



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

“Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$  sobre  
la expresión de claudinas y la secreción de citocinas  
en células AGS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A:

Paola Isabel Andrade Alvarez



DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. Erika Patricia Rendón Huerta

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno:

Apellido paterno: Andrade  
Apellido materno: Alvarez  
Nombre (s): Paola Isabel  
Teléfono: 5338-5860  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad: Ciencias  
No. De cuenta: 303049632

2. Datos del tutor:

Grado: Dr  
Nombre (s): Erika Patricia  
Apellido paterno: Rendón  
Apellido materno: Huerta

3. Datos del sinodal 1

Grado: Dr  
Nombre (s): Luis Felipe  
Apellido paterno: Jiménez  
Apellido materno: García

4. Datos del sinodal 2

Grado: Dr  
Nombre (s): Luis Felipe  
Apellido paterno: Montaña  
Apellido materno: Estrada

5. Datos del sinodal 3

Grado: Dr  
Nombre (s): Alfonso José  
Apellido paterno: Vilchis  
Apellido materno: Peluyera

6. Datos del sinodal 4

Grado: Dr  
Nombre (s): Alejandro  
Apellido paterno: Marche  
Apellido materno: Cova

7. Datos del trabajo escrito:

Título: Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$  sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS  
Número de páginas: 91  
Año: 2011



FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

**DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ**  
**Director General**  
**Dirección General de Administración Escolar**  
**Presente**

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$  sobre la expresión de claudinas y secreción de citocinas en células AGS**

realizado por **Andrade Álvarez Paola Isabel** con número de cuenta **3-0304963-2** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Luis Felipe Jiménez García

Propietario Dr. Luis Felipe Montaña Estrada

Propietario Dra. Erika Patricia Rendón Huerta  
Tutora

Suplente Dr. Alejandro Marche Cova

Suplente Dr. Alfonso José Vilchis Peluyera

**Atentamente,**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU "**  
**Ciudad Universitaria, D. F., a 08 de noviembre de 2011**  
**EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES**

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.  
MAG/CZS/cigs

## *“Agradecimientos”*

*Agradezco a todas esas personas que han estado presentes en cada día de mi vida, inspirando cada detalle, ya que gracias a que se han encontrado en mi vida hoy soy quien soy.*

*Gracias por ser parte de lo que más amo,  
Gracias por entender mis enfados,  
Gracias por demostrarme que se puede,  
Gracias por la simpleza con que ves las cosas,  
Gracias por no reprocharme nada,  
y sobre todo GRACIAS por ser parte de mi vida.*

*Si tuviera que mencionar nombres nunca acabaría ya que cada persona me ha iluminado con toda su luz, ustedes saben cuánto valen en mi vida.....*

## Índice:

<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>3</b>
1. Helicobacter pylori.....	3
1.1 Generalidades.....	3
1.2 Penetración y adherencia: Interacción con el epitelio gástrico humano.....	4
1.3 Principales factores de virulencia responsables de la colonización y patogenicidad.....	6
1.4 Mecanismos de CagA.....	8
1.5 Epidemiología.....	9
2. Uniones celulares.....	11
2.1 Uniones comunicantes.....	12
2.2 Desmosomas y hemidesmosomas.....	13
2.3 Uniones adherentes.....	14
2.3.1 Caderinas.....	14
2.3.2 Cateninas.....	14
2.3.3 Nectinas.....	14
2.3.4 Integrinas.....	15
2.4 Uniones estrechas.....	16
2.4.1 Ocludinas.....	17
2.4.2 JAM.....	17
2.4.3 Claudinas.....	18
3. Citocinas.....	23
3.1 Interleucina 1 (IL-1).....	25
3.2 Interleucina 8 (IL-8).....	26
3.3 Interferon gamma (INF- $\gamma$ ).....	27
3.4 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).....	28
<b>Antecedentes.....</b>	<b>30</b>

<b>Justificación.....</b>	<b>32</b>
<b>Objetivo.....</b>	<b>33</b>
A. Objetivo general	
B. Objetivos particulares	
<b>Hipótesis.....</b>	<b>34</b>
<b>Metodología.....</b>	<b>35</b>
1. Descongelamiento de células AGS.....	35
2. Propagación y mantenimiento de las células AGS.....	36
3. Congelamiento de células AGS.....	36
4. Co-cultivo de células AGS y cepas CagA+ y CagA- de <i>Helicobacter pylori</i> .....	37
5. Tratamiento de células AGS con IL-1 $\beta$ y cepas de <i>Helicobacter pylori</i> .....	38
6. Extracción total de proteínas .....	38
7. Determinación de proteínas.....	39
8. Análisis por Western Blot.....	40
9. Borrado de membranas.....	41
10. Ensayo de ELISA para la determinación de la concentración de IL-1 $\beta$ e IL-8.....	42
<b>Resultados.....</b>	<b>44</b>
1. Expresión de claudinas en co-cultivos de células AGS con cepas CagA+ y CagA- de <i>Helicobacter pylori</i> .....	44
2. Observación de co-cultivos de células AGS y cepas CagA+ y CagA- de <i>H. pylori</i> en microscopio invertido.....	52
3. Cuantificación de IL-1 $\beta$ en medios condicionados de co-cultivos de células AGS y cepas CagA+ y CagA- de <i>H. pylori</i> .....	54
4. Expresión de claudinas 5, 6 y 7 en co-cultivos de células AGS con IL-1 $\beta$ y cepas CagA+ y CagA- de <i>Helicobacter pylori</i> estimuladas previamente con 10ng/mL de IL-1 $\beta$ .....	56

5. Observación en microscopio invertido de células AGS estimuladas con IL-1 $\beta$ y expuestas a la presencia cepas CagA+ 295 y CagA- 25 de <i>H. pylori</i> .....	63
6. Cuantificación de IL-8 en medios condicionados de células AGS co-cultivadas con cepas CagA+ y CagA- de <i>H. pylori</i> .....	68
<b>Discusión.....</b>	<b>70</b>
1. Expresión de claudinas en co-cultivos de células AGS con cepas CagA+ y CagA- de <i>Helicobacter pylori</i> .....	70
2. Expresión de claudinas en células AGS, estimuladas previamente con IL-1 $\beta$ , co-cultivadas con cepas CagA+ y CagA- de <i>Helicobacter pylori</i> .....	71
3. Observación en microscopio invertido de co-cultivos de células AGS y cepas CagA+ y CagA- de <i>H. pylori</i> , estimuladas y no estimuladas con IL-1 $\beta$ . ....	72
4. Cuantificación de IL-1 $\beta$ e IL-8 en medios condicionados de co-cultivos de células AGS con cepas CagA+ y CagA- de <i>H. pylori</i> .....	73
<b>Conclusión.....</b>	<b>75</b>
<b>Perspectivas.....</b>	<b>76</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>77</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>85</b>

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

## **Resumen**

*Helicobacter pylori* es una bacteria gram negativa que infecta y persiste en el estómago humano en más de la mitad de la población mundial, en algunos individuos induce gastritis crónica progresando hasta cáncer gástrico. Recientemente la Organización Mundial de la Salud (OMS) la clasificó como carcinógeno tipo I.

*Helicobacter pylori* puede ser clasificada en cepas CagA+ y CagA- basado en la presencia o ausencia de la expresión del gen cagA el cual está localizado al final de la isla de patogenicidad (cagPAI). Se ha demostrado que cepas CagA+ inducen cáncer gástrico de una manera más agresiva respecto a las cepas CagA-.

*H. pylori* se adhiere a las células epiteliales alterando la estructura y función de las uniones intercelulares entre ellas, las uniones estrechas. Las uniones estrechas están formadas principalmente por: 1) proteínas citosólicas y 2) proteínas transmembranales entre las que se encuentran la familia de las claudinas, ocludina y JAM.

Recientemente se han reportado estudios en donde se muestra que *H. pylori* promueve la deslocalización de claudinas 4 y 5, lo que altera las funciones de la barrera epitelial. Por otro lado se ha reportado la expresión de claudinas 6, 7 y 9 y su redistribución a citosol en biopsias de estómago de pacientes positivos a *H. pylori*. Lo anterior sugiere que la alteración de las claudinas podría ser un factor que, junto con los ya conocidos, promueva el desarrollo del cáncer gástrico.

Posterior a la adhesión bacteriana, las células epiteliales liberan IL-8 e IL-1 $\beta$  y junto con factores citotóxicos de *H. pylori*, se liberan proteasas y metabolitos provocando un alto grado oxidativo el cual podría causar daño al DNA, generar mutaciones y promover la aparición del cáncer gástrico. Por lo anterior, la relación entre el cáncer gástrico y la infección por las diferentes cepas (CagA+, CagA-) de *H. pylori* cada vez adquiere más relevancia, reforzando el papel de esta infección como un factor importante para la oncogénesis gástrica. Por ello nosotros analizamos el efecto de cepas CagA+ de *H. pylori* sobre la expresión de claudinas en la línea celular AGS derivada de adenocarcinoma gástrico humano. Las células AGS

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

fueron incubadas con cepas CagA+ y CagA- de *H. pylori* y la expresión de las claudinas y secreción de IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  fue determinada. Los resultados demostraron que: 1) claudina 5, 6 y 7 se encuentran alteradas en etapas tempranas de infección, 2) se correlacionó la presencia de BabA con la alteración en la expresión de claudinas 5 y 7, 3) la alteración de las claudinas 6 y 7 correlacionó de manera independiente con la estimulación de IL-1 $\beta$  y 4) la infección por *H. pylori* e IL-1  $\beta$  indujo secreción de IL-8, pero no de TNF- $\alpha$  ni INF- $\gamma$ .

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

## Introducción

### 1. *Helicobacter pylori*.

#### 1.1 Generalidades.

*Helicobacter pylori* (*H.pylori*) fue aislada por Barry Marshall y Robin Warren a partir de una biopsia de estómago humano en 1983. Ellos la identificaron como una bacteria que colonizaba el estómago humano y desde entonces ha sido intensamente investigada tanto su función como el efecto que causa en la célula. *H. pylori* es una bacteria gram-negativa, espiralada y microaerófila, que mide de 2 - 5  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.5 - 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, puede poseer hasta 6 flagelos unipolares o bipolares recubiertos por una vaina, crece a una temperatura de 37°C y una atmósfera parcial de 5% de CO<sub>2</sub> (1). *H.pylori* vive en el estómago y duodeno de los seres humanos y toma ventajas de los jugos gástricos producidos por el estómago para prevenir la sobrevivencia de virus, bacterias y otros organismos en su microambiente (2).

Mediante su actividad de ureasa, *H. pylori* cataliza la hidrólisis de la urea en amonio y dióxido de carbono para neutralizar la acidez del estómago y así poder mantenerse en la mucosa gástrica generando un pH casi neutro a su alrededor, manteniéndose adherida en la superficie epitelial de la mucosa gástrica (3) (Figura 1).

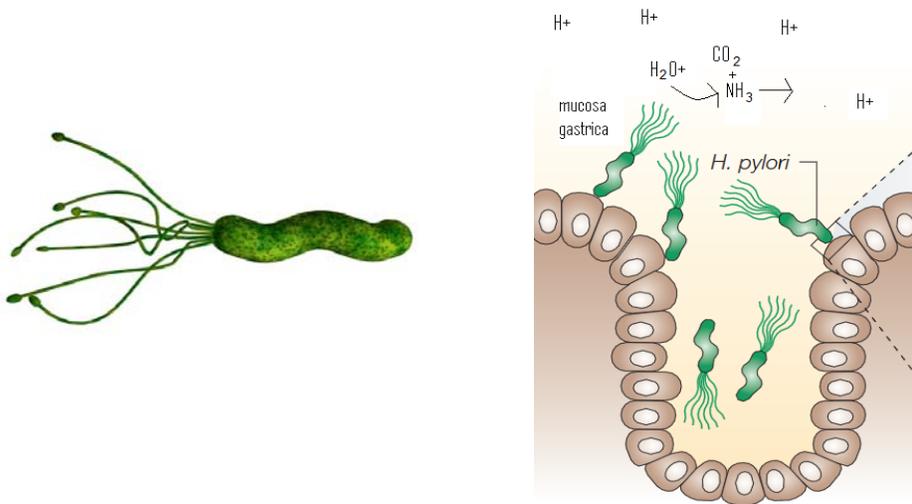


Fig. 1. *Helicobacter pylori* impulsada por sus flagelos se translada con movimientos giratorios para penetrar en la mucosa gástrica y adherirse al epitelio. (Modificado de Masanori Hatakeyam (2004) Nature (4); 688-694).

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

## 1.2 Penetración y adherencia: Interacción con el epitelio gástrico humano.

La transmisión de *H. pylori* puede llevarse a cabo por la vía oral-oral, fecal-oral o algunas veces se puede presentar una transmisión intrafamiliar (4).

*H. pylori* ingresa por la boca y con ayuda de sus flagelos llega hasta la capa de la mucosa gástrica, la cual recubre a las células epiteliales. Las propiedades de los flagelos le confieren características muy importantes a la bacteria; ya que con ellos puede buscar el dominio apical de las células epiteliales para poder adherirse a este y gracias a la polaridad de los flagelos la bacteria tiene la capacidad de sentir microambientes con pH muy bajos y alejarse de ellos, favoreciendo su permanencia en la superficie de la mucosa gástrica donde el pH es cercano a la neutralidad, esto es aprovechado por la bacteria para sobrevivir.

Una vez que la bacteria ha llegado a la capa epitelial se adhiere a la membrana celular o directamente en las uniones intercelulares, principalmente por proteínas de adhesión o adhesinas como babA, sabA, alpA, alpB, Hopo, HpA, las cuales son proteínas glicoconjugadas o lípidos bacterianos involucrados en el inicio de la colonización. Posterior a la adhesión la bacteria se ancla a la membrana de las células epiteliales y, mediante el sistema de secreción tipo IV (1), transfiere al hospedero muchos de los factores de virulencia (3). Los componentes conservados del sistema de secreción tipo IV incluyen a las ATPasas VirB4 y VirB11 localizadas en la membrana interna de la bacteria y con las que se provee de la energía para la translocación de los factores de virulencia al hospedero (5).

Una vez que ha inyectando sus toxinas, se generan una serie de eventos alterando la barrera epitelial y así *H. pylori* coloniza el epitelio gástrico.

Las células del epitelio gástrico responden a la infección de *H. pylori* por la activación de NF- $\kappa$ B (*factor nuclear kappaB*) y la alta regulación de la expresión de un sistema de genes proinflamatorios (6), provocando la infiltración de macrófagos y granulocitos dentro de la mucosa lo que conlleva a la inflamación del epitelio gástrico y su degeneración finaliza con apoptosis celular (7).

Tras la adherencia de *H.pylori* en la mucosa gástrica, se generan varios cambios, entre los

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

que se encuentran la inducción de cambios en la morfología celular mediados por la fosforilación de proteínas del citoesqueleto, activación de señales intracelulares, daño al DNA, incremento en la proliferación celular compensatoria, atrofia vía estrés oxidativo, inducción de apoptosis tipo 1 o autofagia programada tipo II, inducción de mutaciones en genes supresores de tumores y secreción de una gran variedad de citocinas y quimiocinas, entre las cuales destacan el TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1, IL-6 e IL-8 (8) (Figura 2).

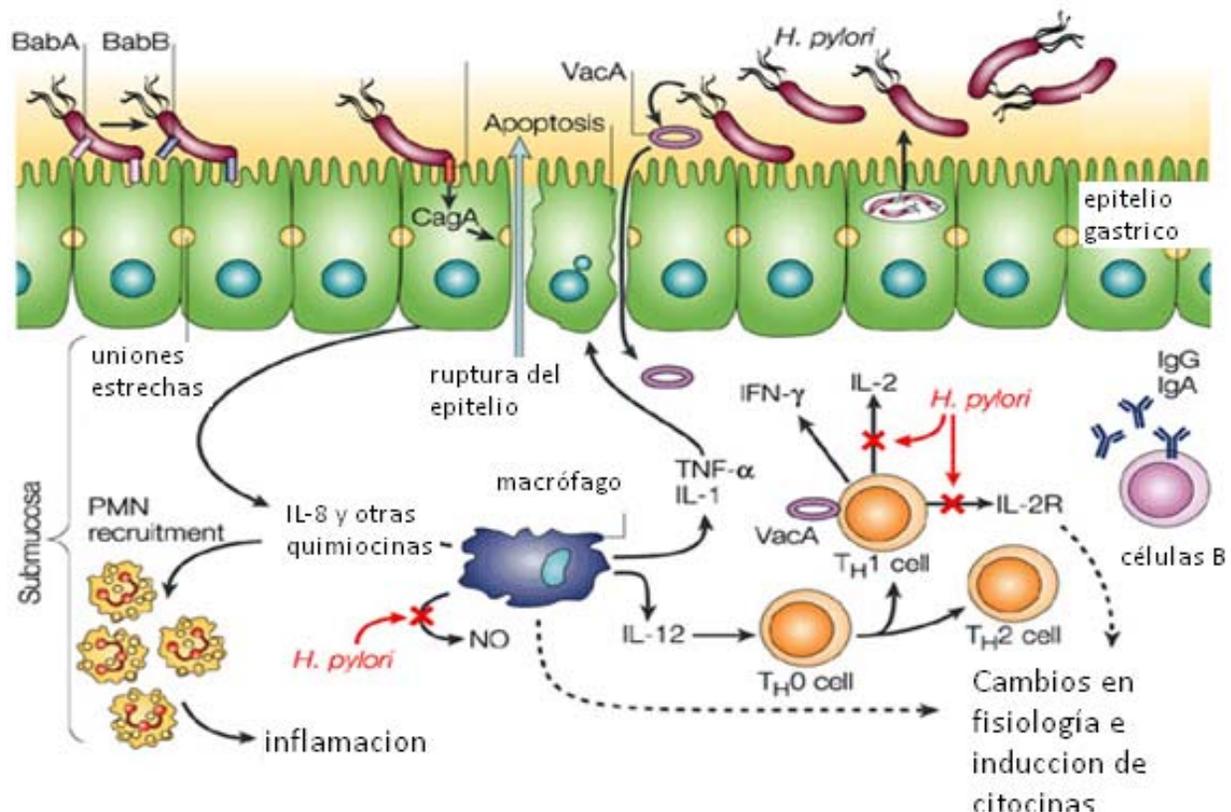


Fig. 2. Diversas respuestas que genera el hospedero ante la presencia de *Helicobacter pylori*. *H. Pylori* se une a las células del epitelio gástrico a través de varias adhesinas infiltrando diversas toxinas a la célula y promoviendo una serie de respuestas celulares. (Modificado de Denise M. Monack, *et al.* (2004) Nature Reviews Microbiology (2); 747-765).

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

## 1.3 Principales factores de virulencia responsables de la colonización y patogenicidad.

Para que *H. pylori* se adhiera a la célula y pueda colonizar la mucosa gástrica requiere de factores que contribuyan a la colonización y consiga al daño de la mucosa gástrica. Los factores que contribuyen a la colonización son (Figura 3):

- Ureasa
- Sistemas antioxidantes

- Adhesina fijadora de antígenos de grupos sanguíneos (**BabA<sup>1</sup>**)

BabA es una proteína de membrana externa codificada por el gen babA2 que fija el antígeno Lewis B y ABO y los antígenos sialil-Lewis x/a. Presenta dos alelos, babA1 y babA2, aunque solo babA2 es funcionalmente activo, este es recurrente en casos de úlcera duodenal y cáncer gástrico (9).

- Proteína inflamatoria de membrana externa (**OipA<sup>2</sup>**)

Es una adhesina que cuando se expresa junto a CagA se asocia con una respuesta inflamatoria aumentada de la mucosa gástrica. OipA y algunos peptidoglicanos (PG) se asocian también a la secreción y activación de algunas citocinas como la IL-8. OipA está relacionada con la presencia de gastritis crónica y úlcera duodenal (10).

- Citotoxina-A vacuolizante (**VacA<sup>3</sup>**)

Esta citotoxina presenta gran variación genética, y se encuentra dividida en dos regiones: m y s en donde m1 y m2 son regiones altamente variables y s1 y s2 son regiones que codifican al péptido señal; genotipos s1/m1 están asociados a niveles altos de dicha toxina, su presencia produce múltiples funciones y cambios morfológicos dentro de las células epiteliales gástricas (11) (Figura 4). VacA solo es expresada en un 65% a pesar de que todas las cepas la presenten, y se ha reportado que está asociada principalmente a la presencia de

---

<sup>1</sup> BabA: *Blood group antigen binding adhesin*

<sup>2</sup> OipA: *Outer membrane inflammatory protein A*

<sup>3</sup> VacA: *Vacuolating cytotoxin-A*

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

ulcera péptica (12). En la célula epitelial, VacA se une al receptor RPTP  $\alpha$  y  $\beta$  (*receptor protein tyrosine phosphatase alfa y beta*), se internaliza para formar poros y vacuolas o se introduce dentro de la membrana mitocondrial e induce activación de caspasa-3 promoviendo la apoptosis celular. En células epiteliales provoca vacuolización e induce apoptosis y en linfocitos inhibe la proliferación de células Th 0 y la presentación de antígenos por linfocitos B (13).

- Proteína citotóxica de membrana externa (**CagA**)

Esta citotoxina es codificada por el gen *cagA*, localizada en el final de la isla de patogenicidad *cagA* (*cagPAI*) (14), presenta un peso molecular de 120 y 130 KDa. En el huésped produce una respuesta similar a factores de crecimiento, se transloca a la célula por medio del Sistema de Secreción tipo IV, es fosforilada y modifica principalmente al citoesqueleto, en donde induce expresión proinflamatoria por citocinas como por ejemplo IL-8, provoca una dramática elongación celular, inflamación crónica y a largo plazo, puede promover una gran proliferación celular (15). *H. pylori* puede ser clasificada en cepas *cagA*<sup>+</sup> y *cagA*<sup>-</sup> basado en la presencia o ausencia del gen *cagA*.

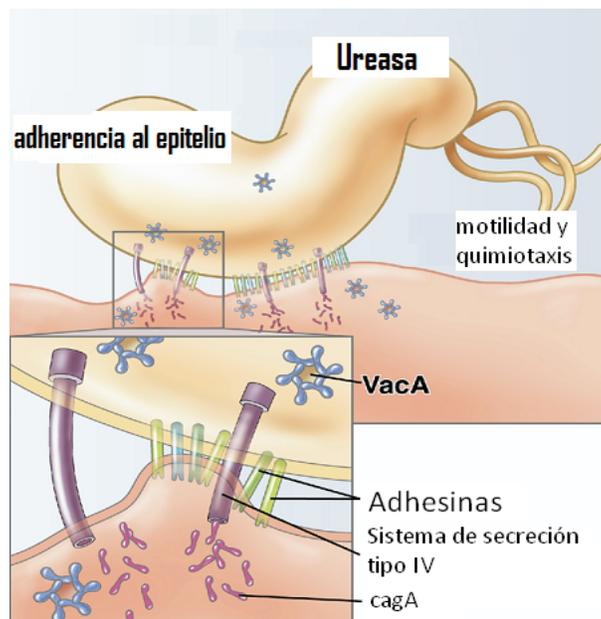


Fig. 3. Interacción entre *H. pylori* y el hospedero. Varias adhesinas median la unión de la bacteria a la parte apical de la membrana celular, secretando factores de citotoxicidad. (Modificado de Denise M. Monack et al. (2004) Nature Reviews Microbiology (2); 747-765).

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

## 1.4 Mecanismo de CagA

CagA es inyectado a la célula huésped mediante el Sistema de Secreción tipo IV (T4SS) para posteriormente ser translocado al interior de la célula, uniéndose a una  $\beta$ -integrina presente en la cara basal de la célula (14,16). Una vez translocada, CagA es fosforilada por la tirosina cinasa Src previamente fosforilada en una secuencia repetitiva, la región EPIYA. Posteriormente, se une a SHP-2 y desregula su actividad de fosfatasa promoviendo la separación de las uniones intercelulares, aumentando motilidad y elongación celular para favorecer la colonización bacteriana, infiltrándose entre las células del epitelio gástrico (17). CagA además interactúa con muchas proteínas interviniendo en diversas vías de señalización, reclutando múltiples proteínas celulares, para con ello, desregular gran variedad de funciones celulares, por lo tanto, podría contribuir a la malignidad de tumores gástricos (14) (Figura 4).

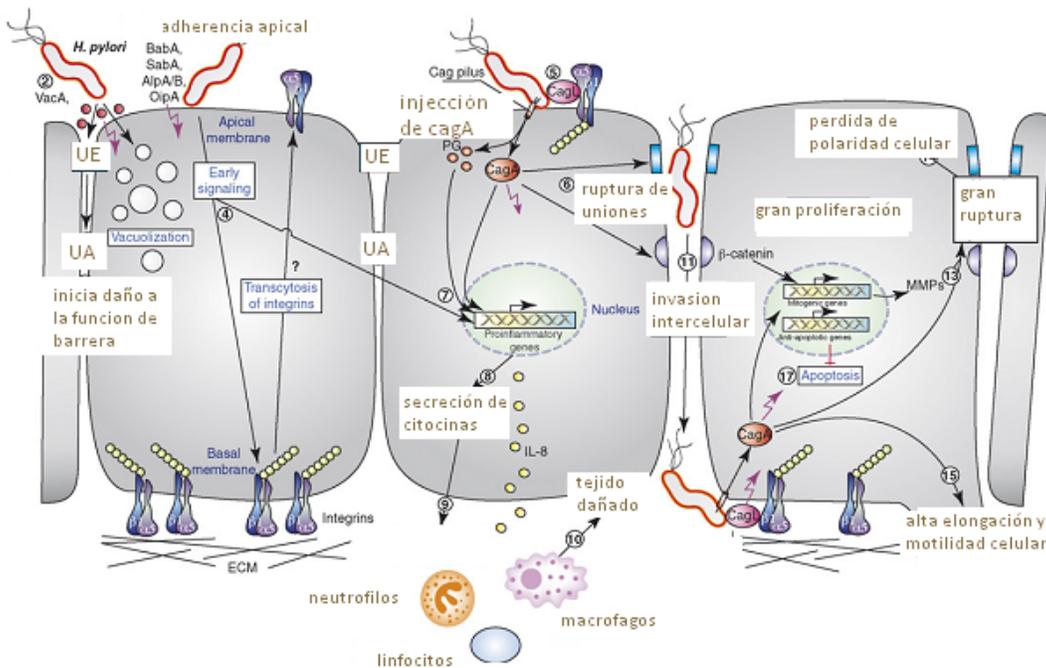


Fig.4. Modelo de la colonización de *H. pylori*. Gran variedad de factores de patogenicidad bacteriana modulan múltiples respuestas del hospedero durante el transcurso de la infección. VacA causa vacuolización celular y daño a nivel intercelular, mientras que CagA activa a NF- $\kappa$ B lo que a su vez induce la síntesis y secreción de citocinas pro-inflamatorias. Tras afectar diversas vías de señalización, *H. pylori* es capaz de promover la pérdida de la polaridad celular y proliferación. (Modificado de Stefan Moese, *et al.* (2004). *Infection and immunity* (72) 6; 3646–3649).

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

## 1.5 Epidemiología

Desde hace muchos años se ha sugerido que *H. pylori* y el humano mantienen una relación puramente comensalista, sin embargo hoy en día se sabe que esta relación es cada vez más patógena a causa de las circunstancias modernas. El resultado de la enfermedad generada por esta relación está determinada por múltiples factores incluyendo la genética del individuo, la composición de la cepa bacteriana, la variación de la respuesta inmune del hospedero, la dieta, el estado socioeconómico y las influencias ambientales (18).

Más de la mitad de la población mundial está infectada por *H. pylori*, esta infección ocurre principalmente en etapas infantiles y persiste por décadas sin presentar ningún tipo de síntomas (19).

Aproximadamente el 10% de las personas infectadas desarrollan patologías gástricas iniciando con gastritis crónica tipo B progresando a úlceras pépticas duodenales y finalmente puede producir cáncer gástrico. El cáncer gástrico es considerado el cuarto tipo de cáncer más común en el mundo con aproximadamente 930,000 nuevos casos diagnosticados al año, y la segunda causa de muerte mundial, por lo tanto, desde 1994 *H. pylori* fue declarada como bacteria carcinogénica clase 1 por la Organización de la Salud Mundial (4, 20).

Existen dos tipos de carcinomas gástricos humanos frecuentemente asociado a la presencia de *H. pylori*:

- a) Intestinal: Asociado a perturbaciones del ambiente en donde en la fase inicial de la carcinogénesis, se activa una respuesta inflamatoria por la infección de *H. pylori*. Esto es seguido por la pérdida de glándulas gástricas, alteraciones en las células epiteliales, incremento del rango de apoptosis y proliferación celular y más tarde una pérdida progresiva de diferenciación, finalizando con la presencia de neoplasias. Este tipo de carcinomas está relacionado con atrofia de la mucosa y metaplasia intestinal. Usualmente se presenta en la edad adulta y predominantemente en el sexo masculino (21, 22).
- b) Difuso: Debido a factores genéticos del hospedero, es un adenocarcinoma poco diferenciado que afecta principalmente a personas jóvenes y ambos sexos son

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

igualmente afectados. En dicho carcinoma existe una gran infiltración de células neoplásicas sin formar estructuras glandulares; no forma asociaciones metaplásicas. Hoy en día se han generado muchos modelos para poder explicar la asociación entre *H. pylori* y su hospedero y la manera en la que interactúan sus diversas proteínas para modificar las vías de señalización, entre estos estudios un modelo animal que se ha usado mucho es el jerbo de mongolia (*Meriones unguiculatus*) que ha llegado a ser uno de los mejores modelos ya que presenta similitud en cuanto a las patologías de las enfermedades que presenta. Respecto a modelos *in vitro*, los co-cultivos con líneas celulares como las células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) han ayudado a dilucidar diversos mecanismos por los cuales *H. pylori* puede co-existir en las células del hospedero (20-22).

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

## 2. Uniones celulares

Los tejidos epiteliales son láminas continuas de células que protegen a los órganos, cavidades y canales del organismo y estas uniones son las encargadas de dar integridad estructural y funcional al epitelio (23). Este complejo de uniones celulares que se encuentra en los contactos célula-célula es una estructura súper desarrollada formada por varios tipos de uniones dependiendo su función:

- Uniones comunicantes (UC)
- Desmosomas y hemidesmosomas
- Uniones adherentes (UA)
- Uniones estrechas (UE)

Las uniones celulares están asociadas en general al citoesqueleto de actina. El papel esencial que desempeñan estas uniones es formar la barrera de difusión paracelular, el aislamiento del ambiente externo, el ensamblaje y organización de la lámina basal del epitelio, la correcta manutención de la integridad epitelial durante la contracción y migración celular (24) y el mantenimiento de compartimentos celulares. De acuerdo a la abundancia proteica que se expresa en las membranas laterales la disposición de estas uniones y la comunicación con el citoesqueleto puede variar sustancialmente. Este aumento o disminución en el número de proteínas asociadas a las uniones se pueden encontrar involucrados en diferentes cambios que regulen el buen funcionamiento celular (25) (Figura 5).

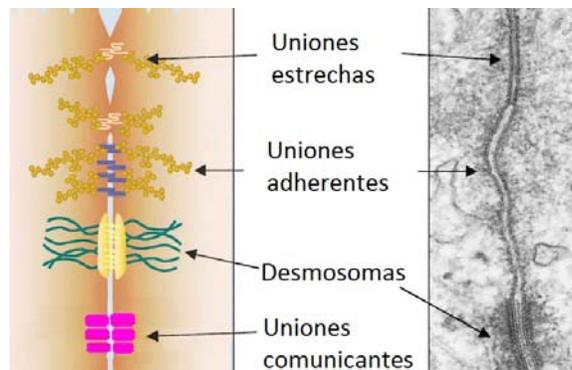


Fig. 5. Esquemización de la composición del complejo de uniones intercelulares (*izquierdo*), y ultraestructura de estas uniones observada por microscopía electrónica (*derecho*). (Modificado de Eveline E. Schneeberger and Robert D. Lynch (2004). *Am J Physiol Cell Physiol* (286); C1213–C1228).

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

## 2.1 Uniones comunicantes (UC)

Las uniones comunicantes también conocidas con el nombre de uniones en hendidura son canales llamados conexones formados por 6 subunidades de proteínas unidas a través de interacciones hidrofóbicas llamadas conexinas. Los conexones forman un poro acuoso entre el citoplasma de dos células adyacentes, y dan paso directo de citoplasma a citoplasma (26, 27).

Median la comunicación entre las células permitiendo el paso de iones y pequeñas moléculas aproximadamente de 1,000Da, dando lugar al acoplamiento metabólico y eléctrico entre las células. Estan encargadas de mediar el paso intercelular permitiendo conexiones eléctricas cuando se requieren señalizaciones de gran rapidez, facilitando la sinapsis (28) (Figura 6).

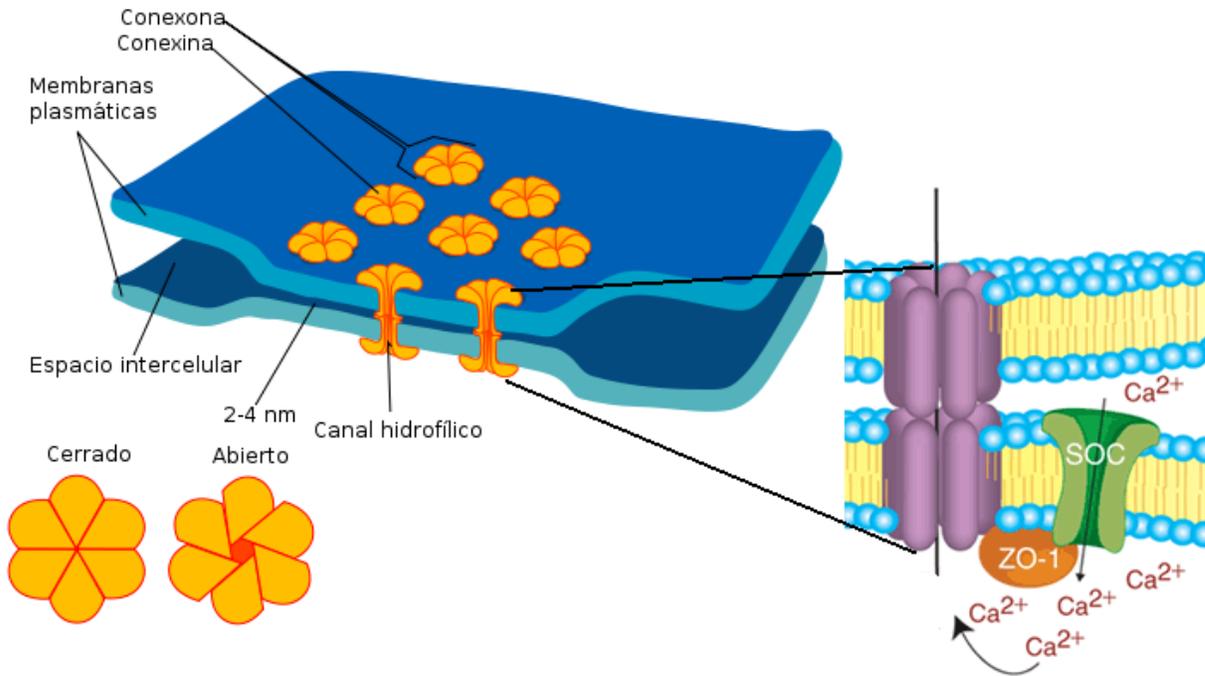


Fig. 6. Esquema que muestra los conexones formados en las uniones comunicantes. Se muestra la forma abierta y cerrada de los canales mediada por  $Ca^{2+}$ .

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

## 2.2 Desmosomas y hemidesmosomas

Los desmosomas y hemidesmosomas son uniones de anclaje intercelulares que proveen de gran adhesión mecánica intercelular, especialmente en tejidos que se encuentran sometidos a mecanismos de estrés. Dichas uniones anclan a los filamentos intermedios y puntos de contacto que fijan a las células adyacentes (29). Están compuestos por varias proteínas transmembranales entre ellas se encuentran las caderinas desmosomales, las desmogleinas, las desmocolininas, las placoglobinas, las placofilinas y las desmoplaquinas (30).

Miden de 0.2 a 0.5 micrómetros de diámetro en epidermis humana y consisten en densas placas acomodadas simétricamente en la superficie del citoplasma de la membrana plasmática mostrando una organización perpendicular (28). Los dominios estructurales de las células adyacentes interactúan entre sí de manera dependiente de Ca<sup>2+</sup> y sus dominios intercelulares se unen a las placoglobinas y desmoplaquinas que anclan a las proteínas del citoesqueleto (31).

La diferencia entre los desmosomas y los hemidesmosomas es que los desmosomas forman complejos de unión entre células epiteliales adyacentes y los hemidesmosomas anclan la cara basal de las células epiteliales a la lámina basal (31, 32) (Figura 7).

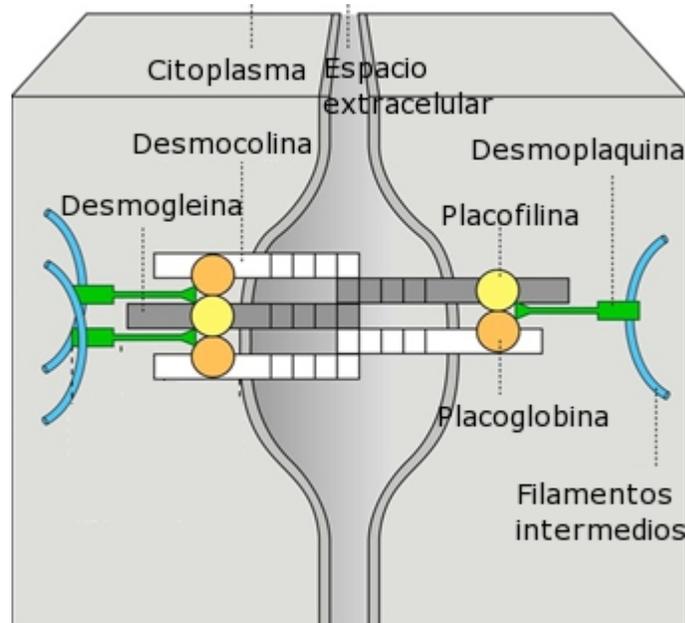


Fig. 7. Esquema representativo de la estructura que forman los desmosomas mediante las proteínas que los constituyen. (Modificado de Jens Waschke (2008). *Histochem Cell Biol* (130); 21–54).

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

## 2.3 Uniones adherentes (UA)

Las uniones adherentes son un cinturón continuo de glicoproteínas que sirve para mantener juntas a las células vecinas a través de familias de proteínas dependientes de Ca<sup>2+</sup> (33). Es una estructura que une a la membrana y a los componentes del citoesqueleto en regiones de contacto discretas, permitiendo la transmisión de fuerzas mecánicas a lo largo de la lámina epitelial. Su dominio citoplasmático se encuentra asociado a proteínas intracelulares, tales como los filamentos de actina. Están formadas por un complejo de proteínas membranales y factores asociados, entre ellos se encuentran las caderinas, integrinas, nectinas y cateninas siendo altamente específicas (33) (Figura 8).

### 2.3.1 Caderinas

Fueron la primera familia de proteínas descrita en las uniones adherentes. Se unen a una proteína idéntica de una célula adyacente y su dominio citoplasmático domina la actividad requerida para adherirse. Esta unión se puede hacer también con cateninas y es crucial para una adhesión muy fuerte. Están caracterizadas por tener grandes dominios citoplasmáticos y extracelulares y el dominio extracelular establece interacciones homofilicas entre células vecinas (33).

### 2.3.2 Cateninas

Participan como intermediarios para unir a las cadherinas con el citoesqueleto y es un componente importante de la vía de señalización Wnt. Hay tres tipos de cateninas  $\alpha$ ,  $\beta$  y p120 las cuales interactúan con el dominio intracelular de las cadherinas (23).

### 2.3.3 Nectinas

Son miembros de la superfamilia de proteínas de adhesión IgG. Con al menos cuatro miembros de nectinas, están encargadas de formar homodimeros de manera lateral, pueden

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

engancharse tanto a proteínas homofílicas y heterofílicas con otras nectinas o receptores de las mismas (33).

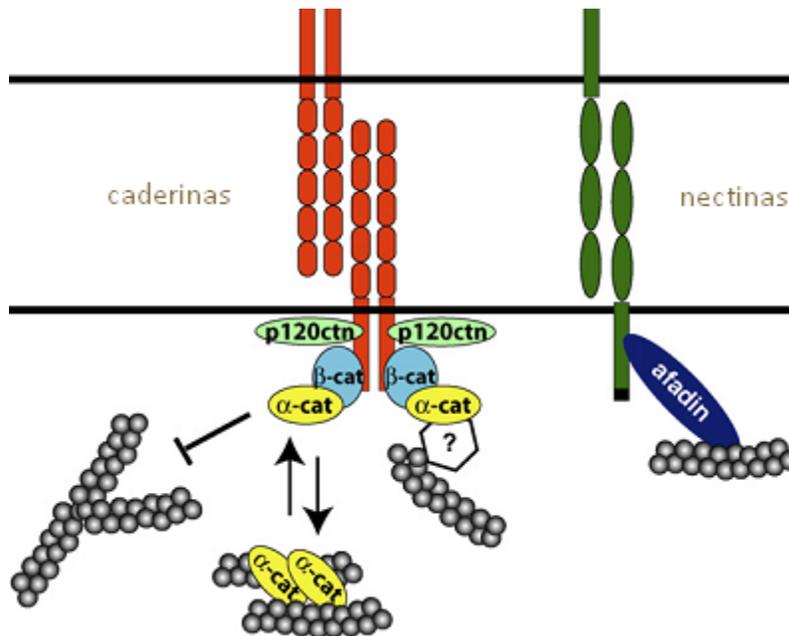


Fig. 8. Componentes estructurales de las uniones adherentes. Las caderinas y nectinas se adhieren homofílicamente directamente o indirectamente a los filamentos de actina vía cateninas (Buzz Baum and Marios Georgiou (2011) J. Cell Biol. (192) 6; 907–917).

### 2.3.4 Integrinas

Son una familia de glicoproteínas formadas por heterodímeros que consisten de una subunidad  $\alpha$  asociada a una subunidad  $\beta$ . Cada subunidad consta de un dominio transmembranal largo y uno corto localizado en el citoplasma. Se conocen 18 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$  los cuales pueden dimerizarse para formar alrededor de 24 diferentes receptores de integrinas (34). Su función radica en unir a la matriz celular con el citoesqueleto (35, 36).

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

## 2.4 Uniones estrechas (UE)

Las uniones estrechas se encuentran localizadas en la parte apical de los epitelios y endotelios, formando un cinturón continuo. Actúan como una barrera fisiológica para el transporte paracelular de agua, iones y pequeñas moléculas no iónicas, manteniendo la polaridad celular. Esto permite conservar la diferencia de gradientes entre la membrana basal y la lateral y previene el intercambio libre de la mayoría de los solutos entre el lumen y el espacio intersticial a lo largo de la ruta paracelular (37).

Las uniones estrechas están formadas por aproximadamente 50 proteínas. Dentro de estas proteínas se encuentran proteínas transmembranales (occludina, claudinas, tricelulaina, JAM), de anclaje (ZO-1, ZO-2, ZO-3, cingulina), asociadas a vías de transducción celular (MAPK, PKC, entre otras) y factores transcripcionales entre (ZONAB, ASIP, sAfinin, ZAK y GEF-H1, entre otras (37, 38) (Figura 9).

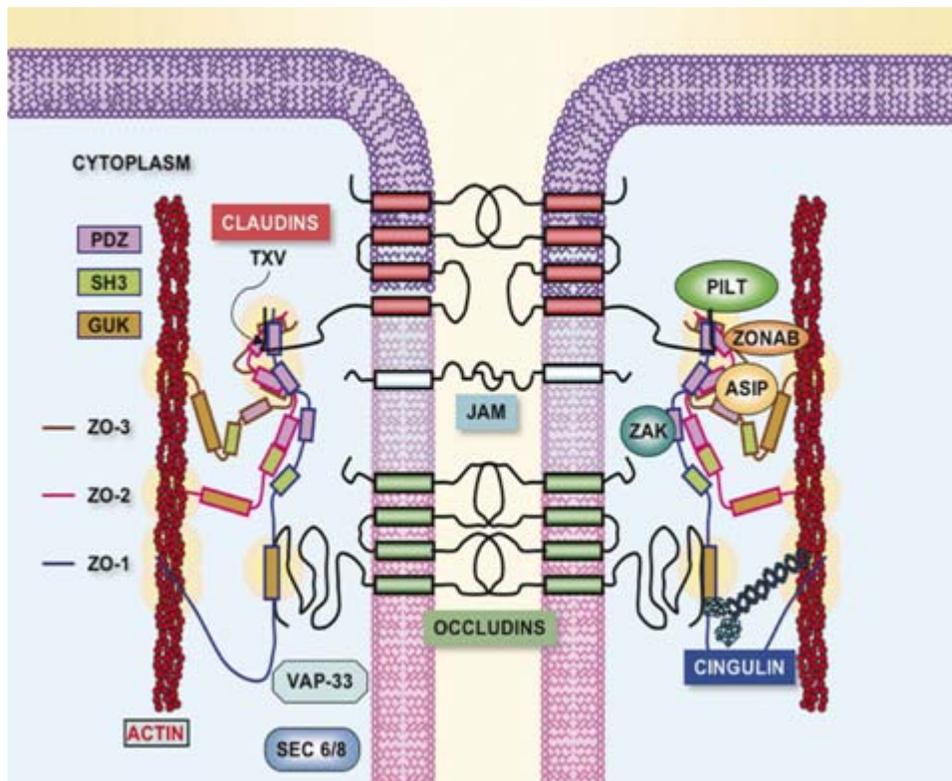


Fig. 9. Estructura molecular de las uniones estrechas. Uniones encontradas en la zona más apical de las células epiteliales y endoteliales (Marcelino Cereijido, *et al.* (2007). Archives of Medical Research (38) 465-478).

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

## 2.4.1 Ocludinas

Las ocludinas son proteínas integrales de membrana encontradas en las uniones estrechas de los epitelios y endotelios y tienen un peso aproximado de 60kDa. Presentan cuatro dominios transmembranales, formando dos asas extracelulares y una corta la cual se encuentra en el citosol. Tanto el dominio carboxilo como el amino se encuentran en el citosol y el dominio carboxilo terminal es rico en serina, treonina y tirosina favoreciendo su fosforilación mediada por tirosin-cinasas (39,40) (Figura 10).

Las dos asas extracelulares tienen una composición inusual de aminoácidos, ya que la primera contiene un alto contenido de tirosinas y glicinas (61%) y la segunda solo mantiene un 18% de tirosinas. La ocludina presenta una isoforma conocida como ocludina 1B la cual principalmente varía en el peso molecular siendo un poco más pesada (25, 41).

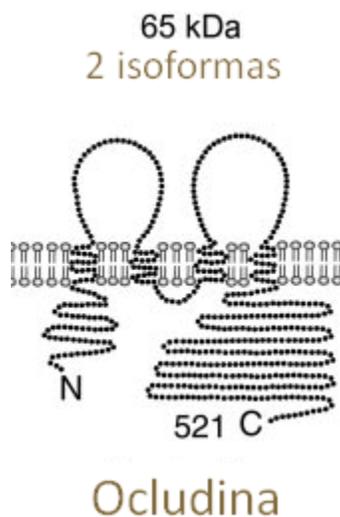


Fig. 10. Esquema que muestra la estructura de la ocludina. (Modificado de Eveline E. Schneeberger and Robert D. Lynch (2004) Am J Physiol Cell Physiol (286); C1213–C1228).

## 2.4.2 JAM (*Junctional Adhesión Molecule*)

Las JAM son glicoproteínas encontradas en endotelios, epitelios y en células hematopoyéticas. Esta familia de proteínas incluye a JAM A, JAM B, JAM C, ESAM (*endothelial cell specific adhesion molecule*), CAR (*coxsackievirus and adenovirus receptor*),

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

CLMP (*coxsackievirus and adenovirus receptor-like membrane protein*) y JAM 4 encontradas en gran cantidad de tejidos (42). Tienen un peso que va de 40 a 43kDa y se caracterizan por tener una región carboxilo terminal corta intracelular que une dominios PDZ3, ZO1 y PDZ9, un dominio transmembranal y una región extracelular con dos dominios semejantes a las inmunoglobulinas. Forman contactos homofilicos y facilitan la migración de monocitos a través de la vía paracelular (25) (Figura 11).

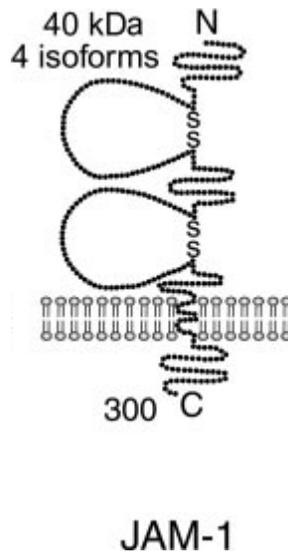


Fig. 11. Estructura de un monómero de JAM-1 mostrando su región carboxilo terminal en el citosol y su región amino terminal extracelularmente. (Modificado de Eveline E. Schneeberger and Robert D. Lynch (2004). *Am J Physiol Cell Physiol* (286); C1213–C1228).

### 2.4.3 Claudinas

El nombre claudina deriva de la palabra en latín “claudere” que significa cerrado. Las claudinas forman una familia de proteínas integrales de membrana consideradas como el esqueleto de las uniones estrechas (Figura 12) (43).

A la fecha se han reportado alrededor de 24 isoformas en mamíferos, y sus patrones de expresión son específicos de cada tejido. Tienen un peso molecular que va de 20 a 27kDa (44). Presentan cuatro dominios transmembranales (TMD-1, TMD-2, TMD-3 y TMD-4) y su región amino y carboxilo terminal están localizados en el citosol. El dominio carboxilo terminal es altamente conservado y contiene un dominio PDZ con el que se pueden unir a proteínas

---

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

citósolicas tales como ZO, PATJ entre otras, todas ellas involucradas en procesos de señalización (46). La región del carboxilo terminal varía en sus aminoácidos entre las diversas isoformas y puede ser fosforilada en los residuos de serina y/o treonina, esta fosforilación se encuentra asociada a cambios en la permeabilidad paracelular y resistencia transepitelial (47).

Exhibe dos asas extracelulares las cuales permiten el paso de iones a través del paso paracelular. La primer asa es más larga (entre 52 residuos de aa) que la segunda (de 16 a 33 residuos de aa) y es importante para la selectividad de cargas en el flujo paracelular ya que presenta dos cisteínas altamente conservadas que forman un enlace disulfuro promoviendo la estabilidad de la conformación proteica. La segunda asa forma dímeros con otras claudinas de células vecinas, y actúa como receptor para ciertas toxinas bacterianas (45).

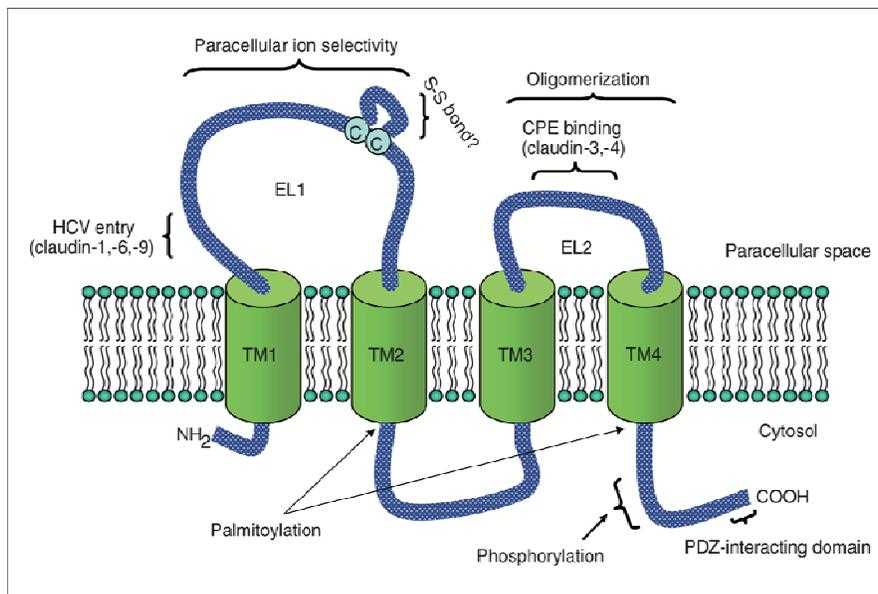


Fig. 12. Estructura general de un monómero de claudina en donde se observan algunas de las funciones reportadas para cada región (Madhu Lal-Nag and Patrice J Morin (2009) *Genome Biology* (10); 235).

Las claudinas pueden interactuar a lo largo de la membrana plasmática de la misma célula, interacción conocida como interacción *cis*, y con claudinas de la membrana vecina, interacciones *trans*. La interacción de una claudina con otra de su mismo tipo se conoce

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

como interacción homotípicas (cldn 1- cldn 1), cuando la interacción se lleva a cabo con una claudina de otro tipo se le conoce como interacción heterotípica (cldn 1- cldn 3) (Figura 13) (43, 48).

La mayoría de las claudinas son fosforiladas en la región carboxilo terminal. Esta fosforilación puede estar asociada a cambios en la función de barrera como es el caso de la fosforilación de las claudinas 3 y 4 cuya fosforilación da como resultado un incremento en la permeabilidad paracelular. Aunado a la fosforilación, la palmitoilación genera influencia en la estabilidad de las proteínas a nivel transcripcional (49)

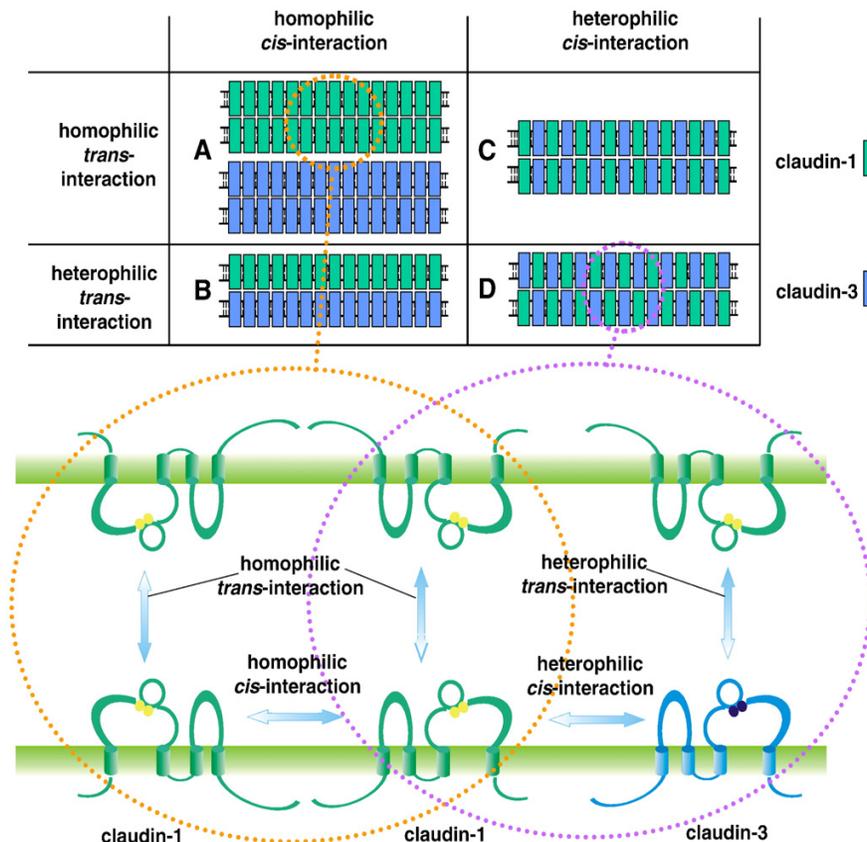


Fig. 13. Interacciones homofílicas y heterofílicas, *cis* y *trans* entre claudinas (Gerd Krause, et al. (2008) *Biochimica et Biophysica Acta* (1778); 631–645.).

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

### ***Papel de las claudinas en diversas patologías.***

Diversas enfermedades en humanos se han correlacionado con alguna mutación en los genes de las claudinas, tales como daños en los ductos biliares, esclerosis neonatal, fallas en el hígado, sordera, entre otras. Las alteraciones observadas en las claudinas pueden estar relacionadas a una alta o baja expresión y a su deslocalización de la membrana, encontrándose preferencialmente en el citosol en líneas celulares cancerosas.

Las claudinas 3 y 4 presentan una sobre-expresión en múltiples tumores y funcionan como receptores de la enterotoxina de *Clostridium perfringens*. Claudina 6 se encuentra disminuida en cáncer de colon. Por otro lado las claudinas 1, 6 y 9 funcionan como receptores celulares para la entrada del virus de la hepatitis C, siendo indispensable la presencia de claudina-1. Claudina 7 disminuye su expresión en carcinoma ductal, y los carcinomas hepatocelulares muestran una disminución de los niveles de claudinas 4 y 5 (50) (Tabla 1).

Por otro lado se ha observado que la función de las claudinas es regulatoria en múltiples niveles, ya que se encuentra relacionada con procesos de tumorigenesis como en la motilidad, invasión y sobrevivencia celular. A este respecto, se ha reportado que la sobreexpresión de claudinas 6, 7 y 9 aumenta la proliferación, migración y capacidad invasiva de células de adenocarcinoma gástrico (48, 49, 51).

Recientemente se ha reportado una asociación de la actividad de las claudinas con una activación de proteínas de matriz llamadas metaloproteasas. La activación de claudinas 1, 2, 3, 4 y 5 se ha asociado con la activación de metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, lo que sugiere que las claudinas podrán utilizar este mecanismo para promover la invasividad y la metastasis (51).

“Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$  sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

Tabla 1: Expresión de algunas claudinas en diversos tipos de tumores (51, 52).

Neoplasia	Expresión de claudinas
Carcinoma de mama	1 $\downarrow$ , 3 $\uparrow$ y 4 $\uparrow$
Carcinoma del tracto biliar	7 $\downarrow$ , 4 $\uparrow$ y 1 $\uparrow$
Carcinoma colorectal	8 $\downarrow$ , 12 $\uparrow$
Carcinoma endometrial	1 $\downarrow$ y 2 $\uparrow$
Adenocarcinoma gástrico	3 $\uparrow$ , 4 $\uparrow$ y 5 $\uparrow$
Carcinoma epitelial de ovario	1 $\downarrow$ , 3 $\downarrow$ , 4 $\downarrow$ , 5 $\uparrow$ y 7 $\uparrow$
Carcinoma pancreático	1 $\uparrow$ , 3 $\uparrow$ y 4 $\uparrow$
Carcinoma de próstata	4 $\uparrow$ , 5 $\downarrow$ y 7 $\uparrow$
Carcinoma de la glándula tiroidea	4 $\uparrow$ y 7 $\uparrow$

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

## 3. CITOCINAS

Las citocinas son antígenos no específicos o proteínas solubles de bajo peso molecular generadas por monocitos, linfocitos y otros tipos de celulares. Mediadoras de crecimiento celular, inmunidad, inflamación, reparación y diferenciación, entre otras, son el principal medio de comunicación celular e inician la respuesta inflamatoria definiendo la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica (53). La secreción de las citocinas es breve y auto limitada y su síntesis, como consecuencia de la activación celular, es transitoria. Las citocinas con frecuencia tienen un efecto pleiotropico ya que tienen la capacidad de actuar sobre diferentes tipos celulares, así una misma citocina puede ser capaz de mediar diversos efectos biológicos. Las citocinas se producen en respuesta a los microorganismos y a otros antígenos y estimulan diferentes respuestas en las células que participan en la inmunidad y la inflamación.

Las citocinas son polipéptidos o glicoproteínas con un peso molecular de 30 kDa, aunque algunas pueden formar oligómeros de mayor peso molecular. La clonación de los genes de estas citocinas ha permitido su producción en masa y actualmente se está explorando la utilidad terapéutica de la administración de citocinas o moléculas antagonistas en enfermedades infecciosas, tumorales o autoinmunes. Los receptores para citocinas están formados por una o más proteínas transmembranales (54).

Las citocinas ejercen su función actuando sobre receptores específicos de membrana y contribuyen a la activación, blastogénesis y/o diferenciación en células efectoras, regulando también otros procesos como la apoptosis, adquisición de capacidad citotóxica y la recirculación de los leucocitos (55).

Según la función de las citocinas se pueden dividir en dos grupos: antiinflamatorias y proinflamatorias (Figura 14, Tabla 2).

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

Tabla 2: Clasificación de citocinas (54).

clasificación	citocinas
antiinflamatorias	IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\alpha$ y $\gamma$
proinflamatorias	IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$

La nomenclatura de las citocinas se basa en sus orígenes celulares. Un ejemplo son las citocinas producidas por fagocitos monocucleares las cuales se denominan monocinas, linfocinas aquellas que son sintetizadas por linfocitos o interleucinas aquellas que son sintetizadas por leucocitos. La función de las citocinas ha sido ampliamente estudiada por su importancia en procesos de inflamación, inmunidad y hematopoyesis. Las citocinas tienen dos diferentes maneras de actuar: de manera autocrina o de manera paracrina y dos citocinas pueden antagonizar sus acciones mutuamente (56).

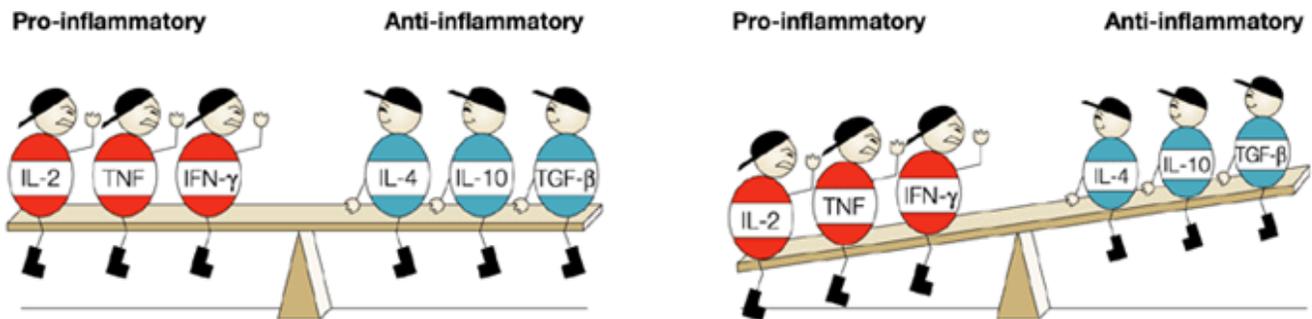


Fig. 14. La expresión de citocinas inicia la respuesta inflamatoria. Normalmente hay un equilibrio entre ambos tipos de citocinas (izquierda) sin embargo, en una gran diversidad de enfermedades las citocinas proinflamatorias aumentan su expresión (derecha). (Modificado de John J. O'Shea, Averil Ma & Peter Lipsky (2002) Nature Reviews Immunology 2, 37-45).

La cascada de eventos que generan las citocinas inicia con la activación de linfocitos T, que incluye la liberación de citocinas como IFN- $\alpha$ , IL-2 y TNF- $\alpha$  para promover la movilización de macrófagos con el fin de eliminar algún factor que este siendo señalizado; la síntesis continua y aplicada de esta cascada de eventos puede causar severos daños en tejidos y vasos sanguíneos (57).

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

Diversos estudios evidencian una clara relación entre *H. pylori* e IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , estos trabajos pretenden vislumbrar si dichas citocinas promueven una reducción en la integridad de la barrera epitelial induciendo cambios principalmente en las uniones estrechas aunados a la presencia de diferentes cepas de *H. pylori* (56).

### 3.1 Interleucina 1 (IL-1)

Existen dos tipos de interleucina 1 denominadas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  las cuales tienen una similitud menor al 30%. Están relacionadas con el proceso inflamatorio y poseen varios efectos biológicos tales como: la inducción de la síntesis de prostaglandinas en las células endoteliales, el incremento de los niveles de síntesis de proteínas hepáticas inducido por daño celular, la inducción de producción de colágeno y fibroblastos en el hueso, la inducción de la expresión de moléculas de adhesión celular y la generación de metabolitos reactivos de oxígeno, entre otras (57). La producción de IL-1 es inducida por productos bacterianos como el lipopolisacárido (LPS) y otras citocinas como TNF, IL-2 IL-3 IL-12 y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrofagos (GM-CSF). Otros inductores pueden ser la hiperosmolaridad, isquemia, anfetaminas, moléculas inflamatorias, factores de coagulación, entre otros (58).

La IL-1 $\beta$  es sintetizada como un precursor de 31KDa y adquiere su forma madura por la acción de proteasas generando una proteína de 17KDa la cual permanece en el citosol para poder ser activada por la enzima convertidora de IL-1 $\beta$  (ICE) conocida como caspasa-1, de esta manera la IL-1 $\beta$  se encuentra ya funcional, al presentarse en pequeñas cantidades actúa como mediador de la inflamación local y en grandes cantidades ejerce efectos endocrinos (54, 58).

Los receptores de IL-1 (IL-1R) han sido reconocidos como parte de la superfamilia de los receptores IL-1/Toll-like (TLR) y sus miembros participan en la respuesta inmune innata y en la inflamación. Esta familia incluye también a los receptores para la IL-19 y receptores derivados de bacterias gram-negativas. Todos los miembros de esta familia tienen

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

secuencias similares en sus región citosólica y dicha región de homología se conoce como dominio TIR (receptor Toll/interleucina-1) (59, 60) (Figura 15).

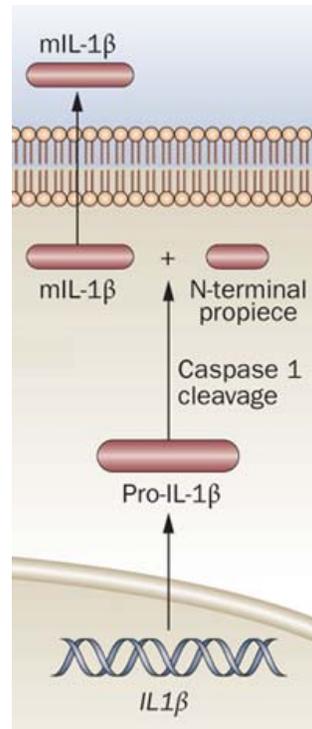


Fig. 15. IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  son codificadas por dos genes separados, ambas proteínas son sintetizadas como precursores pro-péptido sin una secuencia señal. En el caso de la secreción de IL-1 $\beta$  lo que ocurre es que la pro IL-1 $\beta$  se adhiere a la cascapa 1 de la forma madura de IL-1 $\beta$ , para convertirse en Pro-IL-1 $\beta$  ya secretada como proteína activa. (Modificado de Cem Gabay *et al.* (2010) *Nature Reviews Rheumatology* (6) 232-241).

### 3.2 Interleucina 8 (IL-8)

Conocida también como CXCL8, es una quimiocina proinflamatoria de bajo peso molecular que es liberada por macrófagos, monocitos, neutrofilos, células endoteliales, fibroblastos y hepatocitos. Los principales inductores de su síntesis son el LPS, el TNF y la IL-1 (61, 62).

Los receptores para la IL-8 (IL-8R) se encuentran en diversos tipos celulares aunque el epitelio gástrico es el tejido en donde más se secreta. Esta quimiocina ejerce un papel primordial en la

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

iniciación de la respuesta inflamatoria al promover la quimiotaxis y posterior desgranulación de los neutrófilos. Además, desarrolla una acción quimiotáctica sobre otras células entre las que se encuentran los linfocitos T y los basófilos, estimulando con ello la liberación de histamina. Algunas de las acciones proinflamatorias del TNF $\alpha$  y la IL-1 son mediadas por la secreción de IL-8, ya que actúa como un mediador secundario de los procesos inflamatorios (62) (Figura 16).

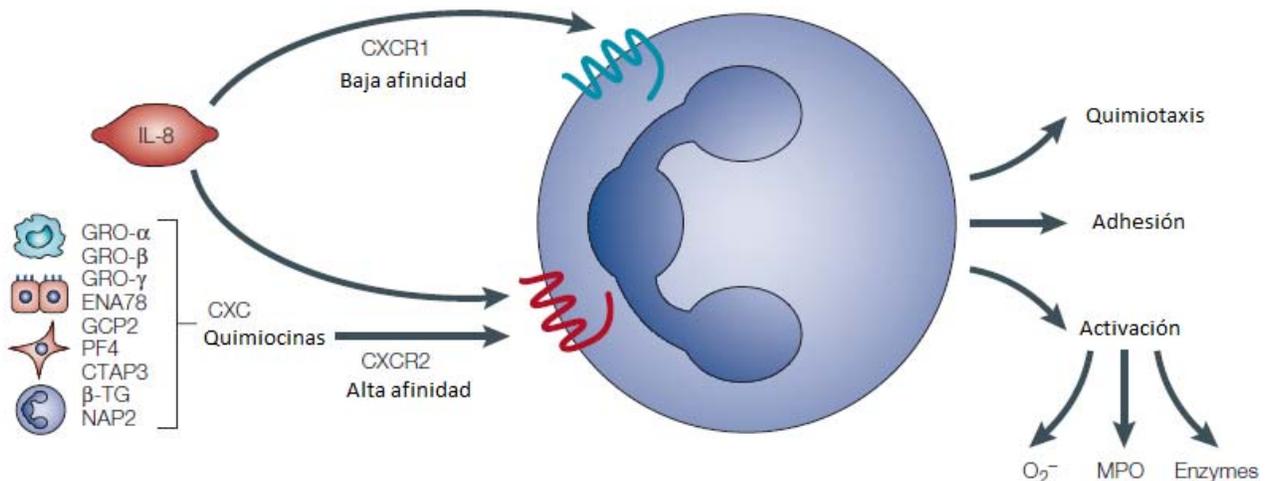


Fig. 16. IL-8 activa quimiocinas de baja afinidad los cuales median la activación de neutrófilos y las quimiocinas de alta afinidad activan a otras quimiocinas y median la quimiotaxis (Modificado de Peter J. Barne. Nature reviews drug discovery vol 1 (2002) 437-446).

### 3.3 Interferón gamma (INF- $\gamma$ ).

INF- $\gamma$  es una glicoproteína, producida por los linfocitos T subtipos CD4 y CD8 y las células NK (*natural killer*). Regula varias funciones inmunológicas. Su producción se incrementa por la acción de varias citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12 e IL-18. Produce activación de macrófagos y estimula la producción de anticuerpos contra polisacáridos de la pared bacteriana. Sus principales acciones biológicas son la inducción de un estado de resistencia a la infección viral en las células diana y la inhibición de la proliferación celular (63).

Es el principal factor activador de macrófagos en los que estimula la producción de IL-1 y TNF, aumenta su capacidad lítica e induce la expresión de moléculas de histocompatibilidad clase I

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

y II del MHC con lo que aumenta la presentación antigénica y la activación de linfocitos CD4+ y CD8+. El IFN- $\gamma$  tiene un efecto protector contra infecciones parasitarias y otros patógenos intracelulares y puede contribuir a muchos de los efectos tóxicos de las endotoxinas bacterianas. También regula positivamente la capacidad citotóxica de los linfocitos T y de las células NK promoviendo su activación y maduración. Así mismo, actúa sobre los linfocitos B inhibiendo su proliferación y favoreciendo su diferenciación hacia células productoras de isotipos IgG<sub>2a</sub> o IgG3. El IFN- $\gamma$  activa los neutrófilos y las células endoteliales, promoviendo la adhesión e infiltración linfocitaria, su producción es controlada por medio de la secreción de citocinas principalmente IL-2 e IL-18 (64).

### **3.4 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).**

Proteína de 17KDa producida por macrófagos principalmente constituida por tres polipéptidos que forman un trímero compacto. Existe en forma libre y también como proteína de membrana. Presenta gran capacidad para activar monocitos, macrófagos y neutrofilos tras la estimulación por endotoxinas bacterianas, actúa como factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), IFN- $\gamma$ , IL-2 ó IL-15. También puede inducir la producción de proteínas de fase aguda por medio de la IL-6. (62). Es similar a IL-1 e IL-8 ya que contiene alto potencial citotóxico al inducir lisis celular en células epiteliales y estimular gran cantidad de enzimas para inducir a la célula a apoptosis. Así mismo promueve la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales de los capilares y los recluta en el lugar de la infección.

El TNF-  $\alpha$  es el principal mediador de la respuesta inmune frente a bacterias gram-negativas y los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) estimulan de manera importante su producción (62, 65).

A concentraciones bajas el TNF-  $\alpha$  actúa localmente como un mediador paracrino provocando: aumento de la adhesividad de las células endoteliales de los vasos, activación leucocitaria y estimulación de la producción de IL-1, IL-6 e IL-8 en fagocitos mononucleares, y co-estimula la activación de linfocitos T y B. Cuando las cantidades de TNF-  $\alpha$  son altas, actúa de modo endocrino y provoca acciones sistémicas: estimula la producción de reactantes de fase aguda por el hígado y la producción de IL-1 e IL-6 en células del endotelio vascular; activa el sistema

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

de coagulación e induce fiebre y suprime la proliferación de las células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea. Los linfocitos T en reposo carecen de receptores para TNF-  $\alpha$ , que aparecen tras su estimulación antigénica (66).

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

## **Antecedentes**

*H.pylori* infecta y persiste en el estomago humano de mas de la mitad de la población humana. Dicha bacteria esta caracterizada por una extensa infiltración de sustancias toxicas entre ellas CagA, la cual se en disuelve en la lamina del mucus gástrico estimulando la migración de neutrófilos, monocitos, linfocitos y otras células inflamatorias, que una vez activadas comienzan a liberar mediadores químicos como citocinas, eicosanoides y neuropeptidos que se encargan de amplificar la respuesta inflamatoria (67).

Posterior a la adhesión bacteriana, las células epiteliales liberan IL- 8 e IL-1 $\beta$  y junto con factores citotóxicos de *H. pylori* se liberan proteasas y metabolitos provocando un alto grado oxidativo el cual podría causar daño al DNA, generar mutaciones y promover la aparición del cáncer gástrico (2). Por otro lado CagA promueve la pérdida de la polaridad epitelial promoviendo el desensamble de las uniones intercelulares, entre ellas, las uniones estrechas, incrementando la permeabilidad e infiltración de células inmunes. Se encuentra implicada en el reclutamiento de factores de señalización, proliferación celular y rearreglos del citoesqueleto de actina, activa a NF- $\kappa$ B e induce la producción de citocinas proinflamatorias (68,18).

De la misma manera se ha asociado a VacA con el daño en la arquitectura del epitelio gástrico. Esta citotoxina mantiene una actividad vacuolizante, observando una notable degeneración de las células diana (67) y se ha visto que modifica la resistencia transepitelial lo que sugiere una alteración de las uniones intercelulares.

Estudios *in vitro* han mostrado que, bajo ciertas circunstancias, la colonización de *H.pylori* en el epitelio gástrico induce cambios en la morfología de las células y promueve la migración celular. Esto sugiere una pérdida de las uniones célula-célula y célula-matriz alterando el balance fisiológico y la integridad del epitelio *in vivo*, ya que la función de este radica en separar diferentes compartimentos y regular el paso de diferentes sustancias mediante mecanismos de transporte transcelular asimétrico representado por canales y bombas

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

anclados en la membrana y mediante el transporte paracelular, encargado de regular el paso de iones y pequeñas moléculas. Por otro lado se ha reportado que *H. pylori* promueve la deslocalización de claudinas 4 y 5, lo que altera las funciones de la barrera epitelial (3). Biopsias de estómago de pacientes positivos a *H. pylori* muestran un aumento en la expresión de claudinas 6, 7 y 9 (8). Estas mismas claudinas promueven la proliferación, migración e invasividad celular cuando son transfectadas en células de adenocarcinoma gástrico (50).

Diversos estudios han mostrado que alteraciones en los niveles de expresión de las claudinas están asociadas a los procesos de tumorigénesis. Por ejemplo se ha observado una disminución de claudina 7 en cáncer de mama invasivo. Por otro lado, otros estudios muestran un aumento en la expresión de algunas claudinas en diversos tipos de cáncer. En las células epiteliales con características carcinogénicas, la alta secreción de citocinas y factores de crecimiento asociados entre ellos (IL-1, IL-4, IL-13, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , entre otros), induce un marcado desplazamiento de ocludina y algunas ZO's localizadas en la región de las uniones estrechas (67). La alta secreción de IL-1 $\beta$  actúa al lado de TNF- $\alpha$  promoviendo una reducción de la función de barrera relajando la hermeticidad de las uniones estrechas permitiendo el paso de los leucocitos hacia los sitios de infección y la infiltración de *H. pylori* (36). De la misma manera la sobre-expresión de TNF- $\alpha$ , en pacientes infectados con *H. pylori*, está asociada con la internalización de claudina 1 y 4 al citosol (49).

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

## **Justificación**

Estudios epidemiológicos han demostrado una clara asociación entre la infección por *H. pylori* y la aparición de cáncer gástrico, lo que parece estar determinado por una secuencia de cambios progresivos asociados a cepas CagA+ de *H. pylori*. Sin embargo, los mecanismos que favorecen el desarrollo del cáncer son multifactoriales, ya que aunque una inmensa mayoría de los pacientes presentan gastritis crónica y la mayoría son positivos a *Helicobacter pylori*, no todos desarrollan cáncer gástrico. Dentro de los factores que se consideran importantes para el desarrollo del mismo, se encuentran factores ambientales, respuestas inflamatorias del huésped, presencia de factores de virulencia de la bacteria y/o modificaciones en los fenotipos de las células epiteliales gástricas.

Reportes previos de nuestro grupo han demostrado una sobreexpresión de claudinas 6, 7 y 9 en biopsias de pacientes positivos a *H. pylori*. Mediante estudios *in vitro* mostramos también que esta sobreexpresión promueve la proliferación, migración e invasividad de las células de adenocarcinoma gástrico, sin embargo a la fecha se desconoce si: 1) *H. pylori* puede promover cambios en la expresión de claudinas 6, 7 y 9, 2) si la alteración de las claudinas correlaciona con la presencia de la proteína CagA de la bacteria, 3) si la presencia de citocinas proinflamatorias, como la IL-1 $\beta$ , puede potenciar estos cambios, y 4) que vías de señalización intracelular están involucradas en la alteración. El presente proyecto estuvo enfocado a contestar de manera preliminar parte de estas preguntas.

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

### A) OBJETIVO GENERAL

1. Evaluar el efecto de cepas de CagA<sup>+</sup> y CagA<sup>-</sup> de *Helicobacter pylori*, sobre la expresión de claudinas en una línea epitelial derivada de adenocarcinoma gástrico humano (AGS)

### B) Los objetivos particulares del proyecto son:

- A. Determinar si las cepas CagA<sup>+</sup> de *H. pylori* modifican la expresión de claudinas en diferentes tiempos.
- B. Evaluar si la IL-1 $\beta$  promueve una *alteración* más drástica sobre la expresión de claudinas en células AGS co-cultivadas con cepas CagA<sup>+</sup> y CagA<sup>-</sup> de *H. pylori*.
- C. Evaluar si la IL-1 $\beta$  induce la *secreción* de citocinas como la IL-8, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  en células AGS co-cultivadas con cepas CagA<sup>+</sup> y CagA<sup>-</sup> de *H. pylori*.

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

## **Hipótesis**

La hipótesis de este proyecto plantea que:

Al incubar a células de adenocarcinoma gástrico en presencia de una cepa CagA+, se observarán cambios en la expresión de claudinas y éstos serán potenciados por la presencia de IL-1 $\beta$ . Estos cambios pudieran estar implicados en la activación de vías intracelulares que conllevan a la proliferación e invasividad celular.

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

## **Metodología**

### CULTIVOS CELULARES

Un cultivo celular es el proceso mediante el cual se promueve el crecimiento de diversos tipos celulares en una incubadora cuyas condiciones de temperatura y mezcla de gases (generalmente, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub>) se encuentran controladas. Las condiciones de cultivo varían ampliamente para cada tipo celular, y las variaciones de estas condiciones pueden dar lugar a la expresión de diferentes fenotipos celulares.

Otro factor importante para promover el crecimiento celular es el medio de crecimiento en el cual se mantienen las células. Este puede variar tanto en pH, concentraciones de glucosa, factores de crecimiento y la presencia de otros componentes nutritivos. El crecimiento celular puede presentarse en *suspensión* o de manera *adherente*. Es muy común que las células que crecen de manera adherente se cultiven en cajas de plástico para aumentar sus propiedades de adhesión y propiciar la comunicación mediante otras señales necesarias para su crecimiento y diferenciación.

Para realizar los experimentos descritos en este trabajo, se utilizó la línea celular derivada de adenocarcinoma gástrico humano, AGS. Dicha línea presenta una morfología epitelial redondeada con presencia de células hiperdiploides y multinucleadas, su núcleo es largo y globular conteniendo varios nucleolos y presenta una densidad de saturación de 4.5X10<sup>6</sup> células (69).

#### **1. Descongelamiento de células AGS**

Para la propagación de la línea celular, se descongelaron crioviales que contenían células AGS, y se colocaron en tubos cónicos de 15 ml para posteriormente adicionar 3ml de medio de cultivo D-MEM (Sigma-Aldrich) suplementado con 1 mg/ml de Insulina de (SIGMA), 2mM de piruvato de sodio (GIBCO), 2mM de L-Glutamina (GIBCO) , 10,000U/ml/10,000

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

microgramos de penicilina-estreptomicina (GIBCO), y 5% de suero fetal bovino (GIBCO). Posteriormente se realizó una centrifugación a 1500rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 1ml de medio de cultivo D-MEM. La suspensión celular se colocó en una caja de petri p-100 con 7 ml de medio D-MEM y se colocaron en una incubadora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **2. Propagación y mantenimiento de las células AGS**

Para realizar los experimentos correspondientes se propagó la línea celular AGS. Para ello, se retiró el medio de cultivo, se realizaron dos lavados con 5 mL de PBS 1X, y se incubaron de 1 a 3 min con 1 mL de Tripsina-EDTA 1X, con el fin de lograr el desprendimiento total de las células. La tripsina se inactivó con 5 mL de medio de cultivo y las células se resuspendieron delicadamente. La suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min, se eliminó el medio y el botón celular se resuspendió con 7 mL de medio, para poder tomar una alícuota y contar las células en la cámara de New Bauer. Se contaron las células de los 4 cuadrantes de los extremos (cada cuadrante 2 veces), se sacó el promedio y se dividió entre 4 para obtener el número de células  $\times 10^4$ /mL de suspensión celular. Se colocaron aproximadamente  $7 \times 10^5$  células por caja petri y al siguiente día se realizaron dos lavados con 5 mL PBS 1X y se añadió medio fresco para dejar en crecimiento solo las células que se habían adherido satisfactoriamente a la caja.

### **3. Ultracongelamiento de células AGS**

El congelamiento de células usualmente se realiza para tener alícuotas de la línea celular y mantenerlas almacenadas para posteriores experimentos, evitando la senescencia y la transformación celular, con ello, también se evita la muerte o contaminación total de la línea celular.

Para la congelación de las células se retiró el medio de cultivo de las cajas que tienen cultivos confluentes, se lavó dos veces con 5 mL de PBS 1X, y se adicionó 1 mL de Tripsina-EDTA 1X, incubando de 1 a 3 minutos hasta lograr el desprendimiento total de las células. Se

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

inactivó la tripsina y la suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. Posteriormente se eliminó el medio y finalmente se adicionó el volumen necesario de DMEM + Glicerol al 10% para congelar aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por vial y se almacenaron a  $-70^\circ\text{C}$ .

### 4. Co-cultivo de células AGS y cepas CagA+ y CagA- de *Helicobacter pylori*.

Las cepas de *Helicobacter pylori* fueron obtenidas de Centro Médico Nacional Siglo XXI, las cuales tenían las siguientes características:

1. Cepa 263-2003: paciente de 33 años de edad con ulcera duodenal. cagA+, vacAs1m1, babA2-, oipA+.
2. Cepa 295-2003: paciente de 55 años de edad con gastritis. cagA+, vacAs1m1, babA2, oipA+.
3. Cepa 31-2004: paciente con ulcera duodenal. cagA-, vacAs2m2, babA-, oipA+.
4. Cepa: 25-2005: paciente con ulcera duodenal. cagA-, vacAs2m2, babA+, oipA-.

Para realizar los experimentos de las células AGS con las cepas de *Helicobacter pylori*, las bacterias crecidas en medio sólido se rasparon y se colocaron en 1mL de medio D-MEM. Se determinó la cantidad de bacterias colocando una muestra en 1mL de medio Muller Hinton y obteniendo el valor de absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro (JENWAY- Genova). El número de colonias/1mL se obtuvo calculando las unidades formadoras de colonias,  $\text{UFC} = \text{Abs} / (8 \times 10^{-10})$ .

Cajas confluentes de células AGS se infectaron con  $1 \times 10^7$  bacterias y se incubaron durante 15 min a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  para permitir su adhesión. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar a las bacterias que no se adhirieron a las células y se añadió medio D-MEM, iniciando en ese momento el tiempo de infección bacteriana.

Para observar el efecto que causa en las claudinas al exponerlas a las diferentes cepas de *Helicobacter pylori* CagA+ y CagA- se incubaron durante 5', 30', 1, 2, 4 y 6 horas. Al término de cada incubación se retiró 1 mL de sobrenadante de cada caja para mediciones

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

posteriores y se realizaron lavados con PBS 1X y se congelaron las cajas a -75°C hasta su procesamiento.

### **5. Tratamiento de células AGS con IL-1 $\beta$ y cepas de *Helicobacter pylori*.**

Las células AGS con una confluencia del 70% se trataron con 10ng/mL de IL-1 $\beta$  durante 48 horas previas a la infección con las cepas CagA+ (295) y CagA- (25). Una vez transcurrido ese tiempo se infectaron a las células con  $1 \times 10^7$  bacterias durante 15 min a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar a las bacterias que no se adhirieron a las células y se volvió a colocar medio D-MEM, iniciando en ese momento el conteo del tiempo de infección bacteriana (5', 30', 1, 2, 4 y 6 horas).

Al finalizar cada tiempo se recolectó 1 mL de sobrenadante de cada caja para experimentos posteriores y se realizaron dos lavados de PBS 1X y se congelaron las cajas a -75°C.

Para determinar si un estímulo continuo con IL-1 $\beta$ , posterior a la adición de las bacterias tiene efectos sobre las proteínas a estudiar, a cajas de células AGS que fueron incubadas con IL-1 $\beta$  durante 48 horas y posteriormente infectadas con las cepas de *H. pylori*, se les adiciono un segundo estímulo de IL-1 $\beta$  (10ng/mL) y se inició el conteo del tiempo de infección bacteriana. Al finalizar el tiempo de cada tratamiento se recolecto 1 mL de sobrenadante para mediciones posteriores, se realizaron 2 lavados de PBS 1X y se congelaron las cajas a -75°C hasta su procesamiento.

### **6. Extracción total de proteínas**

Para evaluar el efecto de la IL-1 $\beta$  y de las cepas de *H. pylori* sobre las proteínas de interés, se obtuvieron extractos totales de proteína de las células AGS.

Para llevar a cabo la extracción, se descongelaron las cajas con los cultivos celulares, se adicionó 1 mL de Buffer de lisis con sus respectivos inhibidores, se raspó cada caja y se recuperó la suspensión de células la cual se colocó en un tubo de polipropileno previamente marcado para posteriormente ser sonicada durante 1 min a 25% de amplitud.

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

Posteriormente cada lisado se centrifugó a 39,000 rpm, durante 30 min a 4°C en una ultracentrífuga utilizando un rotor 70 Ti. Los sobrenadantes obtenidos se guardaron a -20°C.

### 7. Determinación de proteínas

Para poder realizar la cuantificación de proteína se elaboró una curva patrón, para la cual se utilizó una solución stock de albúmina de 1 mg/ml.

Curva patrón de Albúmina (BSA)

Volumen de Albúmina a 1mg/ml ( $\mu$ l)	Volumen de ddH <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	Concentración final ( $\mu$ g/ml)
0	1000	0
10	990	10
20	980	20
30	970	30
40	960	40
50	950	50
60	940	60
70	930	70

Para cuantificar las muestras problema se realizó una dilución de 1:40 de los extractos totales con amortiguador A (Ver Anexo). Todas las diluciones se colocan en tubos limpios marcados y en hielo.

Posteriormente se colocaron 80  $\mu$ L de cada muestra problema y de las muestras de albúmina en una placa de 96 pozos por triplicado y a continuación se colocaron 20  $\mu$ L del reactivo de BIO-RAD. Se mezcló y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 15 min. Las lecturas se registraron utilizando el equipo *Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter de Wallac* a 560 nm. Finalmente se calcularon las concentraciones de proteína específica tomando en cuenta los factores de dilución realizados.

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

## 8. Análisis por Western Blot

La técnica analítica de Western blot o inmunoblot es usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada. En este trabajo se utilizaron geles desnaturizantes para determinar el efecto que tuvo la presencia de la IL-1 $\beta$  y las cepas de *Helicobacter pylori* sobre la expresión de las claudinas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 y 10.

Para ello se preparó un gel de poliacrilamida al 12.5% y a las muestras se les adicionó  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentración final del 5%. Las muestras se colocaron en ebullición por 5 min y se cargaron 20  $\mu$ g de proteína en cada carril. Se aplicó una corriente de 50 mA durante 1 hora aproximadamente y al término se lavó el gel con buffer de transferencia durante 10 min a temperatura ambiente. La transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa se llevó a cabo 1 h a 120 mA. La eficiencia de la transferencia se corroboró tiñiendo la membrana con rojo de Ponceau. Los sitios inespecíficos se bloquearon incubando las membranas con 5% de leche descremada (BIO-RAD) durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación suave y posteriormente se dejó incubando con la solución del primer anticuerpo durante toda la noche con agitación suave a 4°C.

### Anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo	Dilución	Marca
Mouse anti Claudina 1	1 $\mu$ g/ml	ZYMED
Rabbit anti Claudina 2	1 $\mu$ g/ml	ZYMED
Rabbit anti Claudina 3	1 $\mu$ g/ml	ZYMED
Mouse anti Claudina-4	1 $\mu$ g/ml	ZYMED
Mouse anti Claudina-5	1 $\mu$ g/ml	ZYMED
Rabbit anti Claudina-5	1 $\mu$ g/ml	ZYMED
Goat anti Claudina-6	1:500	Sta. Cruz
Rabbit anti Claudina-7	1 $\mu$ g/ml	ZYMED
Goat anti claudina 9	1:500	Sta Cruz
Mouse anti claudina 10	1 $\mu$ g/ml	ZYMED
Mouse anti $\alpha$ -Actina	2:10,000	CINVESTAV

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

Al día siguiente se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con 10 mL de TTBS 1X con agitación suave y posteriormente se incubaron durante 2 h con el segundo anticuerpo disuelto en TTBS con agitación suave y a temperatura ambiente. Al terminar se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con 10 mL de TTBS 1X y un último lavado con 10 mL de TBS 1X durante 10 min con agitación suave y a temperatura ambiente.

### Anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano

Anticuerpo	Dilución	Marca
Goat anti Mouse	1: 15 000	ZYMED
Rabbit anti Mouse	1: 20 000	ZYMED
Goat anti Rabbit	1: 20 000	ZYMED
Rabbit anti Goat	1: 80 000	ZYMED

El revelado de las membranas se realizó por el ensayo de quimioluminiscencia utilizando los reactivos del ECL *Western blotting detection reagents and analisis system* de Amersham Biosciences. Para ello se eliminó el exceso de TBS 1X de las membranas y se colocaron durante 5 minutos en la mezcla de los reactivos. Las membranas se expusieron a placas radiográficas KODAK.

### 9. Borrado de membranas

Se realizan borrados de membranas cuando se requiere comprobar la presencia de alguna proteína en la misma fracción celular estudiada. Para ello se realizaron tres lavados de 3 minutos cada uno con Acetato de sodio 0.05 M pH 3.0 -3.5 y posteriormente se hacen 15 lavados de 5 minutos cada uno con TBS 1X.

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

### 10. Ensayo de ELISA para la determinación de la concentración de IL-1 $\beta$ e IL-8

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas es una técnica bioquímica en la cual un antígeno inmovilizado detecta a un anticuerpo ligado a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color, la aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra.

Se trabajó con el kit de ELISA *MAX deluxe sets* (Biolegend). Se colocaron en primer instancia 100  $\mu$ L del anticuerpo de captura en cada pozo (caja de 96 pozos) y se incubó toda la noche (aproximadamente de 16 a 18 horas) a 4°C. Se realizaron 4 lavados con 200  $\mu$ L de buffer de lavado, se bloqueó por 1 hora con 200  $\mu$ L del diluyente 1X para eliminar las uniones inespecíficas y nuevamente se realizaron 4 lavados con 200  $\mu$ L de buffer de lavado.

Para la realización de la curva estándar se requirió colocar 1 mL de la solución concentrada (500pg/mL) en un tubo eppendorf y se realizó una dilución 1:1 con el diluyente como se muestra en la tabla.

**Curva estándar para ELISA**

Diluyente $\mu$ L	Solución concentrada $\mu$ L	pg/mL
0	1000	500
500	500	250
500	250	125
500	125	62.5
500	62.5	31.3
500	31.3	15.6
500	15.6	7.8

Posteriormente se adicionó en cada pozo 100  $\mu$ L de las muestras de la curva estándar y las muestras problema por duplicado y se incubó durante 2 horas a temperatura

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

ambiente con agitación. Se adicionaron 200  $\mu$ L de buffer de lavado (PBS 1X + tween-20 0.05%) y esto se repitió 4 veces; se adicionaron 100  $\mu$ L de la solución HRP-avidina en cada pozo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. Se realizaron 5 lavados cada uno de 1 minuto con 200  $\mu$ L de buffer de lavado (PBS 1X + tween-20 0.05%), se añadieron 100  $\mu$ L de la solución de sustrato TMB para incubar durante 15 minutos en obscuridad, y finalmente se paró la reacción adicionando 100  $\mu$ L de ácido sulfúrico. Las medidas de absorbancia se obtuvieron utilizando un el lector de ELISA (Bio-tek Instruments, Winooski, VT) a 450nm.

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

## Resultados

### **Expresión de claudinas en co-cultivos de células AGS con cepas CagA+ y CagA- de *Helicobacter pylori*.**

1. Se crecieron células AGS a una confluencia aproximada del 75% y se infectaron con  $1 \times 10^7$  UFC de cuatro cepas de *H. pylori*, dos de ellas positivas a la expresión del gen *cagA* (Cepa 263 *cagA+*, *vacAs1m1*, *babA2-*, *oipA+* y cepa 295 *cagA+*, *vacAs1m1*, *babA2*, *oipA+*) y dos negativas a la expresión del mismo gen (Cepa 31 *cagA-*, *vacAs2m2*, *babA-*, *oipA+* y cepa: 25 *cagA-*, *vacAs2m2*, *babA+*, *oipA*). La expresión de claudinas se evaluó a los 5 min, 30 min, 1h, 2h, 4h y 6h de incubación.

Se cargaron 20  $\mu$ g de proteína total en geles de poliacrilamida y se realizó el Western blot usando anticuerpos específicos contra las claudinas: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 y 10.

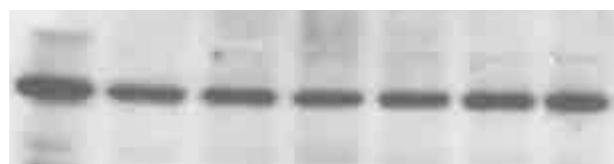
En dichos resultados solo se muestran los Westerns blot de la expresión de las claudinas 5, 6 y 7 ya que fue en donde se observaron más cambios en cuanto a la expresión de dichas claudinas. Un anticuerpo contra  $\alpha$ -actina fue utilizado como control de carga. La intensidad de las bandas obtenidas por el ensayo de quimioluminiscencia fue cuantificada usando el software de análisis de imágenes Gelquant y la intensidad de cada banda fue normalizada con respecto a la banda de las muestras control.

#### Cepas CagA+

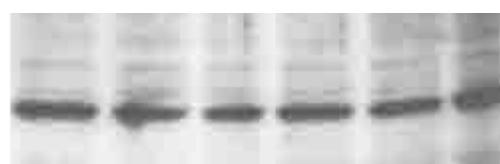
Cepa 295 CagA +

Cepa 263 CagA +

Control de carga  $\alpha$ -actina



C+ 5' 30' 1hr 2hrs 4hrs 6hrs



5' 30' 1hr 2hrs 4hrs 6hrs

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

## Claudina 5

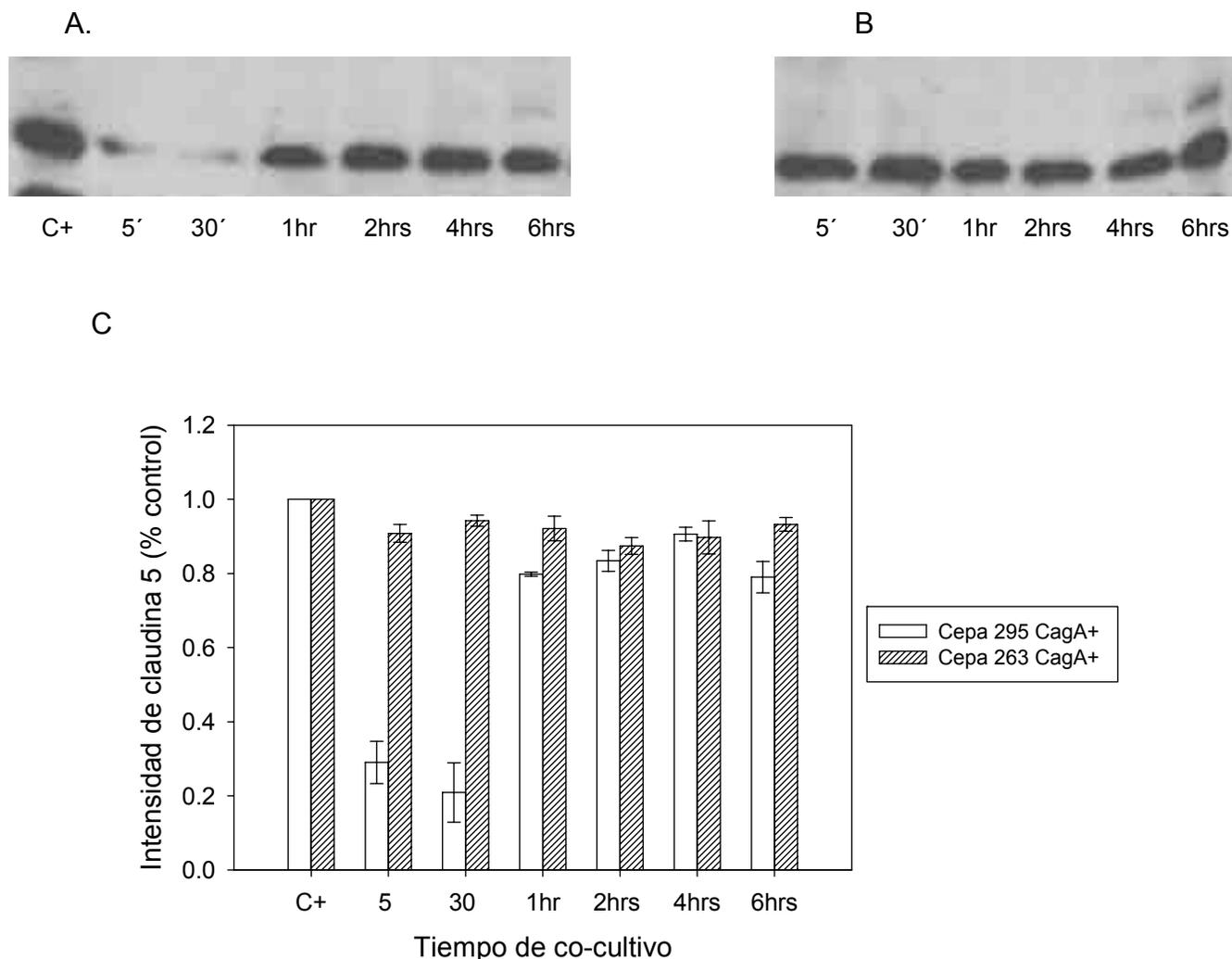


Figura 17. **Expresión de claudina 5 en diferentes tiempos de co-cultivo de células AGS con cepas CagA+ 295 y 263 de *H. pylori* (A y B respectivamente).** Cuantificación de la intensidad de las bandas (Porcentaje relativo al control) detectadas en cada ensayo (C).

Con respecto a la expresión de claudina 5 en las células AGS, se observó una disminución drástica a los 5 y 30 min de incubación con la cepa CagA+ 295 de *H. pylori*. Esta disminución se fue poco a poco restableciendo hasta las 6 horas de co-cultivo. A diferencia de la anterior, la cepa CagA+ 263 no tuvo ningún efecto sobre la misma claudina ya que todas las bandas presentan una intensidad muy similar a la del control (Figura 17).

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

## Claudina 6

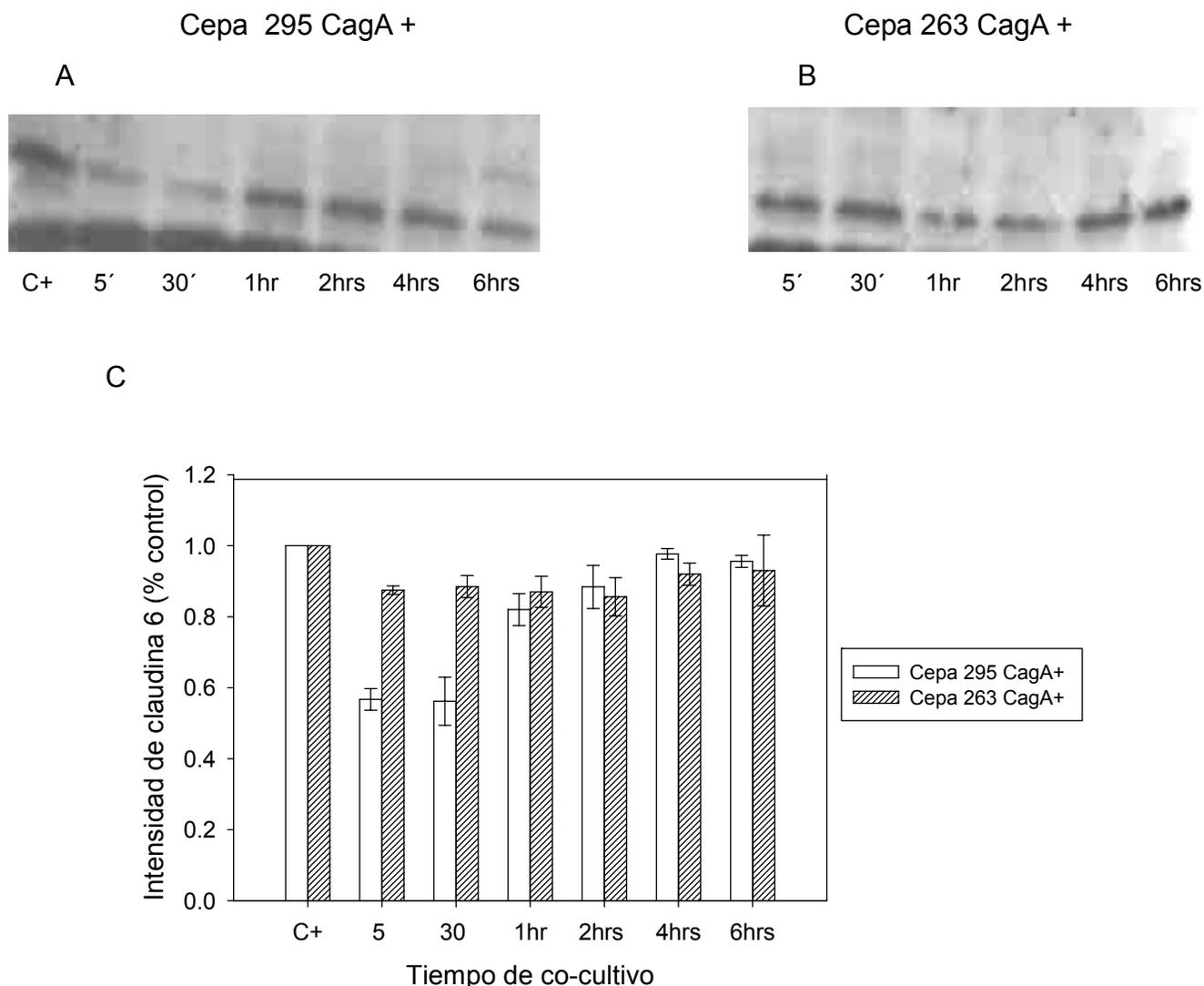


Figura 18. **Expresión de claudina 6 en diferentes tiempos de co-cultivo de células AGS con cepas CagA+ 295 y 263 de *H. pylori* (A y B respectivamente).** Cuantificación de la intensidad de las bandas (porcentaje relativo al control) detectadas en cada ensayo (C).

La expresión de claudina 6 en células AGS presentó un cambio similar al que se observó en relación a claudina 5; ya que a los 5 y 30 minutos de incubación con la cepa CagA+ 295 se observó una disminución en su detección para más tarde restablecer su expresión a niveles casi similares al control (Figura 19 A y C). En contraste, con la cepa CagA+ 263 se observó una ligera disminución en la expresión de claudina 6 a los 60 y 120 min de exposición restableciéndose a las 4 y 6 horas de tratamiento (Figura 18 B y C).

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

## Claudina 7

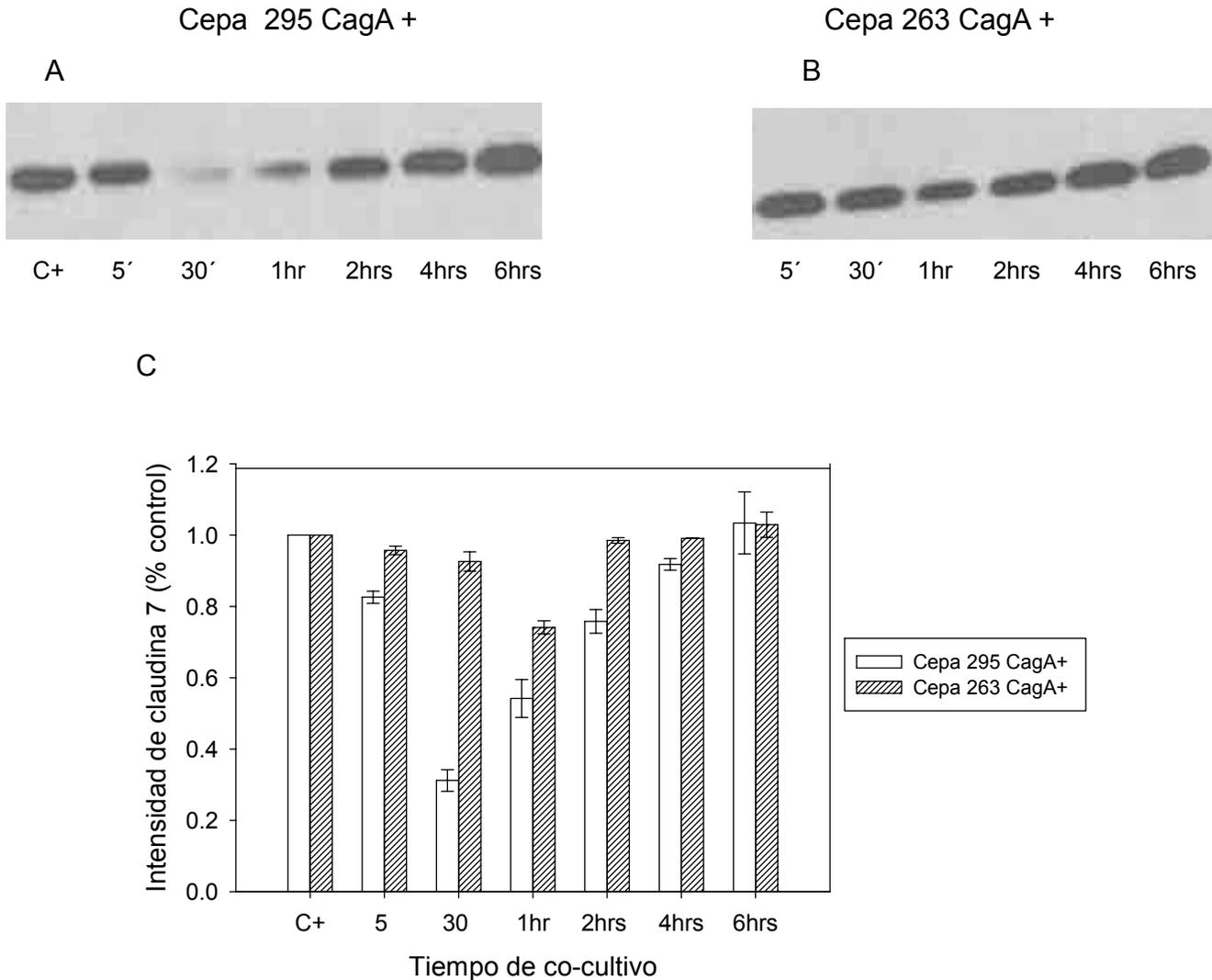


Figura 19. **Expresión de claudina 7 en diferentes tiempos de co-cultivo de células AGS con cepas CagA+ 295 y 263 de *H. pylori* (A y B respectivamente).** Cuantificación de la intensidad de las bandas (porcentaje relativo al control) detectadas en cada ensayo (C).

Con respecto a claudina 7, el efecto que producen ambas cepas de *H. pylori* es diferente al que se observó con claudina 5 y 6 ya que con respecto a la cepa CagA+ 295 se apreció una disminución en la expresión de claudina 7 a los 30 minutos aumentando paulatinamente a lo largo del tiempo hasta restablecer su expresión a niveles de las células control y en el caso de la cepa CagA+ 263 se observó una disminución en la expresión de claudina 7 a los 60 mins y posteriormente un restablecimiento de la misma (Figura 19 A, B y C).

Cepas CagA-



## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

la incubación (Figura 21 A y C). En el caso del tratamiento con la cepa CagA- 25, se logró apreciar una dinámica similar a la observada con la cepa CagA- 31, en donde de igual manera aumentó paulatinamente la expresión de claudina 5 y posteriormente se observó un decremento a las 4 horas de incubación, permaneciendo con un aumento significativo de claudina 5 con la cepa CagA- 25 respecto a la expresión de la misma con la cepa CagA- 31(Figura 20 B y C).

### Claudina 6

A. Cepa 31 CagA –



C+ 5' 30' 1hr 2hrs 4hrs 6hrs

B. Cepa 25 CagA-



5' 30' 1hr 2hrs 4hrs 6hrs

C

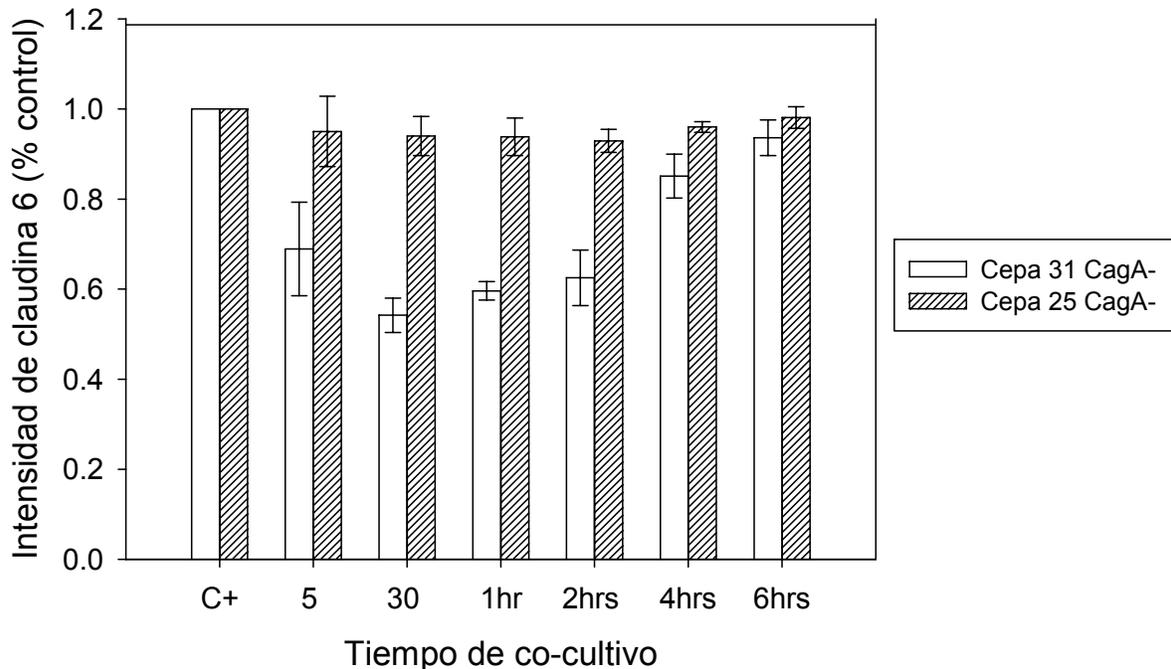


Figura 21. **Expresión de claudina 6 en diferentes tiempos de co-cultivo de células AGS con cepas CagA- 31 y 25 de *H. pylori* (A y B respectivamente).** Cuantificación de la intensidad de las bandas (porcentaje relativo al control) detectadas en cada ensayo (C).

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

La figura 22 muestra la expresión de claudina 6 generada por la presencia de cepas CagA- de *H. pylori*. En el caso de la cepa CagA- 31 se observó una disminución desde el minuto 5 la cual se restableció paulatinamente pero sin llegar a los niveles de las células control (Figura 22 A y C). A diferencia de ésta, la cepa CagA- 25 no indujo cambio alguno sobre la expresión de claudina 6 (Figura 21 B y C).

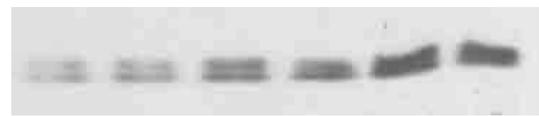
### Claudina 7

A. Cepa 31 CagA –



C+ 5' 30' 1hr 2hrs 4hrs 6hrs

B. Cepa 25 CagA-



5' 30' 1hr 2hrs 4hrs 6hrs

C

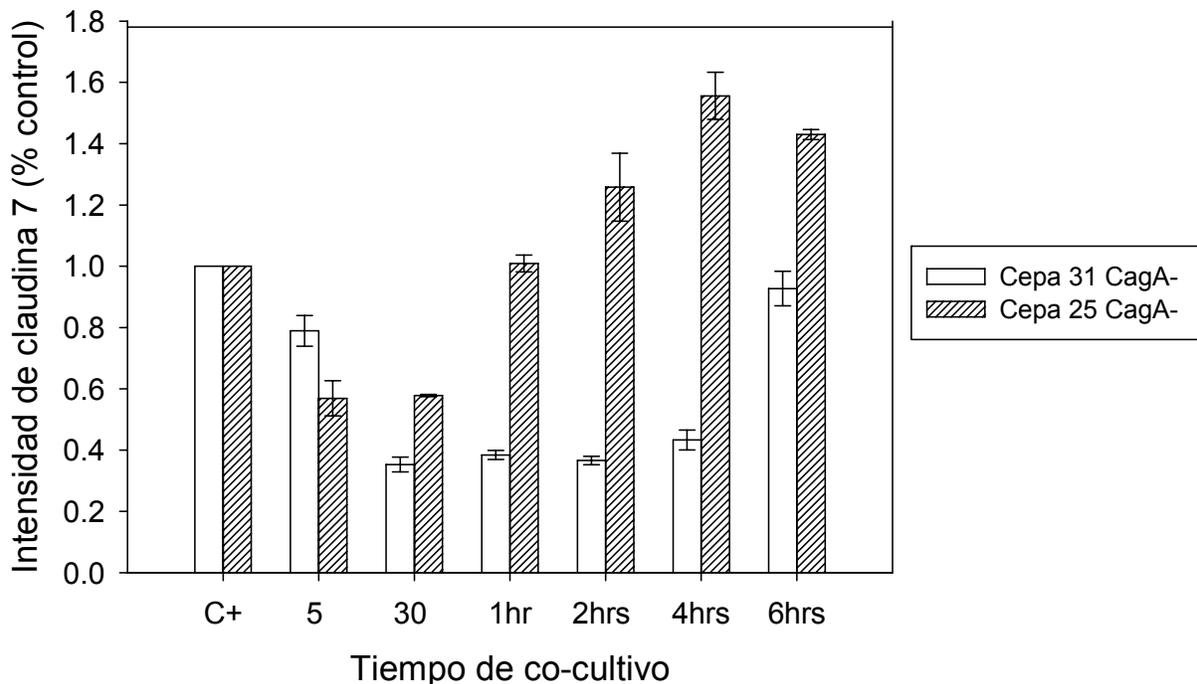


Figura 22. **Expresión de claudina 7 en diferentes tiempos de co-cultivo de células AGS con cepas CagA-31 y 25 de *H. pylori* (A y B respectivamente).** Cuantificación de la intensidad de las bandas (porcentaje relativo al control) detectadas en cada ensayo (C).

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

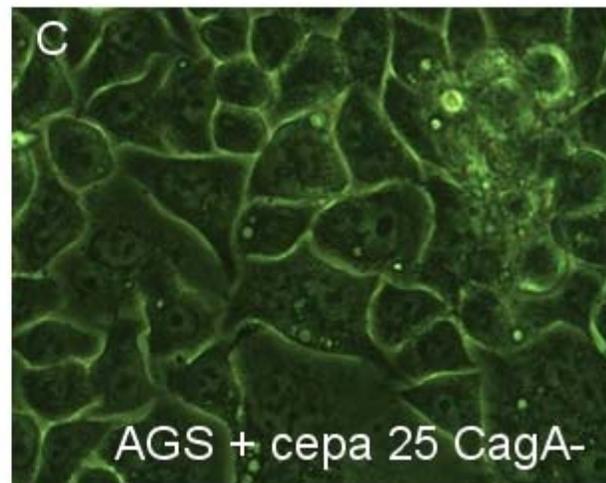
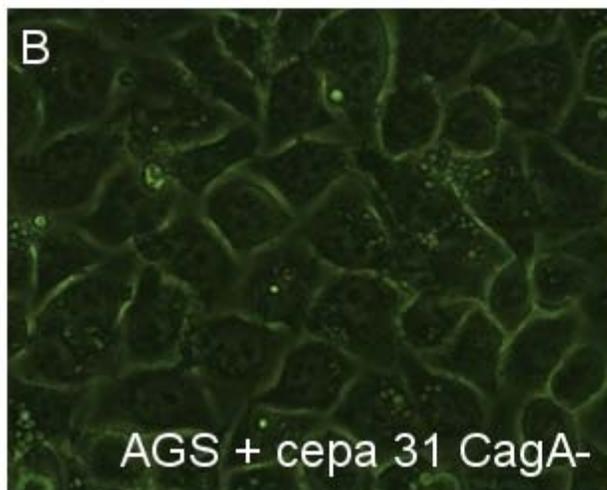
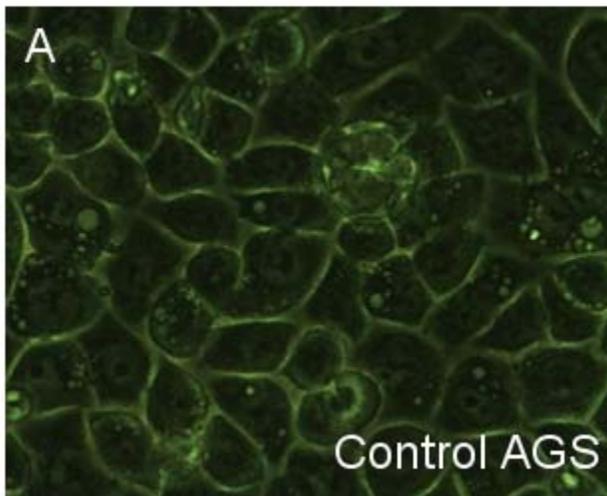
En lo que se refiere a la expresión de claudina 7 en células AGS incubadas con la cepa CagA- 31, se aprecia una disminución a partir de los 5 minutos de tratamiento la cual se mantiene hasta las 4 horas de tratamiento. Después de este tiempo la expresión de claudina 7 se restablece (Figura 23 A y C). Un efecto diferente se observó con la cepa CagA- 25, con la cual la expresión de esta claudina disminuyó desde los 5 min de tratamiento y se restableció paulatinamente hasta ser sobre-expresada claudina 7 a las 2, 4 y 6 horas de tratamiento (Figura 22B y C).

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

### Observación de co-cultivos de células AGS y cepas CagA+ y CagA- de *H. pylori* en microscopio invertido.

Se obtuvieron imágenes en microscopio invertido con el fin de observar la morfología de la línea celular AGS expuesta a la presencia de *H. pylori* para determinar si la alteración que se genera en las claudinas 5, 6 y 7 es debida al re-arreglo de la morfología celular provocada por la presencia de dicha bacteria; para ello al finalizar las 6 horas de tratamiento se obtuvieron imágenes con el fin de comparar la morfología de los co-cultivos respecto al control de células AGS.



“Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$  sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

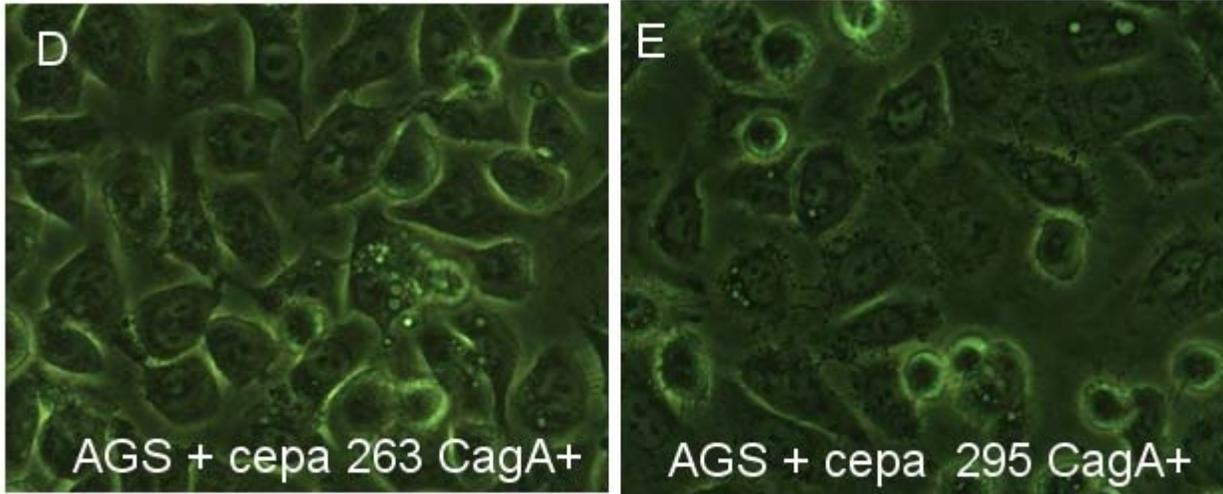


Figura 23. Imágenes en microscopio invertido con resolución de 40X de la línea celular AGS co-cultivada durante 6 h con cepas de *Helicobacter pylori* CagA- y CagA+. (A) Control AGS (B y C) Comparación de células co-cultivadas con las cepas CagA- 31 y 25 de *H. pylori*. (D y E) Comparación de células co-cultivadas con la cepa CagA+ 295 y 263 de *H. pylori*.

La imagen de la cepa CagA- 31 (Figura 23-B) muestra una morfología pronunciadamente más ovalada y con presencia de algunas extensiones respecto al control (Figura 23-A), en el caso de la cepa CagA- 25 (Figura 23-C) se observa mayor elongación y motilidad celular; por otro lado en la figura 24-D se observa la morfología de las células AGS co-cultivadas con la cepa CagA+ 263 en donde las células presentan gran cantidad de extensiones y mayor elongamiento que las cepas CagA- 31 y 25, las características de la cepa CagA+ 295 son mucho más marcadas que en los casos anteriores ya que a la presencia de dicha cepa se aprecian células más elongadas y con grandes extensiones en las que se pierde completamente su morfología, observándose consigo gran motilidad (Figura 23-E).

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

### Cuantificación de IL-1 $\beta$ en medios condicionados de co-cultivos de células AGS y cepas CagA+ y CagA- de *H. pylori*.

El mecanismo de regulación de la secreción acida en la infección de *H. pylori* permanece no clara, pero varios reportes sugieren que las citocinas podrían jugar un rol importante en esta regulación aunado a un efecto muy marcado en la expresión de diversas claudinas; por lo tanto se realizó un ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA) con los medios condicionados obtenidos del co-cultivo de células AGS y *H. pylori* para determinar si existe una relación entre la secreción de IL-1  $\beta$  y cepas CagA+ 295 y CagA- 25 de *H. pylori*, dichas cepas se eligieron ya que son las que producen mayores cambios en la expresión de claudinas 5, 6 y 7 y morfológicamente son las que presentan más cambios.

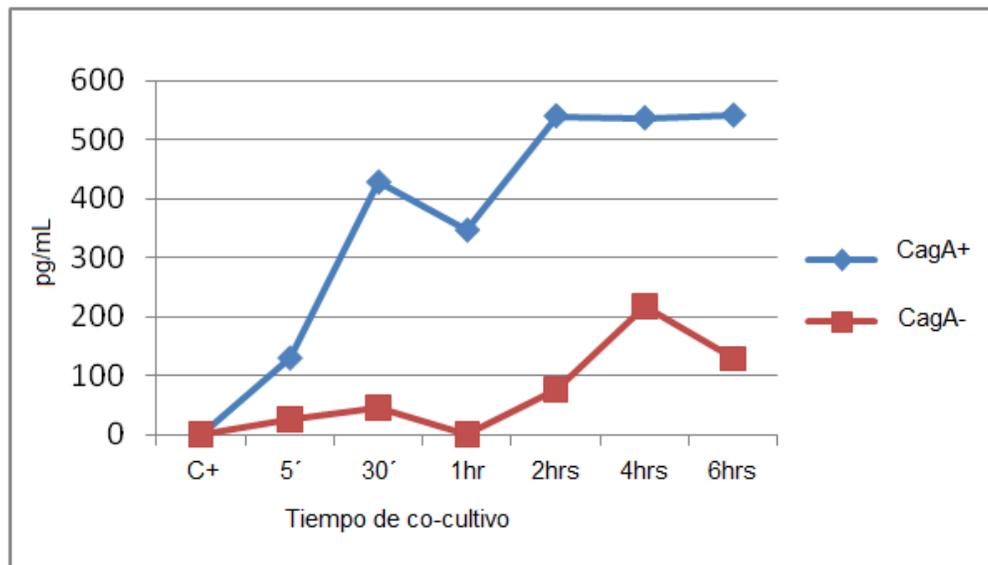


Gráfico 1. **Concentración de IL-1 $\beta$  en diferente tiempo de co-cultivo con cepas de *H. pylori* CagA+ y CagA-.** Azul: células AGS co-cultivadas con cepas CagA+ de *H. pylori*. Rojo: con la misma metodología anterior, se trataron células AGS co-cultivando dichas células con cepas CagA- de *H. pylori*.

La presencia de CagA aumenta y mantiene la secreción de IL-1 $\beta$  durante más tiempo (Gráfico 1). A partir de las 2 horas de co-cultivo se observa un patrón constante de secreción de IL-1 $\beta$  en la cepa CagA+ de *H. pylori*, a diferencia de cepas con ausencia de la expresión del gen cagA en donde después de las 4 horas dicha secreción comienza a disminuir y en

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

ningún momento alcanza niveles tan altos de IL-1 $\beta$  respecto a la cepa CagA+ de *H. pylori* (Gráfico 1). Tanto en cepas CagA+ como CagA- de *Helicobacter pylori* se observa un aumento de IL-1 $\beta$  respecto al control, pero a la presencia de CagA dicho aumento es mucho más significativo que a la ausencia de CagA.

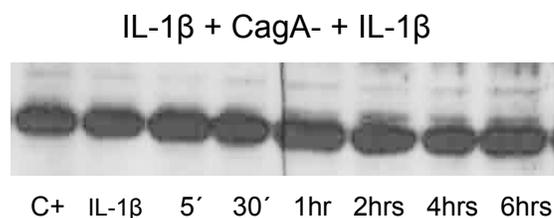
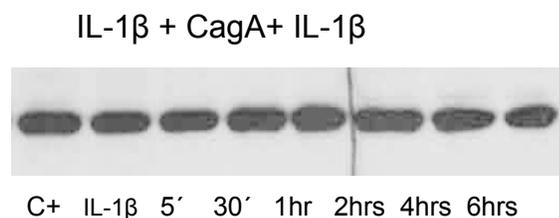
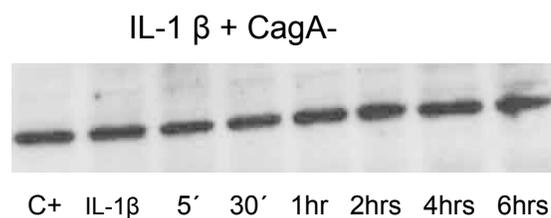
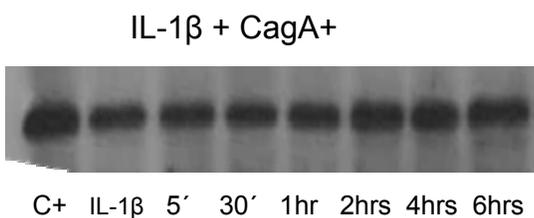
## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

### Expresión de claudinas 5, 6 y 7 en co-cultivos de células AGS con IL-1 $\beta$ y cepas CagA+ y CagA- de *Helicobacter pylori* estimuladas previamente con 10ng/mL de IL-1 $\beta$ .

Para evaluar si el co-cultivo de células AGS con cepas CagA+ y CagA- de *H. pylori* aunada a IL-1 $\beta$  promovía una drástica alteración de claudinas 5, 6 y 7 se realizaron análisis por western blot, en los cuales todos los co-cultivos fueron estimulados con IL-1 $\beta$  durante 48 horas previas, y para determinar si un estímulo continuo con IL-1 $\beta$ , posterior a la adición de las bacterias tiene efectos sobre la expresión de claudinas se les adicionó un segundo estímulo de IL-1 $\beta$  (10ng/mL) y se inició el conteo del tiempo de infección bacteriana, se evaluó la expresión de claudinas a los 5 min, 30 min, 1h, 2h, 4h y 6h de incubación. De igual manera un anticuerpo contra  $\alpha$ -actina fue utilizado como control de carga. La intensidad de las bandas obtenidas por el ensayo de quimioluminiscencia fue cuantificada usando el software de análisis de imágenes Gelquant y la intensidad de cada banda fue normalizada con respecto a la banda de las muestras control.

#### Control de carga $\alpha$ -actina



# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

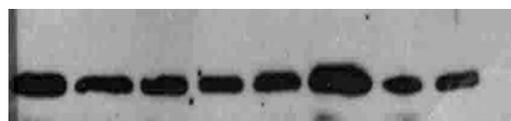
## Claudina 5

A. IL-1 $\beta$  + CagA+



C+ IL-1 $\beta$  5' 30' 1hr 2hrs 4hrs 6hrs

B. IL-1 $\beta$  + CagA-



C+ IL-1 $\beta$  5' 30' 1hr 2hrs 4hrs 6hrs

C

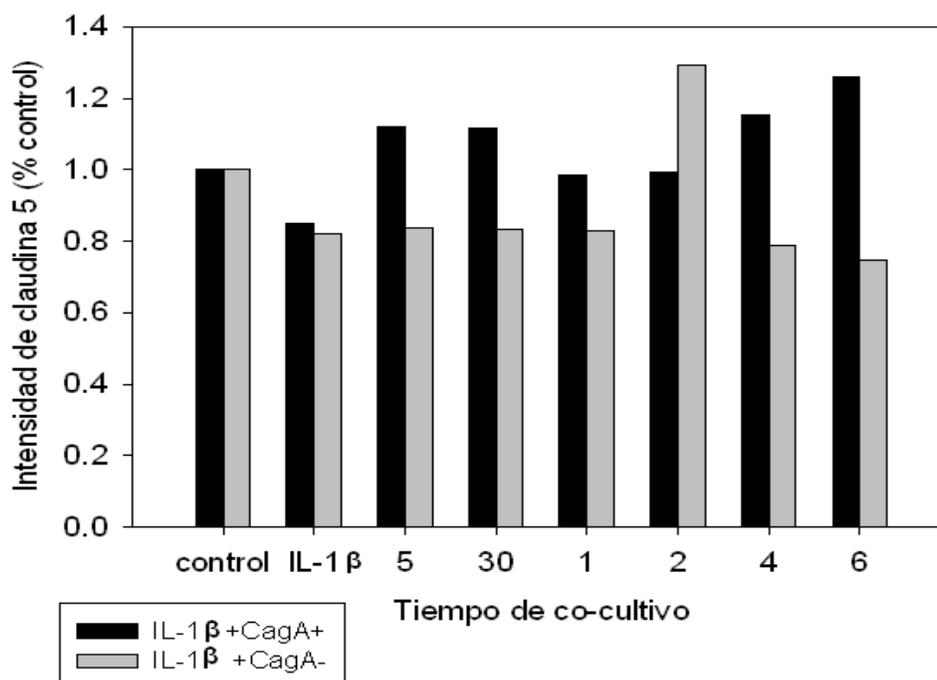


Figura 24. **Expresión de claudina 5 en diferentes tiempos de co-cultivo de células AGS con cepas CagA+ 295 y CagA- 25 de *H. pylori* y estimuladas previamente con IL-1 $\beta$  (A y B respectivamente).** Cuantificación de la intensidad de las bandas detectadas en cada ensayo (porcentaje relativo al control) (C).

Respecto a la expresión de claudina 5 con la cepa CagA+ y el estímulo previo de IL-1 $\beta$  se aprecia un aumento a partir del minuto 5 mantenido en todos los tiempos de co-cultivo (Figura 25 A, C). En el caso de la cepa CagA- y el estímulo previo de IL-1 $\beta$  la expresión de claudina 5 permanece disminuida a partir del minuto 5, pero dicha disminución permanece constante a lo largo de todos los tiempos de co-cultivo (Figura 24 B, C)

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

## Claudina 5

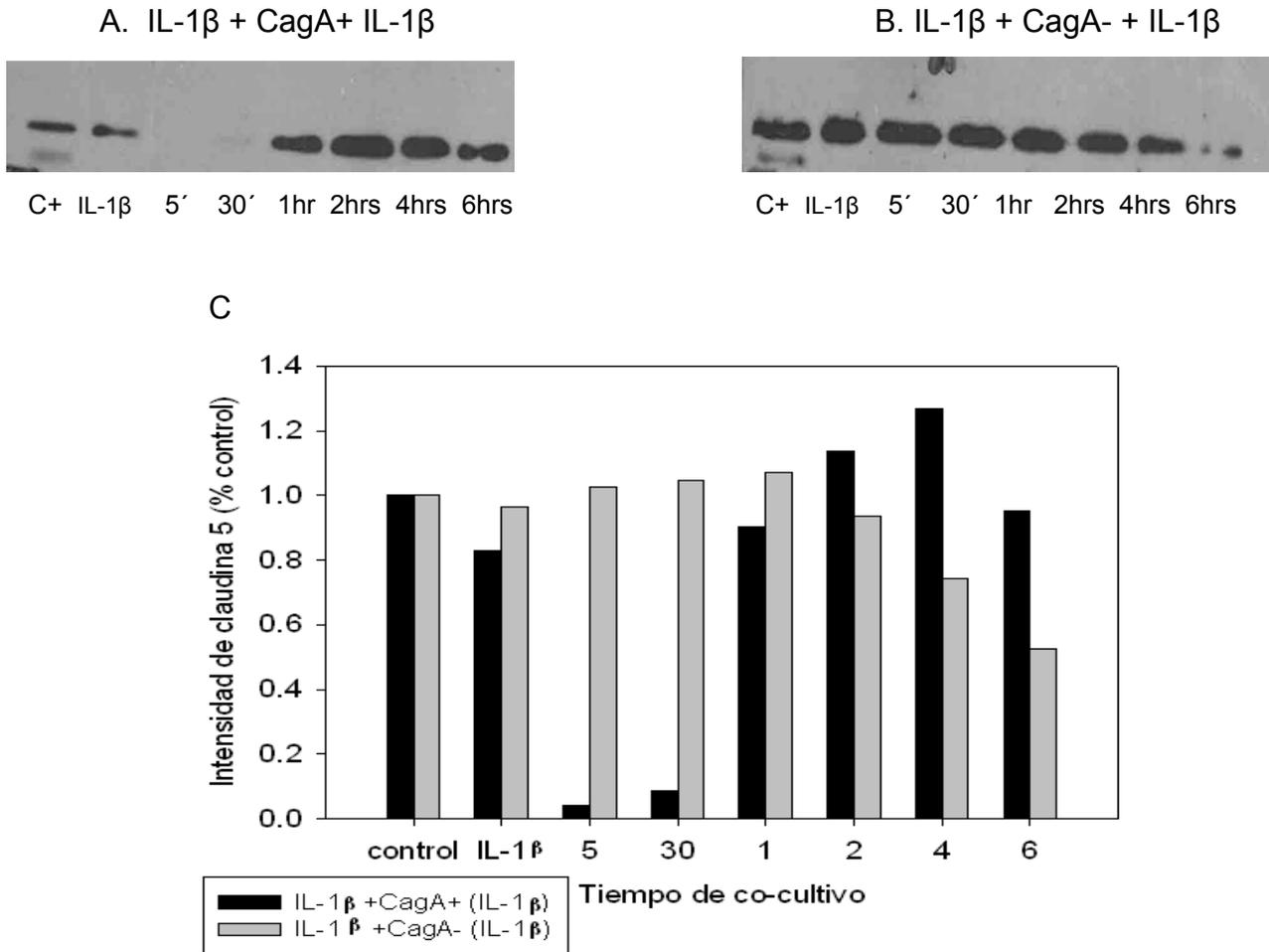


Figura 25. Expresión de claudina 5 en diferentes tiempos de co-cultivo de células AGS con cepas CagA+ 295 y CagA- 25 de *H. pylori* e IL-1 $\beta$  y estimuladas previamente con IL-1 $\beta$  (A y B respectivamente). Cuantificación de la intensidad de las bandas detectadas en cada ensayo (porcentaje relativo al control) (C).

En relación a la expresión de claudina 5 sobre los tratamientos con cepas CagA+ y CagA- estimuladas previamente 48 horas y mantenido el estímulo mediante el co-cultivo se aprecia una disminución muy abrupta a los 5 y 30 minutos, y posteriormente un restablecimiento paulatino el cual a las 4 horas sobrepasa a las células control y finalmente a las 6 horas disminuye nuevamente, esta expresión es debida a la cepa CagA+, con relación a la cepa CagA- la expresión de claudina 5 no presenta cambios significativos sino hasta las 2 horas de tratamiento en donde la expresión de dicha claudina comienza a decrecer poco a poco (Figura 25).

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

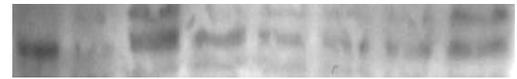
## Claudina 6

A. IL-1 $\beta$  + CagA +



C+ IL-1 $\beta$  5' 30' 1hr 2hrs 4hrs 6hrs

B. IL-1 $\beta$  + CagA-



C+ IL-1 $\beta$  5' 30' 1hr 2hrs 4hrs 6hrs

C

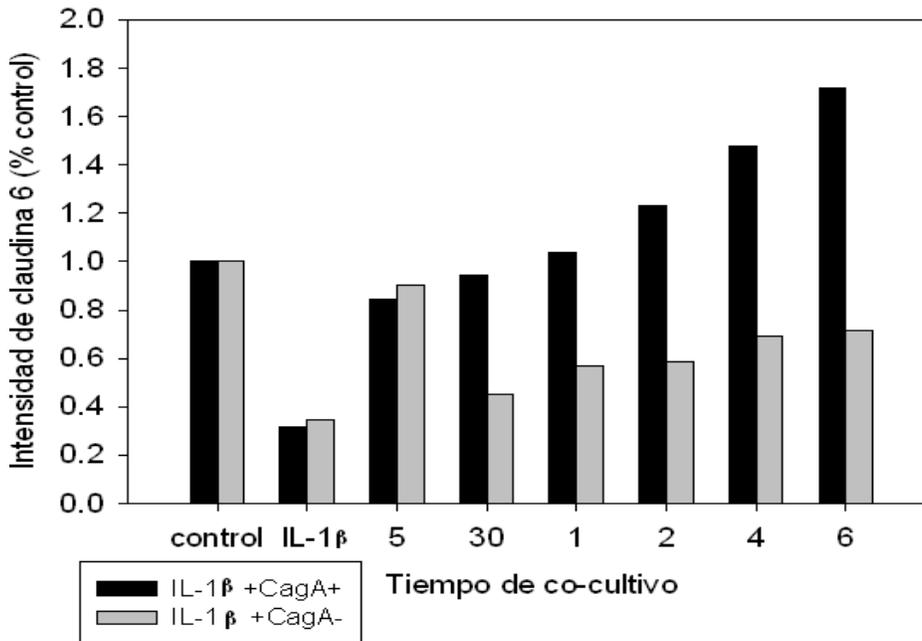


Figura 26. **Expresión de claudina 6 en diferentes tiempos de co-cultivo de células AGS con cepas CagA+ 295 y CagA- 25 de *H. pylori* y estimuladas previamente con IL-1 $\beta$  (A y B respectivamente).** Cuantificación de la intensidad de las bandas detectadas en cada ensayo (porcentaje relativo al control) (C).

Referente a la expresión de claudina 6 que se observa previas 48 horas de estímulo con IL-1 $\beta$  co-cultivada con la cepa CagA+ de *H. pylori* se logra observar un aumento paulatino durante todo el tratamiento, desde los 5 minutos hasta las 6 horas, por otro lado en relación con la cepa CagA- posterior a los 5 minutos de tratamiento comienza a disminuir su expresión y mantener esta disminución después de los 60 minutos y hasta las 6 horas por debajo del control, por lo anterior se asume que el previo estímulo con IL-1 $\beta$  aunado al co-cultivo de cepas CagA+ y CagA- de *H. pylori* induce cambios en la expresión de claudina 6 (Figura 26).

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

## Claudina 6

A. IL-1 $\beta$  + CagA+ IL-1 $\beta$



C+ IL-1 $\beta$  5' 30' 1hr 2hrs 4hrs 6hrs

B. IL-1 $\beta$  + CagA- IL-1 $\beta$



C+ IL-1 $\beta$  5' 30' 1hr 2hrs 4hrs 6hrs

C

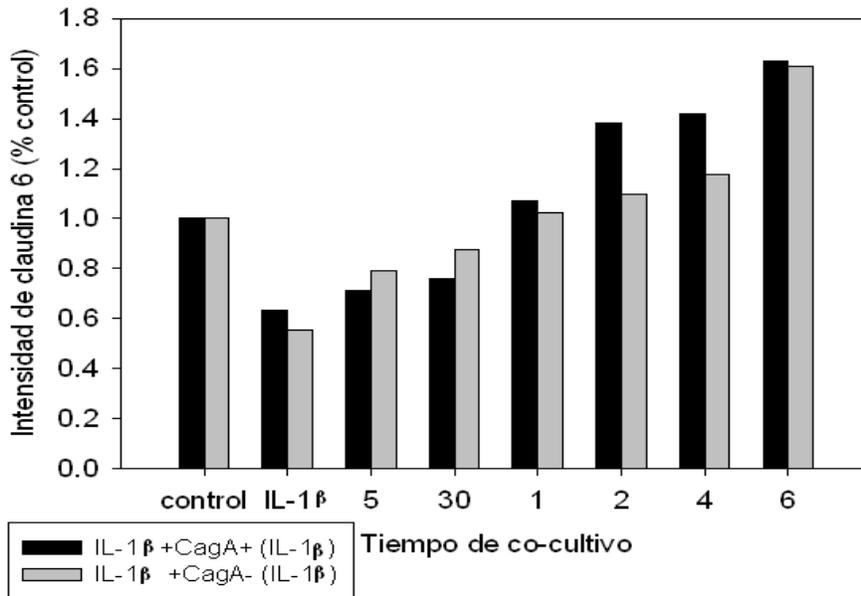


Figura 27. **Expresión de claudina 6 en diferentes tiempos de co-cultivo de células AGS con cepas CagA+ 295 y CagA- 25 de *H. pylori* e IL-1 $\beta$  y estimuladas previamente con IL-1 $\beta$  (A y B respectivamente). Cuantificación de la intensidad de las bandas detectadas en cada ensayo (porcentaje relativo al control) (C).**

La expresión de claudina 6 en co-cultivos con las cepas CagA+ y CagA- de *H. pylori* y expuestas a un segundo estímulo de IL-1 $\beta$  reflejan un mismo patrón ya que en ambos casos la expresión de dicha claudina tiende a ir en aumento paulatino y constante, lo que indica que el doble estímulo no altera la expresión de claudina 6 en co-cultivos de cepas CagA+ pero si influye su expresión al exponerla con cepas CagA- (Figura 27) ya que se promover un aumento de dicha claudina en lugar de originar una disminución como se observo en el caso anterior lo que sugiere que el continuo estímulo de IL-1 $\beta$  aunado a cepas CagA- si promueve una alteración en la expresión de claudina 6 (Figura 26)

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

## Claudina 7

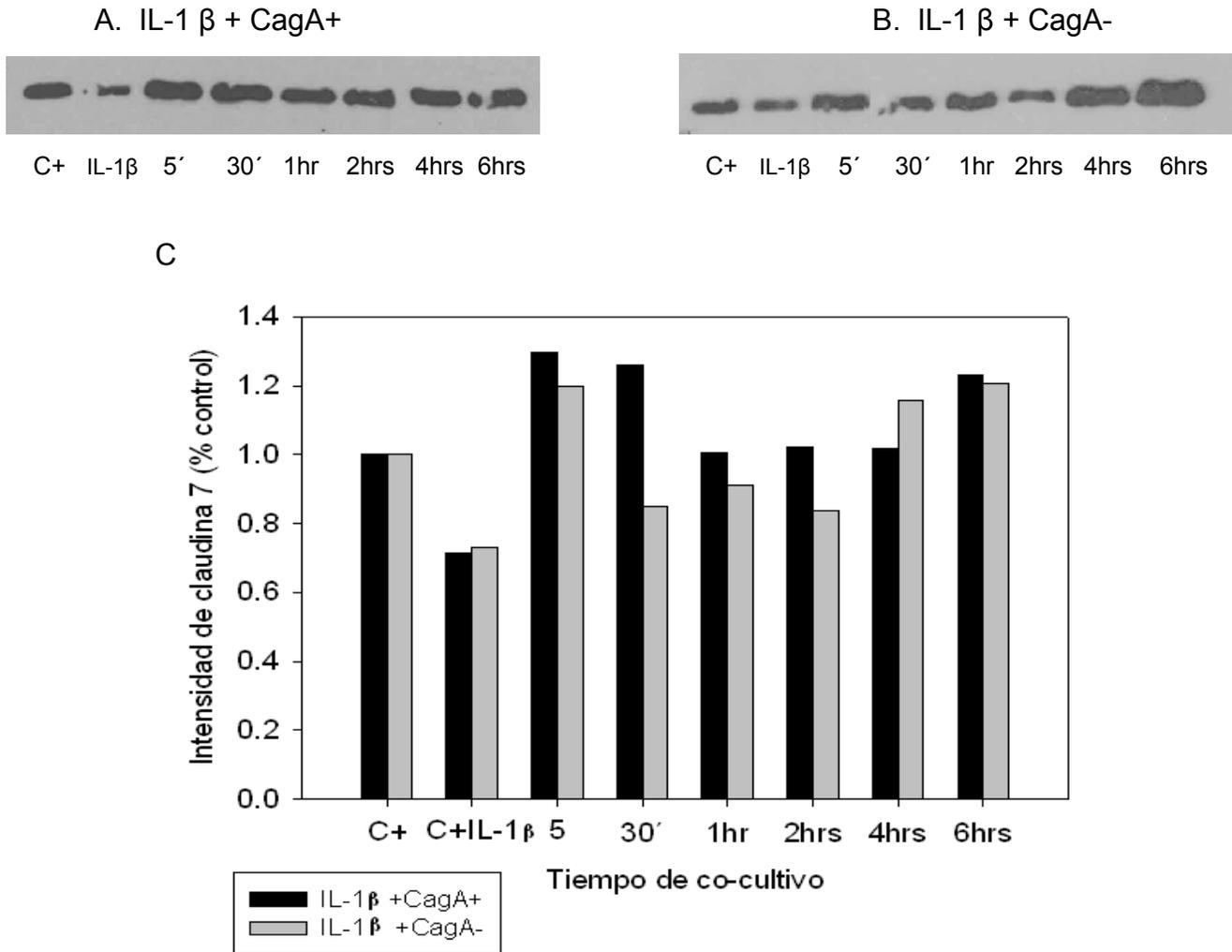


Figura 28. **Expresión de claudina 7 en diferentes tiempos de co-cultivo de células AGS con cepas CagA+ 295 y CagA- 25 de *H. pylori* y estimuladas previamente con IL-1 $\beta$  (A y B respectivamente).** Cuantificación de la intensidad de las bandas detectadas en cada ensayo (porcentaje relativo al control) (C).

La figura 29 muestra la expresión de claudina 7 en células AGS co-cultivadas con las cepas CagA+ y CagA- de *H. pylori* y estimuladas previas 48 horas con IL-1 $\beta$  en donde se observa un aumento en la expresión a los 5 minutos y posteriormente se observa un decremento a partir de los 30 minutos y hasta las 4 horas en donde se presenta una meseta para posteriormente a las 6 horas volver a aumentar su expresión, este efecto, similar expresión en ambos casos (CagA+ y CagA-) puede deberse al estímulo previo de IL-1 $\beta$  la cual promueve aumento y posterior disminución de claudina 7.

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

## Claudina 7

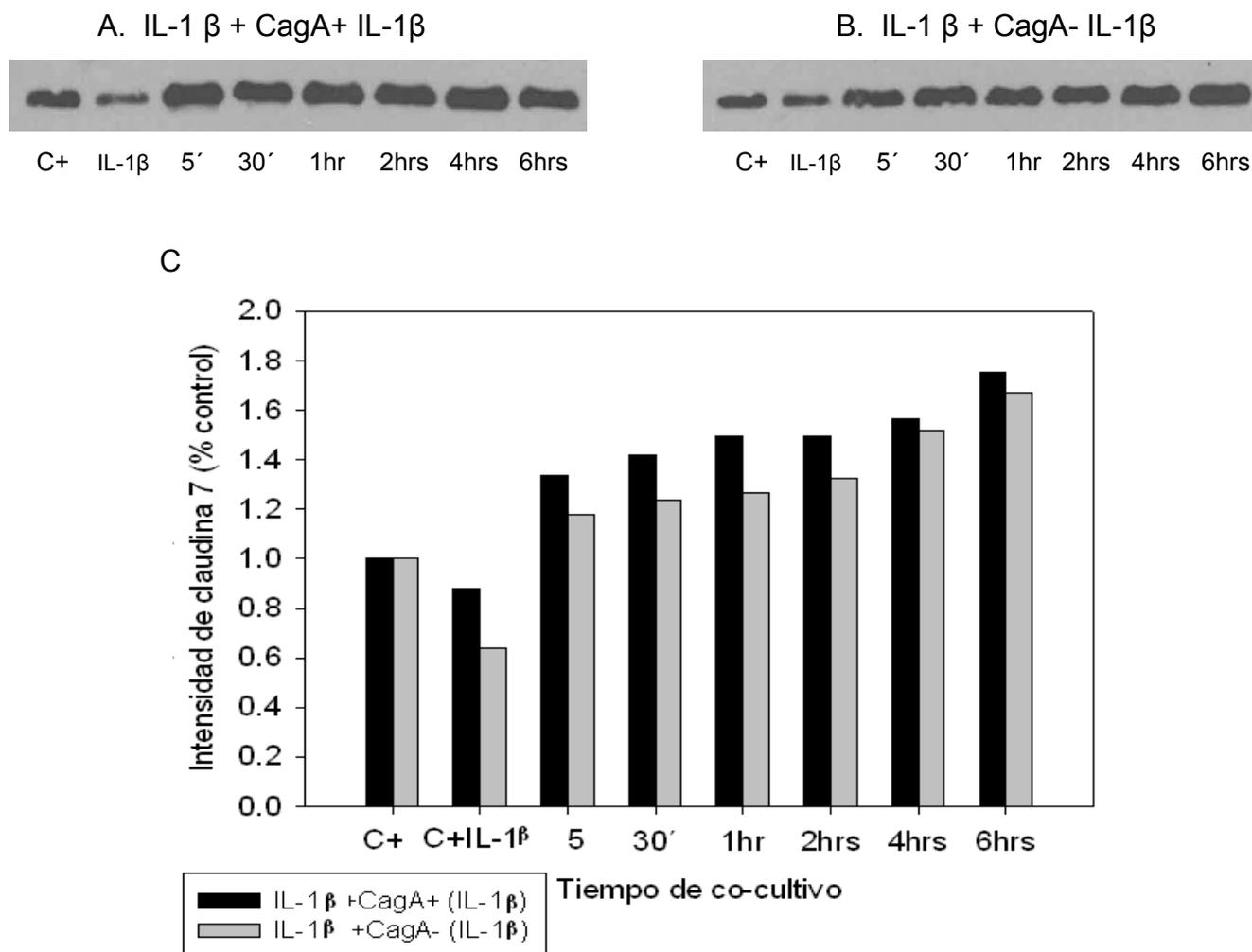


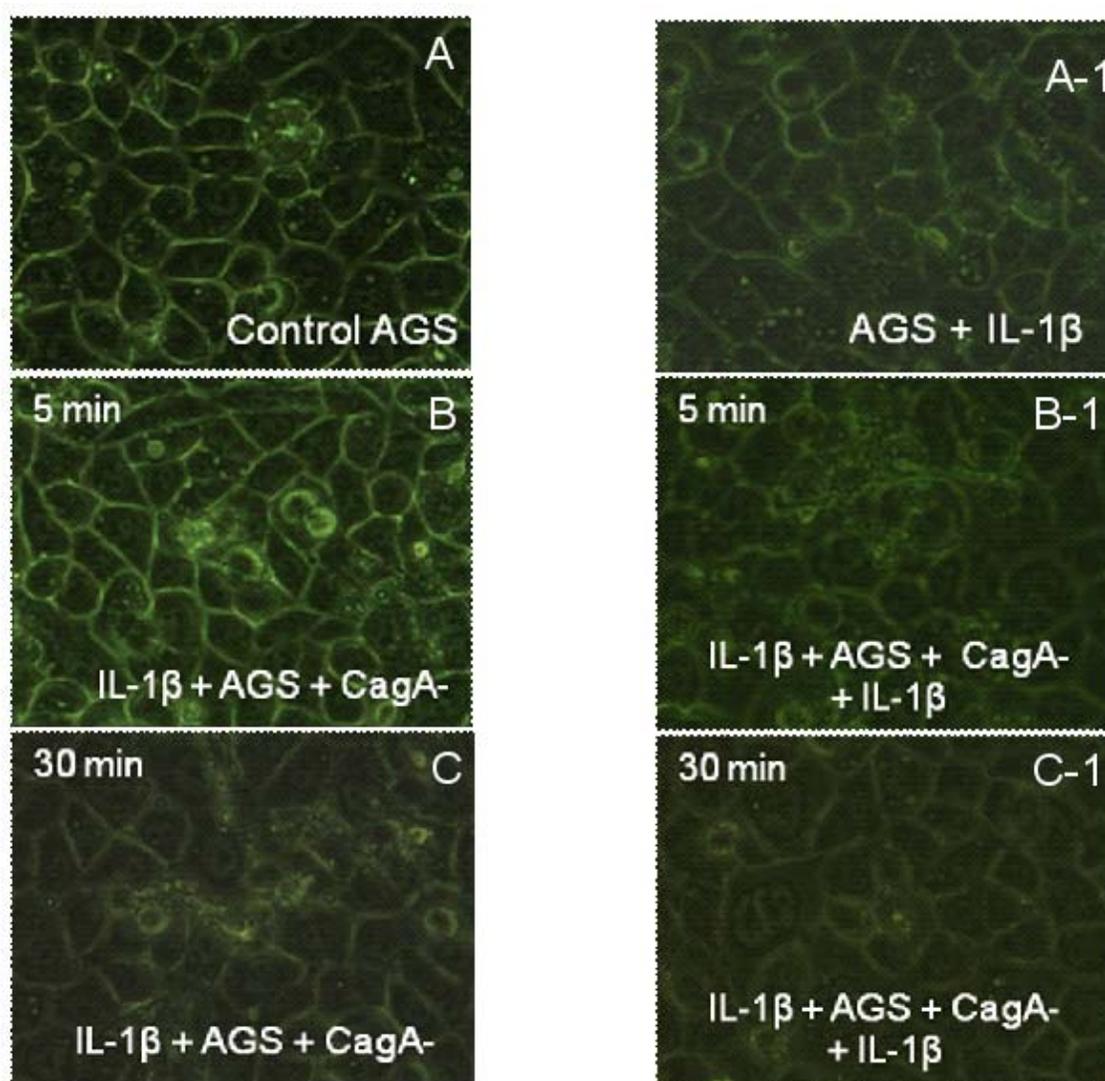
Figura 29. **Expresión de claudina 7 en diferentes tiempos de co-cultivo de células AGS con cepas CagA+ 295 y CagA- 25 de *H. pylori* e IL-1 $\beta$  y estimuladas previamente con IL-1 $\beta$  (A y B respectivamente). Cuantificación de la intensidad de las bandas detectadas en cada ensayo (porcentaje relativo al control) (C).**

En relación con la expresión de claudina 7 en cepas CagA+ y CagA- de *H. pylori* con un estímulo continuo de IL-1 $\beta$  se observa de igual manera que en el caso de claudina 6 (Figura 27) un aumento continuo desde el minuto 5 hasta las 6 horas, por lo tanto se asume que el estímulo continuo de IL-1 $\beta$  aunado a la presencia de cepas de *H. pylori* si promueve un aumento en la expresión de claudina 7 (Figura 29).

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

**Observación en microscopio invertido de células AGS estimuladas con IL-1 $\beta$  y expuestas a la presencia cepas CagA+ 295 y CagA- 25 de *H. pylori*.**

Se obtuvieron imágenes en microscopio invertido para observar la morfología de la línea celular AGS estimuladas con IL-1 $\beta$  y expuesta a la presencia de *H. pylori*. Al finalizar cada tratamiento de ambas cepas CagA+ 295 y CagA- 25 de *H. pylori* estimuladas previamente con IL-1 $\beta$  se tomaron imágenes para observar el efecto que produce el estímulo de IL-1 $\beta$  comparado con el segundo estímulo de la misma aunado a la presencia de cepas CagA+ y CagA- de *H. pylori*.



“Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$  sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

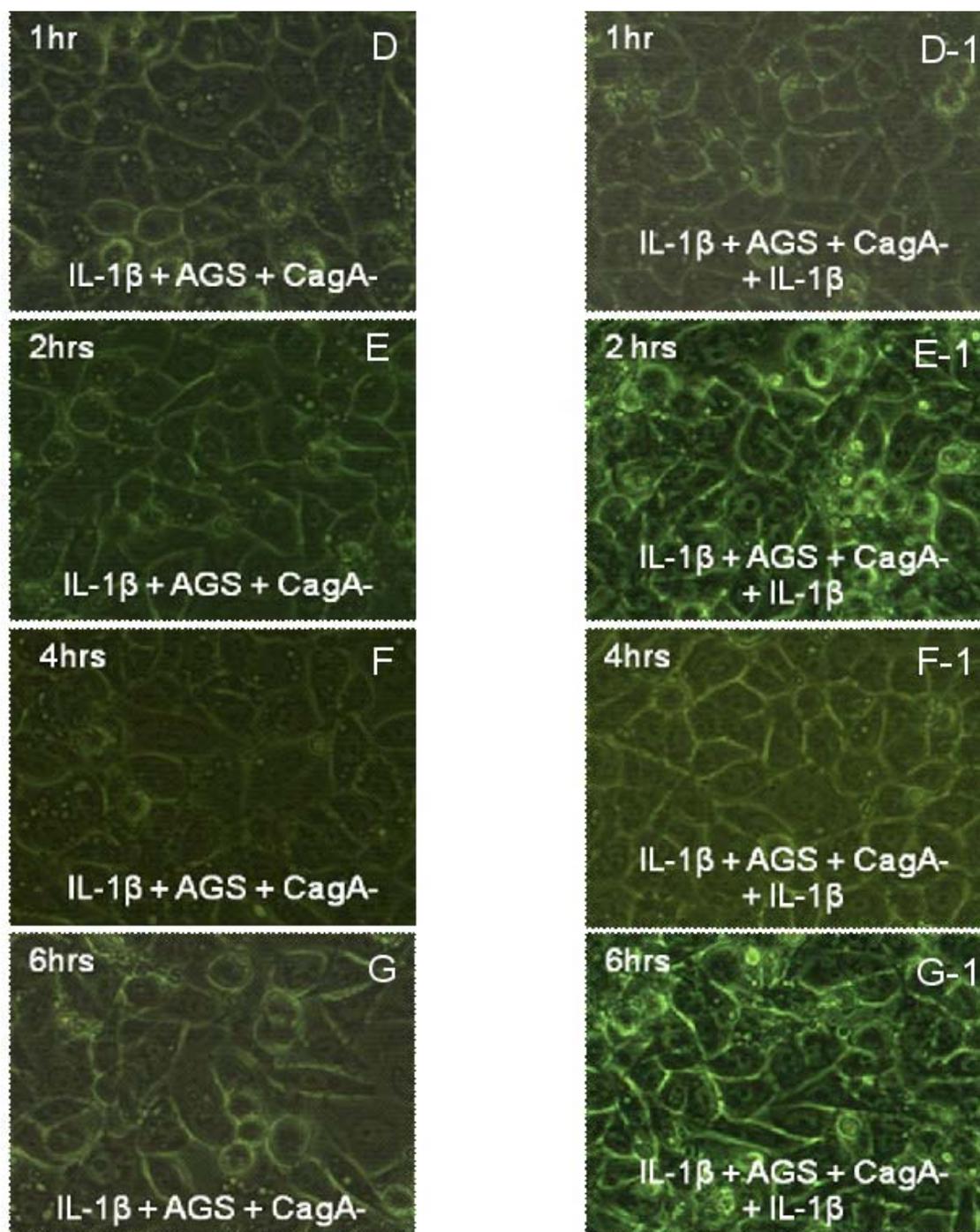
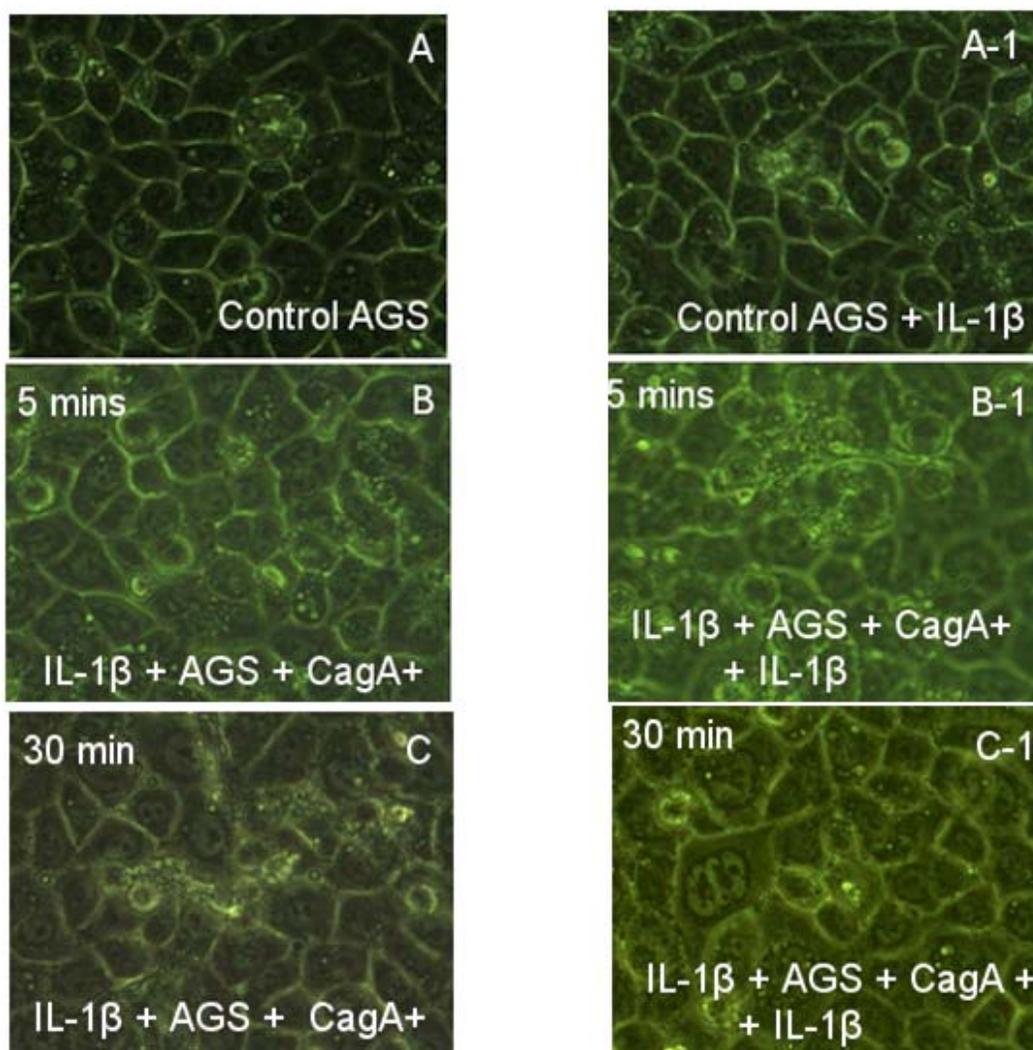


Figura 30. Imágenes en microscopio invertido con resolución de 40X de la línea celular AGS estimuladas durante 48hrs con IL-1 $\beta$  (10ng/mL) y en presencia de la cepa CagA- 25 de *Helicobacter pylori*. (A-G) Co-cultivo de células AGS, previamente incubadas con IL-1 $\beta$ , con la cepa CagA- 25 de *H. pylori* a diferentes tiempos. (A1-G1) Co-cultivo de células AGS, previamente incubadas con IL-1 $\beta$ , con la cepa CagA- 25 de *H. pylori* y un segundo estímulo de IL-1 $\beta$ .

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

Las diferencias morfológicas entre los tratamientos de IL-1 $\beta$  + CagA-25 e IL-1 $\beta$  + CagA-25 + IL-1 $\beta$ , se logran apreciar a partir de las 2 horas de tratamiento siendo mucho más marcadas a las 6 horas dichos cambios morfológicos. Ya que a partir de las 2 horas de co-cultivo las células AGS de ambos tratamiento (figura 30) se observan con elongaciones muy marcadas y se puede distinguir gran cantidad de vacuolas mucho más perceptibles; en el tratamiento de un segundo estímulo de IL-1 $\beta$  se logran observar dichas características mucho más marcadas (figura 30 A1-G1); lo que claramente conlleva a suponer que la presencia de IL-1 $\beta$  afecta la morfología de las células aun sin la presencia del factor de virulencia de CagA de *H. pylori*.



“Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$  sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

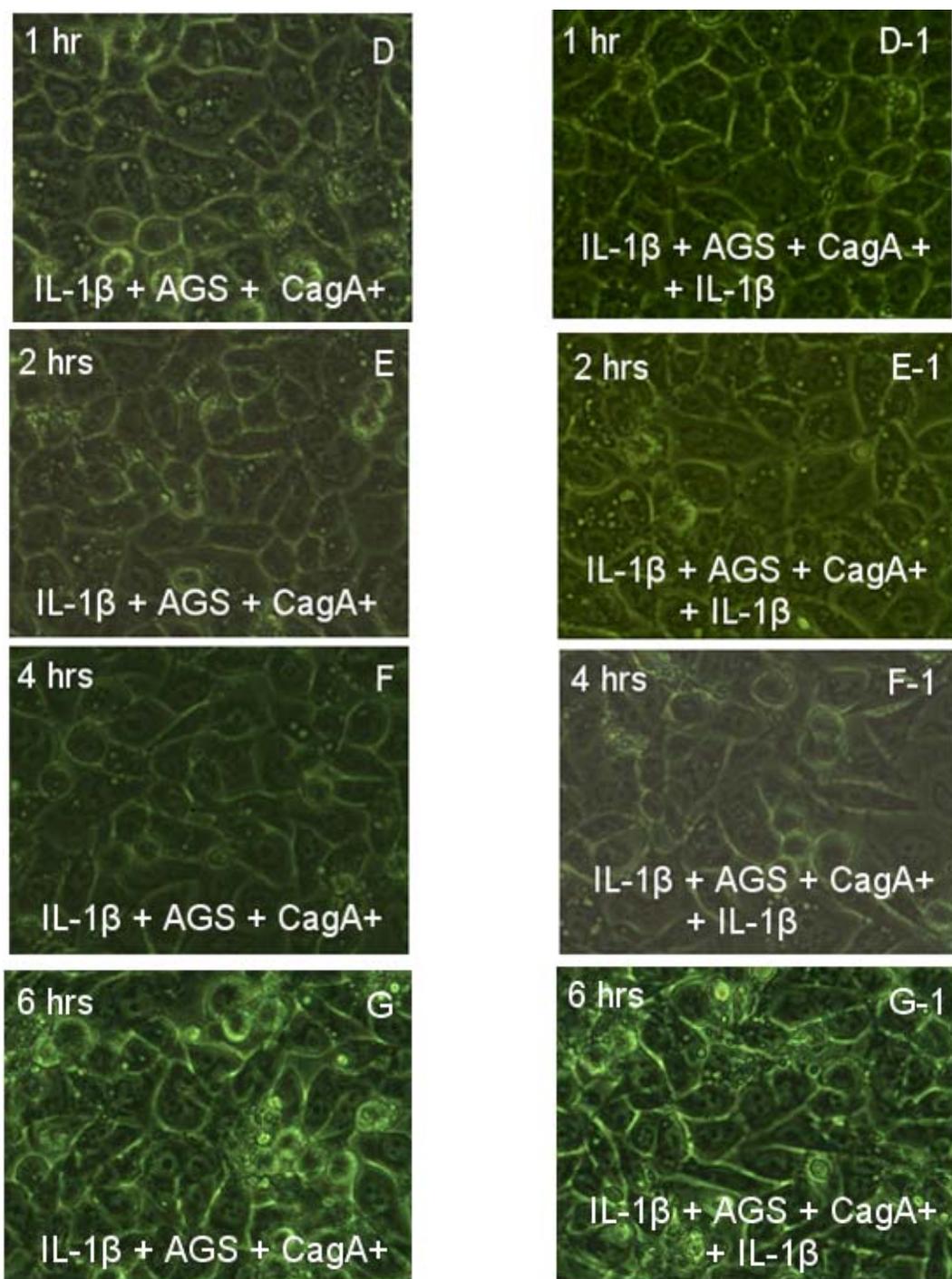


Figura 31. Imágenes en microscopio invertido con resolución de 40X de la línea celular AGS estimulada previamente durante 48hrs con IL-1 $\beta$  y en presencia de la cepa CagA+ 295 de *H. pylori*. (A-G) Co-cultivo de células AGS, previamente incubadas con IL-1  $\beta$ , con la cepa CagA+ 295 de *H. pylori* a diferentes tiempos. (A1-G1) Co-cultivo de células AGS, previamente incubadas con IL-1  $\beta$ , con la cepa CagA+295 de *H. pylori* y un segundo estímulo de IL-1 $\beta$ .

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

Como se puede observar a las 6 horas de tratamiento las células comienzan a despegarse, y la elongación es marcada a partir de las 2 horas de tratamiento en ambos casos, tanto en IL-1 $\beta$  + CagA+ 295 e IL-1 $\beta$  + CagA-+ 295 + IL-1 $\beta$  (Figura 31). La figura 26 A1-G1 presenta mayor motilidad y elongación con respecto a las células del tratamiento con IL-1 $\beta$  + CagA+ 295.

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

### Cuantificación de IL-8 en medios condicionados de células AGS co-cultivadas con cepas CagA+ y CagA- de *H. pylori*.

Para evaluar si el co-cultivo de células AGS con cepas CagA+ y CagA- de *H. pylori* promovía la secreción de otras citocinas proinflamatorias, se cuantificó mediante la técnica de ELISA, la concentración de IL-8, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  en los medios condicionados obtenidos de estos cultivos.

A diferencia de la secreción de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  en donde no se observó secreción de las mismas (datos no mostrados), los co-cultivos de la cepa CagA+ de *H. pylori* con células AGS previamente estimuladas con 10ng/mL de IL-1 $\beta$ , promovieron el aumento y el mantenimiento de la secreción de IL-8 posterior a las cuatro horas con respecto al tiempo de incubación del co-cultivo, en el caso de los co-cultivos de la cepa CagA- de *H. pylori* de igual manera se promueve la secreción de IL-8 pero dicha secreción disminuye a partir de las cuatro horas de incubación (Gráfico 2). Dichos resultados refuerzan el papel de CagA en los procesos proinflamatorios.

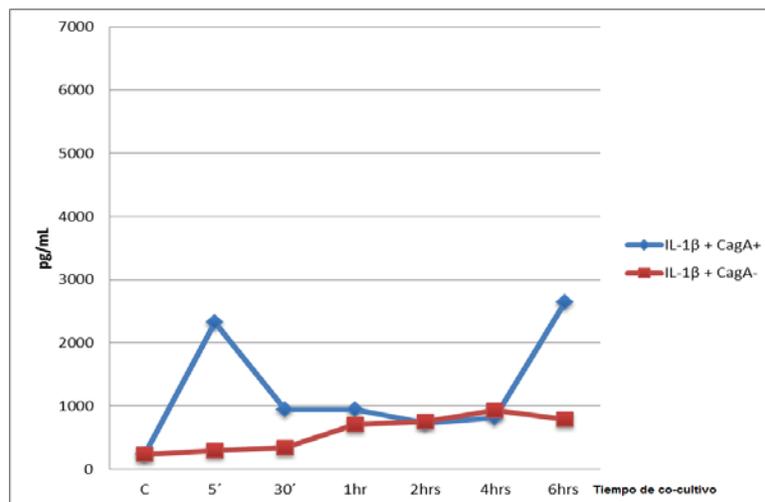


Gráfico 2. Concentración de IL-8 en medios condicionados a partir del co-cultivo de cepas CagA+ y CagA- de *H. pylori* con células AGS pre-tratadas con IL-1 $\beta$ . Azul: células AGS y co-cultivo con la cepa CagA+ de *H. pylori*. Rojo: células AGS y co-cultivo con la cepa CagA- de *H. pylori*.

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

Aunado al papel que CagA pudiera tener en la secreción de IL-8, la secreción de esta interleucina en cepas CagA<sup>+</sup> de *H. pylori* aumentó cuando las células AGS se expusieron a un segundo estímulo de IL-1 $\beta$ , lo que muestra la importancia de tener un estímulo continuo. (Gráfico 3).

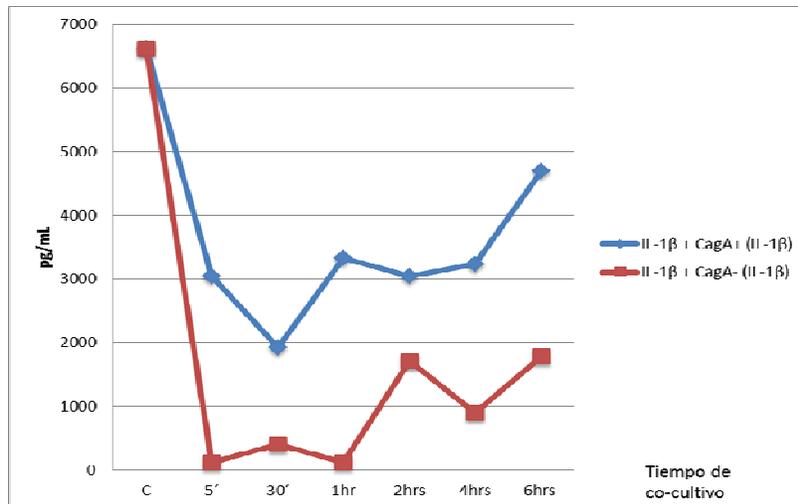


Gráfico 3. **Concentración de IL-8 en medios condicionados a partir del co-cultivo de cepas CagA<sup>+</sup> y CagA<sup>-</sup> de *H. pylori* con células AGS pre-tratadas con IL-1 $\beta$  durante 48 horas previo al co-cultivo y con un segundo estímulo de IL-1  $\beta$  posterior a la adición de *H. pylori*. Azul: células AGS co-cultivadas con la cepa CagA<sup>+</sup> de *H. pylori*. Rojo: células AGS tratadas de la misma manera co-cultivadas con la cepa CagA<sup>-</sup> de *H. pylori*.**

Los resultados obtenidos muestran que, al igual que en las cepas CagA<sup>+</sup>, el segundo estímulo de IL-1 $\beta$  promovió la secreción de IL-8 al medio, aunque en este caso la concentración de la IL-8 secretada fue mayor (Gráfico 3). Estos resultados en conjunto sugieren que tanto la presencia de CagA como del estímulo continuo con IL-1 $\beta$  son necesarios para propiciar un microambiente proinflamatorio favorecido en parte por la presencia de IL-8

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

## Discusión

### **1. Expresión de claudinas en co-cultivos de células AGS con cepas CagA+ y CagA- de *Helicobacter pylori*.**

Es un hecho que las claudinas se expresan de manera tejido-específicas y su principal función es mantener la homeostasis de los tejidos formando barreras en la zona apical de las células, sin embargo se ha reportado que la presencia de organismos patógenos, procesos pro e inflamatorios y patologías como diversos tipos de cáncer, promueven la deslocalización de claudinas de la membrana celular al citosol. En el caso de la infección por *Helicobacter pylori*, los factores de virulencia de esta bacteria juegan un papel muy importante en la regulación de las proteínas de la célula huésped. Cepas CagA+ causan daño a la función de barrera ya que afectan la localización de ZO-1 y por ende promueven la desestabilización de proteínas involucradas en la función de la polaridad celular. Otros estudios han demostrado que *H. pylori* puede promover la deslocalización de claudinas 4 y 5 por medio de la alteración de la cinasa de la cadena ligera de miosina (70). Con base en lo anterior, en este estudio se analizó si la expresión de claudinas ser alterada cuando células de adenocarcinoma gástrico AGS son mantenidas en co-cultivo con cepas CagA+ de *H. pylori*. Los resultados mostraron que las cepas CagA+, a diferencia de las CagA-, produjeron cambios únicamente en la expresión de claudinas 5, 6 y 7. Además también se evidenció que otras proteínas como la BabA, presente en una de las cepas CagA+, parece tener un papel importante en esta alteración. BabA es una proteína de membrana externa que se une al antígeno B de Lewis de las células gástricas. Existe amplia evidencia que muestra que la expresión de BabA puede influenciar la severidad de la enfermedad (71). Cepas de *H. pylori* que poseen BabA, CagA y VacA tienen un alto riesgo de generar cáncer gástrico. Los resqultados obtenidos con las claudinas 5, 6 y 7 mostraron que la expresión cambia en los primeros minutos de infección con *H. pylori*, con una significativa disminución en la cantidad de proteína a los 5 y 30 min de incubación la cual, posteriormente, se restablece a niveles basales. Existe evidencia que muestra que la infección de *Helicobacter pylori* altera a proteínas involucradas en la regulación y el control del “splicing” alternativo (72) afectando la expresión de proteínas del

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

huésped. Se requerirán estudios posteriores para determinar si la disminución en la expresión de estas claudinas se debe a una alteración a nivel de la transcripción provocada por *Helicobacter pylori*.

En el caso de las cepas 25 CagA-, la cual expresa la proteína BabA, se observó una ligera disminución en la expresión de las claudinas 5 y 6. En contraste, la expresión de claudina 7 mostró un aumento significativo a partir de la hora de incubación con la cepa 25 CagA-. Estos resultados hacen suponer que, así como con las cepas CagA+, BabA parece estar relacionada con la alteración en la expresión de las claudinas en los primeros minutos de infección, sin embargo se requiere de más experimentos para determinar si estos cambios son significativos.

### **2. Expresión de claudinas en células AGS, estimuladas previamente con IL-1 $\beta$ , co-cultivadas con cepas CagA+ y CagA- de *Helicobacter pylori*.**

Se ha reportado que citocinas como IL-1 $\beta$ , inducen la remodelación del citoesqueleto de actina y generan cambios en la arquitectura de las uniones estrechas incrementando la permeabilidad celular y provocando alteraciones en las claudinas 3, 4, 5 y 7 en células de epitelio gástrico y de colon (73,74). Debido a que en nuestro trabajo observamos un efecto de las cepas CagA+ sobre las claudinas 5, 6 y 7, decidimos evaluar si una incubación previa con IL-1 $\beta$ , aunado al co-cultivo con cepas CagA+ y CagA- de *H. pylori*, era capaz de potenciar los efectos observados en la expresión de estas claudinas.

Los resultados mostraron que el estímulo previo de IL-1 $\beta$  no altera significativamente la expresión de las claudinas 5, 6 y 7 en las células AGS. En contraste, los ensayos con un estímulo continuo de IL-1 $\beta$  en co-cultivos de células AGS con cepas CagA+ y CagA- de *H. pylori*, mostraron un incremento en la expresión de las claudinas 6 y 7 con respecto al tiempo. Lo anterior sugiere que un microambiente proinflamatorio puede contribuir a generar cambios a nivel de proteínas que pueden ser aprovechados por la bacteria para ejercer sus efectos.

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

### 3. Observación en microscopio invertido de co-cultivos de células AGS y cepas CagA+ y CagA- de *H. pylori*, estimuladas y no estimuladas con IL-1 $\beta$ .

Diferentes cepas de *H. pylori* inducen en mayor o menor proporción cambios en la morfología de las células epiteliales. Ciertos factores de virulencia, entre ellos CagA y VacA, modifican la morfología celular induciendo elongación y promoviendo la motilidad celular. La elongación celular es principalmente promovida por CagA a través de la inactivación de la cinasa de adhesión focal FAK. FAK es una tirosina cinasa activada a través de la vía de MAPK, que controla los puntos focales de adhesión, desregulando los filamentos de actina e induciendo fibras de stress, las cuales dan como resultado células alargadas. Esto a su vez promueve un aumento de la motilidad celular formando un fenotipo conocido con el nombre de fenotipo colibrí (*hummingbird phenotype*) (16,69, 70, 71).

Dado que las cepas CagA+ BabA+ promovieron cambios a nivel de claudinas, quisimos evaluar si existe una correlación entre estas alteraciones y cambios en la morfología celular. Los resultados mostraron, a las 6 horas del co-cultivo de la línea celular AGS con cepas CagA+ de *H. pylori*, pérdida de adhesión al sustrato observándose más redondas y refringentes. Al mismo tiempo, se observaron algunas células vacuoladas, lo que nos habla de la actividad de VacA en estas mismas cepas, ya que como se ha reportado ésta citotoxina puede inducir un decremento en la permeabilidad celular a través de la formación de canales en la membrana que favorecen la promoción de la infección bacteriana y la discapacidad de regular favorablemente el medio citosólico sobre variaciones ambientales (75, 76).

Tomando en cuenta que otros de los factores que se han reportado como desestabilizadores de la expresión de claudinas son los microambientes pro e inflamatorios, se determinó si la IL-1 $\beta$ , una citocina pro-inflamatoria, potenciaba el efecto de las cepas de *Helicobacter pylori* sobre la expresión de las claudinas. Las células AGS incubadas durante 48 horas con IL-1 $\beta$  y posteriormente co -cultivadas con cepas CagA+ y CagA- de *H. pylori*, mostraron cambios notorios a partir de las 2 horas de incubación. En este tiempo las células se observaron más vacuoladas y redondas. Un doble estímulo de IL-1 $\beta$  parece potenciar los cambios

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

morfológicos de las células. IL-1 $\beta$  juega un papel muy importante en la regulación de la expresión de sialil y fucosil transferasas, así como de antígenos de Lewis en la mucosa gástrica normal. Por otro lado se ha determinado que IL-1 $\beta$  activa la expresión de FUT1, FUT2 y FUT4 en células AGS vía la activación de NF- $\kappa$ B y se han relacionado con un alto desarrollo de metastasis (77, 78). Los efectos observados en nuestro estudio concuerdan con la idea de que muy probablemente IL-1 $\beta$  regula la expresión de estas enzimas y promueve la infección por *Helicobacter pylori* y en consecuencia, los cambios a nivel celular. Los estudios que demuestren este mecanismo están en proceso.

#### **4. Cuantificación de IL-1 $\beta$ e IL-8 en medios condicionados de co-cultivos de células AGS con cepas CagA+ y CagA- de *H. pylori*.**

La infección por *H. pylori* y en específico CagA inducen inflamación crónica de la mucosa gástrica y la secreción de diversas citocinas entre las que se encuentran IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  vía el factor de transcripción nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B) (81). En células epiteliales, las citocinas pueden provocar una drástica reorganización de las uniones estrechas, con internalización de proteínas de membrana como ocludina, JAM-1, claudina 1 y 4 (79).

Entre las citocinas que inducen inflamación se encuentra IL-1 $\beta$ . Una característica importante de ésta es promover procesos inflamatorios en varios tipos celulares, estimular la síntesis de ácido araquidónico y la secreción de proteasas como las colagenasas, elastasas y el activador plasmogénico y funcionar como pirógeno, induciendo temperaturas elevadas en el cuerpo (75).

Dado que observamos un efecto de la infección de cepas CagA+ de *H. pylori* sobre la expresión de claudinas 5, 6 y 7, decidimos determinar si la presencia de la bacteria en los cultivos celulares promovía la síntesis y secreción de IL-1 $\beta$  y que esto pudiera potenciar de manera intrínseca la alteración en estas proteínas. Como se mostró en la sección de resultados, la concentración de IL-1 $\beta$  aumentó significativamente a partir de los 5 min de incubación con la cepa CagA+ hasta generar más del doble de la concentración comparado con la cepa CagA-.

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

En lo que respecta a la IL-8, se sabe que su síntesis prolongada conlleva a un reclutamiento de neutrófilos y linfocitos los cuales aumentan la producción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  causando decremento en la acidez gástrica y una disminución de ácido clorhídrico causando condiciones pre-malignas (83). Su secreción es tejido específica ya que en células HEK293 se ha reportado una disminuída secreción de IL-8 (80).

De la misma manera que IL-1 $\beta$ , se cuantifico la secreción de IL-8 en medios condicionados de células AGS co-cultivadas con cepas CagA+ y CagA- de *H. pylori*, pero en este caso pre-tratadas con IL-1 $\beta$ . Los resultados no mostraron una diferencia significativa en la secreción de esta citocina con cepas CagA+ y CagA-. Sin embargo cuando el estímulo de IL-1 $\beta$  fue continuo, se observó un aumento significativo en la concentración de IL-8 secretada en las células AGS incubadas con cepas CagA+ comparado con las cepas CagA-. Los resultados sugieren que, como ha sido reportado, la presencia de IL-1 $\beta$  promueve la secreción de otras citocinas como IL-8. Por otro lado se sabe que en células HEK-293 transfectadas con TLR2 y TLR5 promueven la secreción de IL-8 y TNF- $\alpha$  en una manera independiente de CagA (81, 82).

Estudios preliminares en nuestro laboratorio muestran una baja expresión de TLR-2 y TLR-4 en células AGS. Experimentos futuros determinarán si existe una participación de TLRs en la síntesis de estas citocinas y si estas promueven a su vez los cambios en la expresión de las claudinas estudiadas.

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

### **Conclusión**

1. CagA promueve una disminución en las claudinas 5, 6 y 7 a tiempos cortos.
2. La presencia de BabA correlaciona con un aumento en la expresión de claudinas 5 y 7.
3. La IL-1 $\beta$  promueve un aumento en la expresión de claudinas 6 y 7.
4. El estímulo continuo de IL-1 $\beta$  promueve la secreción continua de IL-8, siendo mayor en las células AGS cultivadas con la cepa CagA+.

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

## **Perspectivas**

El presente estudio sentó las bases para futuras investigaciones en las cuales se pretende:

- 1) Determinar si BabA es la responsable en las alteraciones observadas en las claudinas:
  - A) Medir la localización de BabA y las claudinas de interés por microscopia confocal.
  - B) Comprobar los cambios observados en claudinas utilizando cepas de *H. pylori* que presenten mutaciones en el gen BabA.
  - C) Bloquear al antígeno Lewis B en células AGS con lectinas específicas y medir el efecto de las cepas BabA+ sobre las claudinas.
- 2) Determinar si hay participación de TLRs en la síntesis de citocinas que afectan la expresión de claudinas.
- 3) Determinar si la expresión de claudina 6 y 7 se regula a través de MLCK.
- 4) Estudiar la cascada de señalización por la cual se altera la expresión de las claudinas.

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

## ANEXO

### Medios de cultivo, amortiguadores, soluciones y reactivos utilizados en el desarrollo de los experimentos.

- **Medio de cultivo D-MEM solo**

Disolver un sobre del medio en aproximadamente 800 mL de agua.

Adicionar 2 g de NaHCO<sub>3</sub> y disolver.

Ajustar a pH = 7.4 (puede quedar 0.1 o 0.2 abajo).

Llevar a 1 L de volumen con agua.

Esterilizar por filtración separando en botellas de 500 mL etiquetadas.

- **Medio de cultivo D-MEM para línea celular AGS.**

Disolver un sobre del medio en aproximadamente 800 mL de agua.

Adicionar 2 g de NaHCO<sub>3</sub> y disolver.

Ajustar a pH = 7.4 (puede quedar 0.1 o 0.2 abajo).

Llevar a 1 L de volumen con agua.

Esterilizar por filtración separando en botellas de 500 mL etiquetadas.

Por cada 100 mL de medio DMEM solo adicionar:

0.1 mL de Insulina de SIGMA de 10 mg/mL (10  $\mu$ g/mL o 0.1 U/mL)

0.2 mL de Piruvato de Sodio de GIBCO 100mM (2mM)

1.0 mL de L-Glutamina de GIBCO 200 mM (2mM)

1.0 mL de Penicilina/Estreptomicina de GIBCO 10,000U/mL/10,000  $\mu$ g/mL (100U/mL/100  $\mu$ g/mL).

5.0 mL de Suero Fetal Bovino de GIBCO (5%).

- **DMEM + GLICEROL 10% para congelamiento de líneas celulares.**

Para 10 mL de medio total adicionar:

1.25 mL de Glicerol al 80%

8.75 mL de DMEM suplementado.

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

- **PBS 1X pH = 7.5 para lavados de las líneas celulares.**

Para 1L :

Pesar 9.6 g de PBS (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) de GIBCO

Disolver en 900 mL de agua

Ajustar el pH

Aforar con ddH<sub>2</sub>O, esterilizar por filtración y guardar en refrigeración.

- **Buffer A pH = 7.5 para extracción y cuantificación de proteínas**

Para preparar 100 mL:

0.242 g de Tris base (PM = 121.14 g/mol, C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) de SIGMA (20 mM)

4.506 g de Dextrosa Anhidra (PM = 180.16 g/mol, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) de SIGMA (0.25 M)

0.38 g de EGTA (PM = 380.4 g/mol, C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>) de SIGMA (10 mM)

0.058 g de EDTA (PM = 292.2 g/mol, C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) de SIGMA (2 mM)

Disolver los compuestos y ajustar el pH a 7.5

Aforar a 100 mL con agua

Almacenar en Refrigeración

Antes de emplear adicionar los siguientes inhibidores, por cada mL de “Buffer A” a emplear:

Leupeptina (20 $\mu$ g/mL).....	0.9 $\mu$ L de la solución 25 mg/mL
.....	1.7 $\mu$ L de la solución 12 mg/mL
.....	4 $\mu$ L de la solución 5 mg/mL
Cocktail de Inhibidores de Fosfatasas I de SIGMA (dil 1:100).....	10 $\mu$ L
Cocktail de Inhibidores de Fosfatasas II de SIGMA (dil 1:100).....	10 $\mu$ L
Inhibidor de Tripsina de SIGMA (1mg/mL) .....	1 mg
Aprotinina (20 $\mu$ g/mL).....	10 $\mu$ L de la solución 1 mg/mL
.....	4 $\mu$ L de la solución 2.5 mg/mL

Una vez adicionados los inhibidores dejar el buffer en hielo para su uso.

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

- **Buffer de lisis pH = 7.5 para extracción de proteínas**

Para preparar 100 mL:

0.8766 g de NaCl (150 mM)

0.6057 g de Tris base (PM = 121.14 g/mol, C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) de SIGMA (50 mM)

0.038 g de EGTA (PM = 380.4 g/mol, C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>) de SIGMA (1 mM)

0.029 g de EDTA (PM = 292.2 g/mol, C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) de SIGMA (1 mM)

1.0 mL de IGEPAL (1%)

1.0 mL de Solución de Desoxicolato de Sodio al 10% (0.1%)

0.1 g de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) (0.1%)

Disolver los compuestos y ajustar el pH

Aforar a 100 mL con agua

Almacenar en Refrigeración

Antes de emplear adicionar los siguientes inhibidores, por cada mL de Buffer a emplear:

Leupeptina (20 $\mu$ g/mL) .....	0.9 $\mu$ L de la solución 25 mg/mL
.....	1.7 $\mu$ L de la solución 12 mg/mL
.....	4 $\mu$ L de la solución 5 mg/mL
Cocktail de Inhibidores de Fosfatasa I de SIGMA (dil 1:100).....	10 $\mu$ L
Cocktail de Inhibidores de Fosfatasa II de SIGMA (dil 1:100).....	10 $\mu$ L
Inhibidor de Tripsina de SIGMA (1mg/mL) .....	1 mg
Aprotinina (20 $\mu$ g/mL).....	10 $\mu$ L de la solución 1 mg/mL
.....	4 $\mu$ L de la solución 2.5 mg/mL

Una vez adicionados los inhibidores dejar el buffer en hielo para su uso.

- **Buffer de Laemli 4X para correr con la muestra en la electroforesis.**

Para 50 mL pesar:

20 mL de SDS al 10% (4%)

12.5 mL de Tris 0.5 M pH = 6.8 (0.125M)

10 mL de Glicerol (20%)

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

0.02 g de Azul de Bromofenol (0.04%)

Disolver y aforar a 50 mL

Posteriormente hacer alicuotar en tubos de 15 mL y almacenar en congelación

El volumen de este buffer se encontrará en una relación de 1:1 con el volumen de la muestra.

- **Acrilamida-bis acrilamida 30.8%**

Para 100 mL pesar:

30 g de Acrilamida (BIO-RAD) (30%)

0.8 g de Bis N, N'- metilen bis acrilamida (BIO-RAD) (0.8%)

Disolver poco a poco la acrilamida en 50 mL de ddH<sub>2</sub>O y posteriormente disolver la bis acrilamida.

Llevar a 100 mL con ddH<sub>2</sub>O y guardar en refrigeración

- **Tris 1.5 M pH= 8.8**

Para 100 mL:

Pesar 18.17 g de Tris

Disolver poco a poco en 50ml de ddH<sub>2</sub>O

Ajustar pH y posteriormente aforar a 100ml.

- **Tris 0.5 M pH= 6.8**

Para 100 mL:

Pesar 6.056 g de Tris

Disolver poco a poco en 50ml de ddH<sub>2</sub>O

Ajustar pH y posteriormente aforar a 100ml.

- **Gel separador al 12.5%**

12.5 mL de Acrilamida 30.8%

7.5 mL de Tris 1.5 M pH 8.8

9.55 mL de ddH<sub>2</sub>O

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

150  $\mu$ L de SDS al 20%

15  $\mu$ L de TEMED

150  $\mu$ L de Persulfato de Amonio al 10%

- **Gel concentrador**

2.5 mL de Acrilamida 30.8%

3.75 mL de Tris 0.5 M pH 6.8

8.55 mL de ddH<sub>2</sub>O

75  $\mu$ L de SDS al 20%

15  $\mu$ L de TEMED

150  $\mu$ L de Persulfato de Amonio al 10%.

- **Amortiguador para Electroforesis 10X pH 8.3**

Para 1L pesar:

30.325 g de Tris (250 mM)

144.125 g de Glicina (1.92 M)

10 g de SDS (1%)

pH = 8.3

Aforar con ddH<sub>2</sub>O

- **Amortiguador para Electroforesis 1X por diluciones:**

Hacer una dilución 1:10 a partir del Amortiguador para electroforesis 10X.

Ajustar a pH=8.3 y aforar con ddH<sub>2</sub>O

Concentración final 1X: Tris (25 mM), Glicina (192 mM) & SDS (0.1%)

- **Amortiguador para Electroforesis 1X**

Para 4L pesar:

12.13 g de Tris (25 mM)

57.65 g de Glicina (192 mM)

4 g de SDS (0.1%)

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

pH = 8.3

Aforar con ddH<sub>2</sub>O

- **Rojo de Ponceau**

Para 100 mL pesar:

0.2 g de Rojo de Ponceau (0.2%)

3 mL de ácido acético (3%)

Aforar con ddH<sub>2</sub>O

- **Amortiguador de Transferencia**

Para 1 L pesar:

3.03 g de Tris (25 mM)

14.4 g de Glicina (192 mM)

200 mL de Metanol (20%)

pH = 8.3

Nota: No ajustar pH con ácidos o bases, el pH de 8.3 se obtiene si se pesan correctamente los ingredientes.

Aforar con ddH<sub>2</sub>O y guardar en refrigeración.

- **TBS 10X Bajo en sales**

Para 1L pesar:

24.23 g de Tris (200 mM)

80 g de NaCl (1.36 M)

pH = 7.6

Aforar con ddH<sub>2</sub>O y guardar en refrigeración.

Hacer una dilución 1:10 y emplear. (Concentraciones finales: Tris (20 mM) & NaCl (136 mM))

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

- **TBS 10X Alto en sales**

Para 1L pesar:

24.23 g de Tris (200 mM)

292 g de NaCl (5 M)

Ajustar pH = 7.5

Aforar con ddH<sub>2</sub>O y guardar en refrigeración.

Hacer una dilución 1:10 y emplear. (Concentraciones finales: Tris (20 mM) & NaCl (0.5 M))

- **TBS 1X (Para lavados de membrana)**

Para 1L pesar:

2.423 g de Tris (20 mM)

8 g de NaCl (136 mM)

pH = 7.6

Aforar con ddH<sub>2</sub>O y guardar en refrigeración.

- **TTBS 1X (Para lavados e incubaciones con anticuerpos)**

Para 1L pesar:

2.423 g de Tris (20 mM)

8 g de NaCl (136 mM)

pH = 7.6

1 mL de Tween 20 (0.1%)

Aforar con ddH<sub>2</sub>O y guardar en refrigeración.

- **TTBS 1X**

Por cada 1L de TBS 1X, adicionar 1 mL de Tween 20 (0.1%)

- **Acetato de sodio 0.05 M pH= 3.0-3.5**

4.1015 g de Acetato de sodio ó 3.0 g de ácido acético glacial

Disolver en 900 mL de ddH<sub>2</sub>O

Ajustar el pH con ácido acético 4 M ó NaOH 1N según sea necesario.

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

- **Ácido acético 4 M**

9.608 g de ácido acético en 40 mL finales

- **Buffer de lavado**

Por cada 1L PBS 1X pH 7.4 adicionar Tween-20 0.05%

# “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

## Referencias

1. F. Kamangar, P. Sheikhattari, M. Mohebtash (2011) **Helicobacter pylori and its effects on human health and disease**, H. pylori and Health. (14) 3.
2. Cervantes G. Estrella. **Helicobacter pylori e infecciones asociadas**. Monografías, Facultad de Medicina UNAM.
3. Gamboa F. Jose Luis (2003) Infección por **Helicobacter pylori y enfermedad ulcerosa péptica** UNIV DIAG (1) 20-24.
4. Masanori Hatakeyama (2009) **Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis** Journal of gastroenterology (44) 4; 239-248.
5. Jochen Rudi, Christof Kolb, Matthias Maiwald, Dirk Kuck, Andreas Sieg, Peter R. Galle, Wolfgang Stremmel (1998) **Diversity of Helicobacter pylori vacA and cagA Genes and Relationship to VacA and CagA Protein Expression, Cytotoxin Production, and Associated Diseases** Journal of clinical microbiology (36) 4; 944–948.
6. QIAGEN,(2003-2011)  
<https://www.qiagen.com/geneglobe/pathwayview.aspx?pathwayID=215>
7. Denise M. Monack, Anne Muller Stanley Falkow (2004) **Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system** Nature Reviews Microbiology (2); 747-765.
8. Yang JC, Shun CT, Chien CT, Wang TH. (2008) **Effective prevention and treatment of Helicobacter Pylori infection using a combination of catechins and sialic acid in AGS cells and BALB/c mice**. J Nutr.(138) 11; 2084-90.
9. Yoshio Yamaoka (2008) **Roles of Helicobacter pylori BabA in gastroduodenal Pathogenesis** World J Gastroenterol (14) 27; 4265-4272.
10. Yoshio Yamaoka, Dong H. Kwon, and David Y. Graham (2000) **A Mr 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of Helicobacter pylori**. Proc Natl Acad Sci U S A. (97) 13; 7533–7538.
11. D. Brent Polk and Richard M. Peek, Jr. (2010) **Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond** Nature reviews (10).

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

12. Masanori Hatakeyam (2004) **Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein.** Nature (4); 688-694.
13. Yoshio Yamaoka (2010) **Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors** Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology (7);629-641
14. Yokoyama K, Higashi H, Ishikawa S, Fujii Y, Kondo S, Kato H, Azuma T, Wada A, Hirayama T, Aburatani H, Hatakeyama M. (2005). **Functional antagonism between *Helicobacter pylori* CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells.** Proc Natl Acad Sci U S A. (102) 27; 9661-9666.
15. Mario José Matteo, Rita Inés Armitano, Gabriela Granados, Andrés Dario Wonaga, Christian Sánchez, Martín Olmos and Mariana Catalano (2010) ***Helicobacter pylori* oipA, vacA and dupA genetic diversity in individual hosts.** Journal of Medical Microbiology, (59); 89–95.
16. Wessler S, Backert S. (2008) **Molecular mechanisms of epithelial-barrier disruption by *Helicobacter pylori*.** Trends Microbiol.(16) 8; 397-405.
17. Stefan Moese, Matthias Selbach, Terry Kwok, Volker Brinkmann, Wolfgang König, Thomas F. Meyer, and Steffen Backer. (2004). ***Helicobacter pylori* induce AGS cell motility and elongation via independent signaling pathways.** Infection and immunity (72) 6; 3646–3649.
18. Tamara Matysiak-Budnika, Francis Me´graud. (2006). ***Helicobacter pylori* infection y cancer gastric.** European journal of cancer (42); 708–716.
19. Bourzac KM, Guillemin K. (2005) ***Helicobacter pylori*-host cell interactions mediated by type IV secretion.** Cell Microbiol. (7) 7; 911-919.
20. Asyia Ahmad, Yogesh Govil, and Barbara B. Frank, M. (2003). **Gastric mucosa associated lymphoid tissue lymphoma.** The American journal of gastroenterology. (98) 5; 975-986.
21. Huachuan Zheng, Hiroyuki Takahashi, Yoshihiro Murai, Zhengguo Cui, Kazuhiro Nomoto, Shigeharu Miwa, Koichi Tsuneyama, Yasuo Takano (2007) **Pathobiological characteristics of intestinal and diffuse-type gastric carcinoma in Japan: an immunostaining study on the tissue microarray** J Clin Pathol (60); 273–277.

“Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$  sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

22. Richard M. Peek Jr, Martin J. Blaser. (2002). **Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas.** Nature review (2).
23. Alfredo Trejo Córdova, María del Carmen Navarro Maldonado, Adolfo Rosado Garcia. (2009) **Catenina  $\beta$ : características estructurales y funcionales** ContactoS (75); 15–20.
24. Mirna Perez-Moreno, Colin Jamora, Elaine Fuchs (2003) **Sticky Business: Orchestrating Cellular Review. Signals at Adherens Junctions** Cell (112); 535–548.
25. Eveline E. Schneeberger and Robert D. Lynch (2004). **The tight junction: a multifunctional complex.** Am J Physiol Cell Physiol (286); C1213–C1228.
26. Yoshimi Takai and Hiroyuki Nakanishi (2003) **Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions** Journal of Cell Science (116); 17-27.
27. Laura A. B. Elias, Doris D. Wang & Arnold R. Kriegstein (2007) **Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex.** Nature (448) 23.
28. David C Spray (2005) **Illuminating gap junctions** Nature methods (2) 1.
29. Helen A. Thomason, Anthea Scothern, Selina Mcharg and David R. Garrod (2010) **Desmosomes: adhesive strength and signalling in health and disease** Biochem. J. (429); 419–433.
30. David Garrod (2010) **Review Desmosomes in Vivo.** Dermatology Research and Practice (17).
31. O. Huber (2003) **Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease** Cell. Mol. Life Sci (60) 1872–1890.
32. Jens Waschke (2008). **The desmosome and pemphigus** Histochem Cell Biol (130); 21–54.
33. Buzz Baum and Marios Georgiou (2011) **Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling.** J. Cell Biol. (192) 6; 907–917.
34. Carien M. Niessen, Cara J. Gottardi. (2008). **Review Molecular components of the adherens junction** Biochim Biophys Acta (1778) 3; 562-571.

“Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$  sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

35. White, Donald E, (2004). **The role of  $\beta$ -integrin signaling in mammary gland tumorigenesis**. Dissertations and Theses.
36. David A. Calderwood, Anna Huttenlocher†, William B. Kiosses, David M. Rose, Darren G. Woodside, Martin A. Schwartz and Mark H. Ginsberg. (2001). **Increased filamin binding to  $\beta$ -integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration** Nature cell biology (3).
37. Marcelino Cereijido,<sup>a</sup> Ruben G. Contreras,<sup>a</sup> David Flores-Benitez,<sup>a</sup> Catalina Flores-Maldonado,<sup>a</sup> Isabel Larre,<sup>a</sup> Agustín Ruiz,<sup>b</sup> and Liora Shoshania (2007) **New Diseases Derived or Associated with the Tight Junction**. Archives of Medical Research (38) 465-478.
38. Ken-ichi Suzuki · Yasuo Kokai · Norimasa Sawada Reiko Takakuwa · Kazuhide Kuwahara Emiko Isogai · Hiroshi Isogai · Michio Mori (2002) **SS1 *Helicobacter pylori* disrupts the paracellular barrier of the gastric mucosa and leads to neutrophilic gastritis in mice**. Virchows Arch (440); 318–324.
39. J. M. Mullin, (2004) **Epithelial Barriers, Compartmentation, and Cancer**. Sci. STKE (216).
40. Christina M. Van Itallie, Alan S. Fanning Jennifer Holmes and James M. Anderson (2010) **Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers** Journal of Cell Science (123); 2844-2852.
41. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. (1993) **Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions**. J Cell Biol (123) 2 1777-88.
42. Gianfranco Bazzoni. (2003). **The JAM family of junctional adhesion molecules**. Current Opinion in Cell Biology (15); 525–530.
43. Stephanie Ghislin, Dorian Obino, Sandrine Middendorp, Nicole Boggetto, Catherine Alcaide-Loridan and Frederique Deshayes, (2011). **Junctional adhesion molecules are required for melanoma cell lines transendothelial migration in vitro** Pigment Cell Melanoma Res.

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

44. Gerd Krause, Lars Winkler, Sebastian L. Mueller, Reiner F. Haseloff, Jörg Piontek, Ingolf E. Blasig (2008) Review **Structure and function of claudins** *Biochimica et Biophysica Acta* (1778); 631–645.
45. Susanne Angelow, Robert Ahlstrom and Alan S. L. Yu (2008) **Biology of Claudins** *AJP: Renal Physiology* F867–F876.
46. Madhu Lal-Nag and Patrice J Morin (2009) **Protein family review the claudins.** *Genome Biology* (10) 235.
47. Van Itallie CM, Anderson JM. (2006) **Claudins and epithelial paracellular transport.** *Annu Rev Physiol.* (68); 403-429.
48. Amar B. Singh, Ashok Sharma, and Punita Dhawan. (2010) **Claudin Family of Proteins and Cancer: An Overview** *Journal of Oncology.*
49. Yumiko Kiuchi-Saishin, Shimpei Gotoh, Mikio Furuse, Akiko Takasuga, Yasuo Tano, Shoichiro Tsukita (2002) **Differential Expression Patterns of Claudins, Tight Junction Membrane Proteins, in Mouse Nephron Segments** *J Am Soc Nephrol* (139); 875–886.
50. Verónica E Zavala-Zendejas, Erika P Rendón-Huerta. (2008) **Alteración de la integridad de las uniones estrechas en el desarrollo del cáncer, El papel de las claudinas.** *Bioquímica* (33) 1; 19-29.
51. Veronica Elizabeth Zavala-Zendejas, Ana Cristina Torres-Martinez, Berenice Salas-Morales, Teresa Imelda Fortoul, Luis Felipe Montaña and Erika Patricia Rendon-Huerta (2011) **Claudin-6, 7, or 9 Overexpression in the Human Gastric Adenocarcinoma Cell Line AGS Increases Its Invasiveness, Migration, and Proliferation Rate** *Cancer Investigation*, (29) 1; 1-11.
52. S. S. Oliveira and J. A. Morgado-Díaz (2006) **Review Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer.** *Cellular and Molecular Life Sciences* (64) 1; 17-28.
53. Dinarello CA. (2000) **Proinflammatory cytokines.** *Chest.* (118) 2; 503-508.
54. Abbas A. K., Litchman A. H., Pillai, S. (2008) **Inmunología celular y molecular** 6ta edición. ELSEVIER España 566 pp.

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

---

55. Hernandez Urzua Miguel A, Alvarado Navarro Anabel (2001) **Interleucinas e inmunidad innata**. Rev Biomed (12); 272-280.
56. Felipe Piñol Jiménez y Manuel Paniagua Estévez (2000) **Citocinas, gastritis crónica y *Helicobacter pylori***. Cubana Hematol Inmunol Hemoter (16) 3; 184-89.
57. Axel Weber, Peter Wasiliew, and Michael Kracht (2010) **Interleukin-1 (IL-1) Pathway** Sci. Signal (3) 105.
58. Susana Velez-Castrillon, Camargo Jose, Paula Correa, Anaya Juan Manuel (2004) **Bases moleculares de la familia Interleuquina-1**. Revista colombiana de reumatología (11) 1; 11-39.
59. Guzmán CB y cols. (2004). **Citocinas y otras moléculas involucradas en sepsis y en pacientes con sepsis y complicaciones de neutropenia**. Alergias, asma e inmunología pediátricas (13) 1.
60. Cem Gabay, Céline Lamacchia & Gaby Palmer (2010) **IL-1 pathways in inflammation and human diseases**. Nature Reviews Rheumatology (6) 232-241
61. David J.J. Waugh and Catherine Wilson (2008). **The Interleukin-8 Pathway in Cancer**. Clin Cancer Res (1) 14; 6735-6741.
62. Marcela Aguilar Yepes, Marisol Rojas Moreno. (2008) **Relación entre las concentraciones de citocinas factor de necrosis tumoral-alfa, interleucina 1, interleucinas 6 (FNT- $\alpha$ , IL-1. IL-6) y la protein C reactiva ultrasensible (PCR-us) en pacientes con sepsis**. Tesis Bogota D.C.
63. Farrar MA, Schreiber RD **The molecular biology of Interferón gamma and its receptor**. Annu Rev Immunol (11); 571-611.
64. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. (2004) **Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions**. J Leukoc Biol. (75) 2; 163-89
65. Vassalli P (1992). **The pathophysiology of tumor necrosis factor**. Annu Rev Immunol. (10); 411-53.
66. Lawrence Leung and Catherine M Cahill. (2010) **TNF- $\alpha$  and neuropathic pain - a review** Journal of Neuroinflammation 7-27.

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

67. Lorenza Gonzalez-Mariscal, Susana Lechuga, Erika Garay (2007). **Role of tight junctions in cell proliferation and cancer**. Elsevier progress in histochemistry and cytochemistry (42) 1-57.
68. Patrice J. Morin (2005). **Claudin proteins in human cáncer: promising new targets for diagnosis and therapy**. Cancer research (65) 21; 9603-9606.
69. S.C Barranco, C. M Townsend, Jr., Cacilda Casartelli, B.G. Macik, N.L. Burger, W.R Boerwinkle and W.K Gourley (1983) **Establishment and characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach**. Cancer research (43); 1703-1709.
70. Sarah Keates, Andrew C. Keates, Michel Warny, Richard M. Peek, Jr., Paul G. Murray and Ciarán P. Kelly (1999) **Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by cag+ and cag- Helicobacter pylori** *The Journal of Immunology*, 163: 5552-5559.
71. Lisa Nagase, Naoko Murata-Kamiya, and Masanori Hatakeyama (2011) **Potentiation of Helicobacter pylori CagA virulence through homodimerization** The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. The journal of biological chemistry
72. Holland C, Schmid M, Zimny-Arndt U, Rohloff J, Stein R, Jungblut PR, Meyer TF. (2011) **Quantitative phosphoproteomics reveals link between Helicobacter pylori infection and RNA splicing modulation in host cells**. Proteomics 11(14):2798-811.
73. Datta De D, Bhattacharjya S, Maitra M, Datta A, Choudhury A, et al. (2011) **IL1 $\beta$  Induced Smad 7 Negatively Regulates Gastrin Expression**. PLoS ONE 6(3)
74. Christopher T. Capaldo, Asma Nusrat (2009) **Cytokine regulation of tight junctions** Biochimica et Biophysica Acta 1788 864–871.
75. Francesco Tombola, Laura Morbiato, Giuseppe Del Giudice, Rino Rappuoli, Mario Zoratti, Emanuele Papini (2001) **The helicobacter pylori VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia**. J Clin Invest. 108(6):929–937.
76. Yinghui Zhao, Yabin Zhou, Yundong Sun, Ailian Yu, Han Yu, Wenjuan Li, Zhifang Liu, Jiping Zeng, Xi Li, Chunyan Chen & Jihui Jia (2011) **Virulence factor cytotoxin-associated gene A in Helicobacter pylori is downregulated by interferon-c in**

## “Efecto de cepas de *Helicobacter pylori* e IL-1 $\beta$ sobre la expresión de claudinas y la secreción de citocinas en células AGS”

---

**Vitro** FEMS Immunol Med Microbiol 6176–83.

77. Padró M, Mejías-Luque R, Cobler L, Garrido M, Pérez-Garay M, Puig S, Peracaula R, de Bolós C. 2011 Regulation of **glycosyltransferases and Lewis antigens expression by IL-1 $\beta$  and IL-6 in human gastric cancer cells**. Glycoconj J. 28(2):99-110.
78. Fabiola Gutierrez-Orozco, Brian R. Stephens, Andrew P. Neilson, Rodney Green, Mario G. Ferruzzi y Joshua A. Bomser (2010) **Green and Black Tea Inhibit Cytokine-Induced IL-8 Production and Secretion in AGS Gastric Cancer Cells via Inhibition of NF- $\kappa$ B Activity** Planta Med 76: 1659–1665)
79. Smita A. Sharma, Muralik. R. Tummuru, Geraldine G. Miller y Martin J. Blaser Infection and Immunity, (1995) **Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to Helicobacter pylori stimulation in vitro** 63-5: 1681–1687
80. Kyung Hwa Lee, Jee-Yeon Kim, Woo-Kyung Kim, Dong-Hun Shin, Kyung-Un Choi, Dae Whan Kim, Woo-Jeong Lee, Jin-Hwa Choi, SooHanLee, GwangHaKim, GeunAmSong, TaeYoungJeon, Chi Dae Kim, Ki Whan Hong, Do Youn Park (2011) **Protective effect of rebamipide against Helicobacter pylori-CagA-induced effects on gastric epithelial cells** Springer 56;441–448
81. Salim Ismail, Mark B. Hampton, and Jacqueline I. Keenan (2003) **Helicobacter pylori outer membrane vesicles modulate proliferation and interleukin-8 production by gastric epithelial cells**. Infection and Immunity. 71-10;5670–5675
82. Kumar Pachathundikandi S, Brandt S, Madassery J, Backert S (2011) **Induction of TLR-2 and TLR-5 Expression by Helicobacter pylori Switches cagPAIDependent Signalling Leading to the Secretion of IL-8 and TNF- $\alpha$** . PLoS ONE 6(5): e19614.

