



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

PARTICIPACIÓN DEL
INFLAMASOMA EN LA ACTIVACIÓN DE
LA RESPUESTA INMUNE INNATA
INDUCIDA POR *Helicobacter pylori*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

GLORIA ERANDI PÉREZ FIGUEROA

TUTOR(A): DRA. MA. DEL CARMEN MALDONADO BERNAL

COMITÉ TUTOR:

DR. GERMAN RUBÉN. GUTIERREZ AGUILAR
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 04 de octubre de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **PÉREZ FIGUEROA GLORIA ERANDI** con número de cuenta **509014993** con la tesis titulada **"PARTICIPACIÓN DEL INFLAMASOMA EN LA ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA INDUCIDA POR *HELICOBACTER PYLORI*."**, realizada bajo la dirección de la :
DRA. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL

Presidente: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
Vocal: DR. GERMÁN RUBÉN AGUILAR GUTIÉRREZ
Secretario: DRA. MARIA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL
Suplente: DR. JAVIER TORRES LÓPEZ
Suplente: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de noviembre de 2010


DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN
COORDINADOR DEL PROGRAMA

LUGAR DE REALIZACIÓN:

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Unidad de Investigación de Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil "Federico Gómez".

TUTOR:

Dra. Ma. Del Carmen Maldonado Bernal

Investigador Asociado

SNI Nivel 1

Unidad de Investigación de Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil "Federico Gómez"

Agradecimientos

AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS.

A CONACYT por el apoyo económico recibido durante toda la maestría con número (CVU/Becario) 262173/220266.

A MI COMITÉ TUTOR:

DRA. MA. DEL CARMEN MALDONADO. Por todo su apoyo, paciencia y dirección en el trabajo experimental y teórico de este proyecto. Gracias por creer en mí.

DR. GERMÁN R. AGUILAR GUTIÉRREZ Y DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO. Por todos sus comentarios, enseñanzas y contribuciones a mi formación académica así como, a la mejora de este trabajo.

Agradecimientos

A mis **PADRES** por su infinito amor, confianza y apoyo a lo largo de mi vida. Gracias.

A mi hermano **JUAN JAVIER** por enseñarme a ver la vida de otra manera.

A mis **AMIGOS Y FAMILIARES** que hicieron y hacen más ameno el trabajo de laboratorio y mi vida. Los quiero mucho.

A la **DRA. SARA HUERTA** por su apoyo en la parte experimental en el desarrollo de este trabajo.

A **TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE FORMARON Y FORMAN PARTE DE MI VIDA.** Gracias por confiar en mí y darme una razón más para seguir adelante.

"Lo importante de todo es nunca dejar de hacerte preguntas. La curiosidad tiene su propia razón de existir."

Albert Einstein

Dedicatoria

Esta tesis se la dedico a mis **PADRES**, quienes me han guiado, apoyado e impulsado a ser una mejor persona.

Índice

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRAC..... | 2 |
| ABREVIATURAS..... | 3 |
| INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| HELICOBACTER PYLORI | 5 |
| SISTEMA INMUNE INNATO | 9 |
| <i>Neutrófilos</i> | 10 |
| <i>Activación del sistema inmune innato</i> | 15 |
| INFLAMASOMA..... | 16 |
| <i>Mecanismos moleculares de activación del Inflamasoma</i> | 19 |
| <i>IL-1β e IL-18</i> | 20 |
| JUSTIFICACIÓN | 22 |
| HIPÓTESIS..... | 23 |
| OBJETIVO GENERAL | 24 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 24 |
| DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 25 |
| MATERIAL Y MÉTODO | 26 |
| COMPUESTOS QUÍMICOS INDUCTORES DE LA INHIBICIÓN DEL INFLAMASOMA NALP3..... | 26 |
| CEPAS..... | 26 |
| CULTIVO DE <i>H. PYLORI</i> | 28 |
| CULTIVO E INFECCIÓN DE NEUTRÓFILOS | 28 |
| DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD POR CITOMETRIA DE FLUJO..... | 29 |

| | |
|---|-----------|
| CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS | 30 |
| EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS | 30 |
| VIABILIDAD CELULAR Y CITOTOXICIDAD DE KCL, GLIBURIDE Y Z-VAD-FMK | 31 |
| ENSAYOS DE INHIBICIÓN | 32 |
| ANÁLISIS DE PROTEÍNAS | 32 |
| <i>Western Blot</i> | 32 |
| <i>Inmunocitoquímica</i> | 33 |
| DETERMINACIÓN DE CASPASA 1 ACTIVADA | 35 |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO. | 36 |
| RESULTADOS..... | 37 |
| PUREZA DE NEUTRÓFILOS | 37 |
| CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE IL-1 β DE NEUTRÓFILOS INFECTADOS CON LA CEPA TIPO 26695 Y LA MUTANTE 26695 ^{VIRD4} | 38 |
| CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE IL-18 DE NEUTRÓFILOS INFECTADOS CON LA CEPA TIPO 26695 Y LA MUTANTE 26695 ^{VIRD4} | 39 |
| CITOTOXICIDAD DE LA CEPA TIPO 26695 Y LA MUTANTE 26695 ^{VIRD4} | 41 |
| VIABILIDAD DE LOS NEUTRÓFILOS INFECTADOS CON LA CEPA TIPO 26695 Y LA MUTANTE 26695 ^{VIRD4} | 42 |
| CITOTOXICIDAD DE KCL, GLIBURIDE Y Z-VD-FMK..... | 43 |
| PARTICIPACIÓN DEL INFLAMASOMA EN LA PRODUCCIÓN DE IL-1 β E IL-18..... | 45 |
| EXPRESIÓN DE ASC Y NALP3 EN NEUTRÓFILOS HUMANOS INFECTADOS CON H. PYLORI..... | 48 |
| CASPASA 1 ACTIVADA DE NEUTRÓFILOS HUMANOSI. | 55 |
| RESUMEN DE RESULTADOS..... | 57 |
| DISCUSIÓN..... | 58 |
| CONCLUSIONES..... | 67 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 68 |

Resumen

Helicobacter pylori es una bacteria Gram-negativa que coloniza la mucosa gástrica humana, produciendo dolor recurrente en la edad pediátrica y gastritis, ulcera y cáncer en la edad adulta. El proceso inflamatorio crónico es desencadenado por los neutrófilos y macrófagos que son atraídos al sitio de infección, produciendo inflamación en la zona afectada, activando de esta manera el sistema inmune innato a través de los diferentes receptores de reconocimiento patrón (PRRs) que reconocen *H. pylori*; como los receptores tipo-Toll (TLRs) y los receptores tipo NOD (NLRs). Estos últimos, junto con la proteína adaptadora ASC y la caspasa 1, forman un complejo proteico denominado inflamasoma, el cual se encarga de la maduración de las citocinas IL-1 β e IL-18. Sin embargo, actualmente se desconoce la participación del inflamasoma en la producción de dichas citocinas en respuesta a la infección por *H. pylori*. El objetivo de este trabajo fue determinar la participación del inflamasoma en la respuesta inmune innata inducida por *H. pylori*, en neutrófilos humanos. Para ello se hizo la medición cuantitativa de la producción de IL-1 β e IL-18 a través de ELISA, a los tiempos de 1, 3, 6 y 24 h post infección. También se realizaron, ensayos de inhibición del inflamasoma con diferentes inhibidores en los cultivos de neutrófilos a 24h post-infectados con *H. pylori*. La identificación de la proteína NALP3 y ASC fue realizada por Western Blot e inmunocitoquímica. Se observó una producción máxima de IL-1 β a las 24 h de infección, encontrando diferencia estadísticamente significativa a partir de la tercera hora de infección. La producción de IL-1 β inducida por *H. pylori* de las cepas 26695 y la mutante VirD4 tuvo una disminución del 70 y 50 % respectivamente, en presencia de los diferentes inhibidores. Se identificaron las proteínas ASC y NALP3, previamente inducidas en los neutrófilos humanos infectados, lo que sugiere fuertemente que en la producción de IL-1 β inducida por *H. pylori* participa el inflamasoma NALP3.

Abstract

Helicobacter pylori is a Gram negative bacteria that colonizes the human gastric mucosa causing a recurrent pain in the early age and gastritis, peptic ulcer, and cancer in the adulthood. The chronic inflammatory process is triggered by neutrophils and macrophages that are attracted to the site of infection, initiating inflammation in the affected area and activation of the innate immune system through different PRRs that recognize *H. pylori*. The TLRs and NOD-like receptors are key molecules involved in the activation of inflammasome. The adapter protein ASC and caspase 1 associate with NOD-like receptors to form the complex called inflammasome. This complex is involved in the processing of the cytokines IL-1 β and IL-18. However, it is not known if the inflammasome participates in the production of these cytokines in response to infection by *H. pylori*. So, the aim of this work was to determine the involvement of the inflammasome in the innate immune response induced by *H. pylori* in human neutrophils. For this purpose, the production of IL- β and IL-18 at 1, 3, 6 and 24 h post infection, was quantitated by ELISA. On the other hand, inhibition assays using different chemical compounds that inhibit to the inflammasome (KCl, glyburide and Z-VAD-fmak) were made in culture of neutrophils infected with *H. pylori* 24 h post-infection. NALP3 and ASC proteins were identified by Western blotting and immunocytochemistry. Our results show that *H. pylori* induce high levels of IL-1 β in a time-dependent way. The maximum peak production was observed 24 h post infection with a statistically significant difference since the third hour of infection. The production of IL-1 β induced by *H. pylori* strains 26695 and VirD4 mutant was inhibited from 70 to 50% respectively in presence of two chemical compounds and inhibitor of caspase 1 inhibitor. The identification of ASC and NALP3 proteins in infected human neutrophils suggest that the NALP3 (NLRP3) inflammasome is involved in IL-1 β production after the infection of human neutrophils with *H. pylori*.

Abreviaturas

| | |
|---------------|--|
| ASC | Del inglés “Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD” |
| Bab A | Adhesina de unión a antígeno de grupo sanguíneo |
| BIR | Del inglés “Baculovirus IAP repeat” |
| BSA | Albúmina sérica bovina. |
| CagA | Antígeno A asociado a citotoxina |
| CARD | Dominio de reclutamiento a caspasas |
| CITTA | Transactivador del complejo principal de histocompatibilidad clase II. |
| DAB | Diamino benzidina. |
| DAMPs | Patrones moleculares asociados a daño. |
| DF | Por sus siglas en inglés “domain-fold” |
| ELISA | Ensayo inmunoenzimático de enzima ligada. |
| ERK | Por sus siglas en inglés “extracellular signal regulated” |
| FLT | Tirosin cinasa tipo FMS. |
| G-CSF | Factor estimulador de colonias de granulocitos. |
| GM-CSF | Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos. |
| HGF | Factor de crecimiento de los hepatocitos. |
| Hp-Nap | Proteína activadora de neutrófilos de <i>H. pylori</i> . |
| ICE | Enzima convertasa-IL-1 β . |
| INOS | Oxido nítrico sintasa inducible. |
| INT | Sales de tetrazolio. |
| IPAF | Factor activador de proteasas. |
| LF | Factor letal. |
| LPS | Lipopolisacárido. |
| LRR | Repetidos ricos en leucina. |
| LTA | Ácido lipoteicoico. |
| MALT | Tejido linfoide asociado a mucosa |
| MAMPs | Patrones moleculares asociados a microorganismos. |
| MBL | Lectina unidora de manosa. |
| MCP | Proteína quimioatrayente de monocitos. |

| | |
|--------------------------------|--|
| MD | Diferenciación mieloide. |
| MDP | Muramil dipéptido. |
| MIP | Proteína inflamatoria de macrófago. |
| NAIP | Proteína inhibidora de apoptosis neuronal |
| NK | Por sus siglas en inglés “natural killer”. |
| NLR | Receptor tipo NOD. |
| NOD | Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos. |
| NOS | Especies reactivas de nitrógeno. |
| PRRs | Receptores de reconocimiento patrón. |
| PYD | Dominio pirina. |
| ROS | Especies reactivas del oxígeno. |
| TGF | Factor de crecimiento transformante. |
| TLR | Receptor tipo-Toll. |
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral alfa. |
| TREM | Por sus siglas en inglés “Triggering receptor on myeloid cell” |
| TRPM2 | Receptor potencial M2. |
| UFC | Unidades formadoras de colonia. |
| VacA | Toxina vacuolizante. |

Introducción

Helicobacter pylori

Helicobacter pylori es una bacteria Gram-negativa que coloniza la mucosa gástrica humana, un nicho ecológico único, caracterizado por un pH muy ácido, el cual es una condición letal para la mayoría de los microorganismos. Sin embargo, *H. pylori* está, tan bien adaptada a este entorno hostil que después de la infección, que ocurre generalmente en los primeros años de vida, se establece una infección crónica permanente, en la que genera una respuesta inflamatoria en el hospedero que produce desde una gastritis asintomática, a una patología más compleja como: úlcera péptica, linfoma MALT o carcinoma gástrico (Fontham, 1995; van Doorn, 1998; Montecucco, C. y Rappuol, 2001; Paniagua y cols., 2009).

La selección de un nicho sin competencia y la capacidad de establecer una infección crónica, hace a *H. pylori* una de las bacterias productoras de infección humana más exitosas, colonizando más de la mitad de la población mundial con una prevalencia del 30 al 50 %, en países desarrollados y mayor al 80% en países en desarrollo. En México, la seroprevalencia de acuerdo a datos reportados en 1998 es del 66% en población entre 1 y 90 años de edad (Torres y cols., 1998, Paniagua y cols., 2009). La colonización exitosa y persistencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica humana se logra mediante una combinación de un conjunto único de factores de virulencia que *H. pylori* ha creado. Entre los factores que contribuyen a la patogénesis de *H. pylori* se incluyen: la ureasa, los flagelos, la adhesión y las moléculas efectoras como CagA y VacA (Bernard y cols., 2004).

H. pylori durante la infección produce grandes cantidades de ureasa, lo que le permite protegerse del medio ambiente ácido del estómago a través de la hidrólisis de la urea. Su forma helicoidal y la acción de sus flagelos permiten cruzar la gruesa capa de mucosa que recubre el estómago. Se une a antígenos de LEWIS presentes en las células gástricas del hospedero y secreta factores que atraen y estimulan a las células inflamatorias como proteasas, citotoxinas y fosfolipasas, que son las responsables principales del daño a la mucosa. Entre las moléculas quimiotácticas y activadoras del sistema inmune se encuentran la toxina vacuolizante (VacA), la cual induce *in vitro* la vacuolización de las células infectadas, así como la inducción de apoptosis de las mismas. Por otra parte, también se encuentran las proteínas de adhesión como adhesina de unión a antígeno de grupo sanguíneo (BabA), que están implicadas en la fase inicial de colonización, mediante la interacción entre la bacteria y la superficie celular del hospedero (Testerman y cols., 2001, Paniagua y cols., 2009), la proteína activadora de neutrófilos de *H. pylori* (Hp-Nap) que además de mediar su unión con la superficie de la célula del hospedero, atrae a los neutrófilos produciendo inflamación en la zona afectada, activando al sistema inmune innato del hospedero; otra molécula activadora del sistema inmune es la proteína efectora antígeno A asociado a citotoxina (CagA), la cual es codificada por el gen *cagA* el cual forma parte de una región cromosomal de 38-40 Kb, que contiene 31 genes asociados a virulencia, denominada isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*); de los cuales aproximadamente 12 de estos genes conforman el sistema de secreción tipo IV, un sistema de exportación especializado en la transferencia de proteínas y peptidoglicana a otras células (Montecucco y Rappuol, 2001; Philpott y cols.,

2002). En el sistema de secreción Tipo IV, se han descrito 12 proteínas homólogas al sistema VirB/D de *Agrobacterium tumefaciens*, entre las que se encuentran la HP0524 (VirD4/Cag5) y la HP0544 (VirB4/CagE/PicB) (Saito y cols., 2005). El sistema de secreción Tipo IV consta de lo siguiente: (1) un núcleo que comprende el complejo proteico VirB6, VirB7, VirB8, VirB9, VirB10 y probablemente VirB3, que pueden formar un canal de translocación a través de las membranas bacterianas, (2) dos componentes que construyen una estructura periplasmática o pilus extracelular (VirB2 y VirB5), (3) dos proteínas asociadas a ATPasa que proporciona la energía para el ensamble y/o transporte del sustrato (VirB4 y VirB11), (4) una peptidoglicana hidrolasa (VirB1) que facilita el ensamblaje del canal de transporte/translocación y (5) la proteína VirD4, la cual es requerida como un receptor de señal de secreción y posiblemente como un sustrato translocador de ADN (Saito y cols., 2005, Kutter y cols., 2008).

H. pylori induce a las células del sistema inmune a producir citocinas de respuesta Th1 tales como: factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β , IL-6, IL-8, así como también IL-10, interferon gamma (IFN- γ), factor de activación plaquetario (PAF) y especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (Algood y Cover., 2006) que se sabe son parte fundamental en el desarrollo de la respuesta inflamatoria del hospedero (Figura 1).

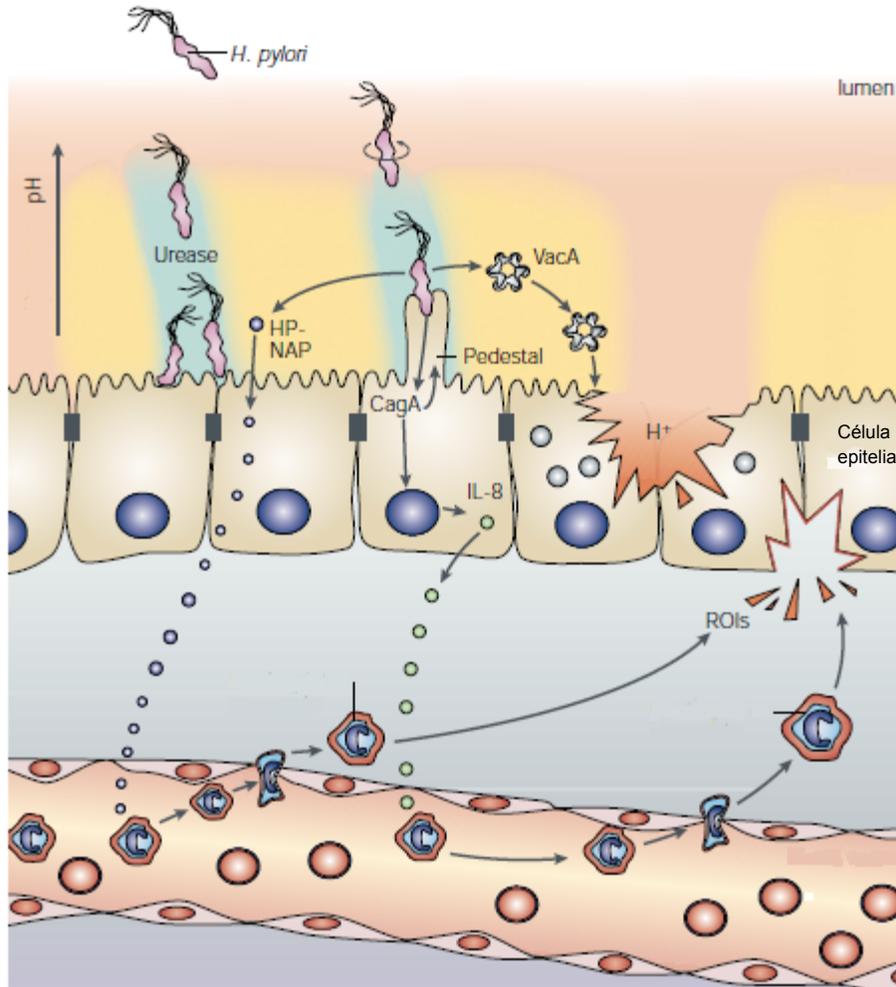


Figura1. Representación gráfica de la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* y factores de virulencia. Durante la infección, la bacteria entra en la luz gástrica, produce ureasa permitiéndole sobrevivir en el medio ambiente ácido (el rosa indica un ambiente fuertemente ácido y el amarillo una leve acidez) mediante la producción de moléculas de amoníaco, cambiando el pH citosólico y periplásmico. Los flagelos impulsan a la bacteria helicoidal en la capa de moco y dejan que alcance el dominio apical de las células epiteliales gástricas. *H. pylori* inyecta la proteína CagA en las células del hospedero mediante el sistema de secreción tipo IV, al Inyectar a la proteína CagA, causa alteración del citoesqueleto, formación de los pedestales y da señales al núcleo para liberar citocinas proinflamatorias, que amplifican la respuesta inflamatoria con el reclutamiento de linfocitos. También secreta factores tóxicos como la proteína activadora de neutrófilos (HP-NAP) y VacA. VacA induce alteraciones de uniones estrechas y la formación de vacuolas de gran tamaño. HP-NAP atraviesa el revestimiento del epitelio recluta neutrófilos y monocitos.

Sistema Inmune Innato

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra infecciones microbianas y es el sistema más antiguo de defensa desde el punto de vista filogenético, el cual ha evolucionado en sintonía con los microorganismos para proteger de infecciones a todos los organismos pluricelulares, incluyendo plantas e insectos. El sistema inmune innato tiene dos funciones importantes: la primera de ellas es ser la primera respuesta establecida por el organismo frente a los microorganismos, impidiendo, controlando o eliminando la infección en el hospedero; la segunda función es estimular la respuesta inmune adaptativa permitiéndole al organismo generar una respuesta con mucha mayor eficacia contra los diversos tipos de microorganismos (Abbas y cols., 2008).

La respuesta inmune innata requiere la actuación de varios mecanismos y elementos:

1. Barreras físicas, químicas y biológicas: entre ellas, la piel y las mucosas, diferentes enzimas de secreciones corporales (lisozima, lactoperoxidasa, etc.) y la microbiota comensal (intestinal, vaginal, etc.) (O'Hara y Shanahan, 2006), correspondiente a cada órgano o sistema.

2. Factores solubles: cuyos principales componentes son el complemento, las proteínas de inflamación y las citocinas.

3. Células: incluyendo, las células fagocíticas, tanto polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), como mononucleares (macrófagos y células dendríticas), y células asesinas como NK (natural killer) y linfocitos citotóxicos.

Las barreras externas (físicas, químicas y biológicas) actúan, todas ellas, de forma constante como primer nivel de defensa, impidiendo la entrada de los microorganismos hacia el interior del organismo y su proliferación. En el supuesto que el agente extraño supere estas barreras se produce la activación de los mecanismos innatos internos (factores solubles y el componente celular) tratando de evitar su establecimiento, desarrollo y acción patógena.

Neutrófilos

Los neutrófilos, también denominados micrófagos o polimorfonucleares (PMN), son glóbulos blancos de tipo granulocito que miden de 12 a 18 μm y es el tipo de leucocito más abundante en sangre periférica en el ser humano, constituyendo del 40 al 70% del total de las células del sistema inmune en condiciones normales (Kuijpers y Roos, 2001). El tiempo de maduración de los neutrófilos es alrededor de dos semanas en la médula ósea, en presencia de los factores de crecimiento mieloides específicos de granulocitos: factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), jugando un papel importante en este proceso (Kuijpers y Roos, 2001). Su periodo de vida media es corto, de 48 a 72 horas. Son la primera estirpe celular del sistema inmune en llegar al sitio de infección; y se caracterizan por su capacidad antimicrobiana y antifúngica otorgada por sus componentes celulares: péptidos antimicrobianos, enzimas proteolíticas específicas de neutrófilos, así como su producción de especies reactivas del oxígeno y trampas extracelulares conocidas como NETs (Kuijpers y

Roos, 2001; Borregaard y cols., 2007; Soehnlein y Lindbom., 2010). Entre los componentes celulares que el neutrófilo va expresando a lo largo de la mielopoyesis y diapédesis además de los gránulos proteolíticos y antimicrobicidas (gránulos azurófilos, gránulos específicos), se encuentran los receptores de multilinaje, algunos PRRs, los miembros de la familia de receptores tipo inmunoglobulinas (LIR 1-4, 6, 7 y 9), receptores Fc para IgG, IgA e IgE, quimiocinas y citocinas (Tabla 1), que permiten determinar la complejidad del neutrófilo en diferentes fases de su ciclo de vida.

Tabla 1. Perfil de Expresión de Moléculas del Neutrófilo durante la mielopoyesis y diapédesis.

| | Medula Ósea | Torrente sanguíneo | Tejido Infectado/Dañado |
|---|--|---|-------------------------|
| Gránulos proteolíticos y antimicrobianos | Gránulos azurófilos | | Gránulos azurófilos |
| | Gránulos específicos | | Gránulos específicos |
| | Gránulos gelatinosos | | Gránulos gelatinosos |
| Receptores | Receptores de multilinaje HGF: c-kit, FLT-3 (Borregaard y cols., 2007) | | |
| | | Restricción de linaje: GM-CSFR, G-CSFR, IL-6R. | |
| | | Receptores para citocinas y quimiocinas: IFN- α 1 y 2, IFN- γ 1 y 2, IL-(1, 4, 6, 10, 13, 17, 18) R, TNFR-1 y 2, TGF- β R2, IL-8R (CXCR-1). | |
| | | Receptores para las inmunoglobulinas IgG, IgA e IgE, Receptores para el reconocimiento de microorganismos: TLRs 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, CD14, MyD88, MD-2, TREM, y NLRs (Borregaard y cols., 2007; Alvares-Arellano y cols., 2007; Ekman y Cardell, 2010) | |
| Citocinas y Quimiocinas | | IL-1 α y β , IL-8, TNF, VEGF, MIP-1 α (CCL3), MIP-2 α (CXCL2) (Borregaard y cols., 2007). | |

Abreviaciones: FLT, tirosin cinasa tipo FMS; G-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos; GM-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos; HGF, factor de crecimiento de los hepatocitos; IL, interleucinas; IFN, interferón; MCP, proteína quimioatrayente de monocitos; MD, diferenciación mieloide; MIP, proteína inflamatoria de macrófago; TGF, factor de crecimiento transformante; TLR, receptores tipo-Toll; TNF, factor de necrosis tumoral; TREM, por sus siglas en ingles "Triggering receptor on myeloid cell"

Los neutrófilos, al igual que los macrófagos y monocitos son participes de la aparición, progresión y resolución de la inflamación, que por definición es un proceso estrictamente regulado, en el que existe una gran dilatación de los vasos sanguíneos y efectos quimiotácticos, permitiendo el paso de líquido, sustancias y células desde la sangre a los tejidos, por lo que éstos aumentan de volumen y temperatura, teniendo como función principal la eliminación de patógenos y tejido dañado, para restaurar la homeostasis del tejido (Soehnlein y Lindbom, 2010).

En este proceso inflamatorio los neutrófilos cambian su fenotipo cada vez que son activados por productos microbianos y/o moléculas quimiotácticas, dando como resultado la expresión de poderosas actividades antimicrobianas y secreción de moléculas quimiotácticas y proinflamatorias (Tabla 2).

Tabla 2: Cambios fenotípicos del neutrófilo en la inflamación.

| | Neutrófilos en reposo | Neutrófilos en proceso inflamatorios |
|---|------------------------------|---|
| Localización | Medula ósea y sangre | Sitios inflamados |
| Vida media | 6-12 h | 24- 48 h |
| Incremento en la movilización de Ca ²⁺ | - | + |
| Actividad anti microbicida | - | + |
| Citotoxicidad | - | + |
| Liberación de gránulos | - | + |
| Secreción de citocinas proinflamatorias | - | + |
| Secreción de quimiocinas para neutrófilos y monocitos | - | + |
| Inducción de la activación de monocitos y macrófagos | - | + |

Tomado de Silva, 2010.

En infecciones ocasionadas con *H. pylori* se ha reportado una correlación entre la degradación de la mucosas con la infiltración de neutrófilos (Montecucco y Rappuoli, 2001) y un cambio en la expresión de sus receptores TLR2 y TLR4, así como, un aumento significativo en la secreción de las citocinas proinflamatorias IL-8, IL-1 β y TNF- α , a los tiempos de 3, 6 y 24 h del reto con la bacteria (Alvares-Arellano y cols., 2007).

Activación del sistema inmune innato

El sistema inmune innato es activado por productos o constituyentes que son invariantes en los microorganismos de una determinada clase y que a su vez son esenciales para su sobrevivencia. Estas moléculas son llamadas patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), algunos ejemplos son: el lipopolisacárido (LPS), las lipoproteínas, el ácido lipoteicoico (LTA), las peptidoglicanas, los lipopéptidos, la flagelina y los ácidos nucleicos como el ADN el RNA bacteriano o viral entre otros (Kaisho y Akira, 2006). Además de estas moléculas, el sistema inmune innato también reconoce señales de daño, generadas por las células, en respuesta a las condiciones patogénicas y a la muerte celular por necrosis. Estas moléculas son llamadas patrones moleculares asociados a daños (DAMPs).

Los receptores que reconocen a los MAMPs y a los DAMPs son llamados receptores de reconocimiento patrón (PRRs). Existe una gran variedad de PRRs como son los receptores tipo-Toll (TLRs), la lectina unidora de manosa (MBL), los receptores dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD), los receptores tipo NOD (NLRs), entre otros. Los PRRs pueden ser expresados en la superficie celular o en los compartimentos intracelulares, principalmente en células del sistema inmune como neutrófilos, células dendríticas, células NK, células epiteliales, células cebadas, monocitos/macrófagos y linfocitos. También estos receptores pueden ser secretados a la circulación sanguínea o bien encontrarse en fluidos tisulares. Se sabe que *H. pylori* puede ser reconocido a través de los distintos PRRs presentes en las células del hospedero, entre los cuales se

encuentran los receptores tipo-Toll, TLR2 que reconoce LPS, y TLR5 que reconoce flagelina, así como también NOD 1 que reconoce la peptidoglicana (Smith y cols., 2003; Warren y Aderem, 2007).

Inflamasoma

Los NLRs pertenecen a una familia de receptores citoplasmáticos, compuesta de 22 miembros, los cuales incluyen a 5 receptores de la familia de NOD, 14 miembros de la familia NALP, a IPAF (factor activador de proteasas ICE), a NAIP (Proteína inhibidora de apoptosis neuronal) y a CIITA (transactivador del complejo principal de histocompatibilidad clase II). La familia de los NLRs tiene una composición estructural única, de un dominio central de unión a nucleótidos (NBS o NOD) denominado NATCH (dominio de oligomerización), el cual se encuentra entre un dominio N-terminal de unión a proteínas (CARD) (dominio de reclutamiento a caspasas), PYD (dominio pirina) o BIR (del inglés Baculovirus IAP repeat) y un dominio C-terminal con repeticiones de 22-28 repetidos ricos en leucina (LRR), el cual es el dominio de reconocimiento del ligando (Petrilli y cols., 2007; Franchi y cols., 2009; Pedra y cols., 2009). Los dominios CARD y PYD también son miembros de la superfamilia de muerte DF, (por sus siglas en inglés Domain-fold), que incluye a los dominios de muerte, así como, también a sus efectores. Se caracterizan por tener 6 α -hélices que están altamente empaquetadas; ambos dominios median interacciones homofílicas entre otras moléculas atraídas por estos motivos (Chamaillard y cols., 2003; McIntire y cols., 2009; Chen y cols., 2009).

Recientemente, se observó que la familia de los NALPs, pertenecientes a la superfamilia de los NLR, forman un complejo multiproteico de aproximadamente 700 kDa, denominado inflamasoma, al interactuar con la caspasa 1 ó 5 y la molécula ASC (del inglés Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD). Estos complejos proteicos se expresan en células del sistema inmune tales como: granulocitos, monocitos, células dendríticas, linfocitos B y T (Kummer y cols., 2007). Son responsables de la maduración y secreción de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-18 e IL-33 (Stehlik y Dorfleutner y cols., 2007; Pétrilli y cols., 2007; Pedra y cols., 2009).

Hasta la fecha se han identificado tres tipos de inflamasomas: NALP1, NALP2/3 e IPAF, de los cuales el más estudiado es NALP3.

1) Inflamasoma NALP1.

El inflamasoma NALP1, también llamado NLRP1, DEFCAP, NAC, CARD7 y CLR17.1, está integrado por NALP1, ASC, caspasa-1 y caspasa-5; se ha reportado que este complejo multiproteico reconoce peptidoglicanos y toxinas microbianas como el factor letal (LF) de *Bacillus anthracis* y es expresado por la mayoría de las células del sistema inmune y por estructuras epiteliales glandulares del estómago, pulmón y testículo, entre otros (Kummer y cols., 2007, Lamkanfi y Dixit, 2009). Es un blanco importante en la regulación de la actividad de las caspasas 1 y 5, que a su vez modulan la actividad de la IL-1 β en desordenes autoinmunes (Tai'eb, 2009).

2) Inflamasoma NALP2/3

El inflamasoma NALP2/3 está conformado por NALP2 ó 3 y CARDINAL (CARD inhibidor de ligandos que activan NF- κ B). En específico, el Inflamasoma NALP3, también conocido como criopirina, NLRP3, CIASI, PYPAF1 y CLRL1, tiene una distribución y expresión en tejidos es más restringida, ya que se expresa principalmente en neutrófilos, piel y ojos (Kummer y cols., 2007). Entre los ligandos descritos para este inflamasoma, se encuentran el LPS de *E. coli*, muramil dipéptido (MDP), la peptidoglicana, el DNA de bacterias y virus, el RNA viral incluyendo el RNA de doble cadena, las toxinas microbianas, la propia bacteria (*S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*) o virus (Sendai, Influenza) y DAMPs como: especies reactivas del oxígeno, cristales de ácido úrico, ATP (vía receptores P2X7), entre otros. También se ha sugerido que el inflamasoma NALP3, responde a cambios de concentraciones de potasio, que son producidos por algunas bacterias por ejemplo; la toxina marina maitotoxina y el ionoforo antiportador K⁺/H⁺ (Chen y cols. 2009).

3) Inflamasoma IPAF

El inflamasoma IPAF, también conocido como NLRC4, NLR4, CARD12, CLR 2.1 y CLAN, se encuentra conformado por la proteína IPAF y la caspasa-1, tiene como ligando descrito a la flagelina de *Salmonella*, *Shigella*, *Legionella* y *Pseudomonas*, que se sabe tienen un sistema de secreción tipo III o IV, por el cual pudieran estar introduciendo la flagelina (Martinon y Tschopp, 2007; Sutterwala y cols., 2007; Lamkanfi y Dixit, 2009; Pedra y cols., 2009).

Mecanismos moleculares de activación del Inflamasoma

Poco se sabe de los mecanismos de activación del inflamasoma. Sin embargo, se ha propuesto que éste puede ser activado de manera directa o indirecta, de forma muy similar al mecanismo involucrado en los NLRs; en el cual estos receptores al encontrarse estratégicamente en la región citoplasmática, pueden responder a las bacterias que evaden la detección extracelular por los TLRs, a los componentes secretados al citosol de la célula hospedera, inyectados a través del sistema de secreción o bien por la formación de poros, también pueden activarse al detectar los productos bacterianos fagocitados por células del sistema inmune (Chen y cols., 2009). Se sabe que IPAF y NALP3 se unen selectivamente a ATP/dATP para su oligomerización a través del dominio NACH (Martinon y cols. 2009). Este es un modelo de activación del inflamasoma a través de los receptores P2X7R, los cuales son canales de iones dependientes de ATP, que conducen potasio a través de la membrana y que a su vez, pueden abrir poros de panexina 1, generando especies reactivas de oxígeno, así como, también altas concentraciones de potasio intracelular; que son detectados por el inflamasoma llevando a la oligomerización de los NLRs, y reclutamiento de ASC y caspasa 1 ó 5 (Bryant y Fitzgerald, 2009.). También se ha propuesto al complejo HSP90-SGT1, como regulador de la activación del inflamasoma, el cual actúa de manera similar a las proteínas ortólogas en plantas, encargadas de la regulación de los NLRs (Martinon y cols., 2009).

IL-1 β e IL-18

La IL-1 β es una citocina de 17 kDa, que se sintetiza en el citoplasma como una molécula de 31 kDa la cual es madurada, procesada y liberada de las células por un mecanismo que implica una enzima llamada endoproteasa, enzima convertasa-IL-1 β (ICE), ahora conocida como la caspasa-1. Pro-IL-1 β es biológicamente inactiva y debe convertirse a su forma madura de 17 kDa para adquirir la capacidad de unirse a receptores y activar a otras estirpes celulares. Esta citocina también es considerada como pirógeno endógeno, producida principalmente por diferentes estirpes del sistema inmune como monocitos y neutrófilos, entre otros (Arend y cols., 2008). La IL-1 β es una citocina multifuncional potente que actúa como eje central en la regulación de la respuesta inmune inflamatoria, que en altas concentraciones es causante de enfermedades autoinflamatorias como la artritis reumatoide o diabetes (Dinarello y cols., 2010).

Normalmente, la IL-1 β es activada en respuesta a una infección, daño y cambios inmunológicos como los que provoca *H. pylori*. Esta citocina es considerada como un mediador clave en la respuesta inflamatoria ya que a concentraciones bajas produce fiebre, neutrofilia y producción de citocinas proinflamatorias adicionales como IL-6 e IL-8. También tiene actividad quimotáctica sobre los granulocitos y promueve la expresión de los genes que la producen, así como, de la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y de ciertos protooncogenes como *c-fos* y *c-jun* (Pétrilli y cols., 2007).

La IL-18 también es una citocina proinflamatoria, producida principalmente por macrófagos/monocitos y linfocitos T, perteneciente a la familia de IL-1, anteriormente llamada factor inductor de interferon gama; es una citocina pleitrópica que actúa en procesos tanto relacionados con la inmunidad innata como la adquirida. Se produce como un precursor inactivo de 24 KDa (pro-IL-18) el cual se rompe después de Asp35 por la caspasa-1 para generar una citocina biológicamente activa, madura de 18 kDa. Sin embargo, la participación de caspasa1 en la maduración de pro-IL-18 no es exclusiva, ya que reportes recientes indican que la proteinasa 3, también puede generar actividad biológica de la pro-IL-18 (Gracie y cols., 2003).

La IL-18 actúa sinérgicamente con la IL-12, favoreciendo la diferenciación de los linfocitos T hacia la estirpe celular de tipo Th1 e induciendo la producción de IFN- γ por las células T, las NK y los macrófagos. Sumado a estos efectos, actúa directamente como citocina proinflamatoria promoviendo la síntesis de IL-1 β , IL-8 y la expresión de moléculas de adhesión. La IL-18 también es capaz de estimular la producción del factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos, del TNF- α y de la iNOS, por las células mononucleares y mesenquimales (Akhtar y cols., 2009).

Justificación

Helicobacter pylori tiene diversos factores de virulencia como el sistema de secreción tipo IV que le han permitido colonizar la mucosa del estómago y activar al sistema inmune. En los neutrófilos humanos, *H. pylori* induce la producción de las citocinas proinflamatorias IL-8, TNF- α e IL-1 β . En la producción de las dos primeras participan el TLR2 y el TLR4. Sin embargo, la producción de IL-1 β es independiente de estos receptores y se desconoce el mecanismo de inducción de esta citocina. En la mayoría de las estirpes celulares del sistema inmune, el inflamasoma promueve la maduración de IL-1 β . En el neutrófilo se ha demostrado la presencia del inflamasoma NALP-3 que se activa cuando se expone al LPS, sin embargo, no se conoce la participación del inflamasoma en la maduración de IL-1 β e IL-18, cuando el neutrófilo es infectado por *H. pylori* y si esta maduración depende del sistema de secreción tipo IV de la bacteria.

Hipótesis

La producción de IL-1 β e IL-18 por neutrófilos infectados con *H. pylori*, es inducida con la participación del inflammasoma NALP3 y de forma independiente del sistema de secreción tipo IV de la bacteria.

Objetivo General

Determinar la participación del inflamasoma NALP3 en la respuesta inflamatoria inducida por *H. pylori* en neutrófilos humanos.

Objetivos Específicos

1. Determinar la producción de IL-1 β e IL-18 en neutrófilos humanos infectados con las cepas de *H. pylori* 26695 (cepa tipo) y la mutante 26695^{virD4-} (modificada en la transportación del sistema de secreción tipo IV).
2. Determinar la expresión de los componentes del inflamasoma NALP3, (NALP3, ASC y Caspasa-1) en neutrófilos humanos estimulados con las cepas de *H. pylori* 26695 y la mutante 26695^{virD4-}.
3. Determinar la participación de NALP3 y caspasa-1 sobre la producción de IL-1 β e IL-18 inducidas por *H. pylori* en neutrófilos.

Diseño Experimental

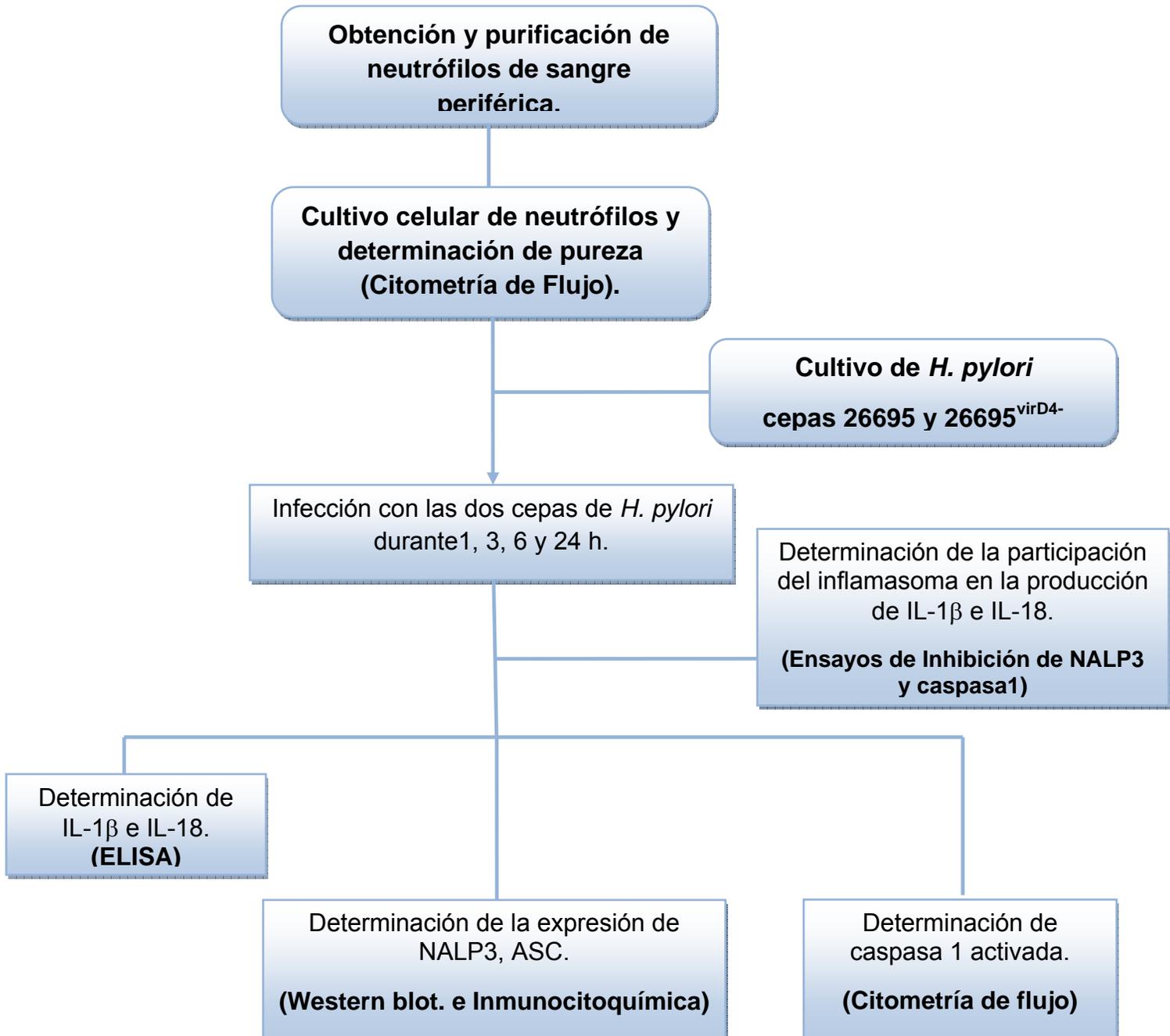


Figura 2: Diagrama de flujo de las fases del diseño experimental seguido en el presente trabajo.

Material y Método

Material:

Compuestos químicos inductores de la inhibición del inflamasoma NALP3

KCl: Haluro metálico compuesto de potasio y cloro que permite cambiar la osmolaridad de la célula por la concentración de potasio; las concentraciones utilizadas fueron 10, 20, 40 mM. Bloquea la activación de NALP3 (Sigma, USA).

Gliburide: También conocido como glibenclamida, N-*p*-[2-(5-Chloro-2-methoxybenzamido) ethyl-benzenesulfonyl-N'-cyclohexylurea, 5-Chloro-N-[4-(cyclohexylureidosulfonyl) phenethyl]-2methoxybenzamide, es una sulfonilurea que bloquea los canales de K⁺ sensibles a ATP (KATP). Las concentraciones utilizadas para este proyecto fueron 50, 100, 200 μM. Bloquea la activación de NALP3 (Sigma, USA).

Z-VAD-FMK: Inhibidor celular permeable de caspasa 1, con secuencia Z-Tyr-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone) y formula C₃₁H₃₉FN₄O₉ que inhibe la inducción de apoptosis, uniéndose a la región catalítica de caspasa 1; las concentraciones usadas fueron 5, 10 y 20 μM. (Promega, USA).

Cepas:

***Helicobacter. pylori* 26695.** Cepa tipo obtenida de un paciente ingles que padecía gastritis crónica a la cual se le ha secuenciado su genoma en su totalidad (ATCC 700392).

***Helicobacter. pylori* 26695^{VirD4-}** Cepa isogénica de la cepa 26695 mutada en la proteína VirD4, componente del sistema de secreción tipo IV que funciona como ATPasa para la traslocación de proteína CagA y material genético de *H. pylori*. Donadas por la Dra. Salama, División de Biología Humana, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington.

Línea celular THP-1: La línea celular THP-1 procede de un paciente con leucemia monocítica aguda. Estas células expresan marcadores característicos de los monocitos y poseen receptores Fc y C3b, con alta capacidad fagocítica. (Donadas por el Dr. Enrique Ortega; Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).

Método:

Cultivo de *H. pylori*

Se cultivaron las cepas tipo 26695 y la cepa isogénica mutante 26695^{virD4} de *H. pylori* en medio gelosa sangre al 5%. Las placas se incubaron a 37 °C con 9% de CO₂ y 5% de humedad. Para su uso, la bacteria fue suspendida en solución salina y centrifugada a 1500 rpm por 5 min para eliminar residuos del cultivo. Posteriormente se resuspendió en solución salina al 0.9% y la densidad óptica de la suspensión se determinó por espectrofotometría, a una longitud de onda de 550 nm, ajuntándola a una absorbancia final fue ajustada a 0.75, correspondiente a 1X10⁹ bacterias/mL.

Cultivo e infección de Neutrófilos

Los neutrófilos se obtuvieron a partir de sangre periférica de tres donadores sanos y seronegativos para *H. pylori*, mediante gradiente de densidad utilizando Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway). A partir del concentrado leucocitario, se realizó una dilución 1:4 con solución salina (NaCl al 0.09%). Posteriormente se depositó en una proporción 1:3 con Lymphoprep, en tubos Falcon de 50 mL. Se centrifugó a 2,000 rpm durante 30 min a temperatura ambiente con desaceleración y aceleración mínima; obteniendo tres fases de la cual solo se recuperó la fase inferior, correspondiente a los polimorfonucleares y eritrocitos. Para la eliminación de los eritrocitos, se lavó con solución de lisis (NH₄Cl 155 mM, NaHCO₃ 10 mM y EDTA 0.1 mM) dos veces, a una velocidad de 1500 rpm por 10 min.

Se analizó la viabilidad celular mediante la tinción con azul tripán y se determinó la pureza mediante citometría de flujo, empleando un anticuerpo anti-CD16b como marcador específico, con el cual se obtuvo una pureza $\geq 98\%$. Posteriormente, se cultivaron los neutrófilos en placas de cultivo de 6 pozos (Nunc) a una densidad de 5×10^6 células/mL, sembrando las células correspondientes en dos mL en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies) suplementado con 5,000 U/mL de penicilina-estreptomicina y 2% de suero fetal bovino (SFB, Gibco BRL, Life Technologies). Las células se incubaron a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂ y 5% de humedad. Después de 18 horas, las células fueron infectadas con las cepas tipo 26695 e isogénica 26695^{virD4} de *H. pylori* (10×10^8 UFC), correspondiente a una MOI de 100, durante, 1, 3, 6 y 24 horas.

Determinación de viabilidad por citometría de flujo

Los neutrófilos obtenidos como previamente se describió fueron cultivados en una microplaca de 6 pozos (Nunc) con 5×10^6 células por pozo y se infectaron con *H. pylori* a una MOI de 100 durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo se tomó una alícuota de 1.5 ml de cada pozo, se centrifugó a 1,250 rpm por 5 min y se lavó con 1 ml de D-PBS (KCl (200 mg/L), KH₂PO₄ (200 mg/L), NaCl (8,000 mg/L) y Na₂HPO₄ (1150 mg/L)). Se adicionó 1 μ l de una solución de calceína AM (1:160) en DMSO y 2 μ l de homodímero de Etidio-1 (EthD-1) (LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit, Invitrogen), se homogenizó y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente, en ausencia de luz. Posteriormente, se tomaron 50 μ l y se analizaron por citometría de flujo. La fluorescencia de la calceína emite a 530 nm

(FITC) y es el indicador de viabilidad celular. La fluorescencia del homodimero de Etidio-1 emite a 610 nm (Rojo Texas) indicando mortalidad celular.

Cuantificación de citocinas

Una vez transcurrido el tiempo de infección, se recolectaron los sobrenadantes y se determinó la producción de IL-1 β e IL-18 mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA), empleando kits comerciales y siguiendo las instrucciones del fabricante (OptEIA, BD Pharmingen, San Diego, CA y Bender MedSystem, USA, CA). Las determinaciones se realizaron por duplicado, de tres donadores diferentes.

Extracción y cuantificación de proteínas

Al término de la infección, las células fueron lisadas con el amortiguador de lisis RIPA (Tris-Cl PH 7.4 100 mM, 300 mM NaCl, 10% NP40, 10% Deoxicolato de Sodio, 1 tableta de mezcla de inhibidores de proteasas (Roche, Complete, Germany)) y suplementado con el inhibidor de proteasas DTT 200 mM. El lisado se incubó por 20 min en hielo y fue centrifugado a 13,500 rpm por 10 min a 4°C, se recupero el sobrenadante y se guardo a -80 °C hasta su uso y análisis por Western Blot. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford con el reactivo Protein Assay (Bio-Rad, Hercules California). Posteriormente las muestras obtenidas se guardaron a -80°C hasta su análisis por Western-Blot.

Viabilidad celular y citotoxicidad de KCl, gliburide y Z-VAD-fmk

Se determinó la viabilidad de los neutrófilos en presencia de la cepa tipo 26695 y la mutante 26695^{virD4}, así como, también en presencia de los componentes químicos que inhiben al inflamasoma NALP3 (10, 20 40 mM de KCl, 50, 100 y 200 μ M de Glyburide y 5, 10 y 20 μ M de Z-VAD) por medio del uso del Kit CytoTox 96 Non-Radioactive (Promega, USA), el cual se basa en la medición de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) sobre las sales de tetrazolio (INT) que son reducidas a productos de formazan. De manera breve, los neutrófilos fueron cultivados en placas de 96 pozos con cada compuesto químico, bajo las mismas condiciones que los cultivos celulares. En cada uno de los experimentos los controles fueron células con medio suplementado con SFB, en ausencia del inhibidor y con el vehículo utilizado (DMSO). Una vez transcurrido el tiempo de los cultivos, la placa de 96 pozos se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 min. A temperatura ambiente, se tomó la mitad del medio (50 μ L), el cual se transfirió a un pozo nuevo. Posteriormente, las células fueron lisadas agregando 5 μ L de una solución de lisis 10X conteniendo 9% de Tritón X-100 (v/v) en agua e incubadas durante 45 min a 37°C, en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, a cada uno de los pozo se les adicionó 50 μ L de la solución sustrato (0.2 g/L de KCl, 8.0 g/L de NaCl, 0.2 g/L de KH₂PO₄, 1.15 g/L de Na₂HPO₄ y 1% de albúmina sérica bovina (BSA) (Promega, USA), que al interactuar con el medio de cultivo, reaccionó produciendo un cambio de coloración del mismo. Cuando se obtuvo el color esperado (salmón), a cada pozo de cultivo se le adicionaron 50 μ l de la solución de paro (ácido acético 1M).

Finalmente, se determinó la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro (BioTek, USA).

Ensayos de Inhibición del inflammasoma

Los neutrófilos fueron cultivados en medio RPMI 1640 bajo las condiciones previamente mencionadas. Después de 18 horas de cultivo los neutrófilos fueron preincubados con gliburide (50 μ M), KCl (10 mM) y Z-VAD-fmk (5 μ M) durante una hora y posteriormente, fueron infectados con *H. pylori* durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se recuperaron los sobrenadantes y se guardaron a -80 °C hasta la determinación de IL-1 β e IL-18.

Análisis de proteínas

Western Blot.

Treinta μ g de proteínas totales fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 6% y 12% y posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF. La membrana fue bloqueada con amortiguador de sales de fosfatos (PBS), conteniendo 5% de leche y 0.05% de Tween-20. Posteriormente, para la detección de las proteínas de interés, NALP3 y ASC, la membrana fue incubada en presencia del anticuerpo monoclonal anti-NALP3 humano (ALX-804-818) a una dilución de 1:1000, anti-ASC (sc-30153, USA) 1:500 y como control de carga se utilizó la detección de tubulina y actina empleando un Ab anti-tubulina, a una dilución de 1:1000 (ab6046); anti-actina 1:1000 (sc-8432, USA). Todos los anticuerpos fueron diluidos en PBS-leche y la incubación se realizó durante toda la noche a 4°C. Después la membrana fue

lavada con PBS-Tween 0.05% y se añadió el segundo anticuerpo, una IgG anti-ratón para NALP3 y actina y una IgG anti-conejo para la tubulina y ASC ambas conjugadas con peroxidasa de rábano a una dilución de 1:5000, incubando por 90 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana fue sometida a cinco lavados de 5 mn con PBS-Tween 0.05% y las proteínas fueron detectadas por medio del sistema Luminol (sc-2048, USA). Como controles se utilizaron lisados de la línea celular pre-monocítica THP-1 activadas con LPS y peróxido de hidrógeno.

Stripping por calor y detergente

Se agrego a cada membrana 5 mL de solución stripping (100 mM 2-mercaptoetanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris –HCl, pH 6.7) e incubo en agitación por 30 min a 50 °C, posteriormente se lavo dos veces con amortiguador de fosfatos en agitación por 10 min, y finalmente se lavo con agua por dos horas con cambios cada 20 min. Se bloqueó con PBS-leche al 3%.

Inmunocitoquímica.

A partir de cultivos de neutrófilos infectados de con *H. pylori* a los diferentes tiempos, se lavaron 2 veces las células con solución salina y se colocaron en laminillas por la técnica de goteo, posteriormente, se fijaron con formalina al 4% por 20 min a 4 °C .Una vez fijadas las laminillas se lavaron con TBS 1X por 5 min ó PBS 1X, para proceder a realizar la inmunotinción. Brevemente, se incubaron con citrato de sodio (0.01M, pH 6) en baño Maria por 20 min a 90 °C para su recuperación antigénica, transcurrido el tiempo se realizaron tres lavados de 5

min, con TBS 1X (para fosfatasa) y se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrogeno al 3% por 15 min, por dos veces (para el protocolo de DAB (Diamino benzidina)). Posteriormente, se bloqueó la unión no específica de los anticuerpos a las células, incubando las muestras con suero normal de cerdo al 2% durante 2 h en agitación en cámara húmeda. Se incubó toda la noche con el anticuerpo anti-NALP3 humano (ALX-804-818) a una dilución 1:400 ó anti- ASC (sc-30153, USA) 1:400 en cámara húmeda. Para cada uno de estos Ab se utilizó como control isotipo: anti-ratón 1:160 (sc-2025, USA) y anti-conejo 1:800 (sc-3840, USA)

Se lavó 5 veces por 8 min, y se incubó con el anticuerpo secundario (link universal, DAKO) por 30 min a temperatura ambiente; se lavo nuevamente y se adiciono estreptavidina conjugada a HRP (Universal LSAB+ KIT/HRP, DAKO Cytomation) En el caso de ASC se reveló con el kit fosfatasa y en el caso de NALP3 el color se desarrollo mediante la adición del sustrato cromógeno denominado Diamino benzidina durante el tiempo necesario de cada marcador con respecto al control de isotipo. Se detuvo la reacción con agua y se contratiño con hematoxilina. Las muestras, se deshidrataron bajo las siguientes condiciones: agua destilada, etanol al 70%, etanol al 90%, etanol al 100% y xilenos en baños de 2 minutos cada uno. Finalmente, las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Cuantificación de células positivas a la inmunotinción.

Las laminillas se analizaron en un microscopio (Olimpus, BX-40) y las células positivas (color café) se cuantificaron en diferentes campos de la laminilla, utilizando un analizador de imágenes (Image-Pro Plus®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD. USA). Se contaron 100 células en cada laminilla, para obtener el % de células positivas a la inmunotinción.

Determinación de caspasa 1 activada

Se cultivaron 1×10^6 cel por pozo, en una microplaca de 24 pozos, bajo las condiciones previamente mencionadas, las cuales se infectaron con *H. pylori* a un MOI de 100 durante 3, 6 y 24 h. Una vez transcurrido cada tiempo, se tomó una alícuota de 300 μ L, se agregó 2 μ L de FLICA Caspasa 1, 150X (FAM-YVAD-FMK Caspase-1 FLICA Kit, Immunochemistry, Technologies, LLC), se incubó por 1 h a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂ y 5% de humedad, protegida de la luz. Posteriormente, se lavo con 1 mL de solución de lavado 1X, dos veces, centrifugando a 1,250 rpm por 5 min, entre cada lavado. Finalmente las células se resuspendieron en 300 μ L de solución de lavado 1X, para ser analizadas por citometría de flujo.

Análisis estadístico.

Se determinaron los valores promedio de las citocinas analizadas IL-1 β e IL-18 de por lo menos tres diferentes experimentos. Se establecieron las diferencias con respecto a los controles utilizando las pruebas estadísticas Kruskal-Wallis y *Student-Newman-Keuls (SNK) post hoc* con $p < 0.05$ para el caso de los ensayos de inhibición y la prueba ANOVA bifactorial de medianas repetidas, *SNK post hoc* para el caso de la cinéticas de producción de citocinas. Se utilizo el programa estadístico SIGMA STAT (Jandel Scientific Software, CA).

Resultados

Pureza de los neutrófilos

Para evaluar la eficacia de la purificación de los neutrófilos, las células purificadas fueron identificadas con los anticuerpos anti-CD3, anti-CD19, anti-CD14 y anti-CD16b acoplados a un fluorocromo, de los cuales, en los diferentes experimentos, menos del 5% de las células obtenidas expresaron CD3, CD19 ó CD14 y el 97.4 % expresaron CD16b, por lo que corresponden a neutrófilos. Esto garantiza que la producción de citocinas, así como el efecto de activación se deba a dichas células y no a otra estirpe celular (Figura 3).

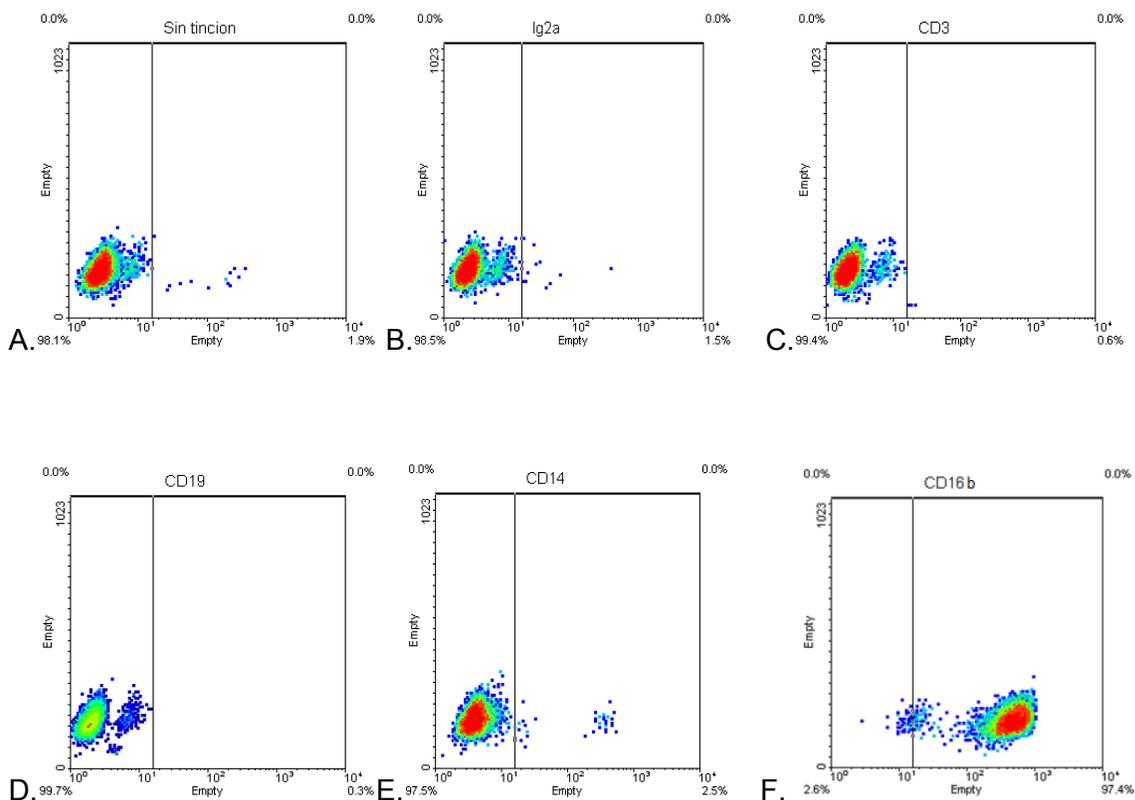


Figura 3. Determinación de pureza de neutrófilos mediante citometría de flujo. Figura representativa de tres experimentos. **A)** Población total sin tefir; **B)** Control isotipo Ig2a PE; **C)** Anti -CD3 (linfocitos T) FITC; **D)** Anti-CD19 (linfocitos B) FITC; **E)** Anti-CD14 (monocitos) PE y **F)** Anti-CD16 b, (neutrófilos) PE.

Cinética de producción de IL-1 β de neutrófilos infectados con la cepa tipo 26695 y la mutante 26695^{VirD4-}

Se determinó la cinética de inducción de la producción de la IL-1 β a diferentes tiempos de infección con la cepa tipo 26695 y la mutante isogénica VirD4⁻ para determinar el pico máximo de producción de la citocina. Esta producción fue directamente proporcional al tiempo, alcanzando un pico máximo de 80 pg/ml a las 24 h. Encontrando diferencia estadísticamente significativa a partir de las 3 h, con respecto a los neutrófilos sin infección y con diferencia significativa en la producción entre las dos cepas a las 24 h $p \leq 0.05$ (Figura 4).

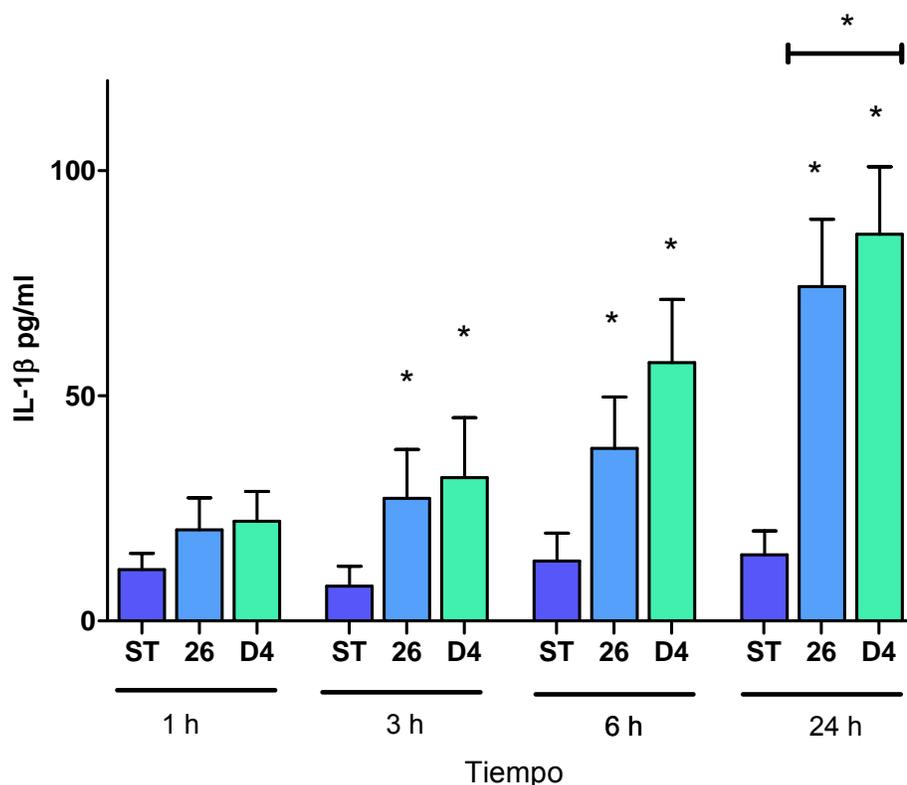


Figura 4. Producción de IL-1 β a los tiempos de 1, 3, 6 y 24 h por neutrófilos humanos infectados con las cepa tipo 26695 y la mutante 26695^{VirD4-} de *H. pylori*. La concentración fue determinada del sobrenadante del cultivo celular, por ELISA. Promedio de tres donadores seronegativos para *H. pylori* \pm SEM * $p < 0.05$ (.ANOVA bifactorial de medidas repetidas y SNK *post hoc*). ST (Células sin infección), 26 (Células Infectadas con la cepa tipo 26695), D4 (Células infectadas con la cepa mutante 26695^{VirD4-}).

Cinética de producción de IL-18 de neutrófilos infectados con la cepa tipo 26695 y la mutante 26695^{VirD4-}

Se determinó la producción de IL-18 de los neutrófilos a los diferentes tiempos de infección con *H. pylori*. La producción fue elevada en todos los tiempos, aproximadamente de 1000 pg/ml. No hubo diferencia en la producción de la citocina entre los neutrófilos no infectados, con respecto a los infectados con las diferentes cepas (Figura 6).

| pg/ml | 2500 | 1250 | 625 | 312.5 | 156.25 | 78.12 | Bco. |
|-------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|------|
| Abs | 1.5415 | 0.873 | 0.4615 | 0.1975 | 0.1205 | 0.053 | 0 |

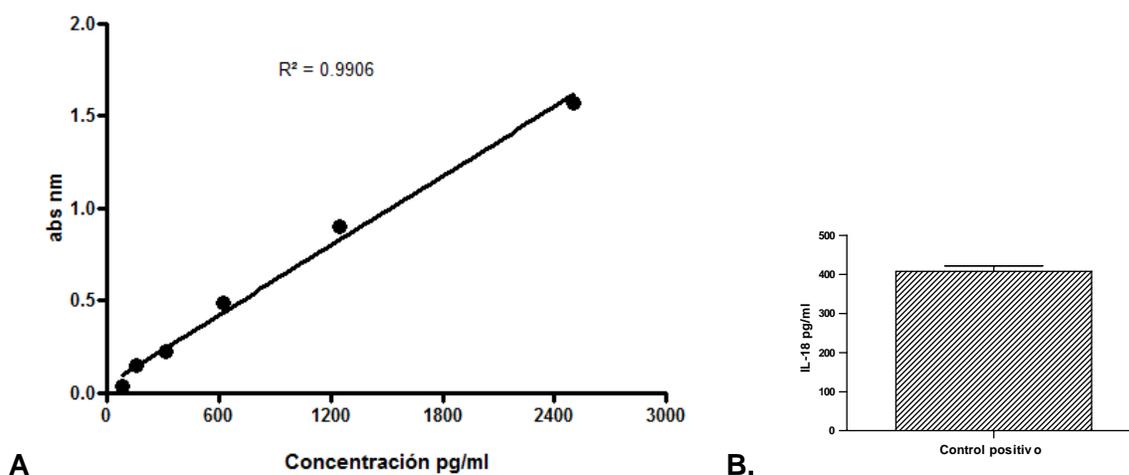


Figura 5. Curva estándar correspondiente a la producción de IL-18. **A)** Curva estándar (Kit human IL-18 Bender MedSystem, País de origen) utilizada para el cálculo de la concentración de la citocina IL-18 producida en los neutrófilos infectados con *H. pylori*. **B)** Producción de IL-18 en el control positivo (Kit human IL-18 Bender MedSystem, país de origen).

Producción de IL-18 en neutrófilos humanos.

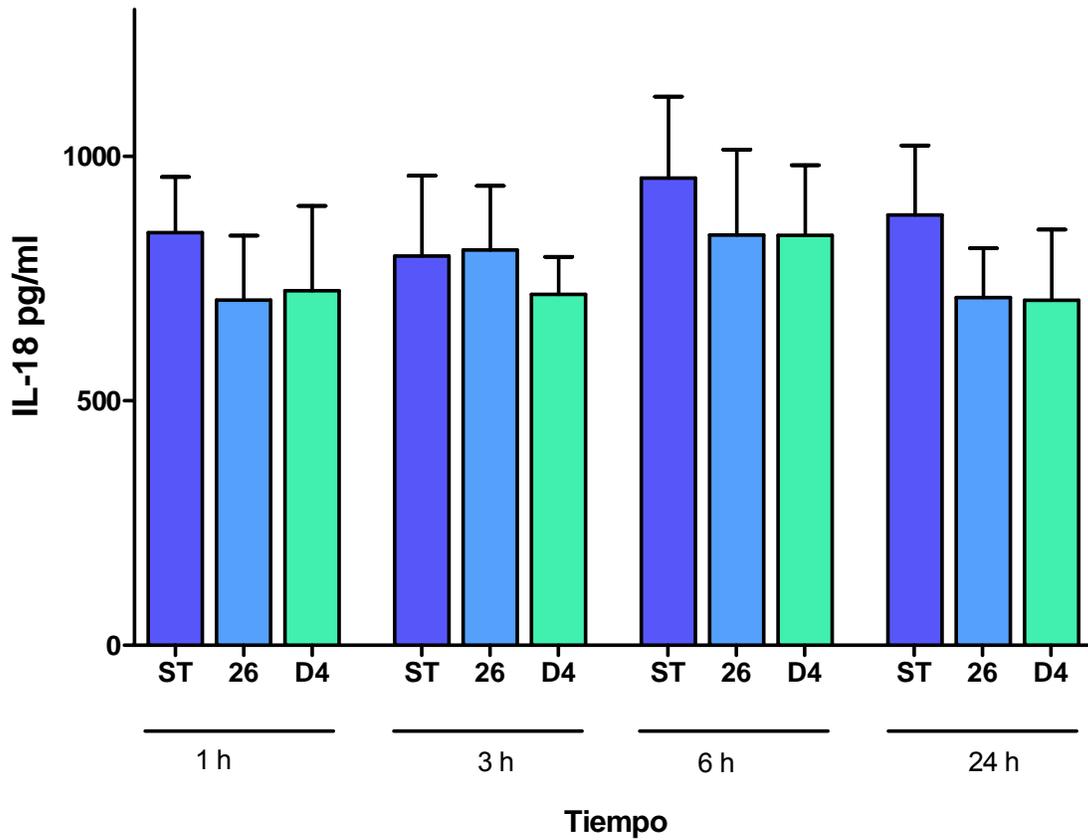


Figura 6. Producción de IL-18 a los tiempos de 1, 3, 6 y 24 h por neutrófilos humanos infectados con las cepa tipo 26695 y la mutante 26695^{virD4-} de *H. pylori*. La concentración fue determinada por ELISA (Kit human IL-18 Bender MedSystem, País de origen) del sobrenadante del cultivo celular. Promedio de inducción de IL-18 de dos donadores seronegativos para *H. pylori* \pm SEM * $p > 0.05$ (.ANOVA bifactorial de medidas repetidas y SNK *post hoc*). ST (Células sin infección), 26 (Células Infectadas con la cepa tipo 26695), D4 (Células Infectadas con la cepa mutante 26695^{virD4-}).

Citotoxicidad de la cepa tipo 26695 y la mutante 26695^{VirD4}

Para determinar la citotoxicidad por la infección se determinó la viabilidad de los neutrófilos en presencia de la cepas tipo 26695 y de la mutante isogénica 26695^{VirD4-}, a los diferentes tiempos empleados en la cinética de producción de IL-1 β e IL-18, observándose que no hubo diferencias significativas con ninguna de las dos cepas, a los diferentes tiempos de infección, con respecto a los neutrófilos sin tratar por lo que no hay citotoxicidad por la infección (Figura 7).

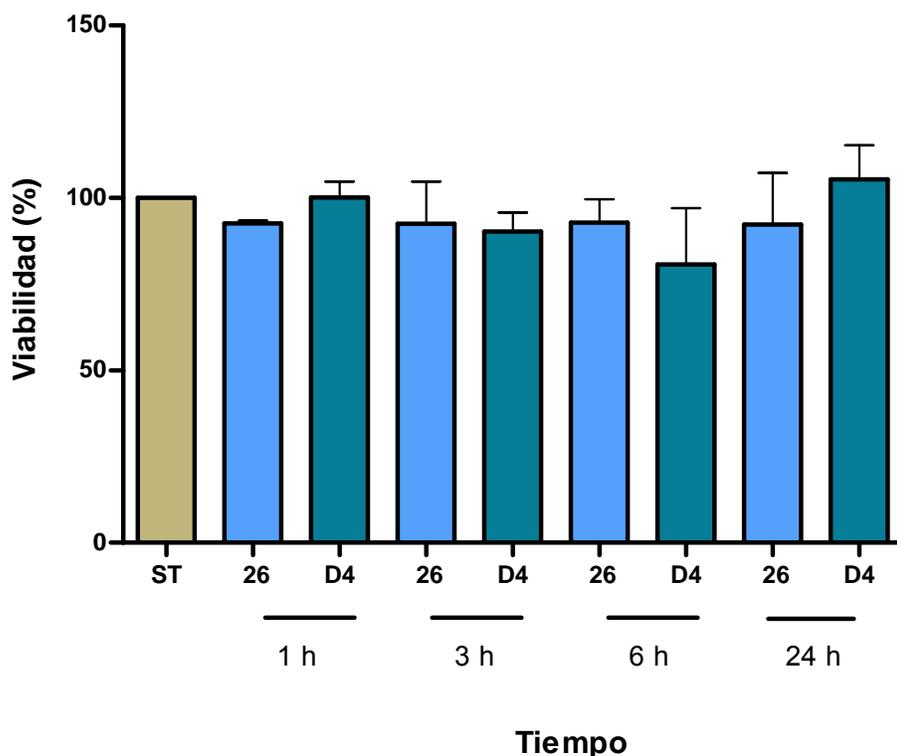
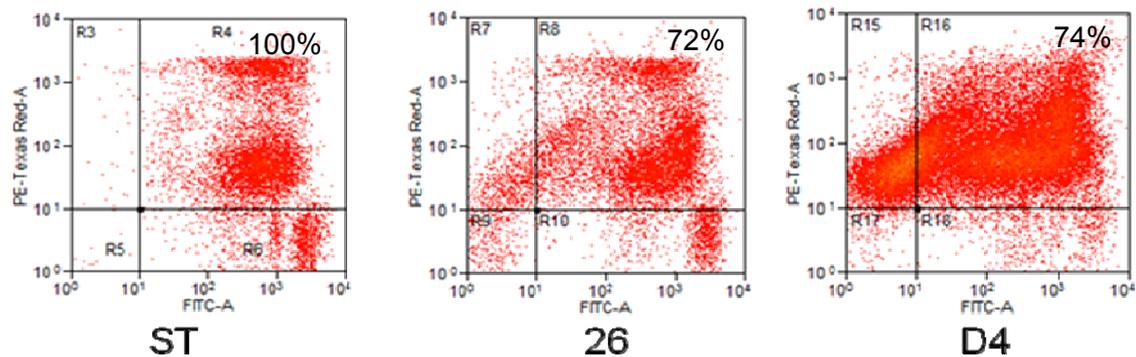


Figura 7. Viabilidad celular a la 1, 3, 6 y 24 h de infección con la cepa tipo y la mutante VirD4⁻ de *H. pylori*. Promedio de tres experimentos independientes (CytoTox96) \pm SEM $p > 0.05$ No existió diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad de los neutrófilos infectados con las cepas de *H. pylori* con respecto al control (ST) (ANOVA, Comparación múltiple Dunnett's). ST: Células sin infección, 26: Células infectadas con la cepa tipo 26695, D4: Células infectadas con la cepa mutante 26695^{virD4-}.

Viabilidad de los neutrófilos infectados con la cepa tipo 26695 y la mutante 26695^{VirD4-}

Con la finalidad de corroborar los resultados de viabilidad de los neutrófilos infectados, ésta se determinó a las 24 h de infección por citometría de flujo, observándose que hubo una disminución de la viabilidad en un 30% en los neutrófilos infectados con respecto a los neutrófilos sin tratar, sin embargo, esta disminución no fue estadísticamente significativa.

A.



B.

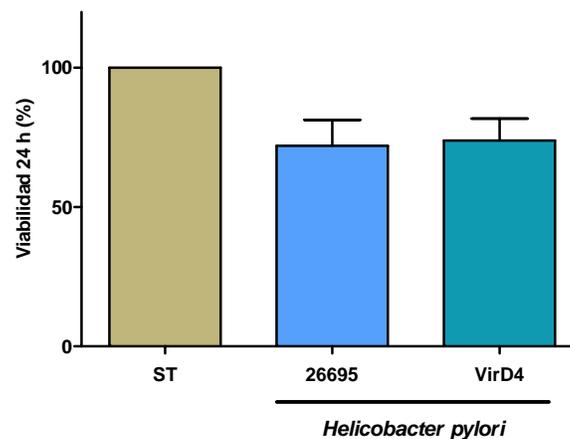
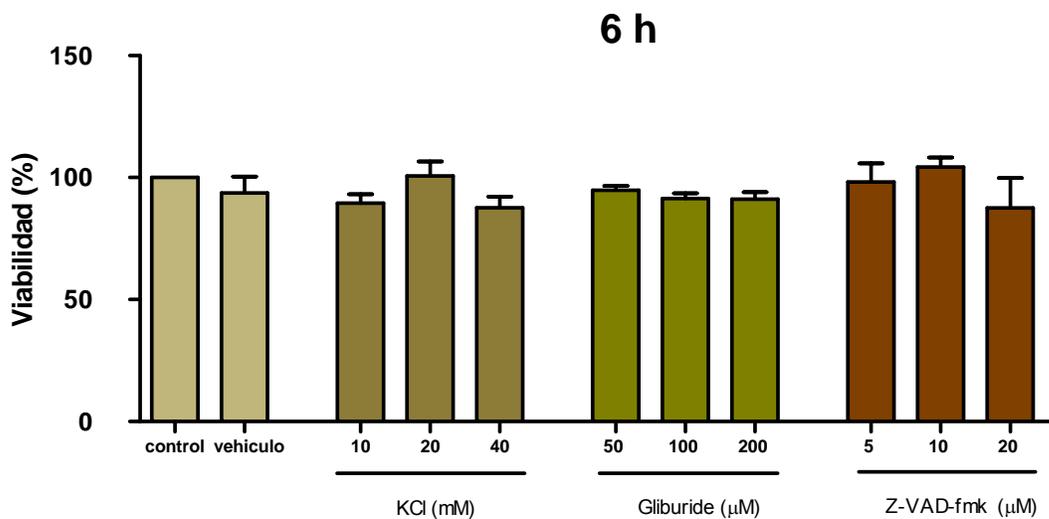


Figura 8. Viabilidad de Neutrófilos infectados con *H. pylori* a las 24 h. de infección. Determinación de la viabilidad por citometría de flujo (kit citotoxicidad y viabilidad. Invitrogene, USA). **A)** Blots representativos de la citometria de flujo de tres experimentos; Las células teñidas con PE representan las células muertas y con FITC las células vivas. **B)** Representación grafica de la viabilidad (%) de tres experimentos independientes; 26695 (cepa tipo), VirD4⁻ (mutante isogénica 26695^{VirD4-}). La diferencia no fue estadísticamente significativa, \pm SEM $p > 0.05$ (ANOVA, Comparación múltiple Dunntte's).

Citotoxicidad de KCl, gliburide, Z-VAD-fmk.

Para determinar la citotoxicidad de los inhibidores del inflamasoma se determinó la viabilidad de los neutrófilos a las 6 y 24 h en presencia de los siguientes compuestos químicos que inhiben al inflamasoma NALP3. En base a concentraciones previamente reportadas en otros modelos celulares. Se utilizaron las siguientes concentraciones para KCl: 10, 20 y 40 mM, gliburide: 50, 100, 200 μ M) y Z-VAD-fmk: 5, 10, 20 mM. No se observaron cambios en la viabilidad de los neutrófilos a las 6 h de incubación con los diferentes inhibidores (Figura 9A). Sin embargo, a las 24 h la viabilidad celular disminuyó a partir de la concentración 20 Mm para KCl, 100 μ M para gliburide y 10 μ M para Z-VAD-fmk (inhibidor de caspasa 1) (Figura 9B). Por lo que para los experimentos de inhibición a las 24 h se utilizaron las concentraciones siguientes: KCl; 10 mM, gliburide; 50 μ M y Z-VAD-fmk; 5 mM.

A.



B.

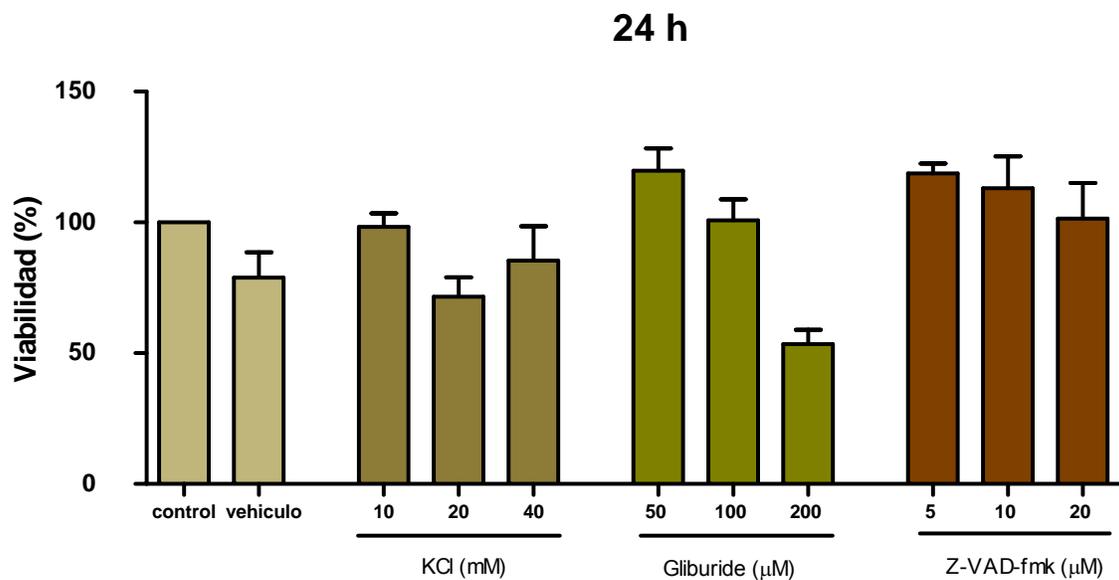


Figura 9. Viabilidad de neutrófilos en presencia de los compuestos químicos KCl, gliburide y Z-VAD-Fmk. a tres concentraciones diferentes. **A)** Viabilidad a las 6 h de incubación con los diferentes inhibidores del inflamasoma y **B)** Viabilidad a las 24 hrs de incubación. Para cada tiempo se realizaron tres experimentos por duplicado (CytoTox96). Se muestra el promedio de los tres experimentos \pm SEM.

Participación del inflamasoma en la producción de IL-1 β e IL-18

Para la determinación de la participación del Inflamasoma NALP3, en la producción de IL-1 β por la infección de *H. pylori*, se realizaron ensayos de inhibición de NALP3 y caspasa1; utilizando las concentraciones previamente determinadas en los ensayos de citotoxicidad de 10 mM de KCl, 50 μ M de gliburide para la inhibición de NALP3 y 5 μ M de Z-VAD-fmk para caspasa1. La producción de IL-1 β en los neutrófilos infectados con la cepa tipo e incubados con los Inhibidores disminuyó drásticamente entre un 50% y un 70%, mientras que con la cepa mutante VirD4⁻ la producción de la IL-1 β sólo disminuyó en un 20 a 50% encontrando diferencia estadísticamente significativa en todos los casos *p<0.05 (Figura 10A), respecto a los neutrófilos sin inhibidores del inflamasoma (solo infectados). Sin embargo, la producción de IL-18 no se vio modificada por ninguno de los inhibidores (Figura 10B).

Participación del inflammasoma en la producción de IL-1 β

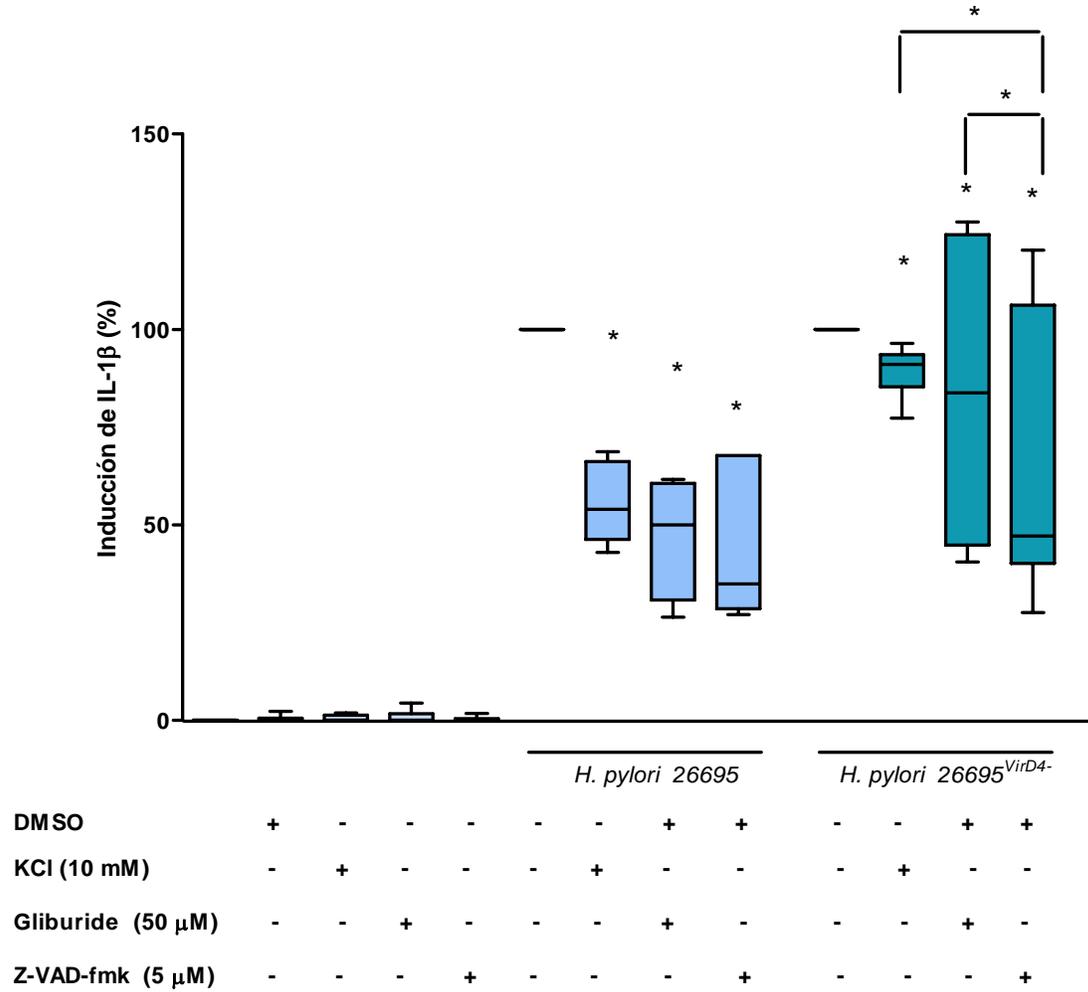


Figura 10A. Inducción de IL-1 β (%) en neutrófilos humanos infectados con las cepas 26695 y la mutante VirD4⁻ por 24 h previamente incubados por 1 h con los compuestos químicos KCl (10 mM), gliburide (50 μ M) y Z-VAD-fmk (5 μ M). Determinación por ELISA de tres donadores seronegativos a *H. pylori*. Representación grafica de la mediana, \pm espacios intercuartiles. Kruskal-Wallis y SNK *post hoc*. * $p < 0.05$.

Participación del inflamasoma en la producción de IL-18

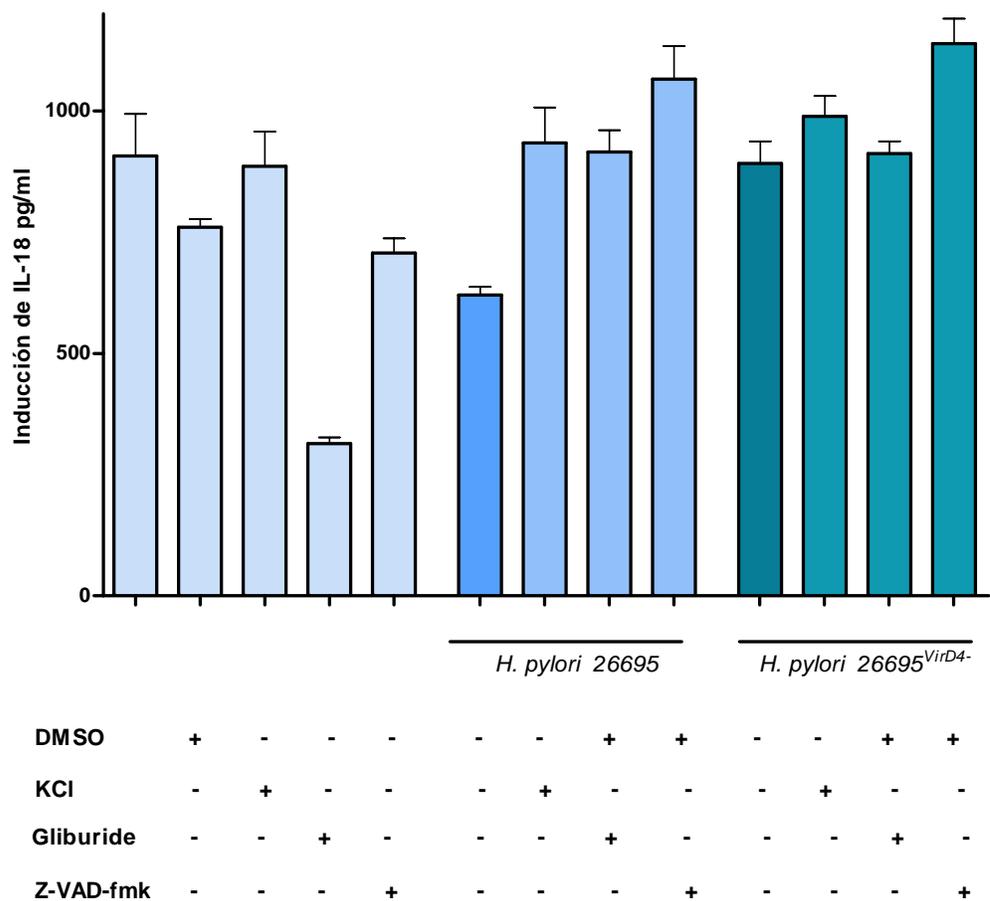


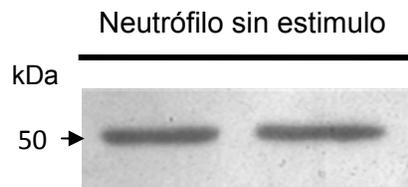
Figura 10B. Producción de IL-18 de neutrofilos humanos infectados con las cepas 26695 y la mutante VirD4⁻ por 24 h, previamente incubados por 1 h con los compuestos químicos KCl (10 mM), gliburide (10 mM) y Z-VAD-fmk (5 μM). Experimento representativo de la inducción de IL-18 de un donador seronegativo a *H. pylori* en presencia de los inhibidores del inflamasoma. Determinación por ELISA (kit human IL-18 Bender MedSystem) de dos donadores seronegativos a *H. pylori*.

Expresión de ASC y NALP3 en neutrófilos humanos infectados con H. pylori.

Para determinar si las proteínas involucradas en la formación del inflammasoma NALP3 se encuentran presentes en la infección, se llevaron a cabo los ensayos celulares utilizando un MOI de 100 para la infección de los neutrófilos a diferentes tiempos 1, 3, 6 y 24 h en los que se determinó la expresión de ASC y NALP3 mediante las técnicas de western blot e inmunocitoquímica previamente estandarizadas (Figura 11). Se observó que *H. pylori* induce la expresión de ASC en los neutrófilos en los diferentes tiempos de infección (Figura 12 y 13).

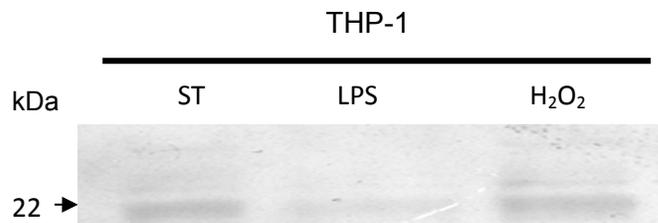
Estandarización de la Expresión de ASC y NALP3.

A. Actina



ASC

B.



C.

NALP3

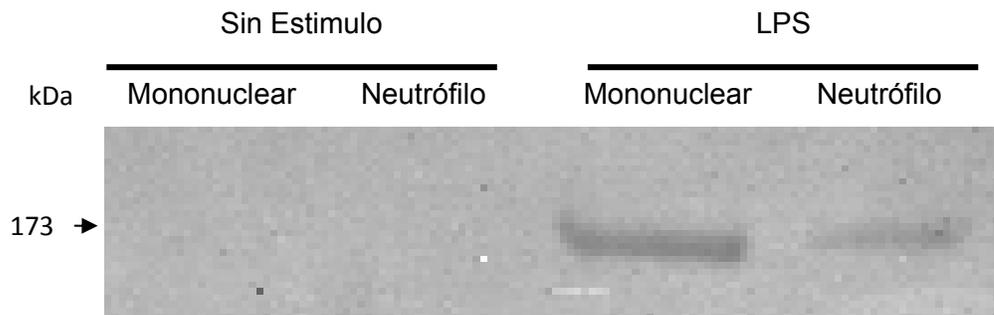


Figura 11. Expresión de los componentes del inflamasoma. **A)** Actina de neutrófilos (Control de carga), **B)** Expresión de ASC en las células THP-1 con peso de 22 kDa estimuladas con LPS y peróxido de hidrogeno (H₂O₂); **C)** Expresión de NALP3 (173 kDa) en mononucleares totales y neutrófilos estimulados con LPS.

Expresión de ASC en neutrófilos humanos infectados con *H. pylori*.

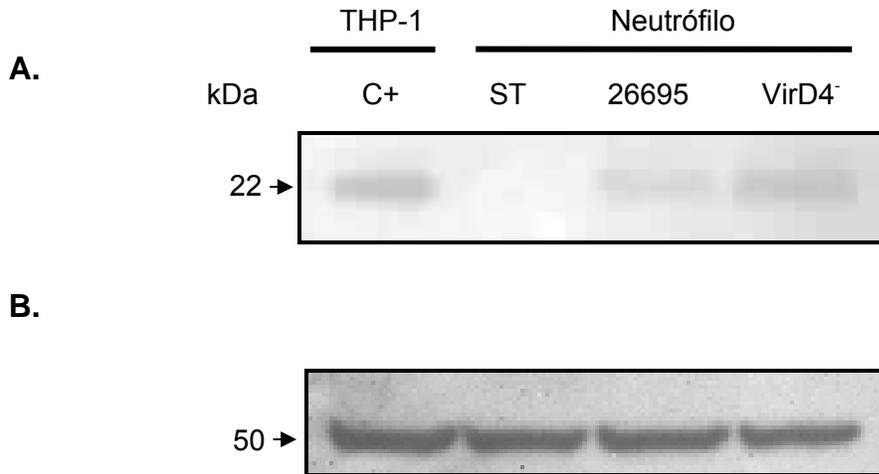
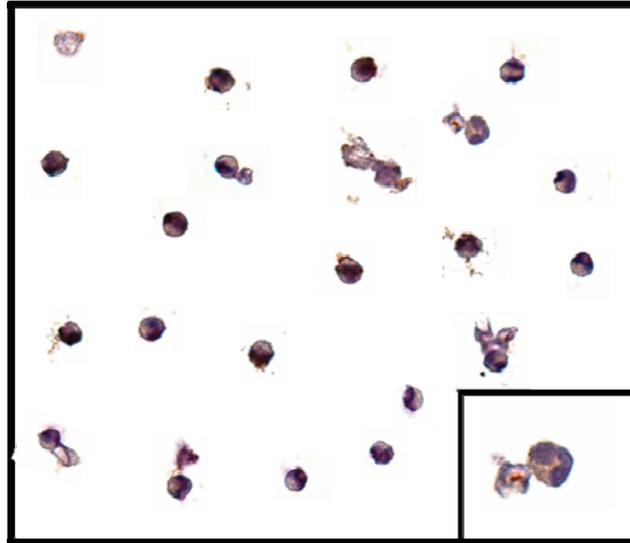


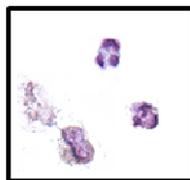
Figura 12. Expresión de ASC en neutrófilos infectados con *H. pylori*. **A)** Imagen representativa de la expresión de ASC de extractos celulares del cultivo de neutrófilos infectados con *H. pylori* y la línea celular THP-1 (Control positivo), se detecto por western blot, la proteína ASC con un peso molecular de 22 kDa de tres experimentos independientes. ST (Células sin infección), 26695 (cepa tipo 26695), VirD4 (mutante 26695^{VirD4}), **B)** control de carga correspondiente a tubulina con un peso de 50 kDa.

Expresión de ASC en neutrófilos humanos

Sin infección



LPS



Control IgG

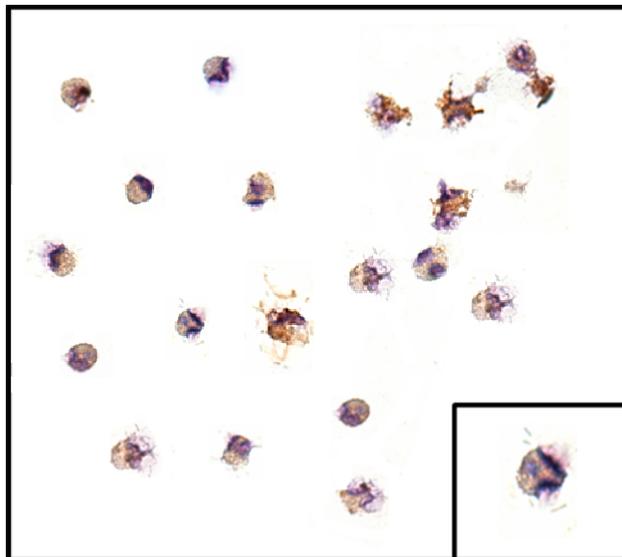
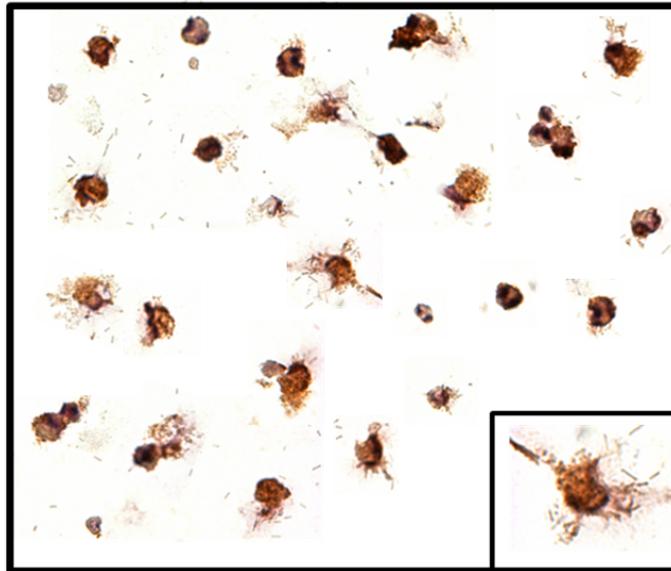
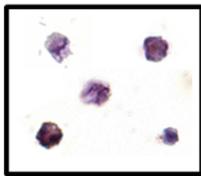


Figura 13. Microfotografía representativa de la expresión de ASC en neutrófilos humanos. Determinación de la expresión por inmunocitoquímica, de ASC en neutrófilos humanos estimulados con LPS (*E. coli*) (control de expresión) y en células sin tratar.

Expresión de ASC en neutrófilos humanos infectados con *H. pylori*.

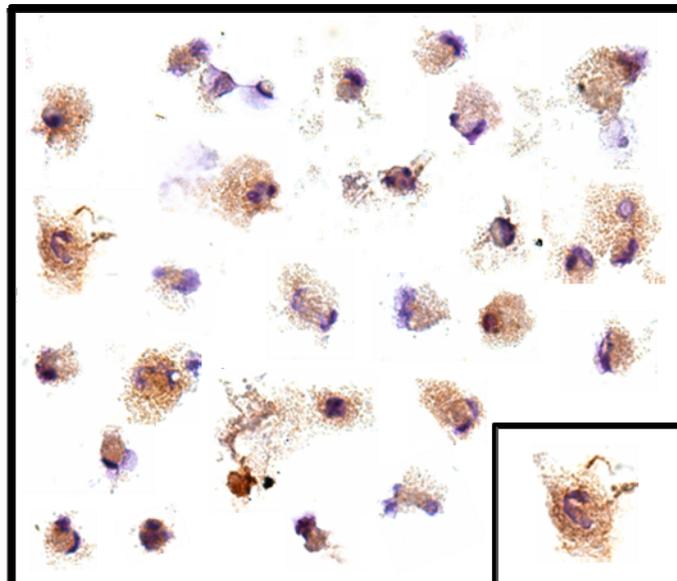
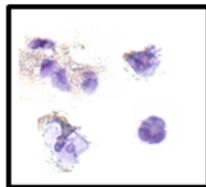
A.

26695

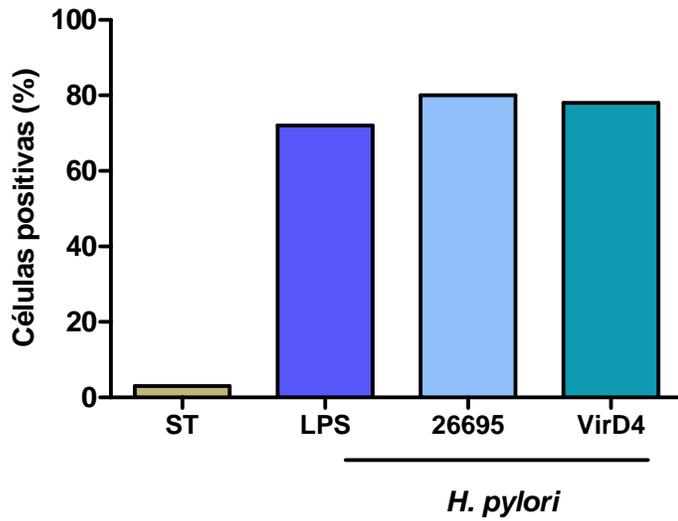


B.

26695^{VirD4-}



C.



D.

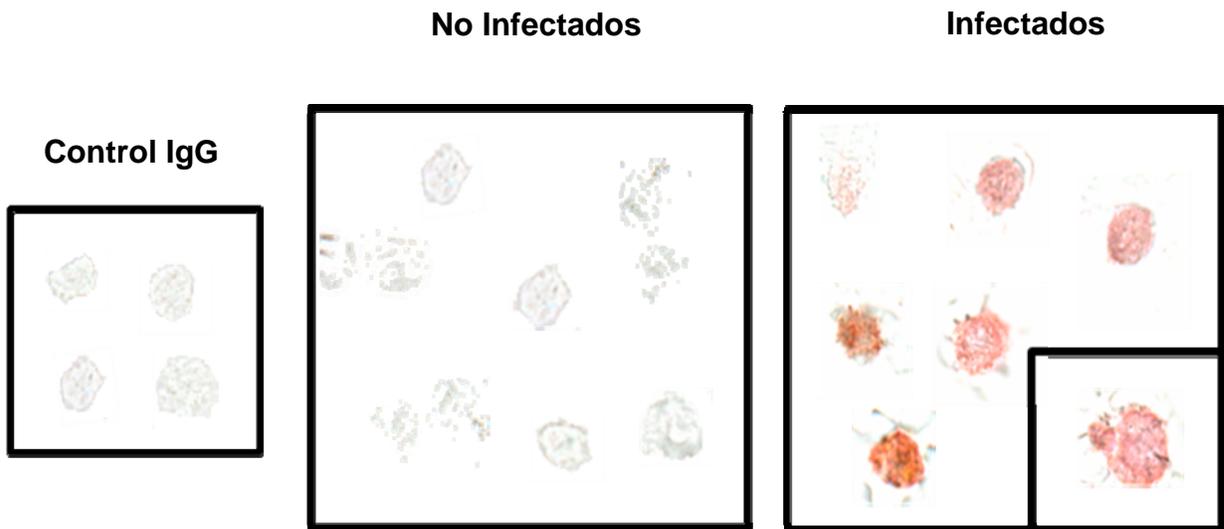


Figura 14. Expresión de ASC en neutrófilos infectados con *H. pylori*. Detección de la proteína ASC por inmunocitoquímica al tiempo de 24 h de infección. **A) y B)** Microfotografía representativa de la expresión de ASC en neutrófilos humanos infectados con la cepa 26695 (A) y la cepa 26695^{VirD4-} (B). Amplificación 100X, **C)** Gráfica representativa de expresión de ASC correspondiente a las microfotografías A y B; **D)** Expresión de ASC en neutrófilos infectados con *H. pylori* detectada por inmunocitoquímica (fosfatasa) al tiempo de 6 h de infección.

Expresión de NALP3 en neutrófilos Humanos infectados con *H. pylori*

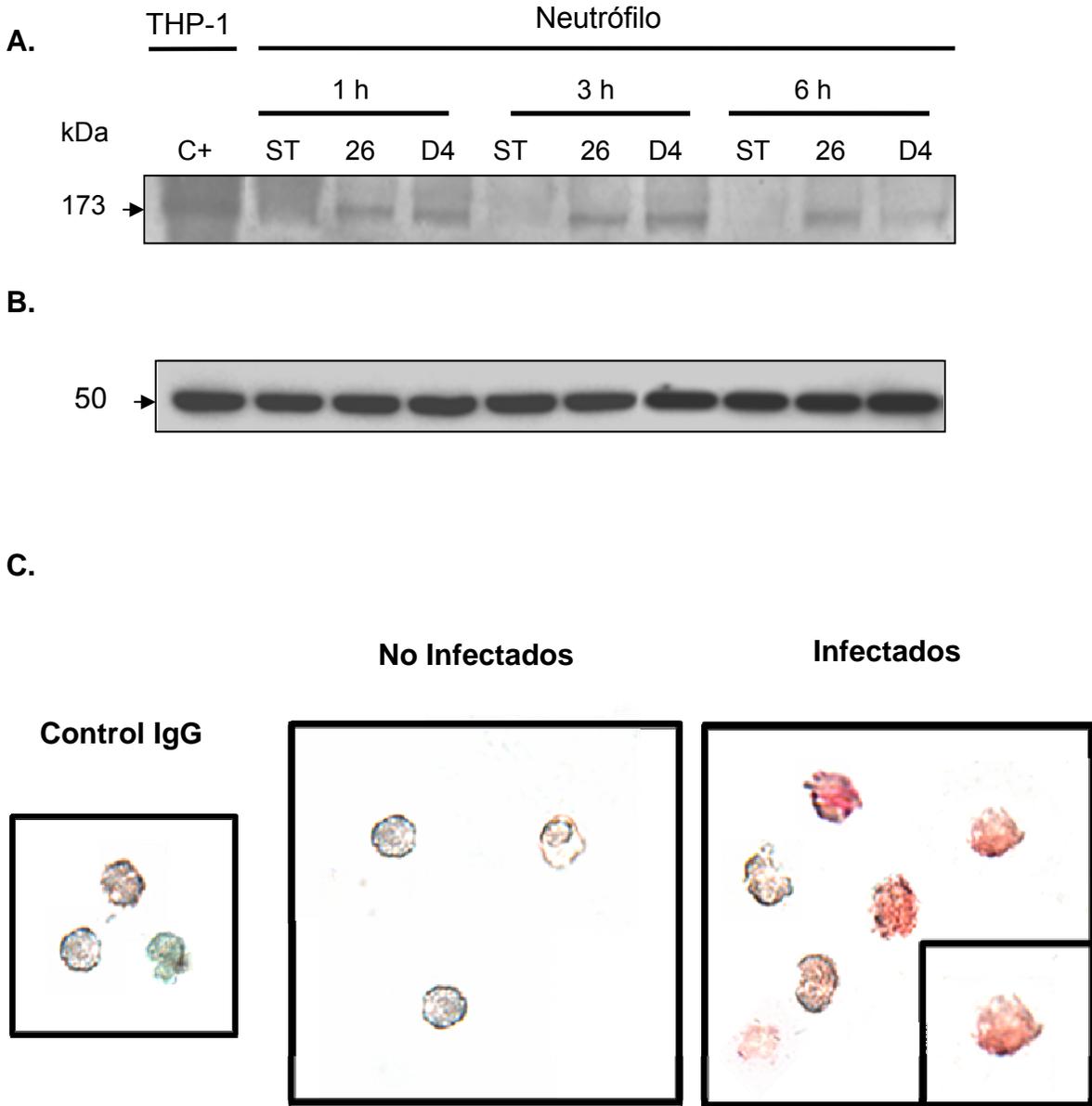
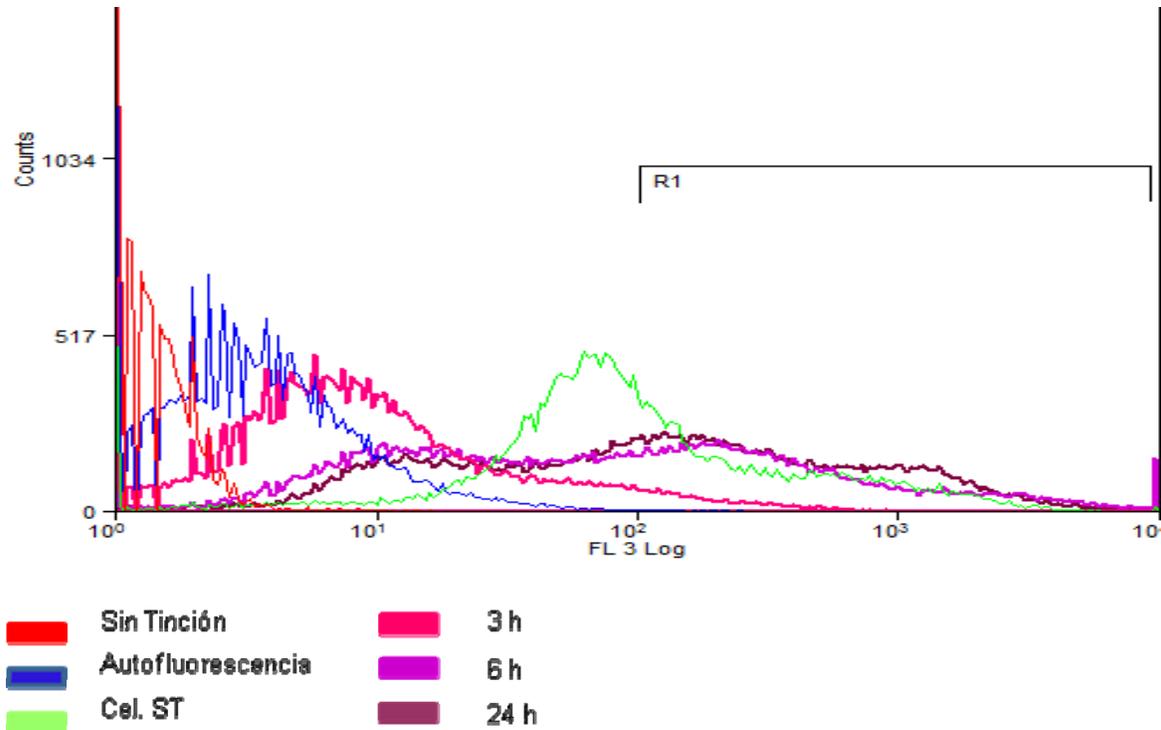


Figura 15. Expresión de NALP3 en neutrófilos humanos infectados con *H. pylori*. **A)** Expresión de NALP3 a los tiempos de 1, 3 y 6 h de infección. Determinación por WB. **B)** control de carga correspondiente a actina con un peso de 50 kDa. **C)** Microfotografía representativa de la expresión de NALP3 en neutrófilos humanos infectados con *H. pylori*. Determinación de la expresión de NALP3 por inmunocitoquímica (fosfatasa), en los neutrófilos infectados al tiempo de 24h de infección. Amplificación 100X.

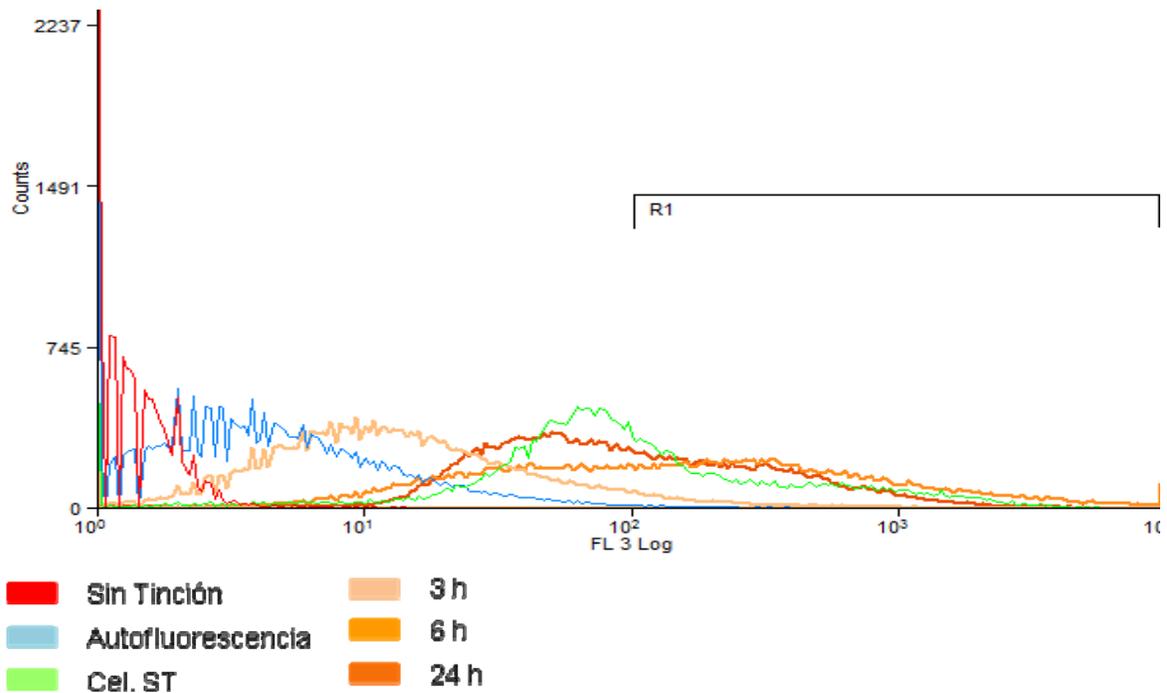
Caspasa 1 activada de neutrófilos humanos

Se determinó la caspasa 1 activada, a través de citometría de flujo en los neutrófilos infectados con *H. pylori* a los tiempos de 3, 6 y 24 h de infección para saber si *H. pylori* induce la activación de la caspasa 1 mediante el inflamasoma, en el proceso de maduración de la IL-1 β . Observándose que la caspasa 1, se encuentra activa en los neutrófilos y disminuye su activación a las 3 h de infección, mientras que a las 6 y 24 h esta disminución se recupera e incrementa conforme el tiempo (Figura 16).

A.



B.



C.

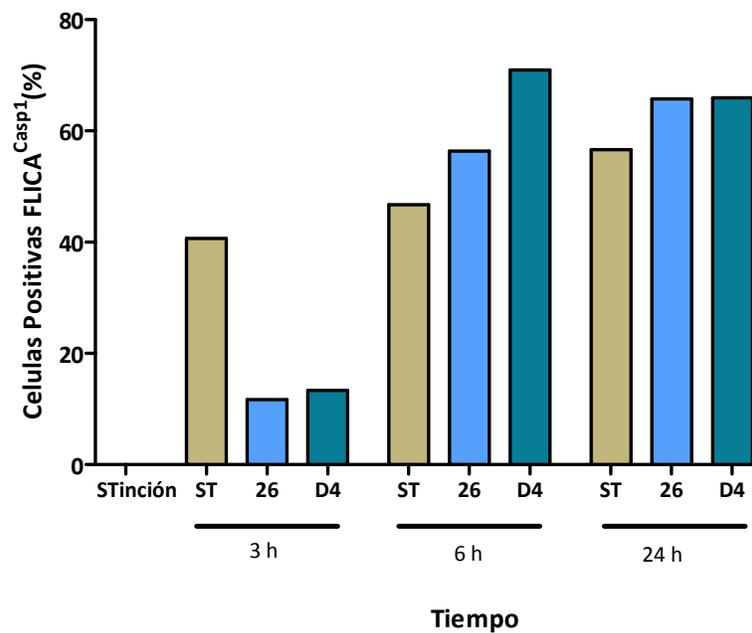


Figura 16. Caspasa 1 activada de neutrófilos humanos. **A)** y **B)** Activación de caspasa 1 en los neutrófilos infectados con la cepa 26695 (A) y la cepa 26695^{VirD4-} (B) de *H. pylori* a los tiempos de 3, 6 y 24 h. Determinación por citometría de flujo (FAM-YVAD-FMK Caspase-1 FLICA Kit). **C)** Gráfica representativa del % de células positivas FLICA^{Casp1+} = células con caspasa 1 activada en la infección con *H. pylori*.

Resumen de resultados

- La producción de IL-1 β por la infección de *H. pylori* incrementa conforme el tiempo, siendo significativa la diferencia desde las 3 h de infección, alcanzando la máxima producción a las 24 h.
- Los neutrófilos infectados con la cepa mutante VirD4- producen mayor concentración de IL-1 β que con la cepa 26695
- La viabilidad de los neutrófilos se mantiene hasta 24 h de infección con la cepa 26695 y la mutante VirD4-.
- La producción de IL-1 β inducida por *H. pylori* se ve disminuida en presencia de los inhibidores de los componentes del inflamasoma NALP3.
- El inhibidor de caspasa 1 disminuye un 80% la producción de IL-1 β en neutrófilos infectados con *H. pylori*.
- No hay inducción de la producción de IL-18 en neutrófilos humanos infectados con *H. pylori*.
- La expresión de las moléculas que conforman el inflamasoma NALP3 y ASC son inducibles por *H.pylori*.
- Caspasa 1 se encuentra activa en los neutrófilos y disminuye su activación a las 3 h de infección.

Discusión

Las infecciones por *H. pylori* representan un problema de salud importante a nivel mundial, debido a que cada vez son más las evidencias del papel patogénico que tiene esta bacteria para desencadenar un proceso inflamatorio crónico que culmina en úlceras pépticas y en ciertas formas de cáncer gástrico (Torres-Valadez y cols., 2010), debido a que después de la colonización por *H. pylori* hay infiltración de polimorfonucleares (neutrófilos, PMN), leucocitos, macrófagos y linfocitos a la mucosa gástrica para contrarrestar la infección. Los mecanismos que estas células utilizan para eliminar a los microorganismos son potencialmente dañinas para el hospedero; en especial la de los neutrófilos; que se ha demostrado que existe una fuerte correlación entre la infiltración de los neutrófilos a la mucosa gástrica y el daño de ésta (Cassatella y cols., 2007). Los neutrófilos son las primeras células en llegar al sitio de infección, sin embargo, el mecanismo de respuesta inmune a la infección por *H. pylori in vivo* aún no ha sido comprendida del todo. Es importante estudiar a los neutrófilos para entender los mecanismos de control que permiten regular la actividad de estas células evitando el daño excesivo de los tejidos, así como, también estudiar las moléculas implicadas en el reconocimiento de *H. pylori* tales como los receptores tipo Toll (TLRs) que previamente se han reportado y se sabe que tienen un papel fundamental en el reconocimiento de *H. pylori* a través de sus diferentes PAMPs (Alvarez-Arellano y cols., 2007). Sin embargo, los resultados obtenidos en los trabajos con TLRs muestran la importancia de estudiar otros receptores que están presentes en el neutrófilo y que se ha demostrado se expresan y funcionan en

otros procesos inflamatorios (Ekman y Cardell, 2010). Entre estos receptores se encuentran los NLRs y el inflamasoma NALP3, los cuales están probablemente participando en la detección de PAMPs de *H. pylori* así como de DAMPs generados por esta bacteria a nivel citoplasmático. El Inflamasoma es un complejo multiproteico formado por receptores NLRs, una molécula adaptadora y la caspasa 1 ó 5; que se encarga de madurar las citocinas IL-1 β e IL-18. Previamente NALP3 se ha visto implicado en la respuesta generada al adyuvante hidróxido de aluminio (Kool y cols., 2008; Eisenbarth y cols., 2008), así como, a la diferencia de concentración de ATP y K⁺² celular y a otros PAMPs como: LPS, DNA y RNA (Chen y cols., 2009).

En este trabajo observamos que *H. pylori* induce el aumento en la producción de la citocina proinflamatoria IL-1 β y por primera vez documentamos la liberación de IL-18 en los neutrófilos humanos. La producción de la IL-1 β se inicio desde las primeras horas de incubación con la cepa tipo de *H. pylori* 26695 y la mutante isogénica VirD4⁻. Esta producción fue directamente proporcional con respecto al tiempo, alcanzando un pico máximo de 80 pg/ml a las 24 h; encontrando diferencia estadísticamente significativa a partir de las 3 h de infección, con respecto a los neutrófilos sin infección. Al comparar la producción de la IL-1 β entre las cepas, puede observarse que ésta es mayor en la cepa mutante desde las primeras horas, encontrando diferencia significativa a las 24 h, lo que indica que en la inducción de IL- β , la proteína VirD4, no es necesaria para la secreción de la citocina, pese a que esta permite la translocación de moléculas que pueden ser identificadas por receptores intracelulares del sistema inmune, de manera que no

hay PAMPs que puedan ser identificados por estos receptores por lo que tienen un menor efecto sobre la célula hospedera. Esto nos lleva a pensar en dos posibilidades: la primera de ellas y más obvia es que la cepa 26695 que contiene el sistema de secreción completo, al inyectar moléculas como CagA en la célula hospedera, genere un rearrreglo en los factores eucarióticos con funcionamiento de señales de transducción como los que lleva a cabo *Salmonella* a través de su sistema de secreción Tipo III (Sánchez y Carnona, 2003; Patel y Galán, 2008); además, *H. pylori* también puede ser capaz de interferir con vías de señalización de la célula hospedera como PI3K, PLC γ y Ras, lo que da lugar a cambios en el patrón de expresión génica de mediadores inflamatorios (Fuentes y cols., 2009). La segunda hipótesis es que la cepa mutante en la proteína VirD4 pudiera estar induciendo nuevas conformaciones en el sistema de secreción por la ausencia de la proteína VirD4, que permitan nuevos sitios de reconocimiento de la bacteria y por lo tanto una mayor inducción de IL-1 β . Pese a que no se han demostrado nuevas conformaciones que permitan la inducción de otras citocinas, si se ha comprobado en el modelo de células AGS que la participación de la ATPasa VirD4 es un factor absolutamente esencial para la translocación de la proteína CagA, pero no de la inducción de IL-8, ya que al deletar el gen que codifica para esta proteína sigue habiendo producción de IL-8 (Fischer, 2001)., Tomando en cuenta otros factores que pudieran estar participando en la producción de IL-1 β , consideramos que la maduración de esta citocina no solo se pudiera estar llevando a cabo por el inflamasoma, sino también por mecanismos enzimáticos en los que están implicadas las enzimas proteinasa-3 y otras serin-proteasas. En

ratones deficientes de caspasa-1, la IL-1 β activa sigue produciéndose, debido a la proteinasa-3, que corta el precursor de IL-1 β , muy cerca del sitio de corte de la caspasa 1 (Coeshott y cols., 1999). Por otra parte, en modelos de inflamación con ratones deficientes de caspasa 1, se ha demostrado también que el precursor de IL-1 β se activa (Joosten y cols., 2009).

En cuanto a la producción de la IL-18 por los neutrófilos, observamos que fue muy alta desde la primer hora de infección con *H. pylori*, aproximadamente de 1,000 pg/ml. Sin diferencia significativa en la producción de esta citocina entre los neutrófilos no infectados, con respecto a los infectados con las dos cepas, lo que probablemente se debe al pool de IL-18 intracelular per se de la célula, como algunos autores lo han sugerido (Arend y cols., 2008; Silliman y cols., 2010). Sin embargo, para demostrar que la infección por *H. pylori* no induce la producción de pro-IL-18, es necesario realizar una cinética de tiempo, que incluya tiempos más cortos de infección a la cinética empleada en este trabajo. Así como, también explorar los mecanismos de maduración de IL-18 alternos al inflammasoma. Se sabe que existe más de un mecanismo para la maduración de IL-18, además del mecanismo en el que participa la caspasa 1, también hay mecanismos en los que están implicadas las serin-proteasas, elastasa y catepsina G, enzimas que forman parte de los componentes de los gránulos del neutrófilo. (Gracie y cols., 2003; Robertson y cols., 2006). La importancia biológica de esto últimos aún no está clara,, pero plantea la posibilidad de que la activación de los neutrófilos durante la respuesta temprana, regule críticamente la capacidad de la IL-18 para contribuir al fenotipo de las siguientes respuestas inmunes adaptativas.

Con base a los resultados obtenidos en este trabajo con respecto a la producción de IL-1 β , se tiene la primer evidencia para considerar a *H. pylori* como activador del inflammasoma desencadenándose la respuesta inflamatoria a través de la maduración de la IL-1 β , citocina proinflamatoria que juegan un papel importante en la producción IL-12 y en la inducción de citotoxicidad, al promover la maduración de linfocitos T y de células NK. IL-1 β también participa en la inducción de la producción de NO y ROS, los cuales además de estar siendo inducidos por, dicha citosina, se están produciendo normalmente por el estrés generado en el ciclo celular y el inducido por la propia bacteria (Wang y cols., 2005; Handa y cols., 2010; Cha y cols., 2010). ROS es un importante activador del inflammasoma NALP3 (Dinarello, 2010), que además de tener cualidades antimicrobicas, puede funcionar como molécula de transducción de señales que inducen la expresión de diversas citocinas inflamatorias y quimiocinas. En monocitos, las especies reactivas de oxígeno activan transitoriamente al canal de Ca²⁺ TRPM2 (por sus siglas en ingles receptor potential protein M2), que señaliza corriente abajo de ERK (extracellular signal regulated), activando y permitiendo la translocación de NF- κ B al núcleo. Así también, promueve la quimiocina de reclutamiento a neutrófilos. (neutrophil-recruiting chemokine milieu) (Soehnlein y, Lindbom, 2010).

Se sabe que la vida media del neutrófilo incrementa en procesos inflamatorios. Sin embargo, en este trabajo fue importante determinar la viabilidad de los neutrófilos a través del tiempo de experimentación. Esto con la finalidad de comprobar que la producción de la IL-1 β se debe a la activación de los neutrófilos y no a la liberación por la muerte que pudiera estar llevándose a cabo al entrar el neutrófilo en

contacto con *H. pylori*. La viabilidad de los neutrófilos se determinó en presencia de la cepa tipo 26695 y de la mutante en VirD4, a los diferentes tiempos empleados en la cinética de producción de IL-1 β , observándose que no hubo diferencias significativas con ninguna de las dos cepas, a los diferentes tiempos de infección, con respecto a los neutrófilos sin tratar. Con esto, se pudo comprobar que la viabilidad de los neutrófilos se mantiene a lo largo del cultivo celular en presencia y ausencia de la infección por *H. pylori*.

Mediante el uso de anticuerpos monoclonales y citometría de flujo, en nuestro grupo de trabajo se determinó la expresión de receptores en la superficie de los neutrófilos la participación de los TLRs 2 y 4 en la activación de neutrófilos por la infección con *H. pylori* (Alvares-Arellano y cols., 2007). Demostrando que la participación de estos receptores sólo estaba implicada en la producción de IL-8 e IL-10 pero no en la de IL-1 β ; por lo que se consideró la probable participación del inflamasoma en la maduración de IL-1 β . Para demostrar esta hipótesis, se realizaron ensayos de inhibición de los componentes del inflamasoma, para lo que primero se determinó la viabilidad de los neutrófilos a las 6 y 24 h en presencia de los siguientes compuestos químicos que inducen la inhibición s del inflamasoma: KCl, gliburide y Z-VAD-fmk. Inicialmente se utilizaron diferentes concentraciones previamente reportadas en la literatura, con la finalidad de encontrar la concentración óptima, a la cual no se generara un efecto tóxico para la célula a los diferentes tiempos de tratamiento. A las 6 h de incubación, no se observó cambio en la viabilidad de los neutrófilos con ninguna concentración de los diferentes inhibidores. Sin embargo, a las 24 h se observó que la viabilidad celular comenzó

a descender a partir de la concentración de 20 mM para KCl, 100 μ M para gliburide y 10 μ M para Z-VAD-fmk (inhibidor de caspasa 1).

La determinación de la participación del Inflamasoma NALP3 por medio de los ensayos de inhibición de la activación del inflamasoma NALP3 y de uno de sus componentes, caspasa 1, a través del KCl (10 mM), del gliburide (50 μ M) y de Z-VAD-fmk, inhibidor específico para caspasa 1; permitió observar claramente que en el proceso de maduración de la citocina IL-1 β , el inflamasoma participó en respuesta a la infección por *H. pylori*; ya que los inhibidores utilizados actúan de manera directa o indirecta contra los componentes del inflamasoma y a diferentes niveles del ensamble de este complejo multiproteico. En el caso de NALP3, los inhibidores actúan de manera indirecta, ya que estos alteran la concentración de K⁺ intracelular, evitando de esta forma la activación del inflamasoma. Sin embargo, el inhibidor comercial Z-VAD-fmk, actúa de manera específica y directa, ya que se une irreversiblemente al sitio activo de la enzima, evitando que lleve a cabo la escisión de la pro-IL-1 β y la pro-IL-18. Se encontró diferencia significativa en la producción de IL-1 β al utilizar los inhibidores KCl, gliburide y Z-VAD-fmk en los neutrófilos infectados con la cepa tipo; observándose que la producción de IL-1 β disminuyó considerablemente (50%) para los dos primeros inhibidores y drásticamente (70%) con Z-VAD-fmk, haciendo mucho más evidente la participación del inflamasoma y la importancia que este tiene en el proceso inflamatorio desencadenado por la infección con *H. pylori*, haciéndolo un posible blanco terapéutico. En el caso de la cepa mutante VirD4⁻, la diferencia fue significativa con los tres inhibidores. Con Z-VAD-fmk, la producción de la citocina

disminuyó en un 40%, con KCl y gliburide disminuyó en un 20 y 30% respectivamente.

En el ensayo de inhibición de la producción de IL-18 no se encontró diferencia significativa con ningún inhibidor con respecto a la inducción de esta citocina, con la cepa tipo y la cepa mutante VirD4⁻ de *H. pylori*; ya que se observó una alta concentración de dicha citocina en los controles sin infección, por lo que no podemos saber si el inflamasoma NALP3 de los neutrófilos humanos participa en su maduración.

La expresión de las proteínas ASC y NALP3 se ha demostrado en macrófagos y células premonocíticas (THP-1) de manera constitutiva y como consecuencia de infección por *Pseudomonas*, DNA y LPS de *E. coli*. Sin embargo, a la fecha no existen reportes de la expresión de ASC en los neutrófilos. En este trabajo por primera vez se detectó ASC como una molécula inducible por la infección con *H. pylori*, detectándola en todos los tiempos estudiados. Adicionalmente, se detectó que se encuentra en la región citoplasmática en las células infectadas. Por otro lado, la expresión de NALP3 previamente se reportó en neutrófilos por Kummer y cols., 2007 y recientemente por Ekman y Cardell, 2010, al ser activados por LPS y MDP, ligandos ya conocidos del inflamasoma en otras estirpes celulares. En este trabajo sólo se pudo detectar por inmunotinción a las 24 h y por western-blot a los tiempos de 1, 3 y 6 h en los neutrófilos infectados con *H. pylori*, observándose que la expresión de NALP3 es inducible y podría proponerse a *H.pylori* como un inductor de la activación del inflamasoma. Su presencia y participación pudo constatarse por los experimentos de inhibición realizados, ya que se sabe que

NALP3 se inhibe a través de cambios en la concentración de potasio, actuando a nivel de los receptores P2X7 dependientes de ATP (Pelegri y Surprenant, 2006).

Se sabe que el procesamiento y secreción de IL-1 β e IL-18 requiere de la actividad de la caspasa 1, la cual se activa después del ensamble del inflamasoma (Martinon y cols., 2002). Por lo cual, en este trabajo fue importante determinar la activación durante la infección con *H. pylori*, encontrándose que la caspasa 1 se está activa de manera basal en los neutrófilos no infectados y que en las primeras horas de infección esta actividad disminuye, lo cual sugiere que pudiera estar inhibiendo el proceso de apoptosis. Sin embargo, la activación de caspasa 1 incrementa, conforme al tiempo de infección en los neutrófilos.

Cabe mencionar que en este trabajo por primera vez se demuestra la participación del inflamasoma NALP3 en la inducción de IL-1 β durante la infección de neutrófilos humanos con *H. pylori*, disectando la participación de cada uno de sus componentes y estimula a seguir estudiando la respuesta inmune innata desencadenada por el neutrófilo, incluyendo otros mecanismos de maduración de las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18, las posibles interacciones entre los receptores TLRs y NLRs, que se sabe existen en otros modelos celulares para erradicar la infecciones, como por ejemplo la que existe entre el TLR5 e IPAF (Nlr4) que activan la vía de iNOS (Oxido Nitrico Sintasa inducible) (Miao y cols., 2007; Buzzo, y cols., 2010), así como, la identificación de los ligando de *H. pylori* que estén activando al inflamasoma NALP3 o IPAF.

Conclusiones

- *H. pylori* induce la producción de IL-1 β en los neutrófilos en forma tiempo dependiente desde las 3 h de infección y es independiente de VirD4, lo que indica que la inducción de IL-1 β no depende de la inyección de algún ligando a través del T4SS.
- *H. pylori* induce la expresión de los componentes del inflamasoma: ASC y NALP3.
- Caspasa 1 se encuentra activa en los neutrófilos y disminuye su activación a las 3 h de infección.
- El inflamasoma NALP3 participa en la inducción de IL-1 β producida por la infección con *H. pylori* en neutrófilos humanos y es independiente de VirD4.
- La IL-18 se produce abundantemente en los neutrófilo de forma independiente al inflamasoma y a la infección por *H. pylori*.

Bibliografía

- Abbas A, Lichtman A, Pillai Shiv. Cellular and Molecular Immunology 6ªEd, Cap 2, Elsevier España.2008.
- Akhtar S, Li X, Chaudry IH, Choudhry MA. Neutrophil chemokines and their role in IL-18-mediated increase in neutrophil O₂- production and intestinal edema following alcohol intoxication and burn injury. Am J. Physiol Gastrointest Liver Physiol 2009; 297(2):G340-347.
- Algood HM, Cover TL. *Helicobacter pylori* Persistence: an Overview of Interactions between H.pylori and Host Immune Defenses. Clin Microbiol Rev 2006; 19(4):597-613.
- Alvarez-Arellano L, Camorlinga-Ponce M, Maldonado-Bernal C, Torres J. Activation of human neutrophils with Helicobacter pylori and the role of Toll-like receptors 2 and 4 in the response. FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 51:473–479.
- Arend WP. Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. Immunol Rev 2008; 223:20–38.
- Bernard M, Cappon A, Del Giudice G, Rappuoli R, Montecucco C. The multiple cellular activities of the VacA cytotoxin of Helicobacter pylori. Int J Med Microbiol 2004; 293(7-8):589-597.
- Borregaard N, Sorensen OE, Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. TRENDS in immunology 2007; (28)8:340-345.
- Bryant C, Fitzgerad K. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. Trends in Cell Biol 2009; 19(9):455-464.

- Buzzo CL, Campopiano JC, Massis LM, Lage SL, Cassado AA, Leme-Souza R, Dias de Cunha L, Russo M, Zamboni DS, Amarante-Mendes GP, Bortoluci KR. A novel pathway for inducible nitric oxide synthase (iNOS) activation through inflammasomes. *J. Biol Chem* 2010; 285(42):32087-32095.
- Cha B, Lim JW, Kim KH, Kim H. HSP90beta interacts with Rac1 to activate NADPH oxidase in Helicobacter pylori-infected gastric epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42(9):1455-1461.
- Chamaillard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol* 2003; 5(9):581-592.
- Chen G, Shaw MH, Kim Y-G, Núñez G. NOD-Like Receptors: Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease. *Annu. Rev Pathol Mech Dis* 2009; 4:365-368.
- Coeshott C, Ohnemus C, Pilyavskaya A, Ross S, Wieczorek M, Kroona H, Leimer AH, Cheronis JC. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc. Natl Acad Sci*1999; 96: 6261–6266.
- Dinarello CA. IL-1: Discoveries, controversies and future. *Eur J Immunology* 2010; 40:595-653.
- Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 2008; 453:1122–1126.
- Ekman AK, Cardell LO. The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology* 2010; 130(1):55-63.

- Fischer W, Püls, J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R: Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol* 2001; 42:1337-1348.
- Fontham ET, Ruiz B, Perez A, Hunter F, Correa P. Determinants of *Helicobacter pylori* infection and chronic gastritis. *Am J Gastroenterology*. 1995; 90:1094-1101.
- Franchi L, Chen G, Marina-Garcia, Abe A, Qu Y, Bao S, Shayman JA, Turk J, Dubyak GR, Nuñez G. Calcium-independent phospholipase A2 beta is dispensable in inflammasome activation and its inhibition by bromoenol lactone. *J Innate Immun* 2009; 1(6):607-617.
- Fuentes-Pananá E, Camorlinga-Ponce M, Maldonado-Bernal C. Infección, inflamación y cáncer gástrico *Salud pública Méx* 2009; 51(5):12-20.
- Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *Journal of Leukocyte Biology* 2003; 73:213-220.
- Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. *Helicobacter pylori*: a ROS-inducing bacterial species in the stomach. *Inflamm Res* 2010; 59(12):997-1003.
- Joosten LA, Netea MG, Fantuzzi G, Koenders MI, Helsen MM, Sparrer H, Pham CT, van der Meer JW, Dinarello CA, van den Berg WB. Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1beta. *Arthritis Rheum* 2009; 60:3651–3662.
- Kaisho, T, Akira, S. Toll-like receptor function and signalling. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:979-987.
- Kool M, Pétrilli V, De Smedt T, Rolaz A, Hammad H, van Nimwegen M, Bergen IM, Castillo R, Lambrecht BN, Tschopp J. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol* 2008; 181:3755–3759.

- Kuijpers TW, Roos D. Neutrophils. Encyclopedia of life sciences 2001; 1-10.
- Kummer J.A, Broekhuizen R. , Everett H. , Agostini L, Kujik L., Martinon F., van Bruggen R. and Tschopp Jürg. Inflammasome Components NALP 1 y 3 Show Distinct but Separate Expression Profiles in Human Tissues Suggesting a Site-specific Role in the Inflammatory Response. J. Histochem. Cytochem 2007; 55:443-452.
- Kutter S, Buhrdorf R , Haas J, Schneider-Brachert W, Haas R, Fischer W. Protein Subassemblies of the Helicobacter pylori Cag Type IV Secretion System Revealed by Localization and Interaction Studies. J. Bacterio 2008; 190(6): 2161–2171.
- Lamkanfi M. and Dixit V.M. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. Immunol Rev 2009; 227:95-105.
- Martinon F, Burns K, y Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. Mol Cell 2002; 10(2):417-426.
- Martinon F, Mayor A y Tschopp J. The Inflammasomes:Guardians of the body. Annu Rev Immunol 2009. 27:229-265.
- Martinon F. Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. Cell Death Differentiation 2007; 14:10-22.
- McIntire CR, Yeretssian G y Saleh M. Inflammasomes in infection and inflammation. Apoptosis 2009; 14:522-535.
- Miao E, Andersen-Nissen E, Warren S.E, Aderem A. ; TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. Semin Immunopathol 2007; 29:275–288.
- Montecucco C, Rappuol R. Living dangerously: how Helicobacter pylori survives in the human stomach. Nat Rev Mol Cell 2001; 2:457-466

- Paniagua GL, Monroy E, Rodriguez R, Arroniz S, Rodriguez C, Cortes JL, Camacho A, Negrete E, Vaca S. Frequency of vacA, cagA and babA2 virulence markers in Helicobacter pyloristrains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009; 8-14.
- Patel JC, Galán JE. Investigating the function of Rho family GTPases during Salmonella/host cell interactions. *Methods Enzymol* 2008; 439:145-158.
- Pedra JHF, Cassel SL, y Sutterwala FS. Sensing pathogens danger signals by the inflammasome. *Curr Opin Immunol* 2009; 21:1-7.
- Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin -1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 2006; 25:5071-5082.
- Pétrilli V, Dostert C, Muruve D.A. y Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:615-622.
- Philpott DJ, Belait D, Troubadour P, Thiberge JM, Tankovic J, Labigne A and Ferrero RL. Reduced activation of inflammatory responses in host cells by mouse-adapted Helicobacter pylori isolates. *Cell Microbiol* 2002; 4:285-296.
- Polenghi A, Bossi F, Durigutto P, Cabrelle A, Tamassia N, Cassatella MA, Montecucco C, Tedesco F, de Bernard M. The neutrophil-activating protein of Helicobacter pylori crosses endothelia to promote neutrophil adhesion in vivo. *J Immunol* 2007; 178:1312-1320.
- Robertson SE , Young JD, Kitson S, Pitt A, Evans J, Roes J, Karaoglu, Ling Santora D, Ghayur T, Liew FY, Gracie JA,. McInnes IA. Expression and alternative processing of IL-18 in human neutrophils. *Eur. J. Immunol* 2006; 36:722–731

- Saito H, Yamaoka Y, Ishizone S, Maruta F, Sugiyama A, Graham DY, Yamauchi K, Ota H, Miyagawa S. Roles of virD4 and cagG genes in the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* using a Mongolian gerbil model. *Gut* 2005; 54(5):584-590.
- Sánchez-Jimenez MM, Carnona Castro NM; Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Infectio Asociación Colombiana de Infectología* 2003; 7(1):22-29.
- Silliman CC, Kelher MR, Gamboni-Robertson F, Hamiel C, England KM-, Dinarello CA, Wyman TH, Khan SY, Dinarello CA, McLaughlin NJ, Bercovitz RS, Banerjee A. Tumor necrosis factor-alpha causes release of cytosolic interleukin-18 from human neutrophils. *Am J Physiol Cell* 2010; 298(3):C714-724.
- Silva M. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *Journal of Leukocyte Biology* 2010; 87:93-102.
- Smith M, Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice A, Ryan K, Crowe S y Goldbergn J. Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR5, but Not TLR4, Are Required for *Helicobacter pylori*-induced NFk-B Activation and Chemokine Expression by Epithelial Cells. *The journal of Biological Chemistry* 2003; 278:35(29). 32552–32560.
- Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature Review Immunology* 2010; 10(6):427-439.
- Stehlik C., Dorfleutner A. COPs and POPs: Modulators of Inflammasome Activity. *Inmunology* 2007; 179(12):7993-7998.
- Sutterwala FS. Oguia Y, Flavell RA. The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. *Leukoc Biol* 2007; 82(2):259-264.

- Tai'eb A. NALP1 and the inflammasomes: challenging our perception of vitiligo and vitiligo-related autoimmune disorders. *Pigment Cell Res* 2007; 20(4): 260–262.
- Testerman TL, McGee DJ, Mobley HL. *Helicobacter pylori* growth and urease detection in the chemically defined medium Ham's F-12 nutrient mixture. *J Clin Microbiol* 2001; 39(11):3842-3850.
- Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, Gomez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, Muñoz O. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Infect Dis* 1998; 178(4):1089-1094.
- Torres Valadez F, García Menéndez A, Zárate Osorno A. Cuadernos del seminario Medicina y salud *Helicobacter pylori*. Editores Intersistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, 2010.
- van Doorn LJ, Figueredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W Quint W. Clinical relevance of the CagA, VacA, and IceA status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998; 115(1):58-66.
- Wang YF, Guo CL, Zhao LZ, Yang GA, Chen P, Wang HK.. Effect of *Helicobacter pylori* infection on gastric mucosal pathologic change and level of nitric oxide and nitric oxide synthase. *World J Gastroenterol* 2005; 11(32):5029-5031.