



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Determinación de persistencia de una cepa de *Helicobacter pylori vapD* positiva dentro de las células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS).

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Luis Roberto Serrano García

TUTOR PRINCIPAL

Dra. María del Rosario Morales Espinosa
[Facultad de Medicina](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Yolanda López Vidal [Facultad de Medicina UNAM](#)
Dr. José Luis Puente García [Instituto de Biotecnología UNAM](#)

Ciudad de México. Noviembre, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PMDCB/1546/2017

Serrano García Luis Roberto
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 14 de agosto del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Determinación de persistencia de una cepa de Helicobacter pylori vapD positiva dentro de las células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS)**", dirigida por el/la Dr(a). **Morales Espinosa María del Rosario**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Martínez Romero María Esperanza
VOCAL	Hernández Lucas Ismael
VOCAL	Encarnación Guevara Sergio Manuel
VOCAL	Cevallos Gaos Miguel Ángel
SECRETARIO	Landa Piedra Abraham

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarte un cordial saludo.

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 14 de agosto de 2017.
COORDINADORA


Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁVAREZ

Índice general

Contenido	Página
Índice general	3
Índice de tablas	4
Índice de figuras	5
Abreviaturas	6
Resumen	7
1. Antecedentes	8
1.1 <i>Helicobacter pylori</i> características generales	8
1.2 Transmisión y epidemiología	9
1.3 Patologías causadas por <i>H. pylori</i>	11
1.4 Mecanismo de virulencia	12
1.5 Relación del gen <i>vapD</i> con la persistencia en patógenos invasivos facultativos	15
1.6 Tratamiento para la erradicación de la infección por <i>H. pylori</i> y las fallas en el tratamiento	18
2. Justificación	19
3. Hipótesis	20
4. Objetivos	21
4.1 Objetivos particulares	21
5. Material y métodos	22
5.1 Diagrama de flujo general	22
5.2 Estandarización de cultivo de células AGS	23
5.2.1 Cultivo de células AGS	23
5.2.2 Propagación	23
5.2.3 Almacenamiento	23
5.3 Determinación de persistencia de <i>H. pylori vapD</i> positivo	24
5.3.1 Cultivo de <i>H. pylori</i>	24
5.3.2 Estandarización del inóculo	24
5.3.3 Cocultivo	24
5.3.4 Obtención de la población de <i>H. pylori</i> intracelular	25
5.3.5 Recuperación de <i>H. pylori</i> intracelular	25
5.3.6 Inmunofluorescencia	26
5.3.7 Western blot	26
5.3.8 Cuantificación de la transcripción del gen <i>vapD</i> mediante PCR tiempo real	27
6. Resultados	29
6.1 Determinación de la viabilidad de <i>H. pylori</i> en el medio intracelular por conteo de UFC en placa de agar sangre	29
6.2 Determinación de <i>H. pylori</i> intracelular por Western Blot	30
6.3 Determinación de <i>H. pylori</i> intracelular por Inmunofluorescencia	33
6.4 Determinación de la transcripción de <i>vapD</i> por PCR-Tiempo real	36
7. Discusión de resultados	38
8. Conclusión	44
9. Bibliografía	45

Índice de tablas

Tabla

Tabla 1. Unidades formadoras de colonias (UFC) a partir de los sobrenadantes y de células AGS durante los diferentes tiempos del ensayo de persistencia.

Página

30

Índice de figuras

Figura	Página
Figura 1. Evolución de la infección causada por <i>H. pylori</i> .	12
Figura 2. Diagrama general de la metodología empleada	22
Figura 3. Electroforesis de proteínas totales (10µg) de los sobrenadantes y de las células AGS infectadas con <i>H. pylori</i> en un gel de acrilamida al 10%	31
Figura 4. Detección de una proteína de choque térmico de <i>H. pylori</i> por Western Blot en sobrenadantes y paquetes celulares procedente del co-cultivo células AGS- <i>H.pylori</i> .	32
Figura 5. Western blot de la proteína específica de <i>H. pylori</i> .	33
Figura 6. Inmunofluorescencia de células AGS infectadas con <i>H. pylori</i> 24 horas después del tratamiento con gentamicina	34
Figura 7. Inmunofluorescencia de células AGS infectadas con <i>H. pylori</i>	35
Figura 8. Células AGS infectadas con <i>H. pylori</i> y la detección de vacuolas	36
Figura 9. Cuantificación relativa del gen <i>vapD</i>	37

Abreviaturas

°C	Grados Celsius
pb	Pares de bases
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosa gástrica
HCl	Ácido clorhídrico
ORF	Marco de lectura abierto
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
NTHi	<i>Haemophilus influenzae</i> no tipificable
H ⁺	Protones
AGS	Células de adenocarcinomas gástrico humano
SFB	Suero Fetal bovino
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
Wt	Muestra sin tartar con gentamicina
BHI	Medio infusión cerebro corazón
PBS	Solución salina amortiguada por fosfatos
UFC	Unidades formadoras de colonias
h	Horas
rpm	Revoluciones por minuto
RIPA	Solución amortiguadora para el ensayo de radioinmunoprecipitación
mA	Mili Amperes
PVDF	Difloruro de Polivinildieno.
TBS	Buffer Cloruro de Sodio y Tris
P	Paquete celular
S	Sobrenadante
Mk/Mock	Muestra sin infectar con <i>Helicobacter pylori</i>
Hpi	Horas post tratamiento con Gentamicina
GAPDH	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
DAPI	4', 6-diamino-2-fenilindol

Resumen

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria Gram-negativa, microaerofílica y multiflagelada que coloniza el estómago de humanos. La presencia de este microorganismo está asociada con el desarrollo de gastritis crónica, úlcera duodenal o gástrica y contribuye de manera importante al desarrollo de adenocarcinoma gástrico o Tejido linfoide asociado a mucosa (MALT). Se han descrito diferentes factores de virulencia producidos por cepas de *H. pylori* como la producción de una citotoxina vacuolizante (VacA), la producción de la proteína CagA, la presencia de la isla de patogenicidad-*cag* (PAI-*cag*) y la expresión en su superficie de un tipo de antígeno de Lewis. Por otra parte se ha propuesto que el microorganismo es capaz de permanecer de manera intracelular en el tejido gástrico, lo cual puede contribuir a la permanencia crónica de la bacteria. A su vez se ha descrito la presencia del gen *vapD* (*virulence associated protein D* por sus siglas en inglés) en cepas de *H. pylori*. La homología que guarda este gen con el de otros microorganismos intracelulares facultativos como son: *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus somnus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Campylobacter spp* (patógenos de humanos), *Dichelobacter nodosus* y *Rhodococcus equi* (patógenos de animales) y *Riemerella anatipestifer*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Xylella fastidiosa* (patógenos de plantas) sugiere que *vapD* en *H. pylori* pudiera participar de manera importante en la sobrevivencia y adaptación del microorganismo dentro de la célula epitelial gástrica, facilitando su permanencia de manera crónica, protegiendo al microorganismo de la respuesta inmune y del acceso de los antimicrobianos, con esto favoreciendo la permanencia de la bacteria por años y contribuyendo a la carcinogénesis gástrica. En este contexto, en el presente estudio se evaluó la capacidad de *H. pylori* para permanecer viable dentro de células gástricas y se relacionó con la transcripción del gen *vapD* de manera intracelular durante 96 horas. Se encontró que el microorganismo es capaz de permanecer viable, presentando de manera predominante una morfología cocoide, la cual podría estar relacionada con el estado viable no cultivable (EVNC). El gen *vapD* se transcribió de manera constitutiva durante todo el ensayo. Este trabajo demostró que *vapD* de *H. pylori* se transcribe en el ambiente intracelular.

1. Antecedentes

1.1 *Helicobacter pylori* características generales

Este microorganismo perteneciente a las ϵ -*Proteobacterias* es un bacilo Gram-negativo que mide de 2.4 a 4 μm de longitud y 0.5 μm de ancho; posee de 3 a 5 flagelos polares (3). Respecto a pruebas bioquímicas es ureasa +, catalasa +, oxidasa +; requiere de condiciones de microaerobiosis para su desarrollo (5% de O_2). Es un microorganismo exigente respecto a los nutrientes; suele crecer de manera efectiva a concentraciones de 1-5% de suero fetal bovino, a mayores concentraciones suele inhibirse su desarrollo (8). Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, a temperaturas menores de 30°C no suele desarrollarse y necesita alrededor de 2 a 5 días para poder presentar colonias visibles. *H. pylori* suele tener morfologías en espiral (en S), curva e incluso puede estar en forma cocoide, esta última guarda relación con el estado viable pero no cultivable (EVNC) presente en otros microorganismos como *Vibrio cholerae* (9), dicho estado suele presentarse en condiciones de estrés como puede ser la hiperosmolaridad o la falta de nutrientes (1). Marshall y Warren aislaron por primera vez a *H. pylori* en 1982 (10). En un inicio se le denominó como *Campylobacter pylori* por la característica de desarrollarse en condiciones de microaerofilia, pero en el año de 1989 se incluyó al género *Helicobacter* (3). Una característica importante de este microorganismo es que suele ser transformante natural (11, 36). La competencia natural de *H. pylori* está mediada por un proceso de 2 pasos: acarreamiento de DNA de doble cadena para que cruce la membrana externa, seguido por el transporte del DNA de cadena sencilla vía ComB la cual es una proteína tipo sistema de secreción tipo IV (11). Se ha observado que *H. pylori* es capaz de introducir DNA después de estar en contacto por 1 minuto con el material genético (36). La tasa de transformación es más eficiente con fragmentos de DNA pequeños (entre 259-732 pb) y la tasa de recombinación es más alta con fragmentos provenientes de otras cepas de *H. pylori*, sin embargo, puede existir recombinación con secuencias de otras especies de *Helicobacter* (36). Otros factores como una baja concentración de CO_2 y una alta de O_2 mejoran las tasas de transformación en el microorganismo (11), esto se puede deber a que algún factor ambiental que afecte la viabilidad de *H. pylori* activa el mecanismo de transformación y

recombinación para que el microorganismo pueda encontrar la forma de adaptarse a esta condición estresante.

1.2 Transmisión y epidemiología

Muy poco se sabe acerca de la diseminación de este microorganismo, algunos trabajos sugieren que el agua puede ser un reservorio para el microorganismo. Material genético perteneciente a *H. pylori* ha podido ser detectado a partir de PCR en lagos, ríos, grifo del agua, agua de irrigación, agua marina, pozos, sistemas de distribución de agua, agua bebible y aguas recreacionales (1). Otra hipótesis está relacionada con la zoonosis, ya que algunas cepas de *H. pylori* se han aislado de animales como: primates, perros, gatos, borregos, ovejas e incluso de las moscas (3), sin embargo, estos datos han resultado inconsistentes, ya que solo se han podido reproducir en condiciones de laboratorio o los aislamientos no son reproducibles en estos animales. En animales de compañía como perros y gatos suele presentarse la especie *H. helmanni* (3) la cual suele causar gastritis en este tipo de animales, pero se ha encontrado con baja frecuencia en humanos.

Otra forma de diseminación que se ha propuesto es de persona a persona ya sea vía fecal-oral u oral-oral (38). A partir de estudios de PCR se han logrado detectar genes de *Helicobacter pylori* tanto en saliva, placa dental y en heces de humanos, aunque existen muy pocos trabajos en los que se reporten aislamientos del microorganismo a partir de cultivo, ya que en ambos casos al existir microbiota acompañante se inhibe el desarrollo de *H. pylori* (4). En el trabajo de Morales-Espinosa et al. 2009 (37) se encontró una correlación entre la presencia de DNA de *H. pylori* en la placa dental con diversas patologías gástricas, adicionalmente observaron que no hubo diferencia significativa entre la detección del microorganismo por medio de la placa dental y a partir de biopsia. Por otra parte, no hubo correlación entre la presencia de DNA de *H. pylori* en la saliva con alguna patología gástrica (37). En otros trabajos se ha mostrado que en la saliva este microorganismo suele presentarse solo de forma transitoria ya sea por eventos de regurgitación, vómito o reflujo estomacal y se ha propuesto que *H. pylori* no es capaz de colonizar la cavidad bucal, ya que existen muy pocos reportes en los que se haya logrado

aislar al microorganismo de placa dental (3). Esta variabilidad en la frecuencia de identificación de *H. pylori* en la cavidad oral se puede deber: a la región geográfica, al uso de diferentes procedimientos de muestreo o métodos de detección, estatus de salud oral en pacientes, diferencias en el estatus de infección de *H. pylori* y el tipo y número de muestras clínicas usadas (34).

Un factor que presenta una elevada correlación con la infección por este microorganismo es el hacinamiento, un estudio realizado en una institución mental en Austria (12) mostró que la población en general (pacientes y trabajadores) tuvieron una elevada seroprevalencia del microorganismo, incluso algunos de ellos en el momento de su ingreso no presentaban anticuerpos contra esta bacteria, pero tras un segundo muestreo resultaron positivos, mostrando fuerte correlación con la diseminación de persona a persona.

Otro mecanismo de transmisión que se ha propuesto es el iatrogénico (3), si no realiza de manera adecuada la sanitización de los equipos con los que se realizan las endoscopias hay un elevado riesgo de transmitir la bacteria de una persona a otra. Incluso los mismos endoscopistas pueden presentar riesgo de infección si no cuentan con el equipo adecuado como: guantes y desinfectantes eficaces y funcionales.

H. pylori está ampliamente diseminado en todo el mundo existen diversos estudios y revisiones (1, 3, 4, 5, 7, 8) en los que se menciona que más del 50% de la población presenta en algún momento de su vida la infección por esta bacteria y son los países en vías de desarrollo los que presentan mayor incidencia (1, 3, 7). Se ha observado que si se adquiere a la bacteria en etapas tempranas de la vida existe un elevado riesgo de presentar cáncer gástrico. En el año de 1994 la *International Agency for Research on Cancer Working Group* catalogó a esta bacteria como agente carcinogénico tipo 1 (tienen la misma denominación la radiación y el asbesto). (3). En el año 2013 el cáncer gástrico representó el 5.5% de todos los tipos de cánceres (8), Respecto a nuestro país, se han llevado a cabo diversos estudios en el que se ha detectado una alta prevalencia del microorganismo en personas desde etapas muy tempranas de su vida (13), otro factor importante es que las personas mayores a 60 años llegan a presentar hasta 80% de seroprevalencia, algo que no

sucede en países como Suecia o EUA (7). En el estudio realizado por Morales et al. 2008 (15) se analizaron diversas muestras de pacientes mexicanos con diversas patologías gástricas y pudieron observar que más del 70% de la población de estudio presentaban más de dos cepas con perfiles genéticos diferentes, lo cual indica una multicolonización por parte de diferentes cepas de *Helicobacter pylori*.

1.3 Patologías causadas por *Helicobacter pylori*

Se ha observado que *H. pylori* coloniza tanto el cuerpo como el antro del estómago (prefiriendo el segundo), no se ha detectado que el microorganismo colonice ni el yeyuno ni el intestino grueso (34). Para que ocurra la infección se requiere en primer lugar la colonización del microorganismo, es por ello que requiere de diversas adhesinas y factores de colonización (8). Una vez ocurrido esto, hay una etapa proliferativa en la que el microorganismo se replica y genera una inflamación (6). La forma en que progresará la infección dependerá de factores relacionados con la patogenicidad de la cepa (4), la modulación y regulación del sistema inmune del hospedero debido a la generación de interleucinas pro-inflamatorias (6). Para que estos factores generen algún efecto fisiológico en el hospedero se requiere que el microorganismo esté presente desde años hasta décadas. También dependerá de la zona del estómago en la que se está llevando a cabo la infección, por ejemplo, si existe una alta producción de HCl la infección se puede llevar a cabo predominantemente en el antro del estómago y si el sistema inmune mantiene su respuesta inflamatoria puede derivar en úlcera duodenal (4, 6, 8). En cambio, si hay una disminución en la producción de HCl se puede generar una gastritis predominante del cuerpo del estómago la cual puede derivar en úlcera gástrica. Debido a la región en la que se lleva a cabo esta infección se puede afectar la respuesta glandular gástrica, lo cual ocasiona atrofia gástrica, si continúan estas afectaciones por varios años se puede desencadenar metaplasia, displasia y hasta cáncer gástrico. La infección puede diseminarse por todo el estómago pudiendo ocasionar una pangastritis la cual puede derivar en linfoma MALT. (8). En muchas ocasiones puede ocurrir que haya una disminución en la respuesta inflamatoria llevando a un restablecimiento en la producción de HCl, volviendo al hospedero asintomático, a esta condición se le conoce como gastritis crónica superficial difusa (6).

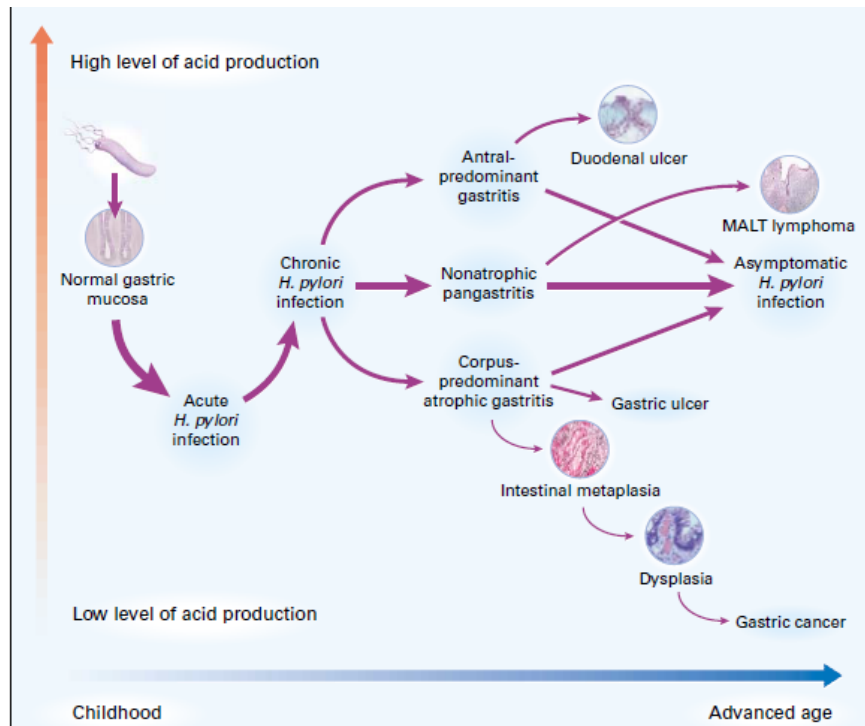


Figura 1. Modificado de (4) Suerbaum, S., Michetti, P. 2002. *Helicobacter pylori* infection. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 347, pp. 1175-1186. Evolución de la infección causada por *H. pylori*.

1.4 Mecanismo de virulencia

Para llevar a cabo la colonización primeramente el microorganismo debe ser capaz de soportar las condiciones ácidas del estómago, el cual suele tener un pH alrededor de 2 (4), ya que se estima que la bacteria solamente puede sobrevivir 30 minutos en el lumen gástrico (34), por tanto, requiere de la enzima ureasa que tras degradar la urea genera un microambiente neutro que le permite mantenerse viable (19). Para poder desplazarse a través del lumen estomacal emplea sus flagelos, los cuales también usa para poder atravesar la capa de moco, además de esto aprovecha su morfología (en S) que funciona como un tornillo para llegar al epitelio gástrico (4, 5, 6, 8). La movilidad y la quimiotaxis

son la clave para la colonización (38), ya que se ha observado que mutaciones en el flagelo o en el sistema de quimiotaxis causan un aumento de 100 y 10 000 veces en la dosis infectiva respectivamente (34). En la capa de moco el grado de difusión de compuestos es bajo, ocasionando que sea más fácil neutralizar el HCl y así mantener el pH neutro por periodos de tiempo más largos. En el epitelio gástrico existen numerosas invaginaciones de 200-500 μm de profundidad, donde las condiciones ácidas son mucho menores respecto al lumen gástrico, dichas regiones pueden ser usadas por *H. pylori* para colonizar (34). Una vez que la bacteria llega a esta región puede llevar a cabo la colonización gracias a diferentes adhesinas, entre ellas las más estudiadas son: BabA y SabA, las cuales reconocen ácido siálico (2, 8), ó AlpA y AlpB que reconocen laminina (8).

Existe una proteína que secreta este microorganismo denominada VacA (88 kDa) (4), que está formada por un precursor de 140 kDa que sufre hidrólisis en las regiones amino y carboxilo terminal durante el proceso de secreción (34). Esta proteína es un auto transportador del tipo V y consiste en una toxina tipo A-B que contiene un péptido señal, una región central que tiene la función de toxina y un dominio C-terminal que se requiere para el transporte de la toxina dentro de la célula hospedera (región A de 33 kDa), adicionalmente la región B de 55 kDa se encarga de unir a las células epiteliales (34). VacA se polimeriza formando una estructura tipo poro la cual se une a los receptores tipo tirosin-fosfatasa, o a la subunidad $\beta 2/\text{CD}18$ para poder ingresar (8), una vez que es endocitada forma canales selectivos de aniones en las membranas vacuolares permitiendo la acumulación de Cl^- generando protuberancias en las células (8). La proteína VacA también suele insertarse en la membrana mitocondrial llevando a la apoptosis (2). Se ha observado que el gen que codifica esta proteína (*vacA*) está presente en todas los *Helicobacter pylori*, pero no todas las cepas son capaces de producir una proteína funcional debido a ciertos polimorfismos en ciertas regiones del gen, las cuales se denominan s, m e i; que corresponden a la región secuencia señal (alelos tipo s1a, s1b, s1c s1d o s2) (32, 67), a la región media de *vacA* (alelos m1 y m2) y a una zona intermedia (alelos i1 e i2) respectivamente (34). Cepas con los alelos s1/m1/i1 están asociadas con una mayor actividad vacuolizante y a un mayor riesgo de provocar cáncer que las cepas con los alelos s2/m2/i2 (38, 39, 40). Se ha observado que *vacA* contribuye con la colonización y que la

expresión de la forma no funcional de la proteína (s2/i2) da una ventaja en la colonización respecto a cepas s1/i2 y s1/i1 (40).

La respuesta inflamatoria se presenta gracias a una proteína denominada CagA (120 kDa) (4, 8, 14), la cual está presente en una isla de patogenicidad de 40 kb denominada *cag*-PAI (16). Diversos estudios han mostrado que del 50-70% de las cepas aisladas de *H. pylori* contienen esta isla (34) y se sabe que codifica para un sistema de secreción tipo IV (2, 8, 6) que solo transloca CagA (14, 16). Dicha proteína suele tener diversos efectos sobre la célula gástrica, ya que altera diversos mecanismos de señalización, entre ellos está aumentar la respuesta inflamatoria por la inducción de la producción de IL-8 (16). También suele causar alteraciones en la transducción de señales que origina rearrreglos en el citoesqueleto pudiendo explicar de cierta forma porque algunas cepas son capaces de internalizarse. La proteína CagA puede interactuar con el oncogén *shp2* el cual a su vez causa alteraciones en las uniones estrechas y en las uniones de adherencia del epitelio gástrico, afectando su integridad (34).

De igual manera se ha observado que muchas de las cepas de *H. pylori* patógenas son capaces de evadir la respuesta del sistema inmune a partir de diferentes mecanismos. El LPS y el flagelo suelen presentar baja respuesta inmunogénica debido a que el primero presenta en la región del antígeno O carbohidratos con un perfil semejante al que presentan los antígenos de los grupos sanguíneos (Antígenos de Lewis), mientras que la flagelina presente en el otro no puede ser reconocido por el sistema inmune (20). Células del sistema inmune fagocitan al microorganismo, sin embargo, para evitar la formación del fagosolisoma la célula bacteriana retrasa la polimerización de la actina, ocasionando que la célula inmunitaria siga fagocitando más células de *H. pylori* las cuales formarán megafagosomas, y éstos al entrar en contacto con los lisosomas no acabaran con todas las bacterias presentes debido al pequeño tamaño del lisosoma en comparación con el megafagosoma (18, 20). Además, se ha observado que algunas cepas son capaces de generar la apoptosis en los macrófagos (20). *H. pylori* es capaz de generar vesículas de membrana externa que pueden acarrear diversas proteínas virulentas (VacA y CagA) que

pueden funcionar como “distractor” para el sistema inmune, ya que los macrófagos se encargaran de fagocitar dichas vesículas y no a la célula bacteriana (8).

Un mecanismo que se ha propuesto para la persistencia de esta bacteria es el de invasividad, diversos estudios reportan que algunas cepas de *H. pylori* son capaces de ingresar a la célula gástrica, permanecer viable e incluso de replicarse (17, 21, 22, 23, 41, 42 57). Este mecanismo ayudaría a explicar por qué la bacteria puede persistir durante tanto tiempo en el estómago humano.

Como se ha mencionado anteriormente, no todas las infecciones por *H. pylori* causarán alguna sintomatología; la isla de patogenicidad *cag*-PAI no está presente en todas las cepas (8, 15, 26), algo similar pasa con la funcionalidad de la proteína VacA (8, 15), por tanto, todos estos factores sumados a la invasividad del microorganismo pueden ayudar a explicar la diversidad de afecciones y la capacidad del microorganismo de infectar por largos periodos del tiempo a su hospedero.

1.5 Relación del gen *vapD* con la persistencia en patógenos invasivos facultativos

Cao, P, y colaboradores (25) identificaron en la cepa 60190 de *H. pylori* una región de 4.2 kb río abajo del gen *vacA* con 5 ORF's (open reading frames), los cuales se denominaron *fepC*, *hemU*, *vdIC*, *vdID* y *vapD*. La sorpresa fue que el gen *vapD* tenía alta identidad con otros genes *vapD* de diversos microorganismos. Por ejemplo, para *Dichelobacter nodosus* hubo una identidad del 64.9%, mientras que para *Haemophilus influenzae* fue del 53.6% y para *N. gonorrhoeae* fue del 49.8%. Es importante mencionar que el gen *vap D* en *N. gonorrhoeae* está presente en un plásmido, en *H influenzae* está presente en el cromosoma y en *D. nodosus* está presente tanto en plásmido como en cromosoma. En este mismo trabajo se determinó que la presencia del gen *vapD* en cepas de *H. pylori* no presentó correlación con alguno de los alelos de *vacA* (s1, s2, m1, m2). En el estudio realizado por Kwon, A. et al 2012 (30) se obtuvo la estructura tridimensional de la proteína VapD a partir de la cepa de *H. pylori* 26695, tras hacer un análisis de su estructura se relacionó su función a la de una endoribonucleasa específica para purinas perteneciente a la familia de

ribonucleasas Cas2 del sistema CRISPR. En el estudio realizado por Morales-Espinosa, M. et al 2008 (15) se analizaron diversas cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes mexicanos para determinar la presencia del gen *vapD* y relacionarla con la presencia del gen *vacA* y *cagA*. Sus resultados mostraron que el 38% de las cepas presentaba el gen *vapD* y que el genotipo que más se presentó fue el de la s1-m1 (*vacA* funcional) y *cag-PAI* +. Dichas cepas se aislaron de pacientes con dolor abdominal crónico, úlcera gástrica y úlcera duodenal. El gen *vapD* no presentó relación con algún alelo específico de *vacA*, pero si hubo una correlación entre la presencia de *vapD* y la presencia de la *cag-PAI*.

Dichelobacter nodosus es un microorganismo patógeno facultativo anaerobio estricto, el cual puede dividirse según su patogenicidad en benigno, intermedio y virulento (27). Este microorganismo es el agente causal de la podredumbre de las patas de borrego, la cual es una enfermedad sumamente contagiosa y causa muchas pérdidas económicas en la ganadería (28). La gran mayoría de cepas virulentas y de patogenicidad intermedia poseían un plásmido denominado pJIR318 (28), el cual codifica para diversas proteínas de la familia Vap, entre ellas; VapA (11.3 kDa), VapB (8.9 kDa), VapC (15.2 kDa) y VapD (10.6 kDa). La proteína VapD tiene alta identidad con el ORF5 de *N. gonorrhoeae* el cual está igualmente en un plásmido (28). Tras realizar un análisis al plásmido pJIR318 pudieron observar que los genes *vapA* y *vapD* están localizados en cistrones separados (28).

Rhodococcus equi es un microorganismo patógeno intracelular facultativo Gram-positivo que suele afectar a potros menores de 5 meses (26). Este microorganismo también se ha aislado de otros animales como los cerdos, las vacas y las cabras (26). Incluso este actinomiceto suele ser patógeno oportunista en pacientes con VIH (28). La infección por este patógeno suele causar bronconeumonía supurativa crónica, enteritis ulcerativa y produce alta mortalidad en animales (26). Se ha observado que este microorganismo es capaz de replicarse dentro de macrófagos y aún no se conoce del todo cuales son los genes que contribuyen a su virulencia (28). Las cepas patógenas suelen presentar un plásmido de 85 a 90 kb el cual no presentan las cepas no patógenas (26, 28). Dentro de este plásmido se puede encontrar un clúster con diferentes genes de la familia *vap* (desde la A hasta la H)

(28), aunque no se sabe con precisión la función de cada uno de estos genes, si se sabe que los genes *vapA* y *vapD* se sobreexpresan en condiciones de pH ácido (alrededor de 5) (26), este tipo de condiciones suelen presentarse cuando el macrófago fagocita al microorganismo. También se sabe que la remoción del gen *vapA* prácticamente atenúa la virulencia de *Rhodococcus equi* y ésta se recupera cuando se complementa *vapA* (24).

En *Xylella fastidiosa*, un bacilo Gram-negativo responsable de enfermedades de plantas, se ha observado la inducción de un grupo de genes presentes en el plásmido pXF51 (donde se encuentra el gen *vapD*) cuando la bacteria se somete a estrés térmico, además de estos se observó una sobreexpresión de proteínas involucradas en la patogénesis y la adaptación (31). VapD en *X. fastidiosa* es una proteína termoestable con actividad de endoribonucleasa de la familia Cas2/CRISPR la cual incrementa su expresión durante la formación de biofilm (35).

Haemophilus influenzae no tipificable (NTHi) es una bacteria Gram-negativa que suele ser comensal de la parte superior del tracto respiratorio de humanos, sin embargo, suele causar infecciones tales como otitis media, bronquitis y neumonía, dichas infecciones suelen ser recurrentes (28). En esta bacteria está bien documentada la presencia de un módulo toxina-antitoxina (28, 29). En condiciones normales los genes *vapB* (antitoxina) *vapC* (toxina) se expresan al mismo tiempo ocasionando que la antitoxina neutralice el efecto de la toxina, este heterodímero a su vez se une a un sitio regulatorio que inhibe al par de promotores de cada gen. En condiciones de estrés como: pocos nutrientes disponibles, presencia de antibióticos o estrés oxidativo. La antitoxina que es mucho más lábil se degrada, ocasionando que la toxina actúe y se atenué el desarrollo del microorganismo. La cepa puede volver a restablecerse siempre y cuando se retire el factor estresante (28, 29). Este tipo de módulos toxina-antitoxina se presenta también con los genes *vapX* (antitoxina) *vapD* (toxina) en *H. influenzae* (29).

1.6 Tratamiento para la erradicación de la infección por *H. pylori* y las fallas en el tratamiento

El tratamiento se lleva a cabo mediante la combinación de agentes antimicrobianos administrados por vía oral y agentes antisecretorios de HCl (agentes inhibidores de la bomba de H⁺), cuya finalidad es la de elevar el pH para que los antibióticos puedan actuar en el estómago (65). Dependiendo de la clase de antibiótico(s) administrado(s), el uso de otros compuestos y la duración del tratamiento tendremos diferentes clases de terapias (8). La triple terapia consiste en la primera línea de tratamiento y consiste en el uso de agentes inhibidores de la bomba de H⁺, Amoxicilina/Metronidazol y Claritromicina administrados de 7 a 14 días (4 y 8). En algunos casos a esta primera línea de tratamiento se le suele adicionar sales de bismuto (cuádruple terapia), cuya finalidad es la de coadyuvar con la función de los antibióticos (65). Cuando este primer tratamiento no logra erradicar la infección, se suelen usar los mismos elementos que componen la cuádruple terapia sustituyendo el Metronidazol o Amoxicilina por Tetraciclina o Levofloxacina o Rifabutina por 10 días, lo cual corresponde a la segunda línea de tratamiento (4). Cuando las dos anteriores terapias no logran eliminar al microorganismo se suele emplear una tercera línea de tratamiento en donde se administran inhibidores de la bomba de H⁺, Rifabutina o Levofloxacina, Amoxicilina y Furazolidona durante 10-14 días.

A pesar de que existen estas tres líneas de tratamiento suelen existir pacientes que no responden a estos tratamientos. Se ha reportado que existen cepas de *H. pylori* resistentes a los macrólidos, nitroimidazoles, β-lactamasas, fluoroquinolonas y tetraciclinas (66). Sin embargo, hay que considerar la capacidad de internalización del microorganismo (17, 21, 22, 23) y la posible función que puede tener el gen *vapD* para que *H. pylori* pueda permanecer dentro de la célula por largos periodos volviendo la infección persistente.

2. Justificación

La infección por *Helicobacter pylori* es causante de enfermedades como gastritis y úlcera péptica, de igual forma contribuye al desarrollo de MALT y cáncer gástrico. La diversidad genética del microorganismo y del huésped, el estilo de vida del paciente y la cronicidad de la infección son factores determinantes para el desarrollo y evolución de las diversas patologías. La bacteria tiene una amplia gama de factores de virulencia que le permiten evadir la respuesta inmune y ser resistente a los diversos antibióticos. Además de esto, estudios anteriores han reportado la capacidad de *H. pylori* para internalizarse en células gástricas humanas, pudiendo ser un factor importante en la cronicidad, persistencia y las posibles fallas en el tratamiento de la infección.

El gen *vapD* se ha detectado en diversos microorganismos intracelulares facultativos como *D. nodosus*, *R. equi*, *X. fastidiosa*, *H. influenzae*, entre otros. Se ha asociado la expresión de este gen con la capacidad que tienen estos microorganismos para sobrevivir de manera intracelular. Por tanto, la expresión del gen *vapD* en *H. pylori* puede contribuir de manera importante en la persistencia del microorganismo de manera intracelular. Actualmente no existen estudios que muestren la relación entre la capacidad de la bacteria para permanecer dentro de la célula, sin ser eliminada a través del tiempo, y la transcripción de *vapD*. En este contexto, el presente estudio generará elementos que permitirán conocer si *H. pylori* es capaz de persistir dentro de células de adenocarcinoma gástrico y la posible contribución del gen *vapD* para lograrlo.

3. Hipótesis

El gen *vapD* en microorganismos como *H. influenzae* y *R. equi* se sobre transcribe cuando estas bacterias están presentes de manera intracelular o bajo condiciones de estrés, lo cual indica que dicho gen contribuye a la persistencia de estos microorganismos. Por lo tanto, la transcripción del gen *vapD* en *H. pylori* podría correlacionarse con la persistencia del microorganismo dentro de las células gástricas.

4. Objetivos

- Determinar la relación entre la persistencia intracelular de *Helicobacter pylori* y la transcripción del gen *vapD*.

4.1 Objetivos particulares

- Determinar la persistencia de *H. pylori* dentro de la célula gástrica
- Determinar la transcripción del gen *vapD* de *H. pylori* en el ambiente intracelular

5. Material y métodos

5.1 Diagrama de flujo general

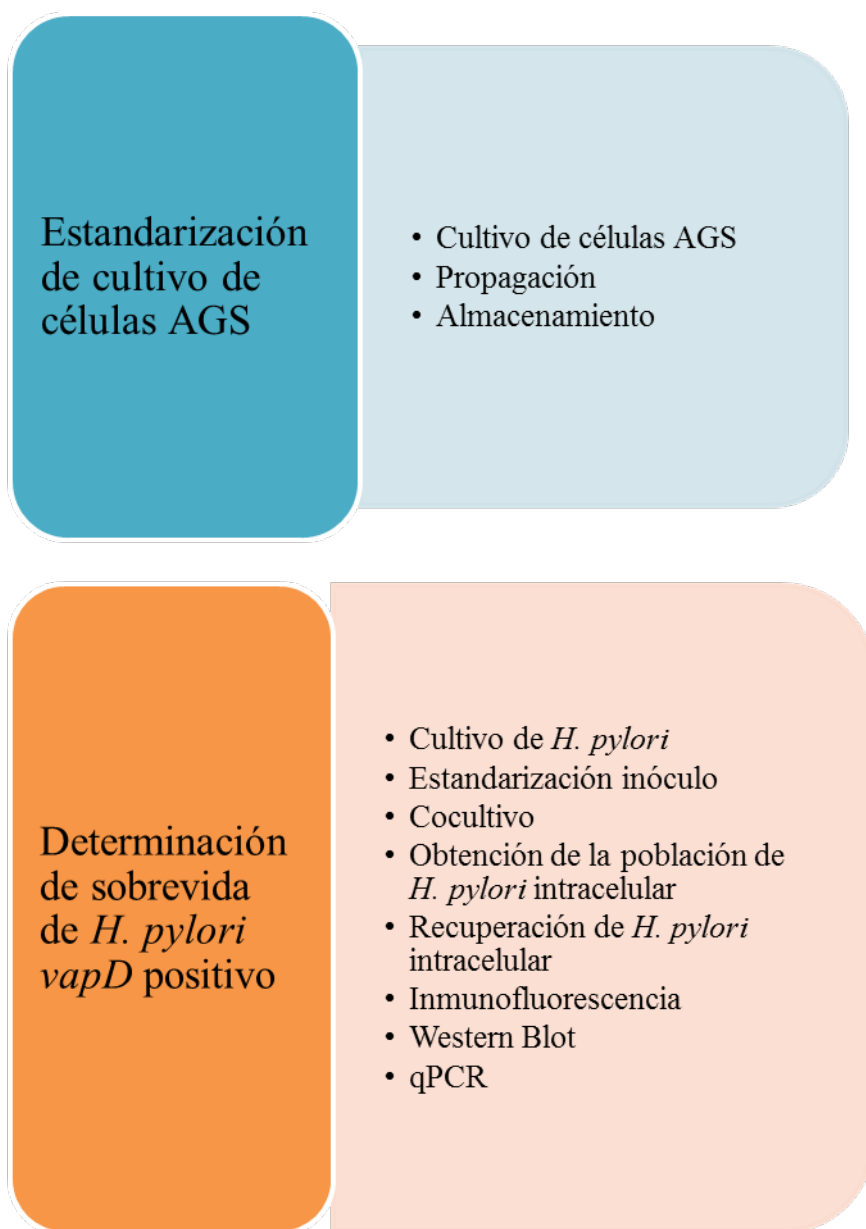


Figura 2. Diagrama general de la metodología a emplear.

5.2 Estandarización de cultivo de células AGS

Para llevar a cabo los ensayos de persistencia en *H. pylori* se empleó la línea celular de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) de la ATCC® (CRL-1739, número de lote: 59257298).

5.2.1 Cultivo de células AGS

Las células AGS se incubaron en cajas Petri de 100 mm con medio DMEM 1X (Life technologies®) suplementado con 5% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Corning) más antibióticos (estreptomicina y penicilina a 100 µg/mL de cada uno) a 37°C con 5% de CO₂. Las células se dejaron en crecimiento hasta que alcanzaron un 80% de confluencia.

5.2.2 Propagación

Una vez que las células tenían un 80% de confluencia se retiró el medio DMEM+SFB+antibióticos y se realizaron 3 lavados usando 10mL de solución PBS c/u, para eliminar las células muertas y demás desechos celulares. Posteriormente se adicionaron 3 mL de una solución de tripsina 0.05% por 3 minutos, para despegar las células que se mantenían unidas a la caja Petri. La inactivación de la tripsina se realizó mediante la adición de 10 mL de solución DMEM con 5% de SFB. A continuación, se colectaron las células en un tubo falcon de 15 mL, se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos a 12°C. Se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 25 mL de medio DMEM+SFB+antibióticos en una caja Petri nueva.

5.2.3 Almacenamiento

Se realizó el mismo procedimiento que en el apartado anterior, pero en la última parte del proceso el paquete celular se resuspendió en 1 mL de SFB con 10% de DMSO y se guardó a -80°C.

5.3 Determinación de la persistencia de *H. pylori vapD* positivo

Para llevar a cabo los ensayos de persistencia en *H. pylori* se empleó la cepa 26695 de la ATCC® (700392).

5.3.1 Cultivo de *H. pylori*

El microorganismo se incubó en cajas Petri de 100mm con agar Casoy (BD®) más 5% de sangre de carnero desfibrinada (Laboratorios Microlab®), en condiciones de microaerofilia (generado con un sobre de microaerofilia que proporciona una mezcla de O₂, CO₂ y N [BBL CampyPak plus, Beckton Dickinson] dentro de una jarra de anaerobiosis) a una temperatura de 37°C. El crecimiento bacteriano se corroboró de acuerdo con su morfología colonial, morfología microscópica (frotis a partir del crecimiento de colonias teñido con tinción de Gram, mostrando bacilos Gram negativos pleomórficos) y pruebas bioquímicas (oxidasa y ureasa positivas).

5.3.2 Estandarización del inóculo

Para llevar a cabo el cocultivo, la cepa de *H. pylori* se resuspendió en 2mL de medio infusión cerebro corazón (Difco) hasta tener una concentración de 3×10^8 bacterias/mL, esto se determinó mediante turbidimetría a partir de la curva de Mac Farland (tubo 1).

5.3.3 Cocultivo

El cocultivo se realizó mediante la inoculación de 3.2×10^5 células eucariotas (conteo realizado mediante cámara de Neubauer) con 107 µL de la suspensión bacteriana de *H. pylori* descrita en la sección anterior (3.2×10^7 bacterias), más 200 µL de medio BHI estéril en placas de 12 pozos, incubando a 37°C en 5% de CO₂ durante 3 h.

5.3.4 Obtención de la población de *H. pylori* intracelular

Una vez concluidas las 3 horas de co-cultivo, de uno de los pozos se recuperó el sobrenadante para contabilizar por unidades formadoras de colonia (UFC) en placa, el número de *H. pylori* viable (control positivo [S WT]). De esta muestra se separó el paquete celular (células AGS y microorganismo) para contabilizar por el mismo método el número total de bacterias viables que interaccionaron con las células AGS (bacterias extracelulares adheridas a las células eucariotas y bacterias intracelulares) (P Wt). Para seleccionar la población de *H. pylori* que ingresó a la célula eucariota, se realizaron 2 lavados con 1 mL de PBS y se adicionó a cada pozo, medio DMEM+2% de SFB con 200 µg/mL de gentamicina dejando incubar durante 6 h a una temperatura de 37°C y en una atmosfera de 5% de CO₂.

5.3.5 Recuperación de *H. pylori* Intracelular

Una vez concluido el tiempo de tratamiento con gentamicina se retiró el medio DMEM con el antibiótico, se lavó con 1 mL de PBS y se adicionó medio DMEM fresco + 2% de SFB. *H. pylori* intracelular se recuperó de la siguiente manera: el paquete celular de células AGS se lavó con PBS a temperatura ambiente, se adicionó 1 mL de PBS y se raspó el fondo del pozo con un gendarme estéril para desprender las células eucariontes adheridas, el paquete celular se recuperó y se centrifugó a 8000 rpm, se desechó el sobrenadante y se agregaron 200 µL de saponina al 0.1% en PBS, dejando incubar a temperatura ambiente por 10 minutos para permitir la salida del microorganismo de la célula AGS. La solución se centrifugó a 8000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante se descartó y el sedimento se re suspendió en 200 µL de caldo BHI, se tomó una alícuota de 50 µL que se sembró en agar Brucella con 5% de sangre de ternera, dejando incubar bajo las condiciones descritas para el crecimiento de *H. pylori*. Finalmente, se contabilizaron las UFC en cada una de las cajas. Esto se repitió a las 12, 24, 36, 48, 60 72, 84 y 96 horas. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

5.3.6 Inmunofluorescencia

Para observar a *H. pylori* intracelular en los diferentes tiempos post tratamiento con gentamicina. Las células se fijaron en el fondo del pozo mediante la adición de 1mL de formaldehído al 3.7% en PBS, dejando incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Se retiró el formaldehído y se realizaron 3 lavados con PBS a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron con 300 μ L de PBS-Tritón X-100 (PBS 1X, 0.25% Tritón X-100 ICN Biomedical Inc®) y se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente en agitación orbital. Se lavó con 1 mL de PBS, por triplicado, posteriormente se adicionaron 500 μ L de una solución que contenía el anticuerpo monoclonal de ratón contra *H. pylori* (Biocare Medical®) a una dilución 1:500 en PBS, para delimitar el citoplasma de la célula AGS se usó un anticuerpo monoclonal de conejo contra β -tubulina (Biocare Medical®) diluido 1:500 en PBS, la mezcla de anticuerpos se incubó a 4°C en agitación orbital, toda la noche. Posteriormente se lavó con 1mL de PBS por pozo, por triplicado. Para la detección de los primeros anticuerpos se emplearon 500 μ L de una mezcla de anti-anticuerpos contra ratón marcados con Alexa 568 (Invitrogen®) y anti-anticuerpos contra conejo marcados con Alexa 488 (Invitrogen®) diluidos 1:1000 en PBS, esta mezcla se dejó incubar a 4°C por 2h. Además, para delimitar el núcleo eucarionte se utilizó 1 mL de una solución de DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindol), la cual se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Finalmente, la muestra se tomó con un cubreobjetos invirtiéndolo y montado sobre un portaobjetos, manteniendo la hidratación con 2 μ L de TBS y glicerol al 10%. Las muestras se analizaron por microscopia confocal.

5.3.7 Western blot

Se extrajeron las proteínas del sobrenadante (control negativo) y del paquete celular (control positivo) mediante la adición de 100 μ L de una solución RIPA 1X (Radio Immuno Precipitation Assay por sus siglas en inglés) con un inhibidor de proteasas *complete* de Roche® (1 pastilla del inhibidor por cada 100 mL de RIPA 1X) y se incubó en hielo por 1 hora, agitando cada 20 minutos. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 5

minutos, con la finalidad de separar las proteínas hidrofílicas (sobrenadante) de las hidrofóbicas (pellet). El sobrenadante se colocó en un tubo de 2 mL. Para la cuantificación se usó el kit *DC protein assay* de Biorad® siguiendo las instrucciones del fabricante, se midió la absorbancia a 750 nm y la concentración de proteínas se determinó mediante una curva patrón. De los extractos de proteínas obtenidos de los sobrenadantes y de los paquetes celulares tratados con saponina (de los tiempos del estudio) se tomaron 30 µg y fueron depositados en geles de acrilamida al 10%. El gel se corrió a 10 mA, durante 20 minutos y posteriormente a 20 mA durante una hora. Para el Western blot se transfirió el gel usando una cámara de transferencia de Biorad®, donde se utilizó una membrana de PVDF *immobilon* de 0.45 µm de Millipore® siguiendo el protocolo señalado por Towbin et al. 1979 (58). La membrana se incubó en una solución de albumina al 5% en PBS y con agitación orbital durante toda la noche para bloquear las regiones inespecíficas. El anticuerpo primario anti *H. pylori* de *Medical Biocare*® se preparó en PBS haciendo una dilución 1:500 y se vertió sobre la membrana, dejando a temperatura ambiente en agitación orbital por 2 horas, posteriormente se hicieron tres lavados con TBS-T 1X y se adicionó el anticuerpo secundario contra ratón (dilución 1:5000 en PBS con 0.1% de albumina) marca *Jackson Immuno Research*, el cual es un anticuerpo que tiene adaptada una enzima peroxidasa que permitirá la detección de la señal. El anticuerpo secundario se dejó en agitación orbital por una hora, se realizaron tres lavados con TBS-T 1X y se reveló usando el kit EZ ECL de *Biological industries*® siguiendo las instrucciones del fabricante, finalmente se expusieron las membranas sobre placas fotográficas y se usó solución reveladora y fijadora marca *Kodak*®.

5.3.8 Cuantificación de la transcripción del gen *vapD* mediante PCR tiempo real

Para determinar los niveles de transcripción de *vapD* en *H. pylori* intracelular durante los diferentes tiempos del ensayo, se trabajó con los paquetes celulares, los cuales fueron lavados con 1 mL de PBS y con ayuda de un gendarme estéril se recuperaron las células AGS con el microorganismo intracelular del fondo del pozo, la mezcla se centrifugó a 8000 rpm y se recuperaron los paquetes celulares los cuales fueron depositados en 100 µL de

RNAlater (Invitrogen®) y se conservaron a -80°C hasta la extracción del RNA total. Para llevar a cabo este proceso se empleó el kit Illustra RNA Spin Mini Kit (GE Healthcare life Sciences®) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y concentración de la extracción se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa y a una lectura de la absorbancia a 260 y 280 nm empleando el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®).

La reacción de transcriptasa reversa se llevó a cabo empleando el kit QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la reacción de PCR en tiempo real se empleó el equipo Step one plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). Se usaron los iniciadores de Cao y colaboradores (25) (F-ATGTATGCTTTAGCGTTTG y R-GGATTTTACAATCTCAGTAA) y se diseñó la sonda (FAM-AGAGCGTTTAAGGTAGAGGACTTTAGCGA) para determinar los niveles de transcripción de *vapD*. Por otra parte, como control endógeno de la transcripción se empleó el kit de detección Human GAPD endogenous control (VIC) (Applied Biosystems®) que contiene los iniciadores y la sonda Taqman®, que se encargan de detectar los niveles de transcripción de la gliceraldehído-fosfato-deshidrogenasa humana (GAPDH).

Para cada reacción de PCR se prepararon 25 µL empleando la iQ Multiplex Powermix (Biorad®). Cada muestra se analizó por triplicado y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C por 2 minutos y 30 ciclos de; 94°C por 15 seg y 60°C por 1 min. La determinación de la transcripción fue con el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta C_T$ y los cálculos se llevaron a cabo con el software Step One versión 2.3. Los niveles de transcripción del gen *GAPDH* se usaron como normalizador para validar los niveles de transcripción de *vapD* en todas las muestras después del tratamiento con gentamicina y el nivel de *vapD* obtenido de la muestra T0 se tomó como el 100% de la transcripción del gen para compararlo con los obtenidos de las muestras problemas.

6. Resultados

6.1 Determinación de la viabilidad de *H. pylori* en el medio intracelular por conteo de UFC en placa de agar sangre

Inicialmente se estandarizó el inóculo de *H. pylori* a 3.2×10^7 bacterias; cantidad que se utilizó como inóculo en los pozos de las placas de cultivos de células, con una población de células AGS de 3.2×10^5 por pozo. El co-cultivo se incubó por 3 horas en CO₂ al 5%, después de este periodo de tiempo se tomó el sobrenadante (control de viabilidad de *H. pylori* en ambiente extracelular) y el paquete celular (control de viabilidad de *H. pylori* en ambiente intracelular). Ambas muestras se sembraron en placas de agar sangre, obteniéndose 1.09×10^6 y 1.36×10^6 UFC respectivamente. Posteriormente, el co-cultivo se trató con gentamicina por 6 horas. Concluidas las 6 horas de tratamiento con el antimicrobiano, inmediatamente (tiempo 0 [t0]) se tomó una alícuota de 50 µl del paquete celular y del sobrenadante para sembrarse en placas de agar sangre, el número de *H. pylori* detectados en la fracción del paquete celular fue de 485 UFC, que fueron los microorganismos que realmente se internalizaron (0.04% de bacterias, con respecto a las detectadas en el cocultivo sin antibiótico), mientras que del sobrenadante solo se obtuvieron 9 UFC (tabla 1). Durante el tiempo 0 hasta las 36 horas de cocultivo, se pudo observar que el conteo de microorganismos se mantiene constante (485, 433, 596 y 537 UFC), mientras que a las 48 h pos-tratamiento, hay un aumento considerable en las UFC (1300). Esta variación tan importante en el número de microorganismos podría deberse a una replicación de *H. pylori* dentro de la célula. Sin embargo, a partir de las 60 horas a las 84 horas, se observa una disminución importante en la recuperación de UFC de *H. pylori* (de 482.7 UFC hasta de 12 UFC), aunque se mantiene la persistencia del microorganismo dentro de la célula. A pesar de esta gran disminución en la recuperación de *H. pylori* en las placas de cultivo de agar sangre, los análisis posteriores de los resultados obtenidos por inmunofluorescencia que muestra la localización de *H. pylori* intracelular, la determinación de una proteína específica de *H. pylori* por Western blot, y la cuantificación de la transcripción del gen *vapD* por PCR Tiempo Real, nos muestran que *H. pylori* se encuentra viable en el ambiente intracelular y persistiendo, muy probablemente en un estado viable no

cultivable (por lo que ya no se detecta en UFC). Es importante mencionar que las UFC obtenidas de sobrenadante durante todos los tiempos del ensayo son insignificante (de 9 UFC a 54 UFC), la detección de UFC en los diferentes tiempos a partir del sobrenadante pueden explicarse por la recuperación del microorganismo a partir de células desprendidas y flotantes en el sobrenadante.

Tabla 1. Unidades formadoras de colonias (UFC) a partir de los sobrenadantes y de células AGS, durante los diferentes tiempos del ensayo de persistencia.

Horas tratamiento pos- con gentamicina	Células AGS	Co-cultivo <i>H. pylori</i> -AGS	t0	t12	t24	t36	t48	t60	t72	t84
UFC sobrenadante	-----	1.09x10 ⁶	9	6.3	2	10.67	63	42.7	60	54.5
UFC Células AGS	-----	1.36 x10 ⁶	485.3	433.3	596	537.3	1300	482.7	50.7	12

t0= es el tiempo inmediato concluido, al periodo de tratamiento con gentamicina (periodo de 6 horas); t12-t84= corresponde de 12 hasta 84 horas después de concluido el tratamiento con gentamicina. Los números son el promedio de tres ensayos.

6.2 Determinación de *H. pylori* intracelular por Western Blot

Se realizó la extracción de proteínas totales a partir de los paquetes celulares (P) y de los sobrenadantes (S) de los diferentes co-cultivos, de cada uno en los diferentes tiempos del ensayo (0, 12 hr, 24 hrs, 36 hrs, 48 hrs, 60 hrs, 72 hrs, 84 hrs) (figura 3). Las muestras fueron corridas en geles de acrilamida al 10% y en electroforesis vertical.

Los patrones de bandas de las proteínas extraídas de las células AGS sin infectar (Mk) son muy similares a los patrones de proteínas obtenidas de las células infectadas con *H. pylori* (P), lo que nos indica que las proteínas predominantes observadas provienen de las células AGS.

Respecto a las proteínas obtenidas a partir de la fracción del sobrenadante (S) se observó que predominan dos bandas de un peso aproximado de 55 y 72 KDa en el perfil de electroforesis.

PROTEÍNAS TOTALES DE CÉLULAS AGS INFECTADAS CON *HELICOBACTER PYLORI*

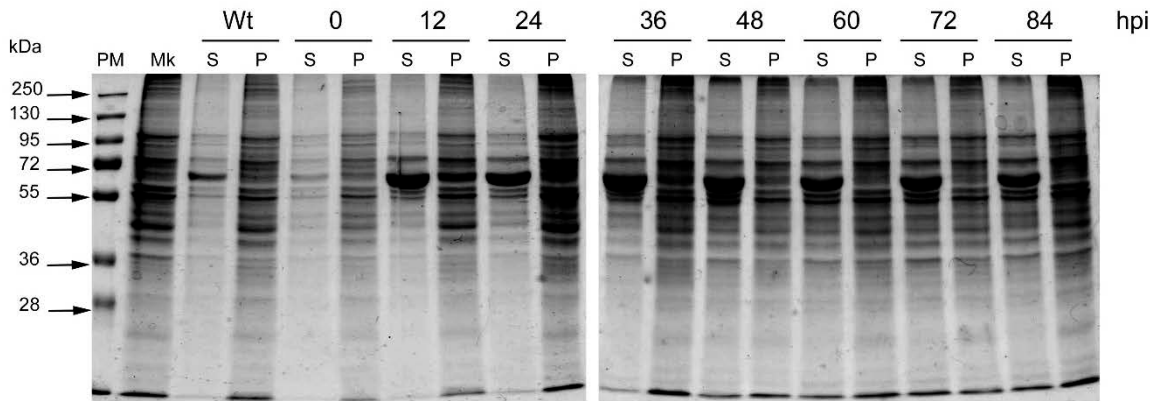


Figura 3. Electroforesis de proteínas totales (10µg) de los sobrenadantes y de las células AGS infectadas con *H. pylori*, en un gel de acrilamida al 10%. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (PM); el carril 2 a las proteínas extraídas del paquete celular sin infectar (Mk); los carriles 3 y 4 contienen las proteínas derivadas del sobrenadante (S) y del paquete celular (P) respectivamente del co-cultivo sin tratar con gentamicina (Wt); los carriles 5 a 20 corresponden a los S y los P de los diferentes tiempos (0 a 84 horas) post tratamiento con gentamicina (*H. pylori*).

La presencia de *H. pylori* intracelular se determinó mediante el Western Blot de los gels de acrilamida (conteniendo las proteínas totales) con la detección de una proteína de membrana externa de choque térmico de aproximadamente 70 kDa y específica para *H. pylori*, utilizando anticuerpos específicos para la proteína. Adicionalmente como control de carga se usó un anticuerpo que reconoce a la enzima gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de humano, cuyo peso es de 36 kDa (figura 4). El cultivo de células AGS limpio (Mk) fue nuestro control negativo (confirmando la ausencia de señal con el anticuerpo contra *H. pylori*). Por otro lado, tanto el sobrenadante y el paquete celular del co-cultivo sin tratamiento con gentamicina (Wt), nos dieron una reacción positiva con el anticuerpo contra *H. pylori* (control positivo de infección) (figura 4), indicando la presencia de bacterias extracelulares. Respecto a cada una de las muestras (S) de los diferentes tiempos post tratamiento con gentamicina, el sobrenadante del tiempo 0 fue la única muestra de señal positiva, donde muy probablemente las proteínas específicas de *H. pylori* fueron detectadas a partir de las células bacterianas muertas por la gentamicina, los sobrenadantes

analizados a partir de las 12 horas hasta las 84 horas pos-tratamiento, fueron todos negativos a la detección de la proteína de choque térmico de *H. pylori*, confirmando la eliminación del microorganismo en el sobrenadante. En cambio, con todas las muestras derivadas de los paquetes celulares (P) de estos diferentes tiempos, hubo señal positiva con el anticuerpo contra la proteína específica de *H. pylori* (figura 4), confirmando la localización de *H. pylori* dentro de las células AGS.

WESTERN BLOT ANTI- HELICOBACTER PYLORI

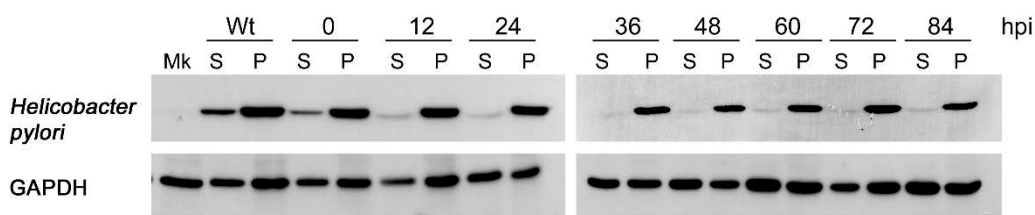


Figura 4. Detección de una proteína de choque térmico de H. pylori en Western blot en sobrenadantes y paquetes celulares, procedente del co-cultivo células AGS-H. pylori.

El carril marcado con Mk, corresponde solo a células AGS (sin H. pylori); los carriles S (sobrenadante) y P (paquete celular) marcados en Wt corresponden al co-cultivo células AGS-H. pylori, sin tratar con gentamicina; los carriles S y P marcados dentro de 0 a 84 (horas) corresponden a las muestras de cada uno de los tiempos del ensay. Se uso un anticuerpo contra la enzima GAPDH (gliceraldehido fosfato deshidrogenasa) de humano, como control de especificidad.

Además, se observó que los anticuerpos específicos contra la proteína de 70 kDa de *H. pylori*, reconocen una proteína de un peso aproximado de 40 kDa, presente en el paquete de células AGS, al igual que la detección de la proteína de 70 KDa. Muy probablemente estas proteínas comparten epítopes. Mientras que en nuestros controles negativos de intracelularidad (sobrenadantes de los tiempos 24, 36, 48, 60, 72 y 84 horas) no se detectan ninguna de las proteínas específicas de *H. pylori*, indicando que la localización de *H. pylori* es intracelular (figura 5).

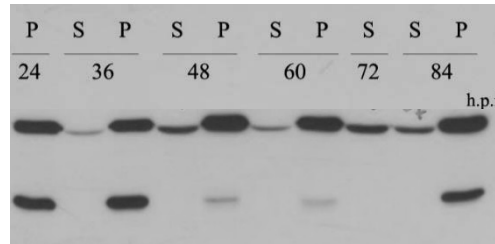
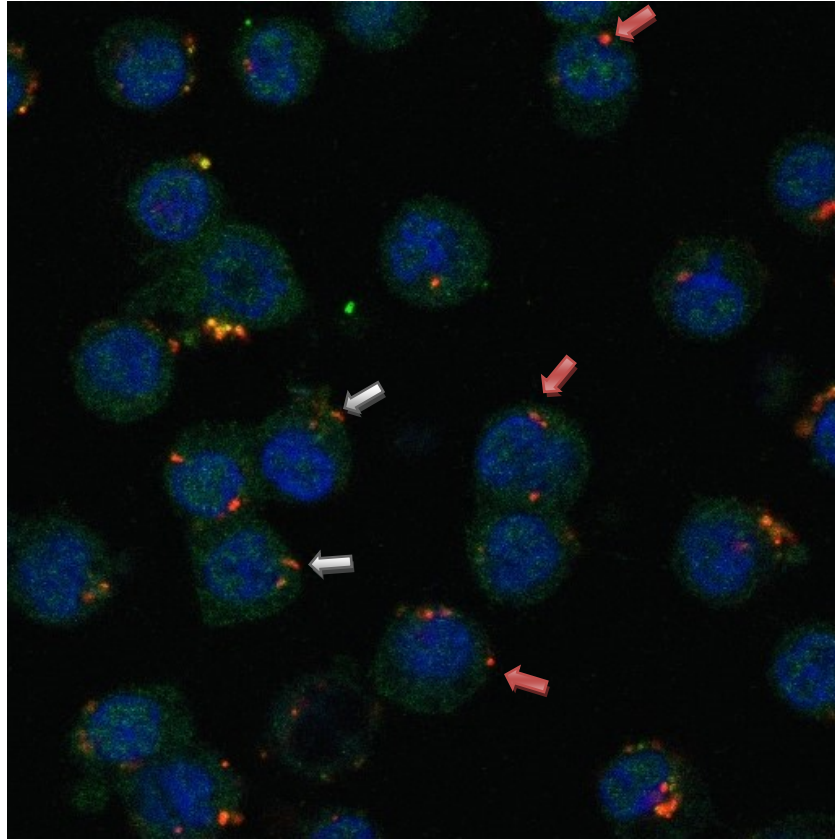


Figura 5. Western blot de la proteína específica de *H. pylori*. La banda superior corresponde a la proteína de membrana de 72 kDa. La banda inferior de aproximadamente 40 kDa solamente se puede observar en las muestras correspondientes a los paquetes celulares (P) de los tiempos 24, 36, 48, 60 y 84 h post tratamiento con gentamicina (h.p.i)

6.3 Determinación de *H. pylori* intracelular por inmunofluorescencia

Se utilizó la técnica de inmunofluorescencia para determinar la localización de *H. pylori* dentro de la célula AGS. La imagen obtenida con el microscopio confocal, donde se traslapan las 3 imágenes obtenidas con cada uno de los anticuerpos específicos contra *H. pylori* (color rojo) y B-tubulina (color verde); y la imagen del núcleo de la célula (color azul) obtenida con el colorante Dapi (4', 6-diamino-2-fenilindol), nos muestran que *H. pylori* se encuentra dentro de la célula (figura 6). En la imagen que corresponde a la muestra infectada sin tratamiento con el antibiótico (Wt) (figura 6, tercera columna) se observa la señal de *H. pylori* en la periferia de las células eucariotas e incluso algunos se localizan en los espacios extracelular. Después del tratamiento con gentamicina (figura 7, cuarta columna) no se observan señales de *H. pylori* en el espacio extracelular. A partir de las 12 horas post-tratamiento con gentamicina, hay un aumento en la señal del microorganismo y una reducción considerable del citoplasma eucarionte, inclusive en algunas células se observan huecos en el citoplasma debido a la formación de vacuolas (figura 8). En los tiempos posteriores (24 a 96 horas post tratamiento con gentamicina) podemos detectar varias señales de *H. pylori* en una misma célula. Es importante mencionar que a lo largo de todo el ensayo se detectan las morfologías: bacilar, curva y cocoide de *H. pylori*, esta última podría estar relacionada con el estado de “resistencia viable pero no cultivable” (EVNC) (Figura 6). Sin embargo, se necesitarán mas pruebas para poder confirmar que realmente el microorganismo esté en EVNC.



*Figura 6. Inmunofluorescencia de células AGS infectadas con H. pylori 24 horas después del tratamiento con gentamicina. La tinción se logró a partir del empleo de diferentes anticuerpos: contra *Helicobacter pylori* (rojo), contra B-tubulina, el cual delimita el citoplasma de la célula (verde) y con el colorante DAPI que muestra y delimita el núcleo (azul). Las flechas rojas muestran al microorganismo con morfología cocoide, mientras que las flechas blancas muestran al microorganismo con morfología bacilar.*

LOCALIZACION INTRACELULAR DE *Helicobacter Pylori*

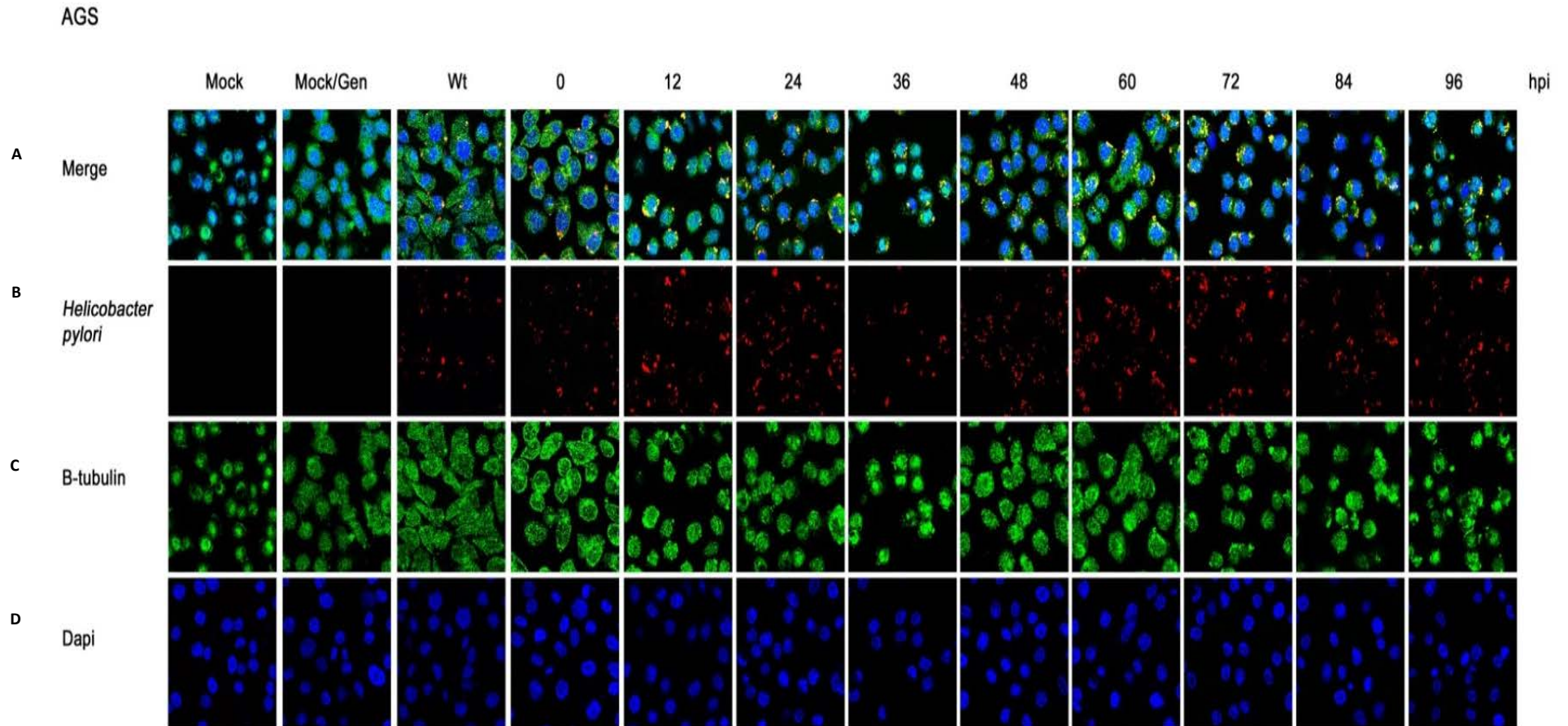


Figura 7. Inmunofluorescencia de células AGS infectadas con *H. pylori*.

Las dos primeras columnas corresponden a: células AGS sin infectar (mock) y células AGS (mock/Gen) tratadas con gentamicina. La tercera columna muestra células AGS infectadas con *H. pylori* durante 3 horas y sin tratamiento con gentamicina. A partir de la cuarta columna hasta la doceava, se muestran los diferentes tiempos en horas (0 a las 96 horas) de los co-cultivos después del tratamiento con gentamicina (*H. pylori*). La hilera A) muestra las tres imágenes traslapadas obtenidas con el microscopio confocal y el uso de los diferentes anticuerpos: contra *Helicobacter pylori* (B), contra B-tubulina, el cual delimita el citoplasma de la célula (C) y con el colorante DAPI que muestra y delimita el núcleo (D).

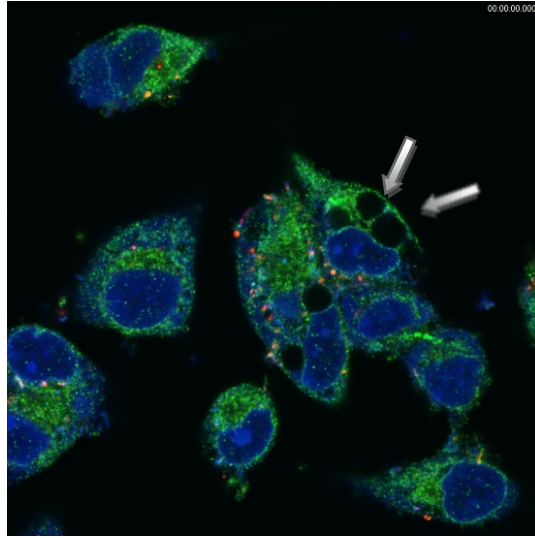


Figura 8. Células AGS infectadas con H. pylori. En rojo se observa a Helicobacter pylori; en verde se observa el citoplasma con presencia de vacuolas (flecha gris); en azul se muestra el núcleo.

6.4 Determinación de la transcripción de *vapD* por PCR-Tiempo Real

La transcripción del gen *vapD* se detectó a lo largo de todo el ensayo, mostrándonos que el gen está activo cuando el microorganismo está dentro de las células AGS. Se tomó como valor de referencia 1.0 al cual se le asignó el 100% del nivel de la transcripción, este valor se generó en el tiempo cero (t_0), inmediatamente, al concluirse las 6 horas del tratamiento con gentamicina (figura 8), donde únicamente se detectaría la transcripción del gen *vapD* de *H. pylori* presente en el medio intracelular. Se observó que la muestra sin tratar con el antibiótico (Wt) presentó solo 0.6 veces más transcripción del gen *vapD* respecto al valor de referencia (t_0). Esta diferencia se explica por la transcripción de gen *vapD* de *H. pylori* (aproximadamente 2.45×10^6 UFC) presente en el medio extracelular (presentes antes de la adición de la gentamicina) más las bacterias intracelulares, contra el número de microorganismos detectados por conteo en placa (485 UFC) en el tiempo 0 (que corresponde al inmediatamente después de concluido el tratamiento con gentamicina). La integración de los resultados con el análisis de la transcripción del gen *vapD* nos muestra un número de UFC muy reducido en comparación con el inóculo, sin embargo, podemos apreciar que la transcripción de *vapD* es alta con base a la relación UFC. A las 12 horas

(t1) y 24 horas (t2) se observa un aumento en la transcripción de *vapD* de aproximadamente 25% y 50% respectivamente (figura 8), con un conteo de 433 UFC y 596. A las 36 horas se observa un descenso en el 33% en los niveles de la transcripción del gen *vapD* con respecto al nivel de referencia (t0), sin embargo, las UFC (537 UFC) no varían significativamente. De las 48 horas a las 84 horas hay un nuevo aumento en los niveles de transcripción del gen *vapD* (de 0.99 a 1.8 veces respecto a t0), lo cual nos muestra que la transcripción del gen continúa elevándose, aunque no es de manera significativa. Finalmente, a las 96 horas se observa una ligera disminución de la transcripción de *vapD*, y una mínima recuperación de UFC (12 UFC). Sin embargo, la detección de *Helicobacter pylori* intracelular por microscopia confocal y fluorescencia y la determinación de proteínas de *H. pylori* por Western blot nos muestran la presencia de *H. pylori* dentro de la célula. El bajo número de UFC podría indicar que el microorganismo se encuentra en una forma viable no cultivable, sin embargo, se necesitaran otro tipo de experimentos para determinar la proporción de la población que entró en EVNC.

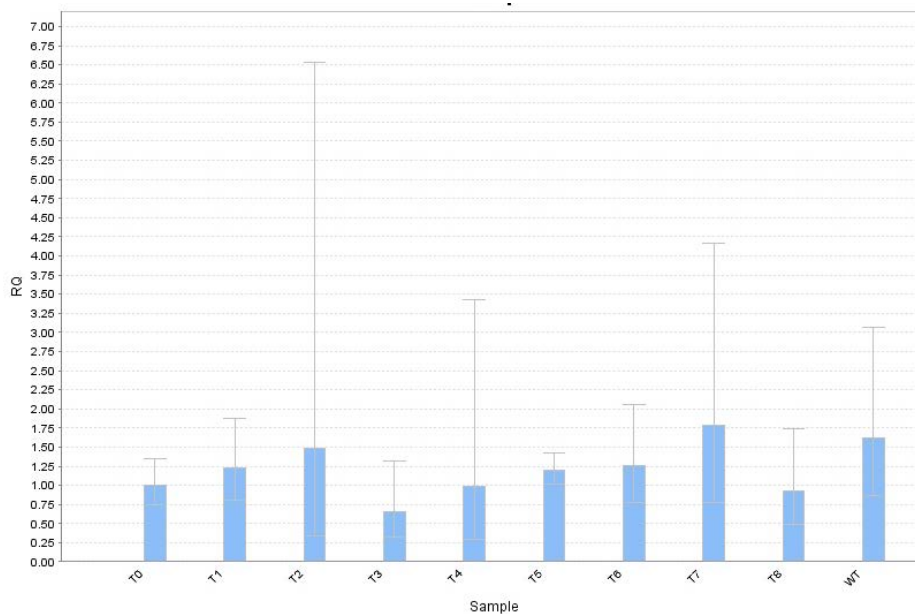


Figura 9. Cuantificación relativa del gen vapD. RQ= cuantificación relativa, T0-T8= muestras post tratamiento con gentamicina de las 0 hasta las 96 horas. WT= muestra sin tratar con gentamicina.

7. Discusión de resultados

La infección por *Helicobacter pylori* está asociada a diversas patologías gástricas tales como gastritis y úlcera péptica, de igual forma contribuye al desarrollo MALT (Tejido Linfoide Asociado a Mucosa por sus siglas en inglés) y cáncer gástrico. Por tanto, la erradicación de la infección es crucial para prevenir el desarrollo de dichas patologías, para lo cual se llevan a cabo diversos tratamientos. Como primera línea de tratamiento se da la terapia triple que consta de dos antibióticos (claritromicina y amoxicilina o metronidazol) y un inhibidor de bomba de protones por 7 días (4, 65). Cuando este tratamiento no es efectivo, se emplean otras estrategias como la terapia cuádruple o el aumento en los días del tratamiento para eliminar al microorganismo. Sin embargo, en algunas ocasiones no se logra erradicar la infección volviéndola persistente, crónica y recurrente (8, 65). Aunque se ha propuesto que las fallas en el tratamiento se pueden deber a la adquisición de genes de resistencia a los antibióticos por la bacteria, es también importante considerar la internalización de la bacteria a las células gástricas (66), lo que impediría a los antimicrobianos entrar en contacto con *H. pylori*. Existen diferentes trabajos que muestran que algunas cepas de *H. pylori* son capaces de internalizarse y de permanecer dentro de la célula de manera crónica e inclusive replicarse (17, 21, 22, 23, 41, 42). Es por esta razón que en el presente trabajo se estudió la capacidad de *H. pylori* de persistir dentro de células gástricas y su posible relación con la transcripción de *vapD*.

En 1997 Cao and Cover (25), describieron por primera vez la presencia del gen *vapD* en un locus cerca del marco de lectura de la citotoxina vacuolizante (*vacA*) en la cepa 60190 de *Helicobacter pylori*. Esto cobró interés, ya que este gen presentó alta similitud con el gen *vapD* presente en plásmido o en cromosoma, descrito en otros microorganismos como: *Dichelobacter nodosus*, *Rhodococcus equi*, *Xilella fastidiosa*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseriae gonorrhoeae*, los cuales son microorganismos intracelulares facultativos. Este tipo de bacterias presentan diversas estrategias para sobrevivir dentro de la célula, como inhibiendo la fusión del fagolisosoma, o induciendo la descarga lisosomal dentro del citoplasma o bien escapando de la vesícula fagocítica para multiplicarse dentro del citoplasma. Se ha reportado que el gen *vapD* es importante para la persistencia de

diferentes patógenos intracelulares facultativos cuando éstos se encuentran en condiciones de estrés (24, 29, 31, 35). Por ejemplo, en *R. equi* tanto *vapD* como *vapA* aumentan sus niveles de transcripción cuando el microorganismo está sometido a medio ácido y H₂O₂, si se eliminan estos genes en *R. equi*, este microorganismo pierde su virulencia y la capacidad de persistir dentro de los macrófagos (24). En *Xylella fastidiosa* se ha observado que los niveles de transcripción de *vapD* aumentan casi 8 veces después de 10 minutos de tener al microorganismo a una temperatura de 40°C. Wen y col en 2003 (62), reportaron la sobreexpresión de diversas proteínas de *Helicobacter pylori* (cepa 26695) cuando éste es crecido en medio de cultivo a pH ácido, entre las proteínas se encuentran las codificadas por genes de virulencia como son algunos genes de la isla de patogenicidad *cag*-PAI y *vapD* (62), sugiriendo que la sobreexpresión de estas proteínas se debe a un fenómeno de adaptación al medio ácido. En *Haemophilus influenzae* el gen *vapD* se ha descrito como parte de un módulo toxina-antitoxina (T-A), donde *vapD* al parecer actúa como la toxina que favorece la interrupción del metabolismo activo, permitiéndole a la bacteria adquirir un estado “dormido o de latencia” ante una condición de estrés como es la exposición a un antimicrobiano y solo favoreciendo nuevamente la replicación bacteriana cuando la antitoxina interfiere con la transcripción de la toxina, cuando las condiciones ambientales son favorables para su sobrevivencia (29). Ren y col en 2012 (29), demostraron el papel de este módulo T-A, cuando co-incubaron a *H. influenzae* en células primarias de aparato respiratorio e inocularon a la bacteria en el oído medio de la chinchilla, observando la intracelularidad de *H. influenzae* y la persistencia del microorganismo dentro de las células epiteliales tanto en el modelo *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, al mutar el gen de la toxina *vapD*, se observó una disminución significativa en la persistencia de la bacteria dentro de la célula epitelial de tracto respiratorio y de oído medio. En la presente tesis, nuestros resultados muestran una persistencia de *H. pylori* dentro de las células AGS hasta de 96 horas (que fue el tiempo elegido de duración en nuestro ensayo). Además, se comprobó por PCR tiempo real que el gen *vapD* de *H. pylori* mantuvo su transcripción durante el periodo de tiempo que duró el ensayo.

Varios trabajos con diferentes microorganismos muestran la importancia de estos módulos T-A en la cronicidad de la infección, participando en la persistencia del microorganismo dentro de la célula, por ejemplo: *Mycobacterium tuberculosis* puede permanecer de forma latente dentro del macrófago, reactivándose la infección con un re-inoculo del microorganismo o por la disminución de la respuesta inmune (68). En *E. coli*, el fenómeno de persistencia se debe a la acción de loci toxina-antitoxina y proteasas específicas como Lon (63), dichos módulos suelen actuar como operones dicistrónicos y la toxina suele tener una función de ribonucleasa (64). En *H. influenzae* la actividad de la toxina VapD ha sido descrita como ribonucleasa con regulación post-transcripcional de la expresión de genes inducida por estrés y la delección de este módulo resulta en el deterioro de la progresión de la enfermedad (29).

Kwon, A. et al. (30) sobre expresaron el gen *vapD* de *H. pylori* en *E. coli* para obtener la forma cristalina de la proteína, determinando que es un dímero de aproximadamente 34.8 kDa y tiene actividad de ribonucleasa. Esto llama la atención ya que en los resultados obtenidos por Western blot en nuestro estudio, se detectó la presencia de una proteína de *H. pylori* con un peso molecular semejante (40 KDa, figura 4). Será importante caracterizar esta proteína y confirmar o descartar que se trate de VapD o de alguna otra con altos niveles de expresión cuando el microorganismo está de manera intracelular. Por otra parte, Kwon et al. observaron también que la secuencia de VapD tiene una alta similitud con proteínas de *R. equi*, *D. nodosus*, *H. influenzae* y *A. actinomycetemcomitans*, las cuales también tienen una alta similitud con la familia de proteínas Cas2 de CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Los autores encontraron que VapD de *H. pylori* puede cortar desde 6 nucleótidos de RNA y es específico para purinas, prefiriendo las uniones UA (30).

H. pylori puede residir en el estómago humano con dos morfologías: una bacilar espiral y otra cocoide, esta última es el resultado de una transición de las células bacilares a un estado viable pero no cultivable (EVNC) (49). En este estado la bacteria sufre cambios en la pared celular, expresión génica y síntesis de proteínas (48), esto origina que, aunque el microorganismo esté metabólicamente activo, no es capaz de crecer en medios de cultivo

tradicionales y solo se puede detectar como células con morfología cocoide a través de microscopía (47), sin embargo, la bacteria se mantiene viable debido a que sigue produciendo ATP, mRNA y mantiene la integridad de la membrana celular (50). Con el ensayo de inmunofluorescencia del presente estudio se detectaron microorganismos intracelulares con morfología bacilar y cocoide durante las 96 horas de duración del ensayo (Figura 6), siendo estos últimos los que se encontraban en mayor proporción. Esto también coincide con los resultados obtenidos en cuenta en placa, ya que después de 60 horas post-tratamiento con gentamicina hubo una disminución considerable en el número de *H. pylori* recuperadas. Los resultados de qPCR y Western blot de la presente tesis pueden sugerir que el microorganismo se encontraba viable en el ambiente intracelular. Sin embargo, se necesitarán ensayos de tinción de células viables y no viables para confirmar que realmente el microorganismo entró en EVNC y no se trate de células en fase de muerte.

Se ha reportado que el EVNC se induce mediante aerobiosis, pH alcalino o ácido, altas temperaturas, altas concentraciones de NaCl, incubación prolongada, tratamiento con inhibidores de la bomba de protones y antibióticos (45, 49). Todas estas condiciones representan un medio adverso para el microorganismo, por lo que para poder adaptarse necesitará disminuir su metabolismo y entrar en un estado de “dormancia” para seguir manteniéndose viable. El medio intracelular puede resultar estresante para la bacteria, debido a las ROS y RNS presentes en las vacuolas de las células AGS (56), esto podría explicar la alta proporción de bacterias intracelulares con morfología cocoide detectadas por inmunofluorescencia ya sea por encontrarse en EVNC o por estar en fase de muerte, lo cual nos indica la importancia que tendría el determinar la proporción de la población que se encuentra viable.

H. pylori en estado de dormancia tiene una disminución en su metabolismo, lo cual también repercute en su capacidad de infectar células (47), sin embargo, es capaz de seguir expresando genes de virulencia como *cagA* y *vacA in vitro* (45, 51, 33, 48). La proteína CagA afecta la morfología celular, la movilidad y la proliferación de las células eucariontes (46). La proteína VacA induce la activación de citocinas inflamatorias después de entrar en la célula hospedera y evita la maduración del fagosoma mediante la formación de

megasomas impidiendo la destrucción del microorganismo por parte de las células del sistema inmune (18, 53). Li, N. et al 2011 (51) encontraron que la transcripción de *vacA* fue menor respecto a *cagA* en las células cocoides. Esto indica que muy probablemente la forma cocoide de *H. pylori* sigue expresando ciertas proteínas indispensables para su sobrevivencia dentro de la célula, incluyendo factores de virulencia.

El microorganismo intracelular evade el sistema inmune por falta de estímulo de éste, ya que la pared celular del microorganismo no estimula la producción de la IL-8 (48). Se ha descrito que *H. pylori* es capaz de eliminar la autofagia de las células eucariontes mediante el silenciamiento por metilación del gen *MAP1LC3AV1*, el cual pertenece a la familia de genes *atg* (autophagy-related genes) (56). Este mecanismo es importante por permitir la eliminación de microorganismos intracelulares mediante la fusión de lisosomas que contienen ROS y RNS con el contenido citoplasmático que se encuentra contenido en vesículas (22, 43, 56). Nuestros resultados con inmunofluorescencia muestran la presencia de vacuolas en las células AGS en una muy baja proporción (Figura 7), las cuales pueden corresponder a un mecanismo de autofagia limitado por *H. pylori* intracelular. Como consecuencia, la célula gástrica puede fungir como reservorio de *H. pylori* para permanecer largo tiempo dentro de la célula sin ser eliminado y sin ser detectado por el sistema inmune, lo cual puede contribuir a la cronicidad de la infección.

Existen numerosos trabajos donde se han reportado las formas cocoides tanto extracelular como intracelular en pacientes con úlcera gástrica, y metaplasia intestinal (59, 60, 61). Se ha reportado que *in vitro* *H. pylori* en EVNC presenta un perfil proteico que estimula la producción de proteínas antiapoptóticas y carcinogénicas (49). De igual forma *H. pylori* cocoide estimula una mayor transcripción del gen *egr-1* (*Early growth response protein 1*), una mayor producción de PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) ocasionando una mayor proliferación tanto de células AGS como GES-1 (51) y un aumento en los niveles de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina cuando interacciona con células GES-1, lo cual es indicativo de daño en el DNA.

Se necesitarán estudio futuros para poder determinar qué papel desempeña VapD en *H. pylori* y si existe una relación con la inducción del estado viable pero no cultivable ya que por ejemplo en *X. fastidiosa* un fitopatógeno, VapD aumenta su expresión cuando se inicia el desarrollo del biofilm dentro del xilema de la planta (35). Lo que indica que la proteína VapD contribuye al desarrollo de estructuras de resistencia como pueden ser los biofilm.

La persistencia de *H. pylori* intracelular puede deberse a la relación que hay entre la expresión de *vapD* y el EVNC, para confirmar esta hipótesis es necesario diseñar una cepa de *H. pylori* mutante para *vapD* y determinar la capacidad que tiene para persistir dentro de las células AGS, de igual forma hará falta determinar la cantidad de la población intracelular que es capaz de entrar en EVNC y cual se encuentra en fase de muerte empleando técnicas de tinción de células viables con SYTO 9® y yoduro de propidio.

Los mecanismos de inflamación crónica que causan la infección podrían asociarse a la continua expresión de genes de virulencia de *H. pylori* intracelular en EVNC (como *cagA*, *vacA* y *babA*) (14, 32, 40, 44, 48, 49) que a su vez activarán la respuesta inmune del hospedero, originando una continua formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) en el tejido epitelial (53). De igual forma diversos estudios muestran que la bacteria en EVNC contribuye a la proliferación de las células epiteliales y elimina la apoptosis de las mismas. Todos estos factores pueden generar la acumulación de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina en el DNA celular y la escisión de sus bases (55). Al tratarse de una infección crónica, estas mutaciones se irán acumulando con el paso de los años hasta causar una desestabilización nuclear y derivar en cáncer (39, 52, 53, 54). Se requieren estudios futuros para comprender el papel de *vapD* en el desarrollo de las diversas enfermedades gástricas, esto permitirá tomar a *vapD* como marcador genético de cronicidad.

8. Conclusión

Helicobacter pylori es detectada dentro de las células AGS durante las 96 horas del ensayo predominantemente con una morfología cocoide, ésta podría estar relacionada con el estado viable no cultivable (EVNC), sin embargo se necesitaran ensayos de viabilidad y producción de ATP en la bacteria para confirmar que el microorganismo se encuentra en dicho estado y no será eliminado por las células AGS, de igual forma podría evaluarse la proporción de la población que es capaz de entrar en EVNC. La transcripción del gen *vapD* en *H. pylori* intracelular se mantiene durante todo el estudio a pesar del bajo número de células recuperadas en conteo en placa, por lo que se sugiere que *vapD* se expresa de manera constitutiva. Para poder determinar si el gen contribuye a la permanencia intracelular del microorganismo, se necesitará diseñar una cepa mutante para *vapD* y determinar la capacidad que tiene el microorganismo para permanecer de manera intracelular en las células AGS.

9. Bibliografía

- (1) García, A., Salas, M., Herrera, C., González, C. 2014. Biofilm and *Helicobacter pylori*: From environment to human host. World Journal of Gastroenterology, Vol. 20, pp. 5632-5638.
- (2) Alzahrani, S., Lina, T., Gonzalez, J., Pinchuk, I., Beswick, E., Reyes, V. 2014. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. World Journal of Gastroenterology, Vol. 20, pp. 12767-12780.
- (3) Brown, L. 2000. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and routes of transmission. Epidemiologic Reviews, Vol 22, pp. 283-297.
- (4) Suerbaum, S., Michetti, P. 2002. *Helicobacter pylori* infection. The New England Journal of Medicine, Vol. 347, pp. 1175-1186.
- (5) Parsonnet, J. 1998. *Helicobacter pylori*: the size of the problem. Gut, Vol. 43, pp. S6-S9.
- (6) Blaser, M., Parsonnet, J. 1994. Parasitism by the “slow” bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. The Journal of Clinical Investigation, Vol. 94, pp. 4-8.
- (7) Peleteiro, B., Bastos, A., Ferro, A. 2014. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage. Digestive Diseases and Sciences, Vol. 59, pp. 1698-1709.

- (8) Testerman, T., Morris, J. 2014. Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World Journal of Gastroenterology*, Vol. 20, pp. 12781-12808.
- (9) Doyle, M., 2002. *Escherichia coli* O157:H7. En: Doyle, P., Zhao, T., Meng, J., Zhao, S. eds. *Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras*. Zaragoza: Acribia, pp. 177-198.
- (10) Marshall, B., Warren, J. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, Vol. 1, pp. 1311- 1315.
- (11) Moore, M., Lam, A., Bhatnagar, S., Solnick, J. 2014. Environmental determinants of transformation efficiency in *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 196, pp. 337-344.
- (12) Lambert, J., Lin, S., Sievert, W. 1995. High prevalence of *Helicobacter pylori* antibodies in an institutionalized population: evidence for person to person transmission. *American Journal of Gastroenterology*, Vol. 90, pp. 2167-2171.
- (13) Torres, J., Herrera, Y., Perez, G, Gomez, A., Camorlinga, M., Cedillo, R., Tapia, R., Muñoz, O. 1998. A community based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *Journal of Infectious Diseases*, Vol. 178, pp. 1089-1094.
- (14) Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R., Covacci, A. 1996. Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I specific and disease associated virulence factor. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*, Vol. 92, pp. 14648-14653.

- (15) Morales, R., González, G., Delgado, G., Méndez, J., Torres, J., Cravioto, A. 2008. Frequency and characterization of *vapD* gene in *Helicobacter pylori* strains of different *vacA* and *cag-PAI* genotype. *Bioquímica*, Vol. 33, pp. 43-50.
- (16) Bourzac, K., Guillemin, K. 2005. *Helicobacter pylori* host cell interactions mediated by type IV secretion. *Cellular Microbiology*, Vol. 7, pp. 911-919.
- (17) Semino, C., Doi, S., Marty, A., Simko, V., Carlstedt, I., Dubois, A. 2003. Intracellular and interstitial expression of *Helicobacter pylori* virulence genes in gastric precancerous intestinal metaplasia and adenocarcinoma. *Journal of Infectious Diseases*, Vol. 187, pp. 1165-1177.
- (18) Allen, L., Schlesinger, L., Kang, B. 2000. Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 191, pp. 115-127.
- (19) Clyne, M., Drumm, B. 1996. The urease enzyme of *Helicobacter pylori* does not function as an adhesin. *Infection and immunity*, Vol. 64, pp. 2817-2820.
- (20) Lina, T., Alzahrani, S., Gonzalez, J., Pinchuk, I., Beswick, E., Reyes, V. 2014. Immune evasion strategies used by *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*. Vol. 20, pp. 12753-12766.
- (21) Hyuck, G., Min, S., Kyung, Y., Hee, J., Keun, C., Shang, H., Chul, S., Je, M., Kon, W., Ho, K. 1999. Invasiveness of *Helicobacter pylori* into human gastric mucosa. *Helicobacter*. Vol. 4, pp. 77-81.
- (22) Amieva, M., Salama, N., Tompkins, L., Falkow, S. 2002. *Helicobacter pylori* enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. *Cellular Microbiology*. Vol. 4, pp. 677-690.

- (23) Wang, Y., Wu, J., Lei, H. 2009. When *Helicobacter pylori* invades and replicates in the cells. *Autophagy*. Vol. 5, pp. 540-542.
- (24) Jain, S., Bloom, B., Hondalus, M. 2003. Deletion of *vapA* encoding virulence associated protein A attenuates the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. *Molecular Microbiology*, Vol. 50, pp. 115-128.
- (25) Cao, P., Cover, T. 1997. High level genetic diversity in the *vapD* chromosomal region of *Helicobacter pylori*. *Journal of bacteriology*, Vol. 179, pp. 2852-2856.
- (26) Benoit, S., Benachour, A., Taouji, S, Auffray, Y., Hartke, A. 2001. Induction of *vap* genes encoded by the virulence plasmid of *Rhodococcus equi* during acid tolerance response. *Research in Microbiology*, Vol. 152, pp. 439-449.
- (27) Katz, M., Strugnell, R., Rood, J. 1992. Molecular characterization of a genomic region associated with virulence in *Dichelobacter nodosus*, Vol. 60, pp. 4586-4592.
- (28) Cline, S., Saleem, S., Daines, D. 2012. Regulation of the *vapBC-1* toxin-antitoxin locus in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Plos One*, Vol. 7, pp. 1-11.
- (29) Ren, D., Walker, A., Daines, D. 2012. Toxin antitoxin loci *vapBC-1* and *vapXD* contribute to survival and virulence in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *BMC Microbiology*, Vol 12, pp. 1-12.
- (30) Kwon, A., Kim, J., Park, S., Lee, K., Min, Y., Im, H., Lee, I., Lee, K., Lee, B. 2012. Structural and biochemical characterization of HP0315 from *Helicobacter pylori* as a VapD protein with an endoribonuclease activity. *Nucleic Acids Research*, Vol. 40, pp. 4216-4228.

- (31) Koide, T., Vencio, Z., Gomes, S. 2006. Global gene expression Analysis of the heat shock response in the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 188, pp. 5821-5830.
- (32) Antherton, J., Cao, P., Peek, R., Tummuru, M., Blaser, M., Cover, T. 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, pp. 17771-17777.
- (33) Rokbi, B., Seguin, D., Guy, B., Mazarin, V., Vidor, E., Mion, F., Cadoz, M., Quentin, M. 2001. Assessment of *Helicobacter pylori* gene expression within mouse and human gastric mucosae by real time reverse transcriptase PCR. *Infection and immunity*, Vol. 69, pp. 4759-4766.
- (34) Marques, S., Rasmussen, L. 2016. *Helicobacter pylori* and its reservoirs: A correlation with the gastric infection. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*. Vol. 7, pp. 126-132.
- (35) Mendes, J., Santiago, A., Toledo, M, Rosselli-Murai, L., Favaro, M., Santos, C., Horta, M., Crucello, A., Beloti, L., Romero, F., Tasic, L., de Souza, A., de Souza, A. 2015. VapD in *Xylella fastidiosa* is a thermostable protein with ribonuclease activity. *PLOS One*. Vol. 10, pp. 1-14.
- (36) Levine, S., Lin, E., Emara, W., Kang, J., Di Benedetto, M., Ando, T., Falush, D., Blaser, M. 2007. Plastic cell and populations: DNA substrate characteristics in *Helicobacter pylori* transformation define a flexible but conservative system for genomic variation. *The FASEB Journal*, Vol. 21, pp. 3456-3467.
- (37) Morales, R., Fernandez, A., Gonzalez, G., Flores, S., Delgado, G., Mendez, J., Sanchez, E., Muñoz, L., Leon, R., Hernandez, J., Cravioto, A. 2009. *Helicobacter pylori* in the oral cavity is associated with gastroesophageal disease. *Oral Microbiology and Immunology*, Vol. 24, pp. 464-468.

(38) Kellberg, D., Otteman, K. 2016. How *H. pylori* senses, targets and interacts with the gastric epithelium. Environmental microbiology, pp. 1-16.

(39) Cover, T. 2016. *Helicobacter pylori* diversity and gastric cancer risk. American society for microbiology, Vol. 7, pp. 1-9.

(40) Winter, J., Letley, D., Cook, K., Rhead, J., Zaitoun, A., Ingram, R., Amilon, K., Croxall, N., Kaye, P, Robinson, K, Atherton, J. 2014. A role for the vacuolating cytotoxin, VacA, in colonization and *Helicobacter pylori*-induced metaplasia in the stomach. The Journal of infectious diseases, Vol. 210, pp. 954-963.

(41) Liu, H., Semino-Mora, C., Dubois, A. 2012. Mechanism of *H. pylori* intracellular entry: an *in vitro* study. Frontiers in cellular and infection microbiology, Vol. 2, pp. 1-9.

(42) Kwok, T., Backert, S., Schwarz, H., Berger, J., Meyer, T. 2001. Specific entry of *Helicobacter pylori* into cultured gastric epithelial cells via a zipper-like mechanism. Infection and immunity, Vol. 70, pp. 2108-2120.

(43) Xiao-Jung, Y., Ruo-Huang, S., Yu-He, L., Bing-Qiang, M., Ze-Bin, J., Bin, W, Peng, G. 2016. Mir-30 increases intracellular survival of *Helicobacter pylori* through inhibition of autophagy pathway. World Journal of Gastroenterology, Vol. 22, pp. 3978-3991.

(44) Zhang, X., Zhang, J., Lin, Y., Xu, Li, N,m Chen, H. She, F. 2015. Analysis of the relationship between invasive capability of *Helicobacter pylori* and gastroduodenal diseases. Vol. 64, pp. 498-506.

(45) Xu, Y., Jing-Jing, J., Gang, Y., Xu, Q., Zhang, W., Piao, Y., Wang, Y., Yuan, Y. 2011. Changes in biological and virulent characteristics of *Helicobacter pylori* exposed to high salt. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, Vol. 12, pp. 2637-2641

- (46) Tohidpour, A., Gorrell, R., Roujeinikova, A., Kwok, T. 2017. The middle fragment of *Helicobacter pylori* CagA induces actin rearrangement and triggers its own uptake into gastric epithelial cells. *Toxins*, Vol. 9, pp. 1-16
- (47) Wu, J., Eisenberg, J., Valdivieso, M., Baker, L., Xi, C. 2017. Reduced infectivity of waterborne viable but nonculturable *Helicobacter pylori* SS1 in mice. *Helicobacter*. Vol. 22, pp. 1-7.
- (48) Cellini, L. 2014. *Helicobacter pylori*: A chameleon-like approach to life. *World Journal of Gastroenterology*. Vol. 20, pp. 5575-5582.
- (49) Loke, M., Goon, C., Vilashni, Y., Lim, J., Ho, B. 2016. Understanding the dimorphic lifestyles of human gastric pathogen *Helicobacter pylori* using the SWATH-based proteomics approach. *Nature Scientific Reports*, Vol. 6, pp. 1-8.
- (50) Richards, C., Buchholz, B., Ford, T, Broadaway, S., Pyle, B., Camper, A. 2011. Optimizing the growth of stressed *Helicobacter pylori*. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 84, pp. 1-19
- (51) Li, N., Han, L., Chen, J., She, F. 2011. Proliferative and apoptotic effects of gastric epithelial cells induced by coccoid *Helicobacter pylori*. *Journal of Basic Microbiology*, Vol. 53, pp. 147-155.
- (52) Kawanishi, S., Ohnishi, S., Ma, N., Hiraku, Y., Murata M. 2017. Crosstalk between DNA Damage and Inflammation in the multiple steps of carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 18, pp. 1-13.
- (53) Butcher, L., Hartog, G., Ernst, P., Crowe, S. 2017. Oxidative stress resulting from *Helicobacter pylori* infection contributes to gastric carcinogenesis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, Vol. 3, pp. 316-322.

- (54) Miftahussurur, M., Yamaoka, Y., Graham, D. 2017. *Helicobacter pylori* as an oncogenic pathogen, revisited. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, Vol. 19, pp. 1-11.
- (55) Kalisperati, P., Spanou, E., Pateras, I., Korkolopoulou, P., Varvarigou, A., Karavokyros, I., Gorgoulis, V., Vlachoyiannopoulos, P., Sougioultzis, S. 2017. Inflammation, DNA damage, *Helicobacter pylori* and gastric tumorigenesis. *Frontiers in genetics*, Vol. 8, pp. 1-8.
- (56) Muhammad, J. Nanjo, S, Ando, T, Yamashita, S., Maekita, T., Ushijima, T., Tabuchi, Y., Sugiyama, T. 2017. Autophagy impairment by *Helicobacter pylori*-induced methylation silencing of *MAP1LC3A1* promotes gastric carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, Vol. 140, pp. 2272-2283.
- (57) Zhang, X., Zhang, J., Lin, Y., Xu, K., Li, N., Chen, H., She, F. 2015. Analysis of the relationship between invasive capability of *Helicobacter pylori* and gastroduodenal diseases. *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 64, pp. 498-506.
- (58) Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 76, pp. 4350-4354.
- (59) Tajbakhsh, S., Samarbaf-Zadeh, A., Moosavlan, M. 2008. Comparison of fluorescent *in situ* hybridization and histological method for the diagnosis of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples. *Medical Science Monitor*, Vol. 14, pp. 183-187.
- (60) Özbek, A., Özbek, E., Dursun, H., Kakan, Y., Demirci, T. 2010. Can *Helicobacter pylori* invade human gastric mucosa? An *in vivo* study using electron microscopy, immunohistochemical methods, and real-time polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Gastroenterology*, Vol. 44, pp. 416-422.

- (61) Bai, H., Li, Q., Liu, X., Li, Y. 2009. Characteristics and interactions of *Helicobacter pylori* and *H. pylori*-infected human gastroduodenal epithelium in peptic ulcer: A transmission electron microscopy study. *Digestive Diseases and Sciences*, Vol. 55, pp. 82-88.
- (62) Wen, Y., Marcus, E., Matrubutham, U., Gleeson, M., Scott, D., Sachs, G. 2003. Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, Vol. 71, pp. 5921-5939.
- (63) Maisonneuve, E., Shakespeare, L., Jørgensen, M., Gerdes, K. 2011. Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 108, pp. 13206-13211.
- (64) Goeders, N., Van Melderren, L. 2014. Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems. *Toxins*, Vol. 6, pp. 304-324.
- (65) Jyh-Chin, Y., Chien-Wei, L., Chun-Jung, L. 2014. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Current status and future concepts. *World Journal of Gastroenterology*, Vol. 20, pp. 5283-5293.
- (66) Hu, Y., Zhang, M., Lu Bin, Dai, J. 2016. *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance, a continuing and intractable problem. *Helicobacter*, Vol. 21, pp. 349-363.
- (67) Delgado-Sapién, G., Cerritos, R., González-Valencia, G., Mendez, J., Cravioto, A., Morales-Espinosa, R. 2017. Novel VacA s1d signal sequence found in *Helicobacter pylori* from mexican children with recurrent abdominal pain. *Symbiosis*, Vol. 5, pp. 1-7.
- (68) Korch, S., Malhotra, V., Contreras, H., Clark-Curtiss, J. 2015. The *Mycobacterium tuberculosis relBE* toxin:antitoxin genes are stress-responsive modules

that regulate growth through translation inhibition. *Journal of Microbiology*. Vol. 11, pp. 783-795.