen interactions in *Helicobacter pylori* related gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 23(9): 1521-1540. doi: 10.3748/wjg.v23.i9.1521.
- Cortes, M.C., Yamakawa, A., Casingal, C.R., Fajardo, L.S., Juan, M.L., De Guzman, B.B., Bondoc, E.M. (2010). Diversity of the cagA gene of *Helicobacter pylori* strains from patients with gastroduodenal diseases in the Philippines. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 60: 90-97. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00722.x

Diaconu S., Predescu, A., Moldoveanu, A., Pop, C.S., Fierbinteanu-Braticevici, C. (2017). *Helicobacter pylori* infection: old and new. *Journal of Medicine and Life*. 10(2): 112-117.

Fischer Wolfgang. (2011). Assembly and molecular mode of action of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion apparatus. *The FEBS Journal*. 278: 1203-1212. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08036.x

Guevara-T., A.A., Criollo-R., A., Suarez-O., J.J., Bohórquez-L., M.E., & Echeverry de Polanco, M.M. (2016). A Systematic Review of Genetic Coevolution of *Homo Sapiens* and *Helicobacter Pylori*: Implications for Development of Gastric Cancer. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 31(4):376-390.

Goodwin, C.S. and Armstrong, J.A. (1990). Microbiological Aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis*. 9(1): 1-13.

Higashi, H., Tsutsumi, R., Fujita, A., Yamazaki, S., Asaka, M., Azuma, T. and Masanori, H. (2002). Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci*. 14428-14433. doi: 10.1073/pnas.222375399

International Agency for Research on Cancer. World Health Organization.

Jia Wu, Song Xu and Yongliang Zhu. (2013). *Helicobacter pylori* CagA: A Critical Destroyer of the Gastric Epithelial Barrier. *Dig Dis and Sci*. 58(7): 1830-1837. doi: 10.1007/s10620-013-2589-x

Kahl, Brad and Yang, David. (2008). Marginal Zone Lymphomas: Management of Nodal, Splenic, and MALT NHL. *Hematology*. 2008(1): 359-364. doi: 10.1182/asheducation-2008.1.359.

- Kaplan-Türköz, B., Jiménez-Soto, L.F., Dian, C., Ertl, C., Remaut, H., Louche, A., Tosi, T., Haas, R. and Terradot, L. (2012). Structural insights into *Helicobacter pylori* oncoprotein CagA interaction with B1 integrin. *PNAS*. 109 (36): 14640-14645. doi: 10.1073/pnas.1206098109
- Kenneth E.L. McColl. (2010). *Helicobacter pylori* Infection. *N Engl J Med*. 362(17): 1597-1604.
- Kim, I.J., Lee, J., Oh, S.J., Yoon, M.S., Jang, S.S., Holland, R.L., Reno, M.L., Hamad, M.N., Maeda, T., Chung, H.J., Chen, J. and Blanke, S.R. (2018). *Helicobacter pylori* Infection Modulates Host Cell Metabolism through VacA-Dependent Inhibition of mTORC1. *Cell Host & Microbe*. 23: 583-593. doi: 10.1016/j.chom.2018.04.006
- Kirsch, L.M., Posselt, G., Hammerl, P. and Wessler, S. (2016). CagA Phosphorylation in *Helicobacter pylori*-Infected B Cells is mediated by the Nonreceptor Tyrosine Kinases of the Src and Abl Families. *Infection and Immunity*. 84(9): 2671-2680. doi:10.1128/IAI.00349-16.
- Kodaman N., Pazos A., Schneider B.G., Piazzuelo M.B., Mera R., Sobota R.S., Sicinschi L.A., Shaffer C.L., Romero-Gallo J., de Sablet T., Harder R.H., Bravo L.E., Peek R.M. Jr, Wilson K.T., Cover T.L., Williams S.M., Correa P. (2014). Human and *Helicobacter pylori* coevolution shapes the risk of gastric disease. *Proc Natl Acad Sci*. 28; 111(4):1455-60. doi: 10.1073/pnas.1318093111.
- Kodaman, N., Sobota, R.S., Mera, R., Schneider, B.G., and Williams, S.M. (2014). Disrupted human-pathogen co-evolution: a model for disease. *Frontiers in genetics*. 5:290. Doi: 10.3389/fgene.2014.00290
- Kuo, S.H., Chen, L.T., Lin, Wu, M.S., Hsu, P.N., Tsai, H.J., Chu, C.Y., Tzeng, Y.S., Wang, H.P., Yeh, K.H. and Cheng, A.L. (2013). Detection of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric mucosa-associated lymphoid

tissue lymphoma cells: clinical and biological significance. *Blood Cancer Journal*. 3, e125. Doi: 10.1038/bcj.2013.22

Kuo, S.H., Wu, M.S., Yeh, K.H., Lin, C.W., Hsu, P.N., Chen, L.T. and Cheng, A.L. (2019). Novel insights of lymphomagenesis of *Helicobacter pylori*-dependent gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Cancers*. 11:547. Doi: 10.3390/cancers11040547.

Lin, W.C., Tsai, H.F., Kuo, S.H., Wu, M.S., Lin, C.W., Hsu, P.I., Cheng, A.L. and Hsu, P.N. (2010). Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Human B lymphocytes, the Origin of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Cancer Res*. 70(14): 5740-5748. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4690

Maccormick, T.M., Souza-Carvalho, C.E., Bravo-Neto, G.P., RJ, TCBC., and Da Costa-Carvalho, M.G. (2019). Comparative analysis of glutathione transferase genetic polymorphism, *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus between the tumor area and the proximal and distal resection margins of gastric cancer. *Rev. Col. Bras. Cir.* 46:1. DOI: 10.1590/0100-6991E-20192068

Masanori Hatakeyama. (2004). Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nature Reviews*. 4: 688-694. doi:10.1038/nrc1433

Masanori Hatakeyama. (2008). SagA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 11(1):30-7. doi: 10.1016/j.mib.2007.12.003

Masanori Hatakeyama. (2011). Anthropological and clinical implications for the structural diversity of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. *Cancer Science*. 102(1): 36-43. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01743.x

Masanori Hatakeyama. (2017). Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer.

Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci. 93 (4): 196-219. doi: 10.2183/pjab.93.013

Matsuo, Y., Kido, Y., and Yamaoka, Y. (2017). *Helicobacter pylori* Outer Membrane Protein-Related Pathogenesis. *Toxins*. 9 (191): 1-9. doi:10.3390/toxins9030101

Merino, E., Flores-Encarnación, M. and Aguilar-Gutiérrez, G.R. (2017). Functional interaction and structural characteristics of unique components of *Helicobacter pylori* T4SS. *The FEBS Journal*. 284: 3540-3549. doi:10.1111/febs.14092

Molina-Castro, S., Ramírez-Mayorga, V. and Alpizar-Alpizar, W. (2018). Priming the seed: *Helicobacter pylori* alters epithelial cell invasiveness in early gastric carcinogenesis. *World J Gastrointest Oncol*. 10(9): 231-243. doi: 10.4251/wjgo.v10.i9.231

Montano, V., Didelot, X., Foll, M., Linz, B., Reinhardt, R., Suerbaum, S., Moodley, Y. and Jensen, J.D. (2015). Worldwide Population Structure, Long-Term Demography, and Local Adaptation of *Helicobacter pylori*. *Genetics*. 200: 947-963. doi:10.1534/genetics.115.176404/-/DC1

Naoko Murata-Kamiya. (2011). Pathophysiological functions of the CagA oncoprotein during infection by *Helicobacter pylori*. *Microbes and Infection*. 13: 799-807. doi:10.1016/j.micinf.2011.03.011

Ohmae, T., Hirata, Y., Maeda, S., Shibata, W., Yanai, A., Ogura, K., Yoshida, H., Kawabe, T., and Omata, M. (2005). *Helicobacter pylori* Activates NF- κ B via the alternative pathway in B lymphocytes. *The Journal of Immunology*. 175: 7162-7169.

Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., Higashi, H., Musashi, M., Iwabuchi, K., Suzuki, M., Yamamada, G., Azuma, T. and Masanori, H. (2008). Transgenic expression of *Helicobacter pylori*

- CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *PNAS*. 105(3): 1003-1008. doi: 10.1073/pnas.0711183105
- Pandey, S., Jha, H.C., Shukla, S.K., Shirley, M.K. and Robertson, E.S. (2018). Epigenetic Regulation of Tumor Suppressors by *Helicobacter pylori* enhances EBV-induced proliferation of gastric epithelial cells. *Mbio*. 9(2). e00649-18. doi: 10.1128/mBio.00649-18.
- Saju, P., Murata-Kamiya, N., Hayashi, T., Senda, Y., Nagase, L., Noda, S., Matsusaka, K., Funata, S., Kunita, A., Urabe, M., Seto, Y., Fukayama, M., Kaneda, A., and Masanori, H. (2019). Host SHP1 phosphatase antagonizes *Helicobacter pylori* CagA and can be downregulated by Epstein-Barr virus. *Nature Microbiology*. 1:16026. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.26.
- Shamshul Ansari and Yoshio Yamaoka. (2017). *Helicobacter pylori* BabA in adaptation for gastric colonization. *World J Gastroenterol*. 23(23): 4158-4169. doi: 10.3748/wjg.v23.i23.4158
- Sheh A., Chaturvedi, R., Merrell, D.S., Correa, P., Wilson, K.T., and Fox J.G. (2013). Phylogeographic Origin of *Helicobacter pylori* determines Host-Adaptive responses upon coculture with gastric epithelial cells. *Infection and Immunity*. 81: 2468-2477.
- Suerbaum, S. and Josenhans, C. (2007). *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nature Reviews Microbiology*. 5: 441-452. doi:10.1038/nrmicro1658
- Suzuki, A. and Ohno, S. (2006) The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J. Cell Sci*. 119, 979–987.
- Talebi, B.A.A. (2017). Strategies used by *Helicobacter pylori* to establish persistent infection. *World J Gastroenterol*. 23(16): 2870-2882. doi: 10.3748/wjg.v23.i16.2870

- Tegtmeyer, N., Wessler, S. and Backert, S. (2011). Role of the cag-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *The FEBS Journal*. 278: 1190-1202. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08035.x
- Tsutsumi, R., Takahashi, A., Azuma, T., Higashi, H. and Masanori, H. (2006). Focal Adhesion Kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 Complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol Cell Biol*. 26(1): 261-276. doi: 10.1128/MCB.26.1.261-276.2006
- Umehara, S., Higashi, H., Ohnishi, N., Asaka, M. and Masanori, H. (2003). Effects of *Helicobacter pylori* CagA protein on the growth and survival of B lymphocytes, the origin of MALT lymphoma. *Oncogene*. 22: 8337-8342. doi: 10.1038/sj.onc.1207028
- Vallejo-Flores, G., Torres, J., Sandoval-Montes, C., Arévalo-Romero, H., Meza, I., Carmorlinga-Ponce, M., Torres-Morales, J., Chávez-Rueda, A.K., Legorreta-Haquet, M.V., and Fuentes-Pananá, E.M. (2015). *Helicobacter pylori* CagA suppresses apoptosis through activation of AKT in a nontransformed epithelial cell model of glandular acini formation. *BioMed Res Int*. 2015:761501. doi: 10.1155/2015/761501.
- Vaziri, F., Tarashi, S., Fateh, A. and Siadat, S.D. (2018). New insights of *Helicobacter pylori* host-pathogen interactions: The triangle of virulence factors, epigenetic modifications and non-coding RNAs. *World J Clin Cases*. 6(5): 64-73. doi: 10.12998/wjcc.v6.i5.64
- Vogiatzi, P., Cassone, M., Luzzi I., Lucchetti, C., Otvos, L. and Giordano, A. (2007). *Helicobacter pylori* as a Class I Carcinogen: Physiopathology and Management Strategies. *Journal of Cellular Biochemistry*. 102: 264-273. doi: 10.1002/jcb.21375

- Wirth, H.P., Beins, M.H., Yang, M., Tham, K.T. and Blaser, M.J. (1998). Experimental Infection of Mongolian Gerbils with Wild-type and Mutant *Helicobacter pylori* Strains. *Infection and Immunity*. 66(10): 4856-4866.
- Wu, W. K.K., Yu, J., Chan, M.T.V., To, K.F. and Cheng, A.S.L. (2016). Combinatorial epigenetic deregulation by *helicobacter pylori* and Epstein- Barr virus infections in gastric tumourigenesis. *Journal of pathology*. 239: 245-249. Doi: 10.1002/path.4731
- Yong, X., Tang, B., Li, B.S., Xie, R., Hu, C.J., Luo, G., Qin, Y., Dong, H. and Yang, S.M. (2015). *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes tumorigenesis of gastric cancer via multiple signaling pathways. *Cell Communication and Signaling*. 13(30): 1-13. doi: 10.1186/s12964-015-0111-0.
- Zhang, X.S., Tegtmeyer, N., Traube, L., Jindal, S., Perez-Perez, G., Sticht, H., Backert, S. and Blaser, M.J. (2015) A specific A/T polymorphism in Western tyrosine phosphorylation B-motifs regulates *Helicobacter pylori* CagA epithelial cell interactions. *PLoS Pathog*. 11, e1004621.
- Zucca, E. and Francesco, B. (2016). The spectrum of MALT lymphoma at different sites: biological and therapeutic relevance. *Blood*. 127(17): 2082- 2092. doi: 10.1182/blood-2015-12-624304
- Zucca, E., Bertoni, F., Vannata, B. and Cavalli, F. (2014). Emerging role of infectious etiologies in the pathogenesis of marginal zone B-cell lymphomas. *Clin Cancer Res*. 20(20); 5207–16. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0496.
- Zullo, A., Hassan, C., Ridola, L., Repici, A., Manta, R., & Andriani, A. (2014). Gastric MALT lymphoma: old and new insights. *Annals of gastroenterology*, 27(1), 27–33.