



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA

EXPRESIÓN PROTEICA DIFERENCIAL DE
Helicobacter pylori
DURANTE LA APOPTOSIS DE CÉLULAS
EPITELIALES GÁSTRICAS

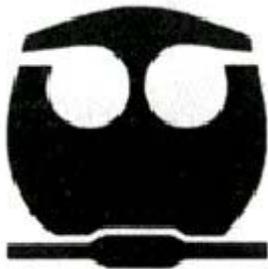
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

VEGA BELMONT ADRIANA



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	DR. JULIO MORÁN ANDRADE
VOCAL:	DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ
SECRETARIO:	DR. GUILLERMO MENDOZA HERNÁNDEZ
SUPLENTE:	DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO
SUPLENTE:	DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

ASESOR:

DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL

SUSTENTANTE:

QFB. ADRIANA VEGA BELMONT

Sitio donde se desarrolló el tema:

Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo brindado en el cultivo de *H. pylori* a la Química Rosa Isabel Amieva Fernández y la asesoría técnica del Dr. Gonzalo Castillo Rojas, del cDr. Mauricio Rodríguez Álvarez y de la Dra. Xóchitl Vega Manríquez. Asimismo, este trabajo fue realizado gracias a la colaboración del Dr. Guillermo Mendoza Hernández y del Dr. Julio Morán Andrade.

La realización de los estudios de posgrado fue financiada por la beca escolar con número de registro 195547 concedida por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. La escritura de la tesis fue financiada por DGAPA (IN225506-2).

DEDICATORIAS

A mi padre:

Gracias papá por enseñarme que los obstáculos no son más que retos y que los tropiezos dejan enseñanzas importantes, pero sobre todo, gracias por ser un ejemplo de paciencia, persistencia y tenacidad. Mis logros reflejan lo orgullosa que estoy de que seas mi padre.

A mi madre:

Tu protección, cuidados, pero sobre todo tu amistad han sido fundamentales durante toda mi vida. Gracias por estar siempre a mi lado, por tí he llegado hasta donde estoy ahora.

A mis hermanos David y Rodrigo:

Gracias por su apoyo y por brindar alegría a mi vida. Ustedes siempre han sido una parte muy importante en mi vida.

Jorge:

Tu paciencia y amor incondicionales han hecho que los problemas sean menores. Gracias por escucharme, por estar siempre a mi lado y por levantarme cada vez que tropiezo.

Diana:

Aún cuando volamos por direcciones diferentes, siempre tengo presente tu amistad incondicional. Gracias por tu cariño y confianza.

A mis compañeras y compañeros del laboratorio:

Gracias por brindarme su amistad y por hacer ameno mi trabajo en el laboratorio. Su compañía, observaciones y ayuda durante la parte experimental han sido fundamentales en la realización de este trabajo. Ahora, comparto este logro con ustedes.

Dra. Yolanda:

Gracias por su apoyo y por su confianza. Usted representa una parte muy importante en mi formación profesional.

Índice

Resumen

Abreviaturas

I. Antecedentes

Epidemiología y transmisión

Patogénesis de la infección por *H. pylori*

Proliferación y apoptosis inducidos por *H. pylori*

Análisis proteómico: una herramienta en el estudio de *H. pylori*

II. Justificación

III. Hipótesis

IV. Objetivos

Objetivo general

Objetivos particulares

V. Material y métodos

Cepa de *H. pylori*

Cultivo de la línea celular AGS (células epiteliales de adenocarcinoma gástrico)

Infección de las células AGS con *H. pylori*

Determinación de la apoptosis en las células AGS infectadas con *H. pylori*

Determinación de la expresión diferencial de *H. pylori* durante la inducción de apoptosis a las células AGS

VI. Resultados

Determinación de la apoptosis en las células AGS infectadas con *H. pylori*

Determinación de la expresión diferencial de *H. pylori* durante la inducción de apoptosis a las células AGS

VII. Discusión

VIII. Conclusiones

IX. Perspectivas

X. Anexos

XI. Bibliografía

RESUMEN

La infección por *Helicobacter pylori* induce un incremento en la tasa de apoptosis en las células epiteliales gástricas que puede provocar una respuesta hiperproliferativa secundaria. Actualmente, se conocen factores de virulencia de *H. pylori* como la proteína asociada a la citotoxina (CagA) y la citotoxina vacuolizante (VacA) que participan en la inducción del proceso apoptótico en el epitelio gástrico; sin embargo, la existencia de factores adicionales participantes así como la expresión proteica diferencial de *H. pylori* durante este proceso no se han estudiado. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la expresión proteica diferencial de *Helicobacter pylori* durante la apoptosis de células epiteliales gástricas AGS.

Las células AGS fueron incubadas con la cepa 7C de *H. pylori* con un índice de multiplicidad de 1:100 o sólo con medio RPMI (control). Se cuantificaron las células con condensación de cromatina detectadas por microscopía de fluorescencia después de las 4, 6, 8, 12, 18 y 24 horas de su incubación con *H. pylori* 7C en su forma viable y no viable. Se determinó la actividad de la caspasa-3 mediante un método fluorométrico y se extrajeron las proteínas bacterianas y celulares en el tiempo en que se observó un incremento significativo en la apoptosis. El perfil proteico de *H. pylori* fue analizado en geles de doble dimensión y las proteínas con un incremento significativo durante la inducción de la apoptosis de las células AGS fueron identificadas por espectrometría de masas.

Después de las 12 horas de la infección, se observó un incremento significativo tanto en el porcentaje de células con condensación de cromatina como en la actividad de la caspasa-3 en las células AGS infectadas con la forma viable de *H. pylori* en comparación con la no viable y con el control. Durante este tiempo, en los geles de doble dimensión se observó el incremento significativo en la expresión de 19 manchas de las cuales se identificaron 5 proteínas de *H. pylori* por espectrometría de masas y se detectaron 31 manchas presentes sólo durante el contacto patógeno-hospedero.

En conclusión, *H. pylori* indujo un incremento significativo en la apoptosis de las células AGS infectadas a las 12 horas sólo en su forma viable. Las proteínas de *H. pylori* identificadas pueden participar en la inducción del evento apoptótico.

ABREVIATURAS

AGS-Hp	Células AGS infectadas con <i>H. pylori</i>
ATCC	Colección Americana de cultivos tipo
BabA	Adhesina de unión al antígeno del grupo sanguíneo Lewis b
CagA	Proteína asociada a la citotoxina
cDNA	DNA complementario
CHAPS	(3-[(3-cloramidopropil) dimetil amonio]-1-propanil sulfonato
CjaA	Proteína de unión a aminoácidos
COX	Ciclooxigenasa
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
FldA	Flavodoxina
GGT	Gamma-glutamyltranspeptidasa
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Hsp	Proteína de choque térmico
IARC	Agencia Internacional para la investigación en cáncer
IL-8	Interleucina-8
IP	Yoduro de propidio
IPG	Gradiente de pH inmóvil
LPS	Lipopolisacárido
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosa
MAP	Proteína activada por mitógeno
MHC	Complejo mayor de Histocompatibilidad
MM	Masa molecular
MOI	Multiplicidad de infección
MS	Espectrometría de masas
NapA	Proteína A activadora de neutrófilos
NIH	Institutos Nacionales de Salud
OMS	Organización Mundial de la Salud

PAI- <i>cag</i>	Isla de Patogenicidad <i>cag</i>
PG	Péptidoglicano
pI	Punto isoeléctrico
PPIasa	Peptidil prolil <i>cis</i> , <i>trans</i> -isomerasa
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SabA	Adhesina de unión al ácido siálico
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SSIV	Sistema de secreción tipo IV
TIGR	Instituto de investigación genómica
TLR	Receptor Toll-like
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral
TrxA	Tiorredoxina
UreA	Subunidad A de la ureasa
UreB	Subunidad B de la ureasa
VacA	Citotoxina vacuolizante
2-DE	Electroforesis de doble dimensión
2-D	Doble dimensión

I. ANTECEDENTES

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria patógena gastrointestinal común que infecta a más del 50% de la población mundial ¹. Desde su aislamiento e identificación en 1983 por Warren y Marshall, se demostró que esta bacteria está asociada con la gastritis crónica (inflamación de la mucosa gástrica), la gastritis crónica activa (inflamación de la mucosa gástrica con infiltración de polimorfonucleares), la úlcera péptica (úlceras gástrica y duodenal), así como con el cáncer gástrico. En 1994, se efectuó un consenso por parte de los Institutos Nacionales de Salud de los E.U.A. (NIH), para reconocer a *H. pylori* como la principal causa de úlcera péptica y es en este mismo año que la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), declara a *H. pylori* un cancerígeno tipo 1 en humanos^{1, 2}.

La infección por *H. pylori* también fue asociada con el desarrollo de los linfomas gástricos no Hodgking; así como con el desarrollo del linfoma gástrico primario de células B del tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) ³.

I.1 Epidemiología y transmisión

Los estudios epidemiológicos han mostrado que la infección por *H. pylori* ocurre en la población mundial. Sin embargo, la incidencia de la infección entre países desarrollados y en vías de desarrollo es significativamente diferente. La prevalencia de la infección por *H. pylori* en niños menores de 10 años residentes en países desarrollados es del 0 al 15%, mientras que en países en desarrollo es del 13 al 60% ^{4, 5}. Por encima de esta edad, comúnmente se observa un incremento en la prevalencia de la infección del 0.5 al 2% por año ⁴. En países en vías de desarrollo, como México, la mayoría de los individuos son infectados desde el primer año de vida y la prevalencia es de hasta un 80% en los adultos jóvenes entre los 18 y 20 años de edad ². En países desarrollados, la infección es casi universal en adultos con un promedio de edad de 60 años y aunque hoy en día en los Estados Unidos y el norte y oeste de Europa la infección es menos frecuente, todavía existe de un 30 a 60% de los adultos que se infectaron en su niñez ^{2, 5}.

El hacinamiento, las condiciones insalubres, el agua contaminada, así como el residir en comunidades cerradas constituyen factores de alta incidencia de la infección. Sin embargo, aún

cuando en los países desarrollados el porcentaje de personas jóvenes infectadas con *H. pylori* ha disminuido debido al mejoramiento en las condiciones de vivienda, en el cuidado médico, así como en las medidas de sanidad, algunos estudios han indicado que todavía existe un riesgo en la adquisición de la infección de aproximadamente el 1% por año ⁴.

En la actualidad se desconoce un reservorio no humano, lo que hace suponer que la infección es especie-específica ^{1, 4}. Los mecanismos de transmisión de la bacteria siguen sin determinarse; sin embargo, por las características de la infección y su amplia distribución, se postula que ésta ocurre de persona a persona, principalmente dentro de los miembros de una familia ⁴. Debido a la localización de la infección y a la necesidad de esta bacteria por la mucosa gástrica para su desarrollo, las vías más probables para su adquisición son la oral-oral, gastro-oral y fecal-oral ^{1, 6}. La principal evidencia para cada una de esas rutas consiste en el aislamiento e identificación del DNA de *H. pylori* en saliva, placa dental, heces y agua ^{1, 6}.

1.2 Patogénesis de la infección por *H. pylori*

H. pylori es un microorganismo gramnegativo, curvo, en forma de espiral, que mide aproximadamente 3.5 por 0.5 μm ; posee múltiples flagelos en uno de sus polos (de 4 a 6) lo que le permite moverse a través de la capa de moco ¹. La exposición a condiciones desfavorables (aerobiosis, cambios de temperatura, exposición a antimicrobianos) o un tiempo prolongado de cultivo resulta en la conversión de la forma bacilar a la cocoide posterior a la formación de las llamadas “formas de U” ¹.

Este microorganismo está excelentemente adaptado a su nicho ecológico y puede colonizar únicamente el epitelio de tipo gástrico, descansando en la superficie de las células epiteliales gástricas bajo la capa de moco adherente y no se encuentra en el tejido duodenal normal ².

El curso de la enfermedad es variable y depende de factores tanto de la bacteria (factores de patogenicidad), como del hospedero (la edad del paciente, los niveles de producción de ácido gástrico, diferencias en la respuesta inmune) y factores ambientales (fumar tabaco, alta ingesta de nitratos y sal, baja ingesta de antioxidantes como vitamina C, etc.) ^{7, 8}.

Posterior a la infección, la bacteria coloniza la mucosa gástrica en forma de parches, causando una gastritis aguda que puede durar semanas o meses antes de evolucionar a una gastritis crónica activa ¹⁻³. La gastritis crónica se desarrolla en los individuos colonizados por *H. pylori*, sin embargo, del 80 al 90% de ellos no presentan los síntomas ⁹.

Durante los años o décadas que siguen a la infección inicial, la gastritis crónica superficial puede permanecer asintomática o evolucionar a formas severas de la enfermedad, tales como una úlcera péptica, o la pérdida casi completa de la función celular del epitelio gástrico observada en la gastritis atrófica ⁹. Se ha estimado que del 10 al 15% de los individuos infectados con *H. pylori* desarrollarán úlcera péptica después de un período de 10 a 20 años ^{7, 10}.

H. pylori es considerado como el agente etiológico de un 70 a un 80% de la gastritis atrófica, enfermedad que involucra el antro y el cuerpo del estómago, siendo este proceso inflamatorio al parecer, más importante en el cuerpo que en el antro ².

La gastritis localizada predominantemente en antro está asociada con hipergastrinemia y alta secreción de ácido gástrico (hiperclorhidria) debida a alteraciones funcionales de las células parietales, lo que puede resultar en ulceraciones en el duodeno que de alguna forma “protegen” al estómago del desarrollo de cáncer gástrico ^{12, 13}. En contraste, la gastritis predominantemente en cuerpo, así como la atrofia multifocal están acompañadas de hipergastrinemia debida a la baja secreción de ácido gástrico (hipoclorhidria) inducida indirectamente por *H. pylori* y a la disminución de la somatostatina antral responsable del mecanismo inhibitorio sobre las células G productoras de la gastrina ^{12, 13}. El incremento en la secreción de gastrina no es capaz de aumentar la secreción de ácido clorhídrico proveniente del cuerpo gástrico inflamado produciendo un estímulo proliferativo continuo en las células del epitelio gástrico así como la pérdida progresiva de las glándulas gástricas. Estas lesiones atróficas en cuerpo gástrico pueden, a su vez, producir metaplasia intestinal, displasia epitelial gástrica y, finalmente, adenocarcinoma gástrico (figura 1) ².

¹²⁻¹⁴.

Aún no está claro si los pacientes con pangastritis tienen predisposición a desarrollar atrofia gástrica y la consecuente progresión a cáncer gástrico; en lugar de ello, la pangastritis no atrófica inducida por *H. pylori* generalmente es de bajo grado con cambios no aparentes en la secreción

ácida ni tendencias a desarrollar úlceras, atrofia gástrica o intestinal y persiste sin complicaciones o síntomas en la mayoría de los pacientes infectados ^{13, 15}.

Estudios epidemiológicos han demostrado la presencia de *H. pylori* en el 85 al 100% de los pacientes con úlcera duodenal y en el 65 al 85% con úlcera gástrica ^{7, 16}.

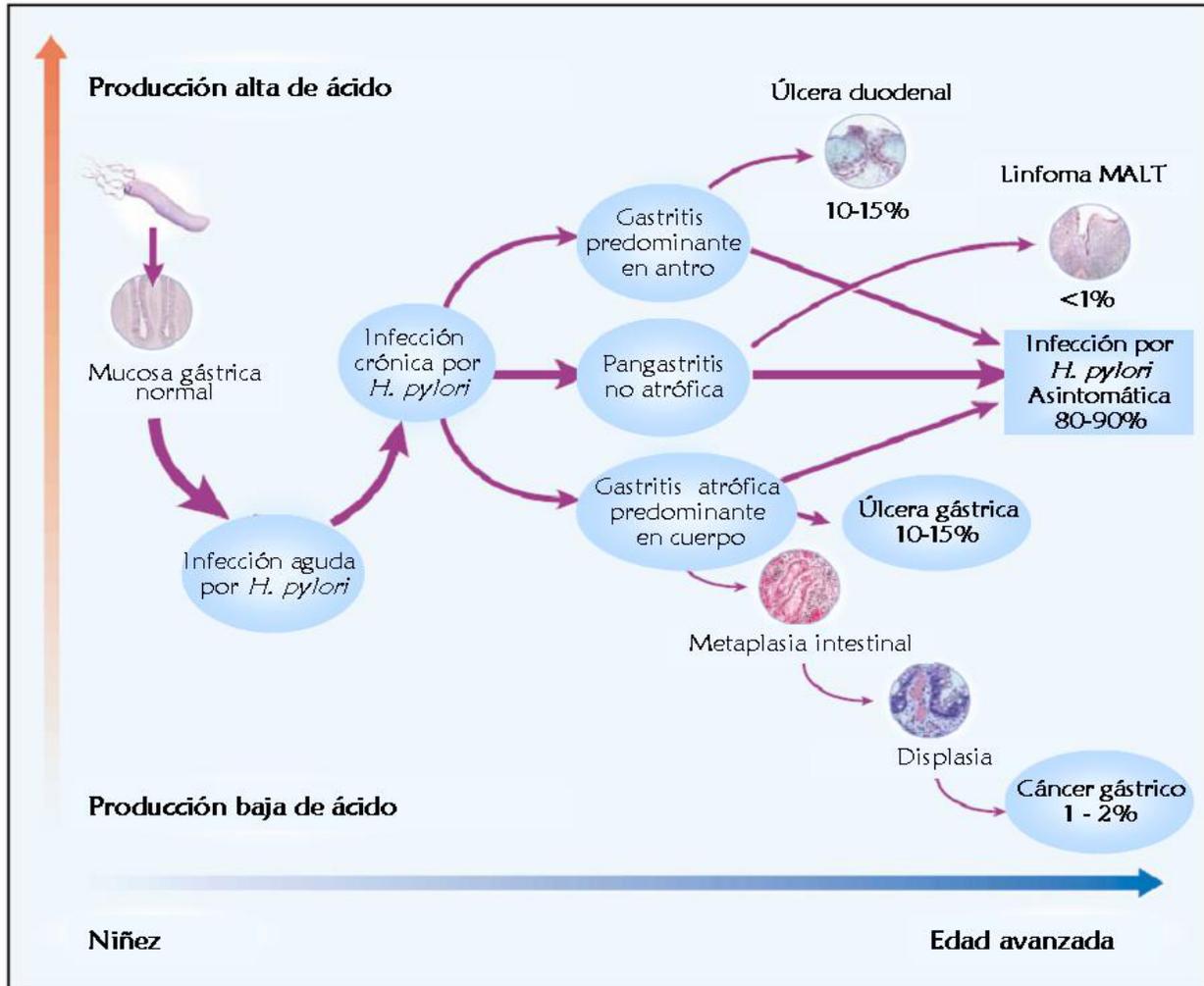


Figura 1. Esquema de la historia natural de la infección por *H. pylori* ⁷⁻¹⁰.

El cáncer gástrico es la segunda causa de muerte debida a cáncer con una incidencia de 798,000 casos nuevos por año y 628,000 muertes ¹⁷. La incidencia de cáncer gástrico varía de una zona geográfica a otra, encontrándose a Japón, China, Corea, el Este de Europa y Suramérica dentro de las zonas con la más alta incidencia (~70% de los casos); y al Este y Norte de África, el Oeste de Europa y Norteamérica con la incidencia más baja ^{17, 18}. Sin embargo, pueden existir contrastes dentro de un mismo país, como son los casos en Hawaii y Nuevo México en donde las

poblaciones de indios americanos nativos, hispanos y japoneses presentan una tasa de incidencia más alta que los caucásicos. De esta manera, las características demográficas y culturales pueden tener un papel importante en la localización geográfica de las zonas más incidentes ¹⁸.

En México, la tasa de mortalidad por cáncer gástrico fue de ~4.5 por 100,000 habitantes en 1980, la cual incrementó a 6.5 después de aproximadamente 10 años con un incremento más evidente en hombres ¹⁹. Además, las tasas de mortalidad asociadas a cáncer gástrico se incrementan notablemente con la edad ¹⁹.

En 1994, *H. pylori* fue clasificado por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), organización subordinada de la Organización Mundial de la Salud (OMS), como un carcinógeno tipo I (carcinógeno definitivo), basándose en estudios de correlación ecológica, estudios de casos y controles, así como en estudios de cohorte. Sin embargo, sólo del 1 al 2% de los individuos infectados por *H. pylori* desarrollan cáncer gástrico ^{5, 7}.

Existe un gran número de estudios epidemiológicos sobre la asociación positiva entre la infección por *H. pylori* y el desarrollo de cáncer gástrico que datan desde 1991 ^{5, 18}. Con la disminución de la infección por *H. pylori* en países industrializados durante el siglo pasado, se observó también una disminución en la morbilidad y mortalidad por cáncer gástrico ⁵. Más aún, en los estudios de casos y controles se ha establecido una asociación positiva entre la seropositividad y el adenocarcinoma gástrico, con un aumento en el riesgo a desarrollar cáncer gástrico de 2.1 a 16.7 veces cuando es comparado con los pacientes seronegativos ⁵.

Se sabe que con un riesgo relativo de 2.1, el número de casos nuevos de cáncer gástrico atribuidos a *H. pylori* es de 337,800, el cual representa el 42% del total de casos de cáncer gástrico a nivel mundial (47% en países en vías de desarrollo y 35% en los demás países) ¹⁷. Sin embargo, en otros estudios se ha confirmado la presencia de una infección por *H. pylori* presente o pasada en la mayoría de los pacientes con cáncer gástrico (>80%), demostrando así que la infección ocurre en la mayoría de los casos de cáncer gástrico ⁵.

Por otra parte, se asume que *H. pylori* tiene una acción indirecta ya que produce gastritis, el cual es un precursor de la atrofia gástrica, metaplasia y displasia ^{17, 20}. Se ha reportado que la gastritis superficial progresa a gastritis atrófica después de 10 años o más y que la metaplasia

intestinal aparece después de otros 10 años más ²⁰. De esta manera, la participación de factores ambientales como la dieta y otros factores exógenos pueden tener un efecto sinergista o antagonista ¹⁷.

La infección por *H. pylori* incrementa significativamente el riesgo a desarrollar linfoma gástrico tipo MALT, encontrándose una asociación de esta patología con la presencia del microorganismo del 72 al 98% ^{11, 12}. La erradicación de *H. pylori* induce la regresión del linfoma gástrico en el 70 - 80% de los casos ^{11, 12}.

El papel de la infección por *H. pylori* en la dispepsia no asociada a úlcera es controversial. Se ha reportado un incremento en la prevalencia de *H. pylori* en la dispepsia no ulcerosa; sin embargo, el alivio de los síntomas es a largo plazo después de la erradicación del microorganismo ¹². Además, se ha sugerido que la erradicación de *H. pylori* mejora los síntomas en sólo el 9% de los pacientes con dispepsia no ulcerosa ¹².

Por otra parte, se ha propuesto que, aunque la infección por *H. pylori* está circunscrita a la mucosa gástrica, esto podría producir lesiones remotas al sitio primario de la infección mediante la alteración en los niveles de los mediadores sistémicos del proceso inflamatorio (TNF- α , IL1- β , IL-8). De esta manera, se han asociado varias enfermedades no gástricas con la infección por *H. pylori* que incluyen diabetes *mellitus*, tiroiditis, artritis reumatoide, desórdenes dermatológicos, encefalopatía hepática, anemia perniciosa, cardiopatía isquémica, entre otras ^{8, 12}.

I. 3 Apoptosis y proliferación inducidos por *H. pylori*

I. 3. 1 Mecanismos de inducción de apoptosis y/o proliferación: estudios *in vivo* e *in vitro*

Se ha sugerido que la asociación entre *H. pylori* y cáncer gástrico puede ser atribuida al daño colateral producido en las células epiteliales gástricas debido a mutaciones causadas por los productos del evento inflamatorio – como especies reactivas del oxígeno (ROS), interleucina-8 (IL-8), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), etc. – que conllevará a la aparición de la atrofia y metaplasia intestinal. Por otro lado, el desarrollo de adenocarcinoma gástrico puede ser resultado de la interacción directa del microorganismo *per se*, o de la liberación de sus productos efectoros en las vías de transducción de señales y expresión de genes, alteraciones en la adhesión celular y en la regulación endócrina, la alteración en el balance entre la apoptosis y la proliferación celular, así como efectos tóxicos directos en las células epiteliales (figura 2) ²⁰.

El mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica depende del balance entre la pérdida celular debido a la muerte celular programada o apoptosis y la proliferación celular ²⁰. En un tejido gástrico no infectado, las células apoptóticas son raras y superficiales, pero se ha encontrado que durante la infección con *H. pylori*, las células apoptóticas son numerosas y localizadas en la profundidad de las glándulas gástricas ²⁰. La gastritis atrófica y la displasia gástrica están asociadas con un incremento en la apoptosis. El aumento en la tasa de apoptosis inducido por *H. pylori* podría dar como consecuencia, una respuesta hiperproliferativa secundaria en un intento por mantener la masa celular. En lesiones en las cuales tanto la apoptosis como la proliferación celular están continuamente aumentadas, las alteraciones y mutaciones en los genes regulatorios de la apoptosis pueden ocurrir con mayor frecuencia, lo que a su vez, incrementa el riesgo en el desarrollo de cáncer gástrico ²¹.

En cultivos de células epiteliales se ha observado que la activación del receptor Fas, la sobreproducción del factor de necrosis tumoral (TNF- α) y de interferón gamma (IFN- γ), así como el incremento en la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible o del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (MHC II) son eventos que participan en la inducción de la apoptosis por *H. pylori* ^{22, 23}.

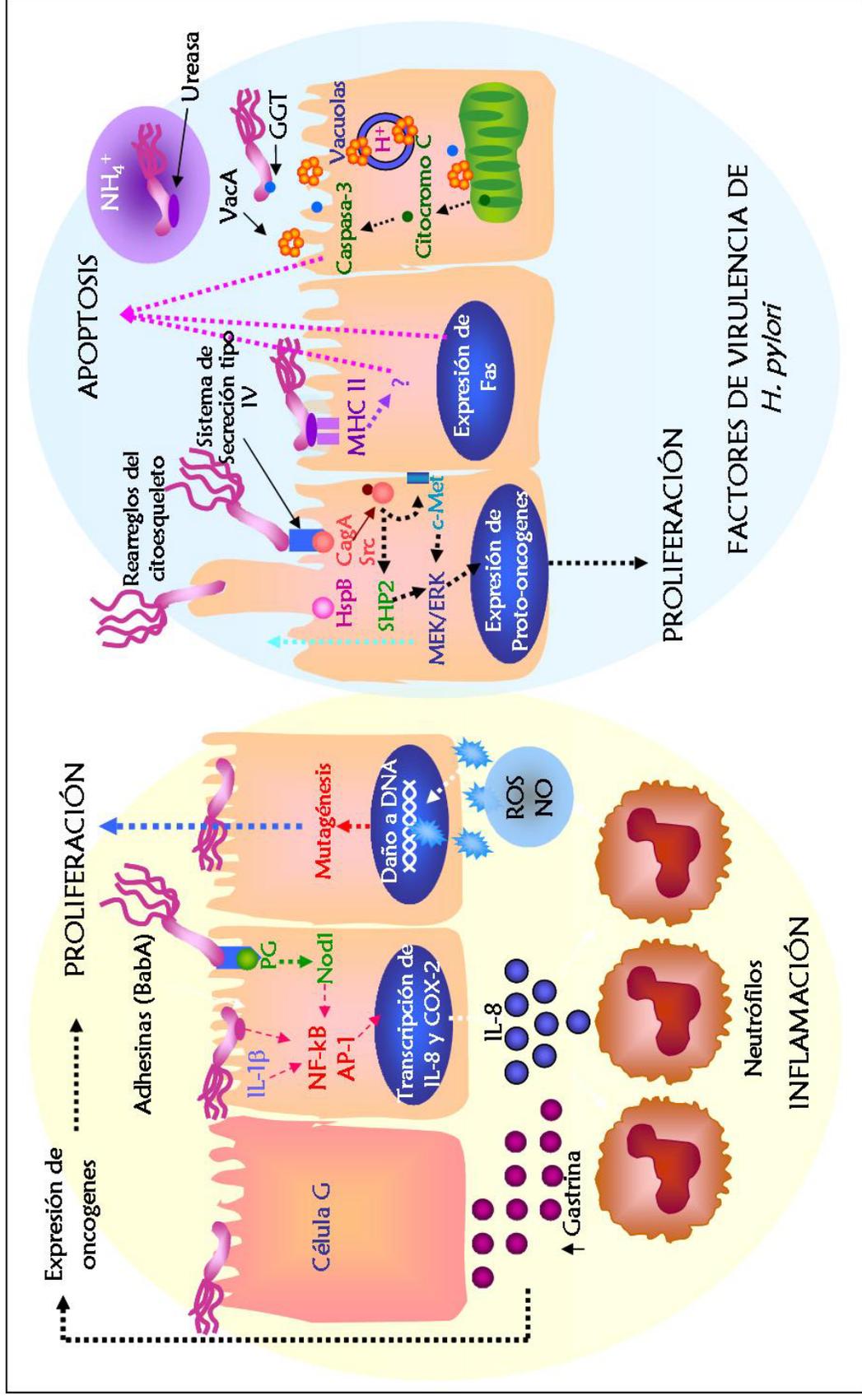


Figura 2. Mecanismos indirectos (inflamación) y directos (factores de virulencia) de inducción de proliferación celular y/o apoptosis durante la infección por *H. pylori*.

La apoptosis en la gastritis asociada a *H. pylori* está acompañada por la activación del sistema Fas-Fas ligando (vía extrínseca de la activación de caspasas) en células epiteliales. Esto fue demostrado en un estudio realizado por Rudi y cols.²⁴ en el que las células epiteliales y de la lámina propia de biopsias gástricas provenientes de pacientes con gastritis crónica asociada a *H. pylori* mostraron una sobreexpresión del receptor Fas (APO-1/CD95) en comparación con biopsias gástricas de mucosa normal. Fas es un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral, el cual cuando se une a su ligando activa a la caspasa 8, un iniciador responsable de la activación de la cascada de caspasas durante el proceso apoptótico.

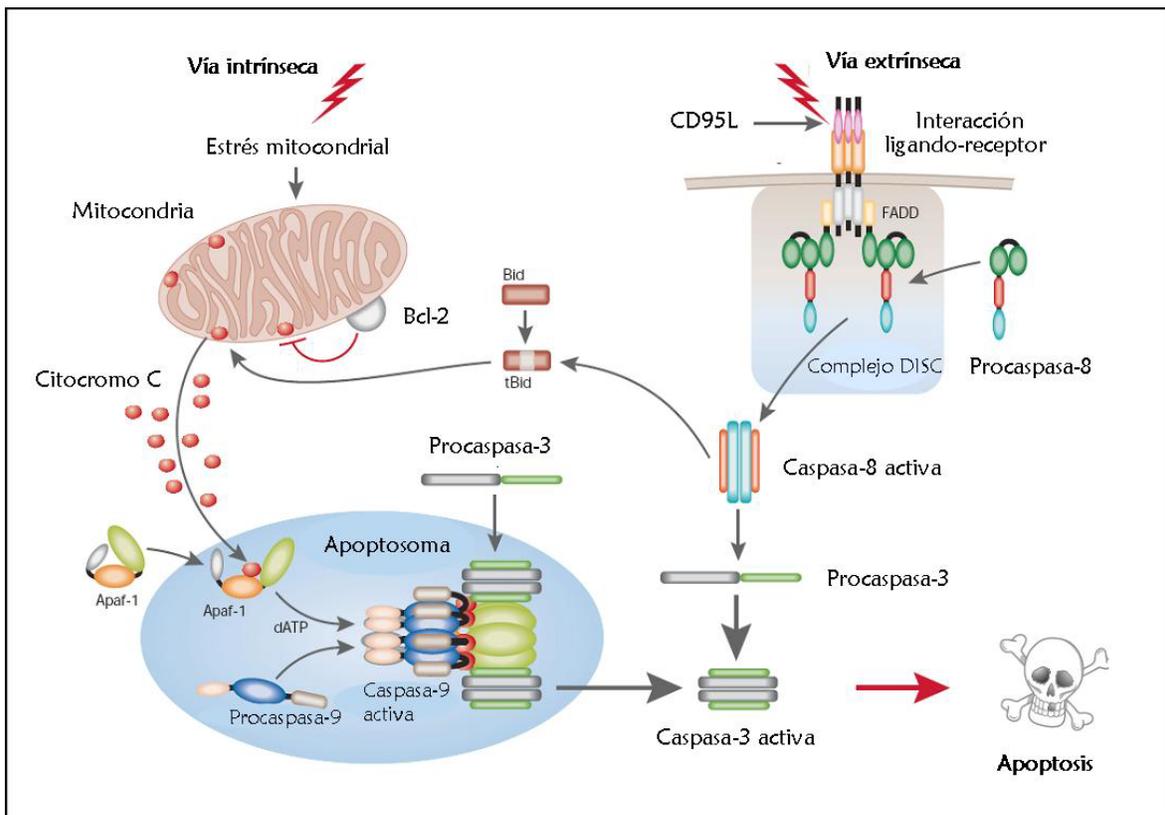


Figura 3. Vías apoptóticas extrínseca mediada por Fas/Fas ligando (CD95L) e intrínseca por la liberación del citocromo c de mitocondria²⁷. DISC, Complejo de señalización inductor de muerte; TRAIL, Ligando inductor de apoptosis relacionado con el Factor de Necrosis Tumoral; FADD, Dominio de muerte asociado con Fas.

Por otra parte, también se ha observado la activación de la caspasa 9 por la liberación del citocromo C como consecuencia del estrés mitocondrial ocasionado por *H. pylori* en células HEP-2 (vía intrínseca de la activación de caspasas)²⁵⁻²⁷. Ambas vías resultarán en la activación de la

caspasa 3, la cual es una molécula efectora responsable de los cambios bioquímicos y morfológicos celulares, de la condensación de cromatina, la fragmentación de DNA y eventualmente, la muerte celular (figura 3) ²⁷.

Adicionalmente, *H. pylori* induce apoptosis en el epitelio gástrico a través de una regulación positiva de la proteína proapoptótica Bax y de la regulación negativa de la familia de proteínas Bcl-2. Los niveles de las proteínas Bcl-2 determinan si una célula vive o muere a través de la regulación de la liberación del citocromo C de la mitocondria ²⁸. Este fenómeno fue observado en pacientes con úlcera duodenal infectados con *H. pylori* y en las células Kato III, lo que indica un efecto directo de este microorganismo en las células de la mucosa gástrica ²².

Alternativamente, la apoptosis puede ser vista como una respuesta a la hiperproliferación celular en un intento por reducir el crecimiento del tejido ⁷; sin embargo, estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han apoyado que la apoptosis ocurre como un primer evento ^{20, 27}.

En un intento por desarrollar un modelo que permitiera reproducir lo más fielmente posible el curso de la infección por *H. pylori*, varios grupos de investigación en Japón inocularon gerbos mongolianos con *H. pylori*, los cuales desarrollaron una gastritis crónica activa después de 12 semanas, úlcera gástrica a las 24 semanas y, finalmente, metaplasia intestinal después de 24 a 48 semanas de la inoculación ^{20, 29}. En un estudio posterior, con un tiempo de infección mayor, se observó el desarrollo de cáncer gástrico en los gerbos infectados con *H. pylori* tratados con bajas dosis de carcinógenos químicos, como el N-metil-N-nitrosourea, o sin ellos. De esta manera, se estableció el gerbo mongoliano como un modelo ideal para el estudio de la carcinogénesis inducida por *H. pylori* ²⁹.

La infección por *H. pylori* está asociada con la expresión de los genes de IL-8 y COX-2, los cuales están controlados a nivel transcripcional. Ambos genes tienen sitios de unión en sus promotores para el factor nuclear- κ B (NF- κ B) ^{23, 30}. NF- κ B es un factor de transcripción que controla cierto número de genes involucrados en la respuesta inflamatoria, en la progresión del ciclo celular, en la inhibición de la apoptosis y en la adhesión celular. Estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que la infección por *H. pylori* activa directamente al factor de transcripción NF- κ B, aunque el incremento en la producción de peróxido de hidrógeno proveniente del proceso inflamatorio también es capaz de inducirlo ^{20, 23}.

Estudios recientes muestran que las MAP cinasas pueden participar como mediadores de la activación de NF- κ B y de la expresión de citocinas como IL-8 ^{31, 32}. Hasta ahora, se han caracterizado tres principales grupos de MAP cinasas: las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), las cinasas N-terminal de c-Jun (JNK), y las MAP cinasas de p38 ^{31, 33}. Estas subfamilias forman tres cascadas paralelas que pueden ser activadas de forma simultánea o independiente. La señalización mediada por MAP cinasas puede regular, al menos en parte, funciones celulares clave como la proliferación celular ³¹. Keates y cols. ³¹ han demostrado que el contacto con *H. pylori* activa rápidamente a las MAP cinasas ERK1/2, p38, JNK46 y JNK54 en células AGS después de 5 minutos de forma dosis dependiente. Como consecuencia de la activación de ERK1/2, se observó un incremento en la transcripción del proto-oncogen *c-fos* así como la fosforilación de Jun. Fos y Jun forman heterodímeros que incrementan la actividad del factor de transcripción AP-1, importante en la proliferación celular y en la transformación neoplásica. En este mismo estudio se demostró que las cepas de *H. pylori cag*⁺ presentan una mayor activación de las MAP cinasas que las cepas *cag*⁻ ³¹. A su vez, la activación constitutiva de la vía de las ERK/MAP cinasas puede dar lugar a la transición del ciclo celular G1/S mediante la sobreexpresión de la ciclina D1, reguladora del paso a través del punto de restricción y la entrada a la fase S, acortando la fase G1 e incrementando la velocidad de la proliferación celular ^{31, 34}.

1.3.2 Principales factores de virulencia de *H. pylori* implicados en el balance proliferación-apoptosis

1.3.2.1 Adherencia y colonización

La virulencia es un concepto íntimamente ligado al desarrollo de enfermedad y es determinado, usualmente, en términos de morbilidad y mortalidad. La sobrevivencia y la multiplicación son prioridades del microorganismo mientras que la enfermedad es simplemente la manifestación de las complejas interacciones requeridas para cumplir con estos objetivos. Existen varios factores de virulencia en *H. pylori* que contribuyen de manera diferente al daño en la mucosa gástrica, entre ellos se encuentran los factores requeridos para su sobrevivencia y la colonización del estómago humano ⁸.

La ureasa fue el primer factor de virulencia esencial en la colonización identificado en *H. pylori*, el cual, permite la sobrevivencia del microorganismo en el ambiente ácido del lumen del

estómago antes de que pueda alcanzar la mucosa gástrica ³⁵. La ureasa es una proteína que se expresa en grandes cantidades por *H. pylori* (6% peso seco bacteriano) y, dependiendo de las condiciones de cultivo, puede alcanzar hasta un 10% del total de la proteína bacteriana producida ^{35, 36}. La ureasa es un dodecámero compuesto de seis subunidades de UreA y seis subunidades de UreB organizado en un anillo de 13 nm y un peso molecular de 550 kDa. Esta enzima cataliza la hidrólisis de la urea produciendo amonio y dióxido de carbono ³⁵⁻³⁷. El papel esencial de la ureasa como un factor de virulencia ha sido demostrado en mutantes de *H. pylori* deficientes de ureasa, los cuales no fueron capaces de colonizar el estómago, aún en animales con aclorhidria, sugiriendo que la neutralización del microambiente no es la única función de la ureasa ³⁵⁻³⁷. La ureasa también puede reclutar neutrófilos y monocitos induciendo la liberación de citocinas proinflamatorias, lo que produce una respuesta inflamatoria localizada que produce daño al tejido gástrico ³⁵⁻³⁷. Por otro lado, en presencia de cloruro de amonio, la citotoxina vacuolizante (VacA) es altamente activa produciendo mayor vacuolización en las células epiteliales en comparación con el efecto de la toxina sola, lo que sugiere una asociación entre la ureasa y la citotoxina vacuolizante para causar daño celular ³⁵. Otros estudios han demostrado que la ureasa de *H. pylori* induce apoptosis en células gástricas *in vitro* e inhibe la liberación de somatostatina gástrica en animales ⁸. En un estudio realizado por Fan y cols. ³⁸, se demostró que *H. pylori* fue capaz de usar moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II expresadas en la superficie del epitelio gástrico infectado como receptores, acto seguido de un incremento en la apoptosis (figura 2). Así mismo, observaron que la inducción de la apoptosis en las células epiteliales gástricas fue dependiente de la expresión de MHC II, debido a que anticuerpos anti-MHC II bloquearon este efecto y células deficientes en la expresión de esta molécula (MHC II⁻) no presentaron apoptosis inducida por *H. pylori* ³⁸. Mediante la inducción de la apoptosis en el epitelio gástrico, la ureasa puede encontrarse implicada en el incremento compensatorio de la proliferación celular y podría contribuir al incremento en las mutaciones en el DNA, lo que puede dar como consecuencia el desarrollo del cáncer gástrico ³⁸.

H. pylori se adhiere a las células epiteliales mediante adhesinas y receptinas. Las adhesinas son proteínas bacterianas, glicoconjugados o lípidos bacterianos involucrados en etapas iniciales de colonización mediante la interacción entre la bacteria y los receptores superficiales de las células epiteliales, como lípidos, proteínas, glicolípidos o glicoproteínas, por ejemplo: N-acetilneuraminilactosa, gangliósido GM3, sulfatos, fosfatidiletanolamina, laminina, el antígeno de grupo sanguíneo Lewis b, etc. ^{35, 37}. La adherencia de *H. pylori* a las células hospederas causa

cambios celulares que incluyen cascadas de transducción de señales que dan como consecuencia la infiltración de células inflamatorias (neutrófilos y monocitos) y, posiblemente, la persistencia del microorganismo ³⁷. Una vez que *H. pylori* alcanza el epitelio gástrico, se adhiere a las células mediante adhesinas como BabA, SabA, AlpA, AlpB, HopZ y HpA. La adhesina BabA (adhesina de unión al antígeno del grupo sanguíneo Lewis b) facilita la unión del microorganismo al antígeno fucosilado del grupo sanguíneo Lewis b presente en las células del epitelio gástrico (figura 2) ³⁵. En modelos animales, la adhesión de *H. pylori* dependiente de Lewis b está acompañada con el incremento en la severidad de la inflamación, el desarrollo de autoanticuerpos contra las células parietales y la consiguiente pérdida de dichas células ³⁵. Aunque se han identificado tres alelos del gen *babA* (*babA1*, *babA2*, *babA3*), sólo el producto del gen *babA2* es activo ³⁹⁻⁴⁰. Estudios en países occidentales han demostrado asociaciones entre la presencia de cepas *babA2*⁺ y el desarrollo de úlcera duodenal y adenocarcinoma gástrico ³⁹. En China, Yu y cols. ⁴⁰ observaron que los aislamientos de *H. pylori babA2*⁺ estaban asociados con los pacientes que presentaron una inflamación crónica más intensa, así como con atrofia glandular gástrica y metaplasia intestinal en el antro gástrico. Esta misma asociación se encontró con los aislamientos *babA2*⁺/*cagA*⁺/*vacA* s1 comparados con las cepas *babA2*⁻/*cagA*⁺/*vacA* s1. Más aún, se observó que los pacientes con cepas de *H. pylori babA2*⁺ presentaron una mayor tasa de proliferación celular que los que tenían cepas *babA2*⁻, adicionalmente, no se observó un incremento paralelo en la tasa de apoptosis ⁴⁰. Sin embargo, el mecanismo por el cual se induce la proliferación celular todavía es desconocido ⁴⁰. De hecho, los países con una alta incidencia de cáncer gástrico como China y Japón tienden a presentar una alta frecuencia de cepas de *H. pylori babA2*⁺ ⁴⁰.

Otro factor de virulencia es el lipopolisacárido de *H. pylori* (LPS), el cual expresa los carbohidratos Lewis X y/o Lewis Y en su antígeno O ^{35, 37, 41}. Varios estudios han demostrado la participación del LPS en la adherencia posiblemente a través de su porción Lewis X ³⁷. Un estudio reciente demostró que la estructura del LPS de la cepa NCTC 11637 de *H. pylori* es similar al del antígeno Lewis X encontrado en el grupo sanguíneo O y en las células epiteliales gástricas ³⁵. El nivel de expresión de estos antígenos varía entre las cepas, mostrando una variación de fase estimulada por el antígeno Lewis expresado en la superficie de las células epiteliales gástricas. Ocasionalmente, *H. pylori* expresa otros antígenos Lewis con un número diferente de residuos de fucosa (Lewis a, Lewis b). Los antígenos Lewis muestran una participación dual en la patogénesis: (1) mimetizan a los antígenos Lewis encontrados en la superficie del epitelio gástrico como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune seguida a la colonización y, a su vez, favoreciendo

la permanencia de *H. pylori* dentro del nicho gástrico; (2) causan daño directo o indirecto debido a la inducción de una respuesta autoinmune contra los antígenos Lewis expresados por *H. pylori* compartidos con la célula hospedera ³⁵. El LPS de *H. pylori* puede ser un factor de virulencia responsable de la inducción de apoptosis en células del epitelio gástrico, ya que es capaz de causar una respuesta en la mucosa gástrica típica de una gastritis aguda y de una marcada apoptosis en el epitelio gástrico de ratas ²⁰. En otro estudio, la inoculación de la cepa de *H. pylori* Sydney (SSI) en ratones C57BL/6 indujo la activación de la caspasa 3 seguida de la fragmentación del DNA, los cuales son marcadores del proceso apoptótico ²⁰. Por otra parte, Kawahara y cols. ⁴¹ demostraron que después de 8 horas de exposición y a diferentes concentraciones, el LPS de *H. pylori* es un potente inductor de apoptosis (>1 ng/mL) en cultivos de células de la mucosa gástrica de cerdos de guinea, mediante la activación de la caspasa 8 y la liberación del citocromo C de mitocondria con la subsiguiente activación de las caspasas 9 y 3.

Las proteínas de choque térmico (Hsp) de *H. pylori* son otras proteínas involucradas en la adherencia de este microorganismo al epitelio gástrico ³⁷. Su receptor en el hospedero es un glicolípido sulfatado ^{37, 42}. Las Hsps son una familia de proteínas inducidas en procariotes y eucariotes por un ambiente de estrés. La función de estas proteínas como chaperonas es la de facilitar el plegamiento, desplegamiento y translocación de polipéptidos intracelulares ⁴⁰. La proteína de choque térmico de 60 kDa (Hsp60) es un potente inmunógeno de *H. pylori* relacionado con la inflamación del tejido gástrico, además de su participación en la adherencia al epitelio gástrico ⁴². Takenaka y cols. ⁴² demostraron que la proteína Hsp60 recombinante de *H. pylori* es capaz de usar como receptor a los receptores TLR (Toll-like receptor) en células KATO III induciendo la secreción de interleucina-8 (IL-8) vía activación del factor de transcripción NF- κ B después de un tiempo de exposición de 8 horas. Por otro lado, la proteína HspB, un homólogo de la familia de proteínas de choque térmico GroEL, ha sido clonada y caracterizada debido a su importancia como un potente inmunógeno ^{43, 44}. Más aún, las cepas de *H. pylori* que expresan esta proteína han sido asociadas con un aumento en el riesgo a desarrollar cáncer gástrico ^{43, 44}. Dos grupos de investigación diferentes encontraron resultados similares en pacientes con adenocarcinoma gástrico que fueron seropositivos a HspB ⁴³. De Luca y cols. ⁴³ demostraron que la coexpresión de HspB y la proteína asociada a la citotoxina (CagA) en células AGS indujo la proliferación celular a través de la expresión del proto-oncogen *c-jun* y el consecuente aumento en la expresión de la ciclina D3 y, por tanto, el incremento de las células en la fase S-G2-M del ciclo celular a las 48 horas del experimento. La expresión de CagA o HspB de forma individual,

no indujo estos efectos en las células AGS, lo que sugiere un efecto cooperativo de estas proteínas⁴³. El mecanismo molecular responsable del efecto patógeno de la proteína HspB de *H. pylori* todavía no ha sido aclarado⁴³.

La gamma-glutamyltranspeptidasa (GGT) es una proteína que se expresa en todas las cepas de *H. pylori* de forma constitutiva, mutantes nulas en esta proteína han mostrado que la GGT no es esencial para el crecimiento del microorganismo *in vitro* y se ha encontrado en otras bacterias como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*^{21, 37}. Esta enzima cataliza la transferencia de grupos glutamilo entre los compuestos como el glutatión y aminoácidos^{21, 37, 45}. En células animales, la GGT participa en el metabolismo del glutatión³⁷. Su función en las bacterias es desconocida, pero se ha sugerido que podría participar en el transporte de aminoácidos³⁷. Una mutante isogénica *ggt* de la cepa virulenta para ratón SS1 de *H. pylori* fue incapaz de colonizar el estómago de ratón; sin embargo, en un estudio más reciente, se observó que la GGT no es esencial en la colonización de ratones infectados con cepas isogénicas de *H. pylori* deficientes en GGT, pero fue considerado como factor de virulencia debido a que la actividad de GGT proporcionó una ventaja a las cepas silvestres durante la colonización ya que la carga bacteriana fue mayor que la de las cepas mutantes^{45, 46}. Además, la GGT es capaz de causar daño celular mediante el aumento en la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2)¹³. En tejidos de mamíferos, se ha reportado la asociación de la actividad de GGT con la proliferación celular, la cual puede ser ocasionada por la alteración en los niveles celulares de especies reactivas de oxígeno⁴⁶. Shibayama y cols.²¹ purificaron, caracterizaron y demostraron que la GGT de *H. pylori* tenía la capacidad de inducir apoptosis en células AGS (figura 2). En este estudio, la detección de la apoptosis inducida en células KATO III por la cepa 26695 de *H. pylori* se realizó a las 24 horas con un índice de infección o de multiplicidad (MOI) de 100 bacterias por célula (1:100). La GGT es un heterodímero en el cual una subunidad grande y una pequeña están asociadas de forma no covalente^{21, 45}. Es traducida en un precursor de una sola cadena que subsecuentemente es procesada en dos subunidades²¹. Después de su secreción y maduración, la GGT se asocia a la membrana a través de un enlace iónico, lo cual es consistente con la observación de que la inducción de la apoptosis requiere el contacto directo de la bacteria con el huésped²¹.

1.3.2.2 Proteína asociada a la citotoxina (CagA)

Los mecanismos involucrados en la carcinogénesis durante la colonización del tejido gástrico por *H. pylori* aún no se comprenden completamente, pero existen evidencias que apuntan hacia la isla de patogenicidad *cag* (PAI-*cag*) como un factor de virulencia importante. La isla de patogenicidad *cag* es un *locus* de 40 Kb que se encuentra insertado en el gen cromosomal de la glutamato racemasa y en él se encuentran codificados 31 genes, algunos de los cuales codifican un aparato de secreción tipo IV (SSIV) requerido para la translocación de la Proteína Asociada a la Citotoxina (CagA), codificada también en esta isla ³⁵. En diversos estudios se ha demostrado que, aunque las diferentes cepas de *H. pylori* son capaces de inducir gastritis, sólo las cepas que presentan la isla de patogenicidad (PAI-*cag*⁺) aumentan el riesgo de una inflamación severa, úlcera péptica y cáncer gástrico distal en comparación con las cepas que no la poseen (PAI-*cag*⁻) ³³. Más aún, se ha demostrado que las cepas de *H. pylori* *cag*⁺ pueden inducir diferentes cascadas de señalización en las células epiteliales gástricas que, finalmente, resultarán en la activación del factor NF-κB y la sobreexpresión de IL-8 y otras citocinas cruciales en la severidad de la enfermedad ³³. Mediante mutantes isogénicas se ha encontrado que algunos de los genes de la PAI-*cag* que son necesarios para la inducción de la actividad del factor NF-κB son *cagE*, *cagG*, *cagH*, *cagI*, *cagL* y *cagM* ⁸. Por otra parte, recientemente, se demostró que *H. pylori* utiliza el sistema de secreción tipo IV, para translocar peptidoglicano como molécula efectora involucrada en la activación de NF-κB mediada por la proteína Nod1, una molécula de reconocimiento de patógenos intracelulares con especificidad para el peptidoglicano de bacterias gramnegativas ³⁰. A través del análisis por microarreglos de DNA complementario (DNAC), se observó una expresión genética diferencial en células epiteliales gástricas después de su infección con cepas PAI-*cag*⁺ y PAI-*cag*⁻ ⁸.

El gen *cagA* se ha empleado como un marcador de la presencia de la isla de patogenicidad, aunque esto no implica que la isla se encuentre completa y funcional ⁴⁷. CagA es una proteína inmunodominante de alto peso molecular (120 - 130 KDa) presente en 50-70% de las cepas de *H. pylori* ^{8, 35}. Los aislamientos clínicos de *H. pylori* han sido clasificados en tipo I y II de acuerdo a la presencia de la isla de patogenicidad completa, la expresión de CagA y la secreción de una citotoxina vacuolizante (VacA) activa. Las cepas tipo I son positivas para todas estas características, mientras que las cepas tipo II no expresan CagA aún cuando contengan el gen, poseen un gen *vacA* silencioso o que codifica una forma inmunoreactiva no tóxica y/o tienen

mecanismos de secreción defectuosos ⁸. Adicionalmente, sólo las cepas tipo I son capaces de inducir la producción de IL-8 *in vitro*. Un número de estudios epidemiológicos ha demostrado que existe una fuerte correlación entre la infección por las cepas de *H. pylori* tipo I y la ocurrencia de enfermedades gastroduodenales severas con una mayor inflamación que puede resultar en ulceración péptica, gastritis atrófica y adenocarcinoma gástrico; mientras que las cepas tipo II con una virulencia atenuada no inducen cambios dramáticos en la mucosa gástrica ⁸. Estos estudios epidemiológicos son apoyados por experimentos en modelos animales, en donde sólo las cepas de *H. pylori* tipo I producen un daño gástrico similar al observado en humanos ⁸.

Una vez dentro de la célula epitelial gástrica, CagA se colocaliza en la membrana celular con las proteínas ZO-1 y JAM, normalmente encontradas en las uniones celulares, afectando a la integridad del epitelio ⁴⁸. A su vez, CagA puede ser fosforilada en sus residuos de tirosina de la secuencia consenso EPIYA localizada en su región C-terminal por las cinasas Src de la célula hospedera ^{35, 48}. Azuma y cols. ⁴⁹ analizaron las frecuencias de los genotipos que contenían más de cuatro repeticiones de la secuencia EPIYA en la región 3' del gen *cagA* y encontraron que la infección por *H. pylori* con un genotipo *cagA*⁺ con más de cuatro secuencias EPIYA correlacionaban con la patogénesis de la atrofia gástrica y el cáncer gástrico. La proteína CagA fosforilada (CagA-P) puede interactuar con la tirosina fosfatasa SHP-2, lo que da lugar a una cascada de señalización celular que puede resultar en la estimulación de la polimerización de la actina con la consecuente formación de un pedestal (efecto del “colibrí”), así como de la movilidad celular (cell scattering), y alteraciones en la adhesión y proliferación celular ⁵⁰. La proteína CagA-P también puede activar a una cinasa de la familia Src (Csk) inactivando a esta familia de tirosina cinasas. Esta señalización puede inducir apoptosis atenuando las otras interacciones de CagA. A su vez, mediante la inactivación de Src, CagA-P induce la desfosforilación de cortactina, la cual luego se colocaliza con los filamentos de actina (F-actina) en la punta y base del pedestal ⁵⁰. La proteína CagA translocada también puede activar la vía de las MAP cinasas (Ras/MEK/ERK) dando lugar a la movilidad o dispersión celular (en células AGS) y a la proliferación celular observada en células MDCK (Figuras 2 y 4) ^{36, 50}.

De acuerdo con lo anterior, la existencia de la PAI-*cag* que se asocia a la expresión de una proteína CagA activa y de un sistema de secreción tipo IV funcional puede promover vías antiapoptóticas, las cuales pueden ayudar a la persistencia del microorganismo disminuyendo la muerte de las células epiteliales a las que se encuentra adherido ⁵⁰. Sin embargo, aún cuando CagA

y otros productos de la PAI-*cag* han sido relacionados con el incremento en la proliferación celular asociado a la infección por *H. pylori*, varios estudios han mostrado que no existen diferencias en los niveles de proliferación y muerte celular entre personas colonizadas con cepas PAI-*cag*⁺ y PAI-*cag*⁻ de *H. pylori* ⁵¹. Además, estudios realizados *in vitro*, demostraron que la alteración de la proliferación celular o apoptosis inducida por cepas de *H. pylori* no estaba asociada con la presencia del gen *cagA* ⁵¹.

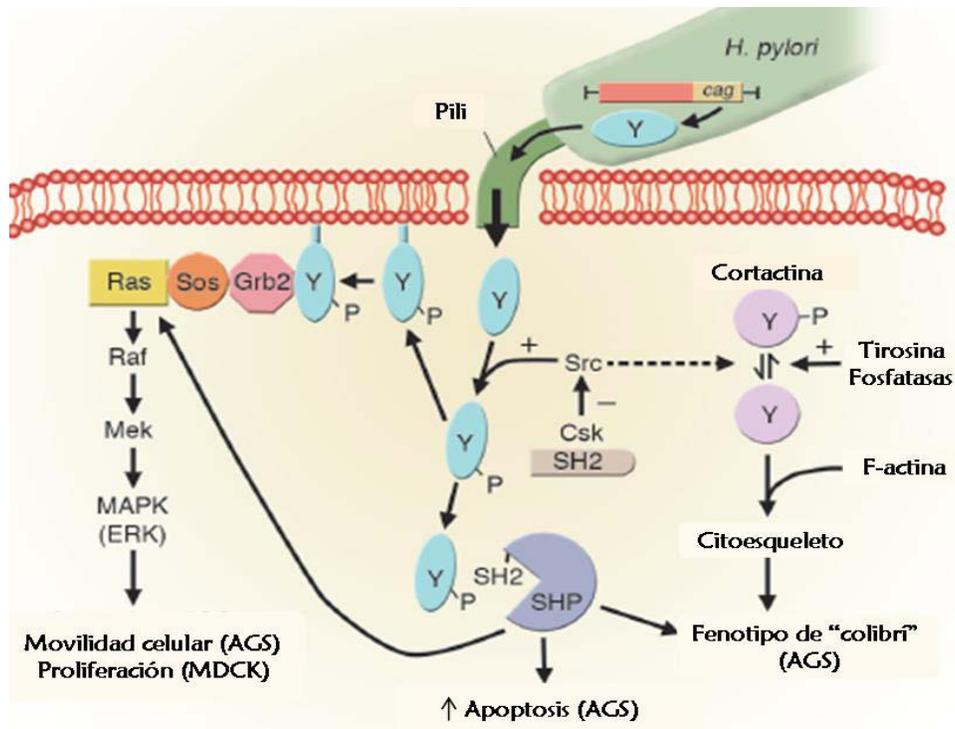


Figura 3. Actividad biológica de CagA en las células gástricas epiteliales. Una vez que CagA es translocado al citoplasma de la célula hospedera, puede ser fosforilado en sus residuos de tirosina (Y). CagA fosforilado (Y-P) interactúa con varias vías de señalización de la célula hospedera produciendo cambios en la morfología celular, proliferación y apoptosis ⁵⁰.

En contraste, Peek y cols. ⁵¹ mostraron mediante la infección de células AGS con aislamientos clínicos de *H. pylori* y sus mutantes isogénicas en la PAI-*cag*, que sólo las cepas de *H. pylori* PAI-*cag*⁺ reducían significativamente la viabilidad de las células infectadas induciendo una acumulación de células de G2-M después de 6 horas e incrementando su apoptosis a las 72 horas del ensayo. Análisis de mutantes en *picB*⁻ mostraron que la expresión del producto de este gen, el cual tiene homología con proteínas involucradas con el SSIV, contribuye a la progresión del ciclo celular en las células AGS y a una respuesta apoptótica ⁵¹.

Por otro lado, con el objetivo de investigar el efecto producido por cepas de *H. pylori* *cagA*⁺ y *cagA*⁻ en la regulación del ciclo celular, dos estudios separados mostraron que al infectar células AGS o KATO III sincronizadas y no sincronizadas con aislamientos clínicos y sus respectivas mutantes en el gen *cagA*, se inhibía la progresión del ciclo celular de G1 a S así como la inducción de la apoptosis independientemente de la presencia del gen ^{52, 53}.

Adicionalmente, se ha demostrado que la expresión de la citotoxina vacuolizante (VacA) asociada con los productos de la PAI-*cag* está involucrada en la inducción de la apoptosis de células del epitelio intestinal (T84) vía Fas/Fas ligando después de 48 horas de infección (MOI 1:100) con cepas de *H. pylori vacA*⁺/PAI-*cag*⁺ y sus respectivas mutantes. Además, mediante mutantes en el gen *cagE*, un mediador de la secreción de IL-8 y de la activación del factor NF-κB en las células epiteliales gástricas, se encontró que la proteína CagE fue necesaria para la inducción directa de la apoptosis en las células epiteliales intestinales independientemente de la migración de polimorfonucleares ⁵⁴. Sin embargo, en el estudio realizado por Peek y cols. ⁵¹ no se encontró relación entre las cepas *vacA*⁺/PAI-*cag*⁺ y la inducción de apoptosis ya que la incubación de células AGS con cepas de *H. pylori vacA*⁻/*picB*⁻ tuvo los mismos efectos inductores de apoptosis que las cepas silvestres que contienen la PAI-*cag* íntegra, lo que sugiere que existen factores determinantes de *H. pylori* independientes de la presencia de la PAI-*cag* o de *vacA* que pueden afectar a los eventos del ciclo celular epitelial.

1.3.2.3 Citotoxina vacuolizante (VacA)

La citotoxina vacuolizante (VacA) es una proteína cuyo gen presenta cierto polimorfismo con alelos que comprenden uno de tres tipos de péptido señal, *s1a*, *s1b*, *s2* y uno de dos tipos de región media, *m1* ó *m2* ^{35, 50}. Se ha observado que las cepas de *H. pylori* con el genotipo *s1a/m1* presentan una actividad citotóxica mayor, además de que están asociadas con el desarrollo de cáncer gástrico. VacA es una proteína sintetizada como una protoxina de 140 kDa que contiene tres dominios funcionales: una secuencia o péptido señal N-terminal (3 kDa), una citotoxina madura (87 kDa) y un dominio C-terminal asociado con la membrana externa (50 kDa). Para poder ser secretada, la protoxina se corta tanto en su región N-terminal como en su región C-terminal, permaneciendo como un monómero de aproximadamente 95 kDa que formará una toxina madura compuesta de 6 ó 7 monómeros en forma de anillo ³⁵. Una vez que VacA es

liberada por *H. pylori*, frecuentemente es cortada, a su vez, en dos subunidades, una de 34 kDa (fragmento N-terminal p34) y otra de 58 kDa (fragmento C-terminal p58), las cuales permanecen asociados por interacciones no covalentes. Estudios *in vitro* han probado que VacA se une a la célula gástrica epitelial mediante la interacción con receptores específicos como el receptor tipo Z de tirosina fosfatasa (Ptpz) o el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF), lo cual podría modular vías de señalización celular ⁵⁰. VacA puede contribuir a la persistencia de *H. pylori* en el nicho gástrico por medio de varios mecanismos^{35, 50}. Primero, es capaz de formar poros o canales en la membrana de las células epiteliales incrementando su permeabilidad a urea, iones Cl^- y HCO_3^- y otros aniones y, con menor eficacia, a ácidos carboxílicos, piruvato, gluconato ³⁶. Una vez que la toxina madura es transportada al interior de la célula hospedera mediante endocitosis, VacA induce la formación de grandes vacuolas en el citoplasma que son acidificadas por la actividad de una ATPasa tipo V unida a la membrana de estas vacuolas ³⁵. Dichas vacuolas se originan a nivel perinuclear hasta que llenan totalmente el citosol celular causando una vacuolización celular masiva. La citotoxicidad de VacA puede afectar el transporte de proteínas así como el procesamiento de antígenos mediante cambios en el tráfico de vesículas a nivel endosoma-prelisosoma. La formación de vacuolas por VacA incrementa la permeabilidad de células polarizadas *in vitro* permitiendo la salida de moléculas de bajo peso molecular hacia la submucosa proporcionando una fuente nutricional para *H. pylori*, así como una disminución en la resistencia trans-epitelial y, por tanto, un incremento en la permeabilidad intracelular ³⁵. Por otro lado, se ha sugerido que VacA puede ayudar a la persistencia de *H. pylori* mediante una inmunosupresión específica debido a que esta toxina bloquea la maduración del fagosoma en macrófagos, inhibe selectivamente la presentación de antígenos en células T, bloquea la proliferación de celular T y regula negativamente los efectos Th1 por interacción con la calcineurina interfiriendo con la señalización ^{35, 50}. Además de la vacuolización celular, VacA tiene otros efectos dañinos directos para la célula, observados *in vitro*, como la inducción de cambios en el citoesqueleto, apoptosis y supresión de la proliferación celular epitelial (figura 4) ^{35, 50, 55}.

A través de la exposición de células AGS a sobrenadantes de cultivos de una cepa *vacA*-s1/m1 y de su respectiva mutante deficiente en este gen, Kuck y cols. ⁵⁵ demostraron que el sobrenadante de la cepa silvestre provocó un incremento en la apoptosis después de 48 horas, a diferencia de la cepa mutante cuyo resultado fue similar al del control sin tratamiento. Además, se encontró que la muerte celular inducida por VacA fue independiente de su capacidad para producir vacuolas ya que la proteína recombinante producida en *E. coli* fue capaz de inducir

apoptosis aunque no hubo formación de vacuolas. Sin embargo, en este estudio no se pudo atribuir completamente el efecto apoptótico a VacA debido a que la remoción de la proteína del sobrenadante por inmunoprecipitación no redujo por completo la capacidad inductora de apoptosis del sobrenadante ⁵⁵.

Mediante la transfección de células HEp-2 con construcciones de DNA con los genes codificantes para VacA, p34 ó p58 fusionados con la proteína verde fluorescente (GFP) y la incubación de las proteínas respectivas con mitocondrias aisladas, Galmiche y cols. ⁵⁶ encontraron que p34 se translocaba y se localizaba específicamente en mitocondria y que podía permanecer libre en la matriz mitocondrial o asociado a la membrana interna. Más aún, la transfección de las proteínas fusionadas p34-GFP y VacA-GFP eran capaces de inducir apoptosis mediante la liberación del citocromo C de la mitocondria y la consecuente activación de la caspasa 3 ⁵⁶.

1.3.2.4 Otros factores de virulencia inductores de apoptosis

Otra de las proteínas secretadas que pudiera contribuir al efecto apoptótico inducido por *H. pylori* es la proteína HP0175, la cual es uno de los antígenos de *H. pylori* preferentemente reconocido por los anticuerpos de pacientes con úlcera gastroduodenal. Esta proteína está caracterizada por un núcleo con actividad C-terminal peptidil prolil *cis*, *trans*-isomerasa (PPIasa) identificado de acuerdo a su similitud con otras secuencias. Las PPIasas han sido caracterizadas como factores de virulencia en *Legionella pneumophila* y *Trypanosoma cruzi*. Basak y cols. ⁵⁷ demostraron que esta proteína purificada de la cepa 26695 de *H. pylori* era capaz de inducir la muerte celular de células AGS de forma tiempo y dosis dependiente. Este efecto fue confirmado mediante la generación de la cepa mutante en el gen cuyo efecto apoptótico fue menor en comparación con la cepa silvestre ⁵⁷.

Finalmente, todos los factores de virulencia antes mencionados son componentes importantes en el desequilibrio apoptosis-proliferación celular provocado por *H. pylori*, aunque todavía se desconoce si existen otros factores involucrados que pudieran ser objeto de estudio.

I.4 Análisis proteómico: una herramienta en el estudio de *H. pylori*

La proteómica puede ser definida como el estudio de todas las proteínas, incluyendo su abundancia relativa, distribución, modificaciones post-traduccionales, así como funciones e interacciones con otras macromoléculas, en una célula u organismo determinado, en un ambiente definido y en una etapa específica en su ciclo celular ⁵⁸. Hasta ahora, la combinación de la electroforesis de doble dimensión (2-DE), la espectrometría de masas (MS), la secuenciación de aminoácidos y la bioinformática (bases de datos como SWISS-PROT, SWISS-2DPAGE, TrEMBL, etc.) ha sido empleada para alcanzar dicho objetivo, aunque se pueden utilizar métodos complementarios basados en la cromatografía de líquidos, así como los microarreglos de proteínas para realizar el análisis proteómico. La 2-DE es una técnica que permite la separación de una mezcla compleja de proteínas (más de 10,000 proteínas) en base a su punto isoeléctrico (pI), a su masa molecular, solubilidad y su relativa abundancia (>10,000 copias por célula) ⁵⁸⁻⁶⁰. Más aún, esta técnica tiene la ventaja de proporcionar un mapa intacto de proteínas, lo que permite la identificación del cambio en el nivel de expresión proteico, así como modificaciones post-traduccionales e isoformas que no son detectadas por un estudio genómico ⁵⁵. Sin embargo, algunas de sus principales desventajas son la limitada resolución de proteínas de baja abundancia (10-1000 copias por célula) y de proteínas hidrofóbicas ^{60, 61}.

La proteómica de *H. pylori* fue iniciada con el objetivo de entender la composición proteica de una bacteria con un genoma relativamente pequeño (~1,600 genes) y de encontrar a las proteínas inmunogénicas relevantes. Hasta ahora, se ha secuenciado el genoma de las cepas de *H. pylori* 26695, J99 y HPAG1, para las cuales se han predicho 1,590, 1,495 y 1536 genes, respectivamente ⁶²⁻⁶⁴. Jungblut y cols. ⁶² realizaron el análisis proteómico de las cepas de *H. pylori* 26695, J99 y SS1 mediante 2-DE con geles de gran formato (23 x 30 cm) logrando detectar 1,863, 1,622 y 1,448 puntos o manchas para cada una de las cepas, respectivamente, distribuyéndose en un intervalo de pH de 4 a 10 y de masa molecular de 5 a 150 kDa ⁶². A partir de las 1,800 proteínas detectadas para la cepa 26695 de *H. pylori*, se seleccionaron 152 para ser identificadas por espectrometría de masas (MALDI-MS), mismas que comprendieron 126 proteínas diferentes lo que, a su vez, representa cerca del 8% del total de los 1,590 genes predichos del genoma ^{62, 63}.

En contraste, al analizar el proteoma obtenido de la cepa NCTC 11637 de *H. pylori*, se observó que algunas proteínas como las subunidades α y β de la ureasa presentan múltiples isoformas, lo que se tradujo en la detección de 93 proteínas productos de 35 genes. Esto sugiere que muchas de las proteínas de *H. pylori* están sujetas a cambios post-traduccionales⁶⁵. A partir de un análisis de lisados totales de la cepa 26695 de *H. pylori* separados por 2-DE en geles de gran formato se identificaron 384 especies proteicas que correspondieron a 290 genes diferentes^{63, 66}. Algunas de estas proteínas tuvieron modificaciones post-traduccionales en múltiples manchas. Además, más del 95% de estas proteínas identificadas pertenecieron a un grupo núcleo de 1,281 genes que son conservados en diversos aislamientos clínicos. Sólo doce proteínas identificadas estuvieron ausentes en algunos de los 15 aislamientos caracterizados, incluyendo a miembros de la PAI-*cag* y algunas de las proteínas de membrana externa participantes en la virulencia de los aislamientos de *H. pylori*⁶⁵. Así mismo, con el objetivo de estudiar proteínas que pudieran servir como blanco para el tratamiento y prevención contra la infección por *H. pylori*, en estos estudios se han identificado algunos factores de virulencia como las subunidades de la ureasa, CagA (Cag26), la catalasa, y GroES, los cuales a su vez, mostraron ser reconocidos por sueros de pacientes infectados⁶². Entre otros factores de virulencia detectados por 2-DE se encuentran NapA (proteína A activadora de neutrófilos), VacA y la GGT^{62, 63, 65}.

El problema de la pobre detección de las proteínas de baja abundancia mediante la 2-DE puede ser reducido mediante el enriquecimiento de un grupo de proteínas en particular como las proteínas de secreción o las proteínas de membrana externa, así como el uso de intervalos de pH más cortos para lograr una mayor resolución⁶⁷. De tal forma que mediante el análisis del secretoma de las cepas 26695 y J99 de *H. pylori* y gracias a la optimización de la técnica para evitar la autólisis espontánea del microorganismo, se detectaron proteínas como VacA, GGT, algunas proteínas de flagelo (FlgE, FlgD, FliE) y tiorredoxinas (TrxC, TrxA), las cuales se han considerado de importancia por ser proteínas que pudieran estar involucradas de forma importante en las interacciones patógeno-hospedero⁶⁸.

Aún cuando en dichos estudios se han detectados diferentes factores de virulencia que pueden estar involucrados en la inducción de la proliferación celular y/o apoptosis en las células del epitelio gástrico, todavía no se ha realizado el análisis proteómico de *H. pylori* durante su contacto con la célula hospedera. De hecho, actualmente, el análisis proteómico se ha enfocado más a la expresión proteica diferencial resultante de la célula hospedera para poder comprender

los mecanismos de señalización celular inducidos por el contacto con *H. pylori*. De esta forma, se han identificado proteínas de células AGS relacionadas con la proliferación celular, la carcinogénesis, adhesión celular, el citoesqueleto y mecanismos de defensa celulares, todas ellas relacionadas con el daño celular mediado por el estrés oxidativo producido por la infección con *H. pylori*⁶⁹.

Finalmente, las proteínas más abundantes de *H. pylori* han sido reportadas en varios estudios proteómicos independientes; sin embargo, por medio de microarreglos de cDNA, se encontró que del 4 al 7% de todos los genes de *H. pylori* presentan expresión elevada en el microorganismo durante la infección de tejido gástrico humano y de gerbo, mismos que no están expresados en cultivos *in vitro*⁶⁶. Por tanto, el estudio proteómico del microorganismo en contacto con la célula hospedera podría resultar en la identificación de nuevos factores de virulencia implicados en la patogénesis de la infección.

II. JUSTIFICACIÓN

La infección por *Helicobacter pylori* induce un incremento en la tasa de apoptosis en las células epiteliales gástricas que puede provocar una respuesta hiperproliferativa secundaria. Aún cuando se conocen factores de virulencia de *H. pylori* como CagA y VacA que participan en la inducción del proceso apoptótico en el epitelio gástrico, se ha sugerido que existen factores adicionales participantes desconocidos que forman parte de una expresión proteica diferencial hasta ahora no estudiada. La identificación y el estudio de dichos factores pueden ser relevantes en la comprensión de la patogénesis de *H. pylori* durante la infección y su resultado clínico.

III. HIPÓTESIS

H. pylori producirá una expresión proteica diferencial durante la inducción de apoptosis a células de adenocarcinoma gástrico (AGS) en comparación con el cultivo puro del microorganismo.

IV. OBJETIVOS

IV. 1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión proteica diferencial de *Helicobacter pylori* durante la apoptosis de células AGS infectadas.

IV. 2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Determinar el tiempo de inducción de apoptosis en las células AGS durante la infección con la cepa de *H. pylori*.
- ✓ Comparar los perfiles proteicos de *H. pylori* obtenidos durante el cultivo individual con el del evento apoptótico de las células AGS.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1 Cepa de *H. pylori*

Se utilizó la cepa 7C de *H. pylori* (*cagA*⁺), la cual es un aislamiento clínico obtenido del cuerpo gástrico de un paciente con gastritis crónica. El cultivo puro de esta cepa estaba conservado en caldo Brucella con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 15% de glicerol, a -70° C.

V.1.2 Identificación de *H. pylori*

Antes de la preparación del inóculo bacteriano para realizar la infección, en los cultivos obtenidos se realizó la identificación de *H. pylori* mediante la observación de la morfología macro y microscópica (tinción de Gram), así como las pruebas de ureasa y citocromo oxidasa ¹.

V.1.3 Condiciones de cultivo de *H. pylori*.

La cepa 7C de *H. pylori* se cultivó en medio agar suero de caballo (base agar GC adicionado de suero de caballo al 8%, vancomicina 10 mg/L, anfotericina 2 mg/L y trimetoprim 5 mg/L) y se incubó en un ambiente microaerofílico (10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂) a 37° C durante 48 - 72 horas ^{62, 63}.

V.1.4 Preparación del inóculo bacteriano

La pureza y morfología microscópica de cada una de las suspensiones bacterianas se verificó mediante una tinción de Gram evitando el uso de cultivos de *H. pylori* con más del 20% de formas cocoides.

A partir de un subcultivo de 48 horas de la cepa 7C de *H. pylori* en placas de agar suero de caballo, se ajustó el inóculo bacteriano en medio RPMI 1640 no suplementado (sin SFB ni antibióticos) a una densidad óptica (DO) de 1.8 ± 0.050 a 625 nm ($\sim 4 \times 10^8$ bacterias viables/mL después del lavado del paquete bacteriano). El paquete bacteriano se lavó con medio RPMI 1640 no suplementado antes de realizar la infección.

La concentración del inóculo bacteriano empleado para realizar la infección se determinó a través de la cuantificación de bacterias viables por mililitro, empleando el kit comercial LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon). Las bacterias se tiñeron adicionando los colorantes fluorescentes SYTO9 (solución stock 3.34 mM) y yoduro de propidio (IP; solución stock 20 mM) a 1 mL de la suspensión bacteriana para obtener una concentración final de 1.5 y 90 μ M, respectivamente, y se dejaron incubando durante 15 min en obscuridad. Finalmente, se adicionaron 10 μ L de una suspensión estándar de microesferas previamente agitada en vórtex (solución stock 1×10^8 /mL, 6 μ m de diámetro) ⁷⁰. Se analizaron 10,000 eventos (bacterias individuales o en cúmulos) en un citómetro COULTER® EPICS® ALTRA™, a través del láser de argón de 488 nm. Así mismo, se realizó la cuenta de UFC/mL en placas de agar suero de caballo.

V.1.5 Preparación de la cepa de *H. pylori* no viable.

La cepa 7C de *H. pylori* se suspendió en 50 mL de solución salina de formaldehído (solución salina isotónica adicionada de 0.6% formaldehído) a una densidad óptica de 0.08–1.0 a 625 nm durante 48 horas a temperatura ambiente. El paquete bacteriano de esta suspensión, se lavó dos veces con solución salina isotónica estéril y se resuspendió en un volumen para obtener una densidad óptica de 1.8 ± 0.050 a 625 nm. Finalmente, se cultivó una alícuota de 100 μ L en medio agar suero de caballo y se incubó a 37° C durante más de 72 horas en un ambiente microaerofílico. La suspensión de bacterias no viables se almacenó a 4° C hasta su uso. Antes de la infección de las células AGS, se realizó una tinción de Gram para verificar la pureza de esta suspensión bacteriana.

V.2 Cultivo de la línea celular AGS (células epiteliales de adenocarcinoma gástrico)

La línea celular que se utilizó en los experimentos se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC CRL 1739). Las células AGS se cultivaron en medio RPMI 1640 (GIBCO™, Invitrogen Corporation) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), glutamina 2 mM, 2 g/L de NaHCO₃, 100 U/mL penicilina, 100 mg/L estreptomycin y 0.25 mg/L anfotericina B (Sigma, St. Louis, Mo) y se incubaron a 37° C en un ambiente de 5% de CO₂ hasta alcanzar un 80% de confluencia. Las células AGS se conservaron a -70° C en SFB adicionado de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de $2-5 \times 10^6$ células/mL.

V.2.1 Preparación de las células para los ensayos de infección

Las células se cultivaron en placas petri (100 x 15 mm) hasta que alcanzaron ~80% de confluencia, se lavaron con solución amortiguadora salina de fosfatos pH 7.4 (PBS) precalentada a 37° C para eliminar a las células no adheridas y se trataron con 3 mL de tripsina al 0.25% (GIBCO™, Invitrogen Corporation) durante 3-5 minutos a 37° C para desprender las células adheridas. De la suspensión celular se tomaron 100 µL y se diluyeron en 100 µL de azul de tripano 0.4% (Gibco, BRL, N.Y.) y 800 µL de PBS para realizar una dilución 1:10. Se cuantificaron las células viables mediante una cámara de Neubauer y el factor de dilución empleado.

Se transfirió el volumen de la suspensión equivalente a $\sim 1 \times 10^6$ células a placas con 6 pozos (35 mm de diámetro) y $\sim 5 \times 10^4$ células en placas de 24 pozos (15 mm de diámetro) con cubreobjetos de 12 mm de diámetro. Las células se incubaron con medio RPMI 1640 suplementado (10% SFB) hasta que se observó una confluencia del 70 - 80% aproximadamente (~ 48 horas). A continuación, cada pozo con células se lavó dos veces con medio RPMI 1640 sin suplementar precalentado a 37° C. Las células se incubaron (37° C, 5% CO₂) en medio RPMI 1640 sin SFB ni antibióticos durante 24 horas antes de la infección para la eliminación de componentes del SFB que pudieran interferir con la interacción de las bacterias con las células, así como en la extracción de proteínas de *H. pylori*⁷¹.

V.3 Infección de las células AGS con *H. pylori*

Antes de la infección de las células AGS en medio RPMI no suplementado, se hicieron dos lavados con PBS precalentado a 37° C para remover las células no adheridas. A dos pozos con células AGS se les adicionó el volumen correspondiente del inóculo de la cepa 7C de *H. pylori* para obtener un índice de multiplicidad (MOI) de 1:100. Así mismo, se infectaron cultivos con la cepa no viable 7C de *H. pylori*. A cada cultivo se le adicionó medio RPMI no suplementado para obtener un volumen final de 2.5 mL. Las células fueron incubadas a 37° C y 5% CO₂.

V.4 Determinación de la apoptosis en las células AGS infectadas con *H. pylori*

V.4.1 Detección de células AGS con condensación de cromatina.

La detección de las células AGS con condensación de cromatina se realizó mediante la tinción con IP después de 0, 12, 18 y 24 horas de la infección. Las células AGS cultivadas en pozos de 15 mm con cubreobjetos de 12 mm de diámetro (~ 5×10^5 células/pozo) previamente incubadas en medio RPMI no suplementado durante 24 horas, se dividieron en cuatro grupos con diferentes tratamientos:

- 1) Células AGS sin infectar como control negativo (control basal de apoptosis).
- 2) Células AGS expuestas a camptotecina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) como control positivo de apoptosis. Se preparó una solución madre 1.9 mM de camptotecina en DMSO y se adicionó a cada pozo el volumen correspondiente para obtener una concentración final de $5 \mu\text{M}$ ⁵³.
- 3) Células AGS infectadas con la cepa 7C de *H. pylori* (MOI 1:100, >90% formas bacilares).
- 4) Células AGS infectadas con la cepa 7C de *H. pylori* no viable (MOI 1:100, 60-80% formas bacilares).

Cada grupo se preparó por duplicado para cada uno de los tres ensayos independientes realizados. Las células se lavaron tres veces con PBS pH 7.4 y se fijaron con paraformaldehído 4% (Electron Microscopy Sciences) durante 40 minutos a 4° C. Las células se lavaron tres veces con agua desionizada y se permeabilizaron con tritón X-100 0.1% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Esta solución se retiró y los residuos se eliminaron mediante tres lavados con agua desionizada. Una vez permeabilizadas las células, se incubaron con una solución de yoduro de propidio (Sigma, St. Louis, Mo) 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron tres veces con agua desionizada, los cubreobjetos se dejaron secar, se colocaron en un portaobjetos utilizándose glicerol como medio de montaje y se sellaron para luego ser observados mediante un microscopio de fluorescencia. Se realizó la cuantificación de células con condensación de cromatina de un total de 300 células y se calculó el porcentaje de

células con condensación de cromatina. Los resultados obtenidos se analizaron mediante la aplicación de la prueba t de student para muestras independientes considerándose significativas las diferencias con una $p < 0.05$.

V.4.2 Determinación de la actividad de la caspasa-3

Los resultados obtenidos por la determinación de la condensación de cromatina en las células AGS infectadas con la cepa *H. pylori* 7C fueron complementados mediante la determinación de la activación de la caspasa-3. Las células AGS de un cultivo en pozos de 35 mm de diámetro infectadas con *H. pylori* y sin infectar se lavaron con PBS pH 7.4 adicionado de una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete™ protease inhibitor cocktail, Roche) y se desprendieron suavemente mediante el uso de un raspador para células. Así mismo, se obtuvieron las células de un pozo con células AGS expuestas a 5 μM de camptotecina como control positivo, además de las células infectadas con la cepa 7C de *H. pylori* no viable. Las suspensiones celulares se centrifugaron a 2,500 x g durante 5 minutos y se resuspendieron en 100 μL de una solución amortiguadora de lisis o de raspado (glicerol 50%, sacarosa 5%, DTT 5mM, CHAPS 0.05%, EGTA 1mM, EDTA 1 mM, HEPES 100 mM, mezcla de inhibidores de proteasas). Las suspensiones fueron agitadas con vórtex hasta la disolución del paquete celular y se conservaron a -20°C hasta su uso.

Una vez realizada la cuantificación de proteínas mediante el micrométodo de Bradford, se prepararon cada una de las muestras con 50 μg de proteína, 2.4 mL de una solución amortiguadora para caspasas que permitió la estabilización de la caspasa-3 (EGTA 1 mM EDTA 1mM, HEPES 100 mM, sacarosa 10%, DTT 10 mM, CHAPS 0.1%, mezcla de inhibidores de proteasas) y 4 μL del substrato fluorogénico (Ac-YVAD-AMC; Peptide Institute Inc., Osaka, Japón) para obtener una concentración final de 16 μM . La mezcla se agitó con vórtex y se transfirió a una celda de cuarzo, dejándose incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente en condiciones de obscuridad. La actividad enzimática de la caspasa-3 se determinó realizando lecturas cada 2 s durante 10 min a una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión de 440 nm en un espectrofluorómetro (RF-5301 PC, Shimadzu Corp., Kioto, Japón)⁷².

El análisis de los resultados se realizó calculando el valor de la pendiente de la recta obtenida de la gráfica fluorescencia en función del tiempo (min). El valor de la pendiente para

cada una de las rectas se multiplicó por 60 y se dividió entre 0.05 para obtener el valor de la actividad enzimática en unidades de fluorescencia/h/mg proteína. Los resultados finales fueron obtenidos de tres ensayos independientes y analizados mediante la prueba t de student para muestras independientes considerándose una $p < 0.05$ como significativo.

La significancia estadística en la cantidad de células con condensación de cromatina y la actividad de la caspasa-3 en cada uno de los grupos evaluados (AGS infectadas con la cepa viable o no viable de *H. pylori*, células AGS sin infectar y células expuestas a camptotecina) determinó la inducción de apoptosis.

V.5 Determinación de la expresión diferencial de *H. pylori* durante la inducción de apoptosis a las células AGS

V.5.1 Extracción y solubilización de proteínas

A partir de una placa con 6 pozos de 35 mm de diámetro se obtuvieron las células AGS infectadas con *H. pylori* al tiempo en el que se observó un incremento significativo en la apoptosis en comparación con el control de células AGS sin infectar. A cada uno de los pozos se les retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS pH 7.4 para descartar a las bacterias no adheridas y a las células AGS desprendidas. Se adicionó 1 mL de PBS a cada uno de los pozos y las células se desprendieron mediante el uso de raspadores. Así mismo, se obtuvieron las células AGS sin infectar y las bacterias incubadas en placas independientes durante el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones que se emplearon para las células AGS infectadas. Las suspensiones celulares obtenidas se centrifugaron a $3,500 \times g$ por 5 minutos y se determinó el peso húmedo del paquete celular. La extracción de las proteínas celulares y bacterianas se realizó resuspendiendo cada uno de los paquetes celulares en 600 μ L de solución amortiguadora de lisis -Tris-HCl 0.01 M pH 6.8, EDTA 1 mM, urea 8 M, ditiotreitól (DTT) 50 mM, glicerol 10% v/v, nonidet P-40 5% v/v y solución de anfolitos 2% v/v (IPG-Buffer pH 3-10, Bio-Rad, USA)- por cada 52.8 mg de peso húmedo para permitir la lisis de más del 90% de las células eucariotas y procariotas ⁷³. Las suspensiones se agitaron vigorosamente en vórtex hasta la disolución visible de los paquetes celulares (~5 minutos) y se centrifugaron a $11,500 \times g$ durante 5 minutos a 4° C. Los sobrenadantes se separaron y almacenaron a -70° C hasta su uso. De esta manera, se extrajeron las proteínas de tres ensayos de infección de forma independiente.

La cuantificación de proteínas de cada uno de los extractos se realizó mediante el ensayo de Bradford (Protein Assay, Bio-Rad, USA). Dado que el amortiguador de lisis empleado interfirió en la cuantificación de proteínas mediante dicho ensayo, se realizó la precipitación y posterior resolubilización de las proteínas de cada una de las muestras. A 100 μ L del extracto proteico se adicionaron 5 volúmenes de acetona al 80% y se mezcló en vórtex. La mezcla se incubó 30 minutos en hielo y se centrifugó a 11,500 $\times g$ durante 5 minutos. La acetona se decantó y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente durante no más de 5 minutos. De acuerdo, a las recomendaciones para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, las proteínas precipitadas se resuspendieron en una solución con urea 6 M, DTT 70 mM y (3-[(3-cloramidopropil) dimetilamonio]-1-propanil sulfonato 1% (CHAPS), durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Así mismo, la integridad y la baja pérdida de proteínas durante el procedimiento de precipitación/resolubilización se observaron en geles de acrilamida al 12.5% de una dimensión teñidos con azul de Coomassie R-250.

V.5.2 Electroforesis de doble dimensión (2-DE)

V.5.2.1 Primera dimensión: Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque se realizó en tiras de inmobilinas con gradiente de pH inmóvil (IPG-Strips, Bio-Rad, USA) de 11 cm con un intervalo de pH de 3 a 10. La cantidad de proteína del extracto obtenido de los ensayos de infección (AGS-Hp) fue de 100 μ g para los geles analíticos. De acuerdo a los geles de una dimensión teñidos con azul de coomassie, la concentración de proteínas bacterianas obtenida fue mayor a la concentración de proteínas de las células AGS en los extractos de la infección, por lo que la cantidad de proteínas empleada de los extractos provenientes de los cultivos individuales de la cepa 7C de *H. pylori* y de las células AGS fue 75 μ g y 50 μ g, respectivamente. Una vez que se observó que las concentraciones de proteínas empleadas eran las óptimas para la comparación entre los geles y la determinación de la expresión diferencial de *H. pylori* 7C durante la inducción de apoptosis, se elaboraron geles de gran formato (20 \times 23 cm) para obtener una mejor resolución. De esta forma, se emplearon tiras de inmobilinas de 17 cm con un intervalo de pH de 3 a 10, para los cuales la cantidad de proteínas fue de 120 μ g del extracto

AGS-Hp, 60 μg del extracto de las células AGS y 90 μg del obtenido de la cepa 7C de *H. pylori*. Las muestras fueron preparadas para su aplicación en las tiras de inmobilinas adicionando a cada alícuota del extracto proteico una solución de CHAPS 4%, urea 7 M, tiourea 2 M, DTT 70 mM, solución de anfolitos 2% v/v y azul de bromofenol 0.001% para obtener un volumen final de 185 μL para rehidratar las tiras IPG de 11 cm y de 300 μL para las tiras de 17 cm. Las muestras se agitaron en vórtex durante 1 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 11,500 $\times g$ durante 5 min a 4° C. Las tiras se colocaron en un carril de rehidratación (Amershan-Pharmacia, UK) y se rehidrataron con la muestra durante 16 horas a temperatura ambiente, conforme a las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se realizó el isoelectroenfoco (Multiphor II, Amershan-Pharmacia, UK) a un voltaje y temperatura (Multitemp III, Pharmacia, Biotech) controlados de acuerdo a indicaciones del fabricante: 200 V/1h, 1,000 V/30 min, 1,500 V/30 min, 2,000 V/30 min y 2,500 V a 17° C hasta completar 55,000 V/h para las tiras de inmobilinas de 11 cm y hasta 65,000 v/h para las tiras de 17 cm. El equilibrio de las tiras se hizo de la siguiente forma:

- Baño 1: Las tiras se introdujeron en una solución de equilibrio (Tris 0.375 M, urea 6 M, glicerol 30% v/v) adicionada con dodecilsulfato de sodio (SDS) 7% y DTT 70 mM en agitación durante 15 min a temperatura ambiente ⁷⁴.
- Baño 2: A continuación las tiras se cambiaron a una solución de equilibrio con SDS 7% y yodoacetamida 120 mM, en donde se mantuvieron en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente ⁷⁴.

V.5.2.2 Segunda dimensión: Geles de poliacrilamida

Antes de la elaboración de los geles de gran formato, se realizó la segunda dimensión con las tiras de inmobilinas 11 cm, las cuales se colocaron en geles reductores de poliacrilamida al 15% de 16 x 18 cm y 1 mm de grosor, en una cámara vertical Hoeffer S600 (Hoeffer Scientific Instruments, USA). Las tiras de inmobilinas de 17 cm se colocaron en geles reductores de poliacrilamida al 15% de gran formato (20 x 23 cm) de 15 mm de grosor en una cámara vertical (Ettan DALTsix Electrophoresis unit, Amersham Biosciences Corp.). Posterior al equilibrio de las tiras de inmobilinas, éstas fueron colocadas en contacto con los geles y selladas con agarosa al 0.5% con azul de bromofenol. La electroforesis a través de los geles de 16 x 18 cm se realizó a voltaje constante (150 V) hasta la salida del colorante del borde inferior del gel. Las condiciones de

la electroforesis para los geles de gran formato fueron: 15 W/30 min, 50 W/30 min y 5 W durante toda la noche hasta que el colorante se salió del borde inferior del gel.

Una vez completada la segunda dimensión los geles se fijaron en una solución compuesta por etanol al 50% y ácido acético al 10% en agua a 4° C durante toda la noche.

V.5.2.3 Tinción con coomassie coloidal modificado de Neuhoff (“Blue Silver”)

Los geles se lavaron dos veces con abundante agua desionizada con agitación suave durante 20 min. A continuación, se adicionó la solución de coomassie coloidal (H_3PO_4 2% v/v, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10% v/v, metanol 20% v/v, coomassie G-250 0.1% m/v), previamente agitada, a cada uno de los geles y se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente ⁷⁵.

Una vez teñidos los geles, se retiró la solución de coomassie coloidal y se lavaron los geles con agua desionizada y con agitación suave hasta eliminar el exceso del colorante antes de obtener la imagen digital.

V.5.2.4 Tinción con nitrato de plata

Los geles teñidos con la solución de coomassie coloidal fueron desteñidos mediante una solución de metanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v).

Una vez eliminado el azul de coomassie de los geles, éstos se lavaron tres veces con una solución de etanol al 50% en agitación por 20 minutos. A continuación se realizó un pretratamiento con tiosulfato de sodio pentahidratado (0.1g/L) durante 1 minuto y luego con agua desionizada, se hicieron tres lavados de 20 segundos cada uno. Los geles se impregnaron con una solución de nitrato de plata (2g/L) y 0.75 mL/L de formaldehído al 37% durante 30 minutos en agitación constante y posteriormente, el exceso se eliminó mediante tres lavados con agua desionizada. Para el revelado se utilizó una solución de carbonato de sodio (60 g/L) con tiosulfato de sodio (4mg/L) y 0.5 mL/L de formaldehído al 37%, hasta que se observaron los puntos de las proteínas separadas (>10 minutos). Finalmente, se realizaron dos lavados con agua desionizada

por 20 segundos cada lavado y la reacción se detuvo con la adición de una solución de ácido acético al 1% por 10 min ⁷⁶.

Las imágenes digitales de cada gel fueron obtenidas mediante un densitómetro (GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad, USA).

V.5.3 Análisis de los geles de doble dimensión

Las imágenes de los geles se analizaron con el programa PDQUEST 2-D versión 8.0 (Bio-Rad, Laboratories, Inc., USA). Las imágenes adquiridas de los geles teñidos con nitrato de plata y azul de coomassie coloidal se editaron y los puntos detectados en cada una de las réplicas para cada caso se compararon entre sí para construir un gel conocido como gel maestro. Cada gel maestro se obtuvo de la representación gaussiana creada por el software para cada mancha detectada en las réplicas, esto es, una representación tridimensional de la imagen original que permitió su análisis cuantitativo ⁷⁷.

Los geles maestros de la infección (AGS-Hp) y de los cultivos individuales de las células AGS (AGS) y de la cepa de *H. pylori* 7C (Hp), se obtuvieron de dos ensayos independientes. Todos los puntos o manchas presentes en cada réplica de los geles teñidos con nitrato de plata procedentes de los extractos proteicos bacterianos y celulares se incluyeron en el gel maestro. Cada una de las réplicas se normalizó a través del número total de puntos válidos. Este método de normalización asume que pocas proteínas cambian dentro del experimento, de tal manera que la intensidad de cada mancha es dividida por la cantidad total de todos los puntos del gel maestro ⁷⁷.

Los geles maestros fueron comparados entre sí para la determinación de la expresión proteica presente durante la apoptosis de las células AGS inducida por *H. pylori* 7C que incluyó las manchas detectadas exclusivamente en los geles teñidos con nitrato de plata de los extractos procedentes de la infección y que pudieran corresponder a proteínas de las células AGS o de *H. pylori* 7C.

El análisis de las imágenes de estos mismos geles teñidos con azul de coomassie coloidal proporcionó información sobre la expresión diferencial de forma cuantitativa de las proteínas de *H. pylori* 7C durante la apoptosis de las células AGS con respecto al cultivo individual bajo las mismas condiciones de incubación. Para ello, cada una de las imágenes de los geles se normalizó

mediante la densidad total del gel, método que considera que la densidad de una imagen (fondo y densidad de las manchas) es relativamente constante de gel a gel, por lo que la intensidad de cada mancha es dividida por el valor de la intensidad de todos los píxeles en la imagen ⁷⁷.

La determinación de la expresión proteica diferencial de *H. pylori* 7C durante la apoptosis inducida en las células AGS se realizó mediante el análisis estadístico de la cantidad o intensidad total de cada mancha definida medido en unidades de densidad óptica determinada por el software PD-Quest ⁷⁷. Para facilitar el análisis de los datos, éstos fueron divididos por un factor de 1000. Los puntos analizados se seleccionaron de acuerdo a dos criterios:

- 1) Detección de las manchas correspondientes a las proteínas de *H. pylori* en las réplicas del cultivo individual así como en los geles procedentes a la infección.
- 2) Poseer un coeficiente de variación (%CV) inter-ensayo de la intensidad para cada mancha (entre réplicas) de menor o igual a 31.2%, el cual es recomendado por considerar las variaciones técnicas y biológicas en cultivos bacterianos que pudieran afectar la reproducibilidad del ensayo ⁷⁸.

Finalmente, las diferencias significativas observadas durante la inducción de la apoptosis de las células AGS por *H. pylori* 7C entre el valor promedio (intensidad media) de las manchas seleccionadas de acuerdo a los criterios establecidos, se determinaron mediante la prueba t de student ($p < 0.05$) para muestras independientes ⁷⁸.

V.5.4 Identificación de proteínas

A partir de los geles teñidos con azul de coomassie coloidal, se seleccionaron las manchas correspondientes a *H. pylori* 7C detectados en los geles de la infección con una intensidad media mayor (≥ 2 veces) con respecto a los geles del cultivo individual para su identificación por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC/MS/MS).

Las manchas que contenían las proteínas de interés se cortaron manualmente del gel en fragmentos de 0.5-1 mm³ y se colocaron en tubos de microfuga de 1.5 mL. El colorante y el SDS residual se removieron mediante dos lavados de 12 y 4 horas, respectivamente, con una solución de metanol 50% (v/v) y ácido acético 5% (v/v).

Los fragmentos se deshidrataron con acetonitrilo 100% y se secaron completamente por centrifugación con vacío. Las proteínas se redujeron mediante la hidratación de los fragmentos de gel con una solución DTT 10 mM en bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) 100 mM pH 8.0. Los geles se incubaron en esta solución a 56° C durante 1 h. Posteriormente, se retiró la solución de DTT y se añadió una solución de iodoacetamida 100 mM en el mismo amortiguador incubando durante 45 minutos en obscuridad a temperatura ambiente.

A continuación, la solución de iodoacetamida se retiró y los fragmentos del gel se deshidrataron con acetonitrilo 100% y se rehidrataron con NH_4HCO_3 100 mM incubando 10 minutos a temperatura ambiente. Los fragmentos de gel se deshidrataron nuevamente con acetonitrilo y se secaron por centrifugación con vacío.

La digestión de las proteínas se realizó mediante la rehidratación de los fragmentos en una solución de tripsina modificada grado secuenciación en NH_4HCO_3 50 mM para obtener una concentración final de tripsina de 20 ng/ μL . La rehidratación se llevó a cabo en hielo durante 45 minutos con agitación ocasional. Los fragmentos de gel se concentraron en el fondo del tubo mediante su centrifugación durante 60 segundos descartando el exceso de la solución de tripsina y se añadieron 10 mL de amortiguador para su incubación a 37° C durante 12-16 horas.

Los péptidos obtenidos a partir de la digestión se extrajeron colectando los sobrenadantes de una incubación con NH_4HCO_3 20 mM y de tres incubaciones de 30 minutos cada una con sonicación y agitación en la solución de extracción de acetonitrilo 50% (v/v) y ácido fórmico 5% (v/v). El volumen del extracto se redujo a un volumen menor a 20 μL por evaporación centrifugando con vacío a temperatura ambiente. Las sales que pudieron interferir con la ionización por electrospray (ESI) se eliminaron y los extractos se concentraron empleando puntas de pipeta con medio de cromatografía de fase reversa C_{18} (Zip Tip) de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Millipore, Bedford, MA, USA).

A continuación un volumen de 8 μL de cada muestra fue introducida a una columna Zorbax C18 (45 μm de diámetro x 15 cm de largo) y separada en un gradiente de elusión de 2% acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico a 98% de acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico a una velocidad de flujo de 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$.

El análisis de la secuencia de los péptidos se llevó a cabo en un espectrómetro de masas híbrido de triple cuadrupolo-trampa de iones lineal (3200 Q TRAP, Applied Biosystems). El instrumento empleado estuvo acoplado en línea a un autoacelerador (Agilent 1100 Series) y a un sistema de cromatografía líquida de alta precisión (LC) que funcionó con un flujo menor a 1 μ L por minuto. En este sistema, se adquirió un espectro de inspección para determinar la intensidad y relación m/z de los péptidos eluidos. Los péptidos que mostraron una mayor intensidad se sometieron a un análisis de espectro de resolución incrementado (EMR) para la determinación más exacta de su carga. Dichos péptidos fueron, a su vez, fragmentados con nitrógeno en la celda de colisión (Q_2). Los iones fragmento obtenidos fueron filtrados en Q_3 e inyectados axialmente al detector para la obtención del espectro de los iones producto (EPI).

Las proteínas fueron identificadas empleando el algoritmo Mascot y la base de datos NCBI nr restringiéndose al grupo *Eubacteria* (<http://www.matrixscience.com>). Los criterios establecidos para considerar una identificación como válida fueron:

- a) La obtención de la secuencia de al menos un péptido de la misma proteína con un intervalo de confianza >95% ($p < 0.05$).
- b) La validación de una identificación potencialmente positiva con una única secuencia peptídica requirió una calificación de Mascot con un intervalo de confianza >99% ($p < 0.01$).

En todos los casos los espectros obtenidos fueron verificados manualmente.

VI. RESULTADOS

VI.1 Determinación de la apoptosis en las células AGS infectadas con *H. pylori*

VI.1.1 Observación microscópica de las células AGS infectadas con *H. pylori*

Previamente a la infección, la cantidad de células AGS por pozo (3.5 cm de diámetro) fue de $5.57 \pm 0.68 \times 10^6$ células. Dichas células se infectaron con una suspensión de *H. pylori* ajustada a 1.8 ± 0.050 a 625 nm equivalente a $4.02 \pm 0.11 \times 10^8$ bacterias viables/mL. Estos valores fueron considerados para realizar la infección de las células AGS a un índice de multiplicidad de 100 bacterias por célula.

Después de 24 h de infección, las bacterias adheridas a las células AGS fueron observadas en el microscopio mediante una tinción de Gram modificada. En dichos cultivos, se observaron, más de 10 bacterias adheridas por célula, lo cual equivale a más del 10% de la MOI con la que se infectaron las células inicialmente (1:100). Además, aproximadamente el 60% de las bacterias adheridas a las células AGS se encontraron en su forma bacilar (figura 4C).

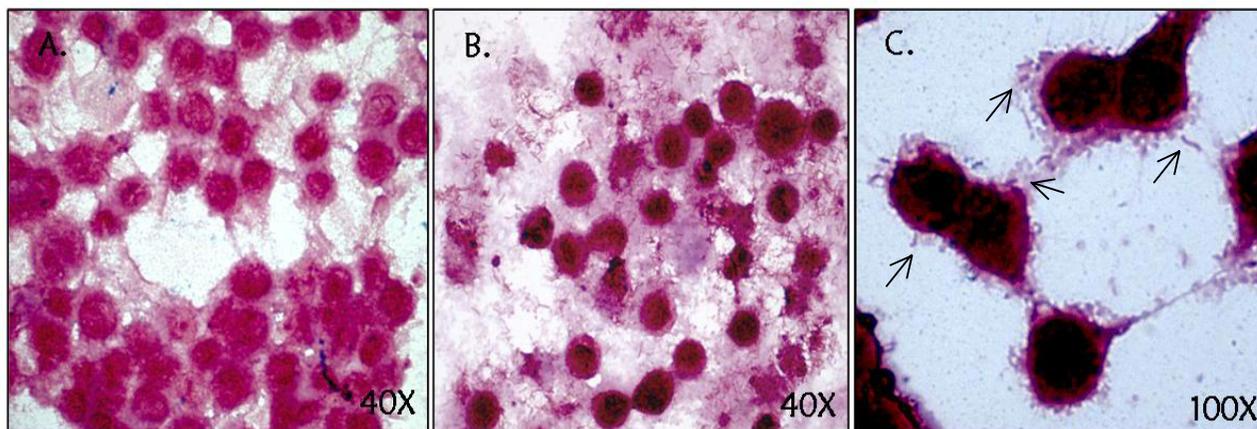


Figura 4. Células AGS sin infectar (A) e infectadas (B y C) con *H. pylori* 7C después de 24 horas. Las flechas señalan al microorganismo en su forma bacilar.

Por otro lado, también se observó una disminución del 40-50% en la confluencia de las células AGS infectadas con la cepa 7C de *H. pylori* en comparación con las células AGS sin infectar después de las 24 h de infección (figuras 4A y 4B).

VI.1.2 Detección de células AGS con condensación de cromatina

La condensación de la cromatina es uno de los eventos morfológicos tempranos de la apoptosis, por tanto, este fue uno de los eventos evaluados para detectar el tiempo de la inducción de la apoptosis en las células AGS debida a la infección por *H. pylori* 7C. A través de la tinción con yoduro de propidio (IP) y la observación en un microscopio de fluorescencia se detectaron las células con condensación de la cromatina en la periferia nuclear, además de características como la reducción en el tamaño celular y alteraciones en la morfología celular, que en conjunto, establecieron los parámetros de las células que fueron consideradas como apoptóticas^{80, 81}. Dichas características fueron observadas en un control positivo de células AGS expuestas a camptotecina, sustancia que funciona como un inductor de apoptosis, y se compararon con los cultivos de células AGS infectadas con un cultivo viable de *H. pylori* 7C, así como con un cultivo no viable de esta misma cepa (cepa tratada con formaldehído 0.6%).

Con el objetivo de encontrar el tiempo en el que se pudiera detectar un incremento significativo de células apoptóticas, se realizó la cuantificación de células AGS con condensación de cromatina a las 4, 6 y 8 horas post-infección. Sin embargo, la cantidad de células con condensación de cromatina no fue mayor del 15% en los cultivos de células AGS infectadas con *H. pylori* 7C; por lo que estos resultados no fueron significativamente diferentes de los valores determinados para el control de las células AGS sin infectar (figura 5).

De manera similar, las células infectadas con la cepa de *H. pylori* no viable no presentaron un porcentaje de células apoptóticas con diferencias significativas durante el ensayo en comparación con las células AGS sin infectar (figura 5).

Debido a lo anterior, la cantidad de células con condensación de cromatina se determinó a los tiempos de infección de 12, 18 y 24 horas. El incremento significativo ($p < 0.05$) de células AGS que mostraron condensación de cromatina en la periferia nuclear fue observado en las células AGS infectadas con *H. pylori* 7C a partir de las 12 horas en comparación con las células AGS sin infectar (figura 6).

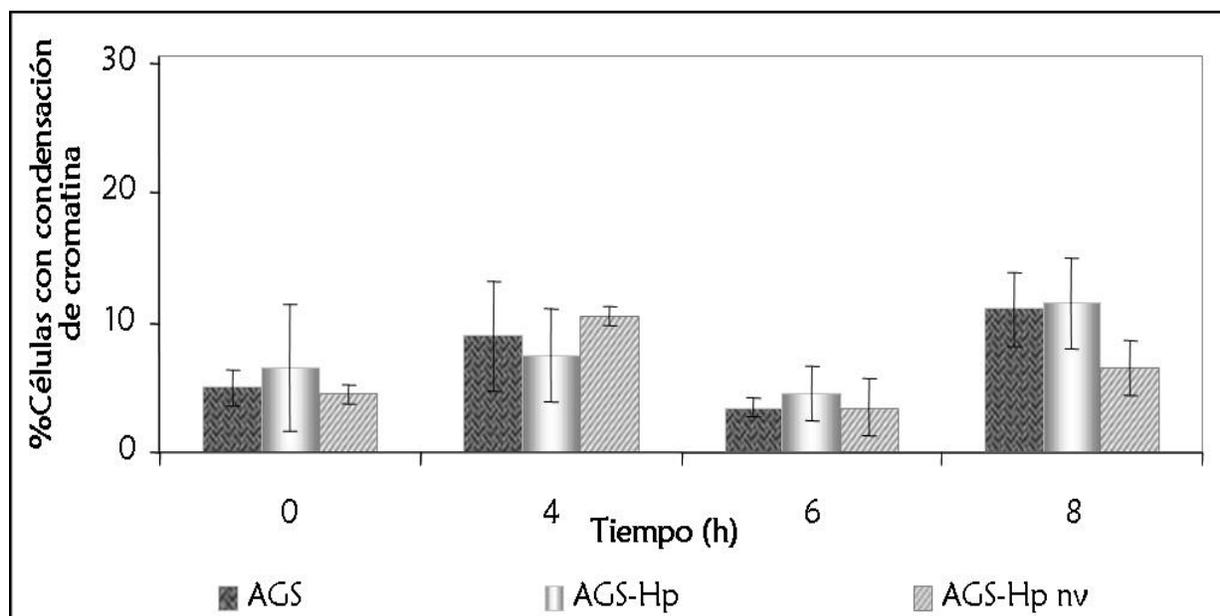


Figura 5. Determinación de la condensación de cromatina en células AGS sin infectar (AGS), células AGS infectadas con *H. pylori* 7C viable (AGS-Hp) y *H. pylori* 7C no viable (AGS-Hp nv) a las 4, 6 y 8 horas. Los datos mostrados son resultado de un ensayo con su respectivo duplicado. Los resultados fueron verificados por un segundo observador y fueron analizados por la prueba t de student.

La cantidad de células con cambios morfológicos celulares, reducción del tamaño celular así como la presencia de cuerpos apoptóticos y disminución en la confluencia celular fue más notable a las 18 y 24 horas post-infección (figura 7).

Los porcentajes de células con condensación de cromatina en los cultivos infectados con *H. pylori* fueron similares a los obtenidos en las células expuestas a camptotecina, durante los tres tiempos de infección. En contraste, el porcentaje de células con condensación de cromatina en los cultivos de células infectadas con la cepa *H. pylori* 7C no viable no mostró diferencias significativas comparado con control de células AGS sin infectar en los tres tiempos del seguimiento (figura 6).

De esta forma, para detectar los factores de *H. pylori* que pudieran estar interviniendo en el incremento en la apoptosis de las células AGS durante la infección, se estudiaron los cultivos

celulares infectados durante 12 h, tiempo en el que el incremento en el porcentaje de células AGS con condensación de cromatina comenzó a ser significativo.

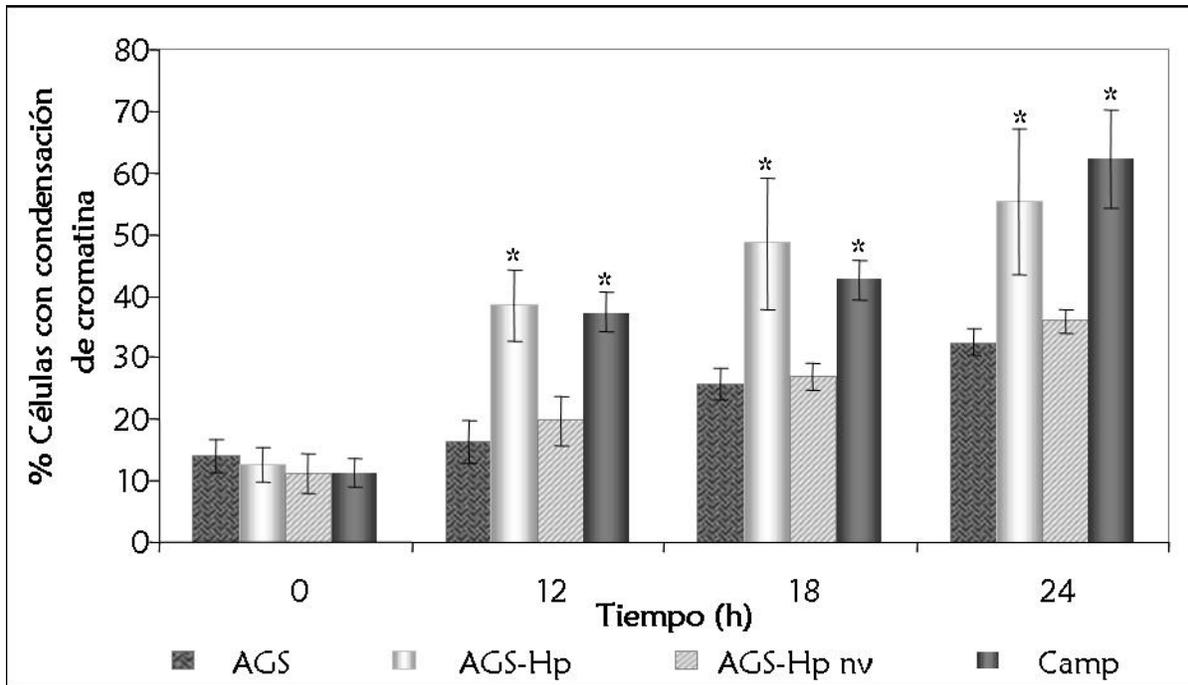


Figura 6. Determinación de la condensación de cromatina en células AGS sin infectar (AGS), células AGS infectadas con *H. pylori* 7C viable (AGS-Hp) y *H. pylori* 7C no viable (AGS-Hp nv) a las 12, 18 y 24 horas. Los datos mostrados son resultado de dos ensayos independientes con sus respectivos duplicados, además de ser verificados por un segundo observador. * $p < 0.05$ comparado con las células AGS sin infectar.

Mediante la tinción con IP, fue posible observar, en algunos casos, a las bacterias adheridas a las células AGS. A las 12 h post-infección, se observó que, aún cuando las condiciones de incubación fueron aeróbicas, la forma bacilar se encontró predominantemente en los cultivos de células AGS infectados con la forma viable de *H. pylori* 7C. Como se puede observar en la figura 8, tanto las formas bacilares como las formas cocoides fueron capaces de adherirse a las células AGS a dicho tiempo del ensayo.

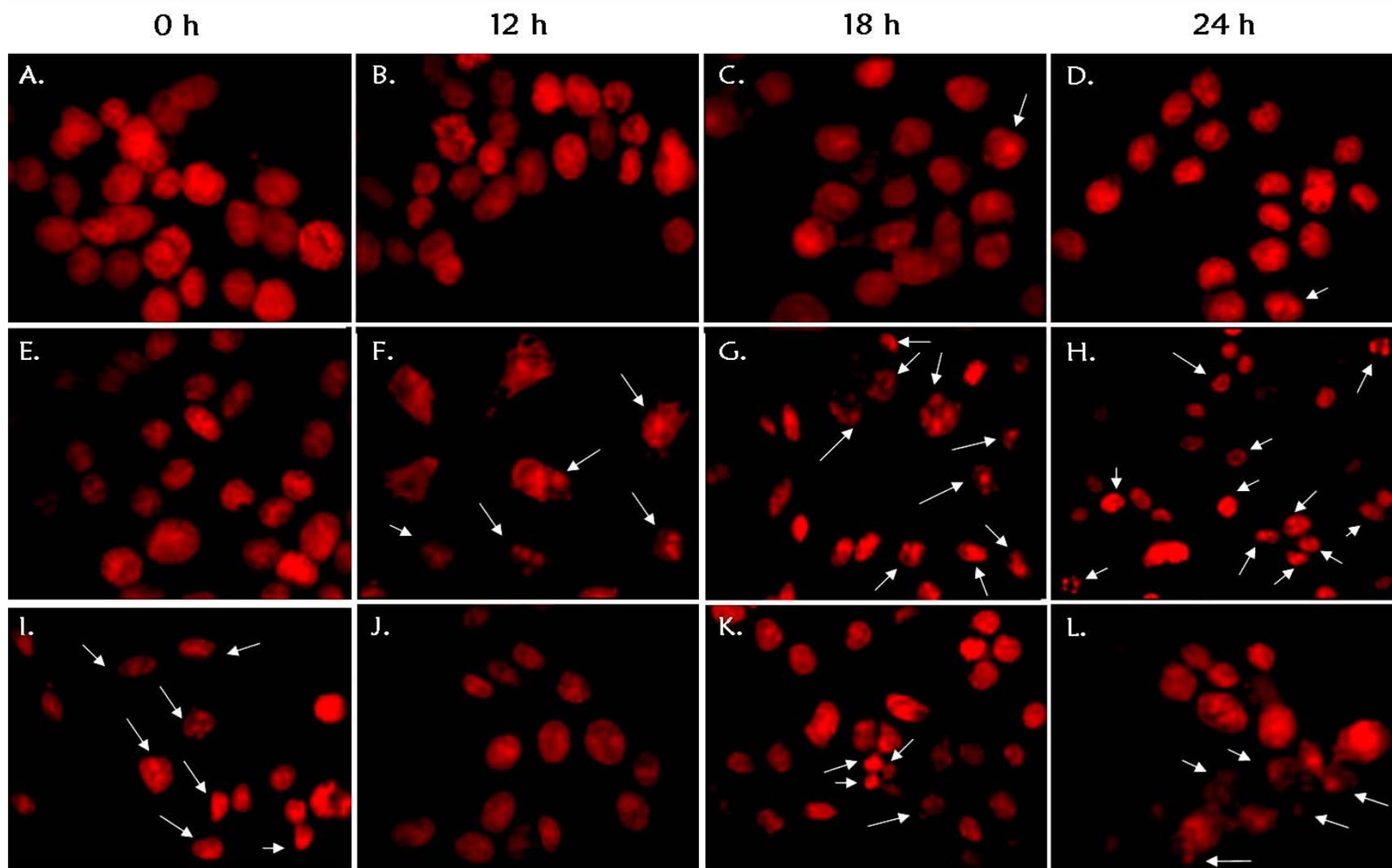


Figura 7. Condensación de cromatina en células AGS sin infectar (A-D), células AGS infectadas con *H. pylori* 7C (E-H) y de las células AGS expuestas a *H. pylori* 7C no viable (J-L), después de 0, 12, 18 y 24 horas. (I) Células AGS con condensación de cromatina expuestas a camptotecina durante 24 h (control positivo). Las flechas muestran las células con condensación de cromatina presentes en cada caso.

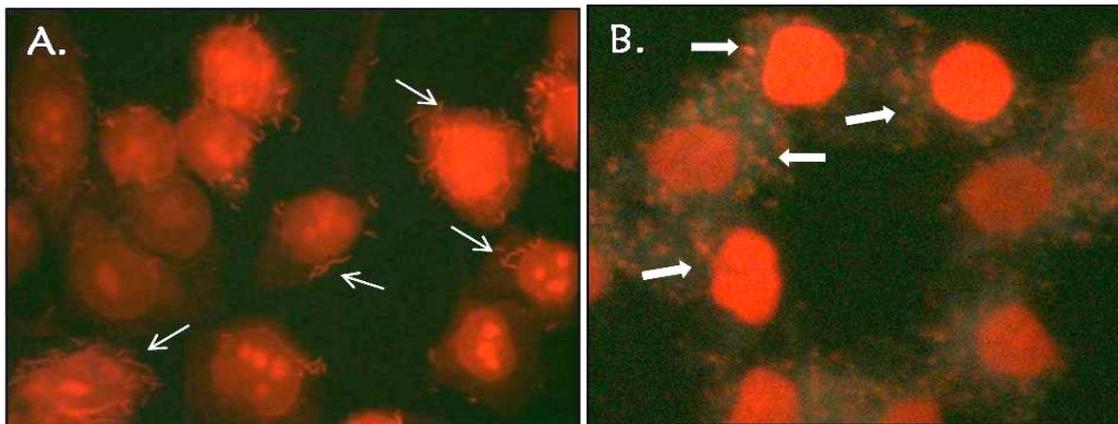


Figura 8. Células AGS infectadas con *H. pylori* 7C (A.) en su forma viable y (B.) en su forma no viable a las 12 h. En flechas delgadas se muestran algunas formas bacilares; y en flechas gruesas se muestran algunas formas cocoides adheridas a las células AGS.

VI.1.3 Determinación de la actividad de la caspasa-3

Para confirmar que el incremento en el porcentaje de células con condensación de cromatina observado a las 12 horas de incubación en los cultivos de células AGS infectados con *H. pylori* era debido a la inducción de apoptosis, se determinó la actividad de la caspasa-3, una molécula efectora de la apoptosis.

La actividad de la caspasa-3 detectada en los extractos proteicos de las células AGS infectadas con *H. pylori* 7C se encontró aumentada 15 veces más que en las células AGS sin infectar ($p < 0.05$). Por otra parte, las células AGS infectadas con *H. pylori* 7C no viable presentaron una actividad de la caspasa-3 similar al de las células AGS no infectadas. La validación de estos resultados se realizó mediante el uso de un control de células AGS expuestas a camptotecina, el cual mostró una actividad 33 veces mayor a la actividad basal observada en las células AGS control (figura 9).

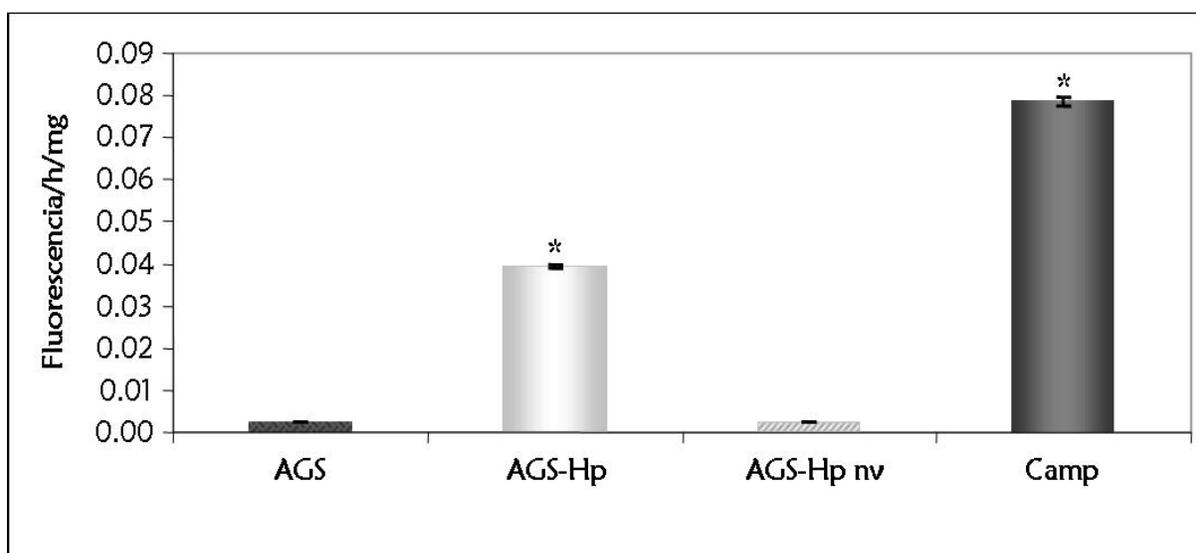


Figura 9. Determinación de la actividad de caspasa-3 en las células AGS infectadas con *H. pylori* 7C viable (AGS-Hp) y con *H. pylori* 7C no viable (AGS-Hp nv) a las 12 h post-infección. Se emplearon como control negativo un cultivo de células AGS sin infectar (AGS) y como control positivo un cultivo de células AGS expuestas a camptotecina 5 μ M (Camp). Los resultados fueron obtenidos de tres ensayos independientes. * $p < 0.05$ (t de student) comparado con las células AGS sin infectar.

Debido al incremento significativo tanto de células con condensación de cromatina como de la actividad de la caspasa-3 en los cultivos de células AGS infectados con *H. pylori* 7C a las 12 horas, se seleccionó este tiempo de infección para los ensayos a partir de los cuales se realizó la extracción de proteínas y la elaboración de los geles de doble dimensión.

VI.2 Determinación de la expresión diferencial de *H. pylori* durante la inducción de apoptosis de las células AGS.

VI.2.1 Electroforesis de doble dimensión (2-DE)

La obtención de los extractos proteicos de la cepa 7C de *H. pylori* después de las 12 h de infección, tiempo en el que se observó un incremento significativo en la apoptosis de las células AGS, se realizó mediante el empleo de una solución amortiguadora de lisis. Este método permitió la recuperación de las proteínas bacterianas y celulares sin degradación de las mismas como se pudo observar en geles de una dimensión (figura 9) y en una concentración suficiente (2-5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) para realizar los geles de doble dimensión.

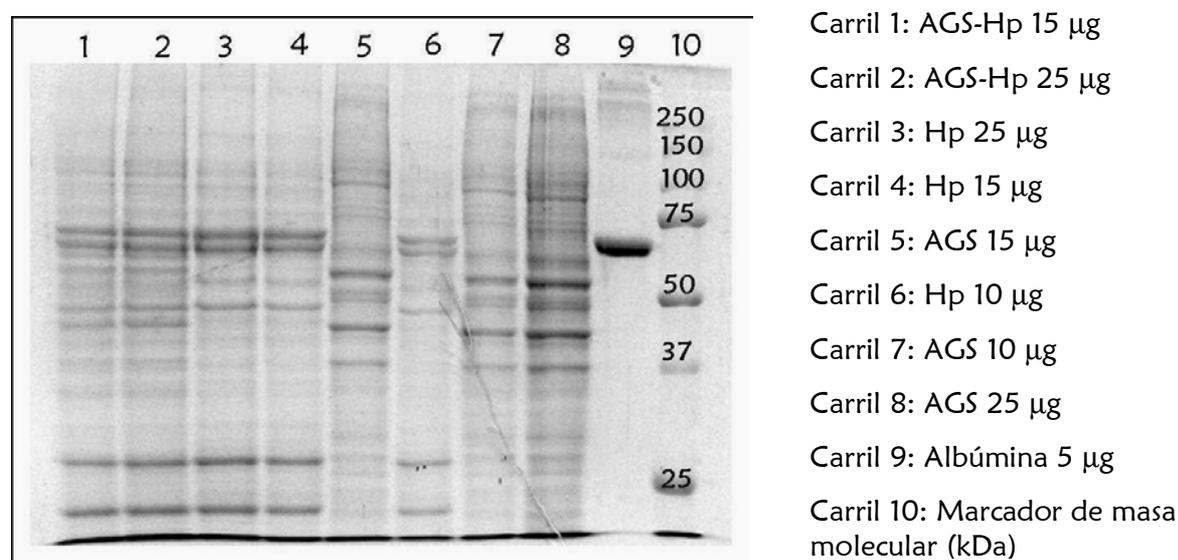


Figura 10. Gel de una dimensión (poliacrilamida 12.5%) teñido con azul de coomassie R-250 con 10, 15 y 25 μg del extracto proteico de los cultivos puros de las células AGS (AGS), de *H. pylori* 7C (Hp) y de la infección (AGS-Hp).

Por otra parte, en los geles de una dimensión se observó que las proteínas de *H. pylori* se encontraban en una proporción mayor que las proteínas de las células AGS en los extractos obtenidos a partir de la infección. La visualización de la intensidad de las bandas correspondientes a las proteínas bacterianas más abundantes en los extractos procedentes de la infección, permitió la estimación cualitativa de la proporción de proteínas bacterianas con respecto a las celulares de 1.5:1 (figura 10). De tal forma que para la detección de la expresión proteica diferencial de la cepa 7C de *H. pylori* durante el evento apoptótico inducido en las células AGS, se elaboraron, inicialmente, geles de doble dimensión de formato mediano (16 x 18 cm, tiras IPG 11 cm) empleándose 75 μg del extracto proteico de *H. pylori* y 50 μg del extracto de las células AGS para la comparación con los geles de la infección en los que se utilizó 100 μg del extracto proteico.

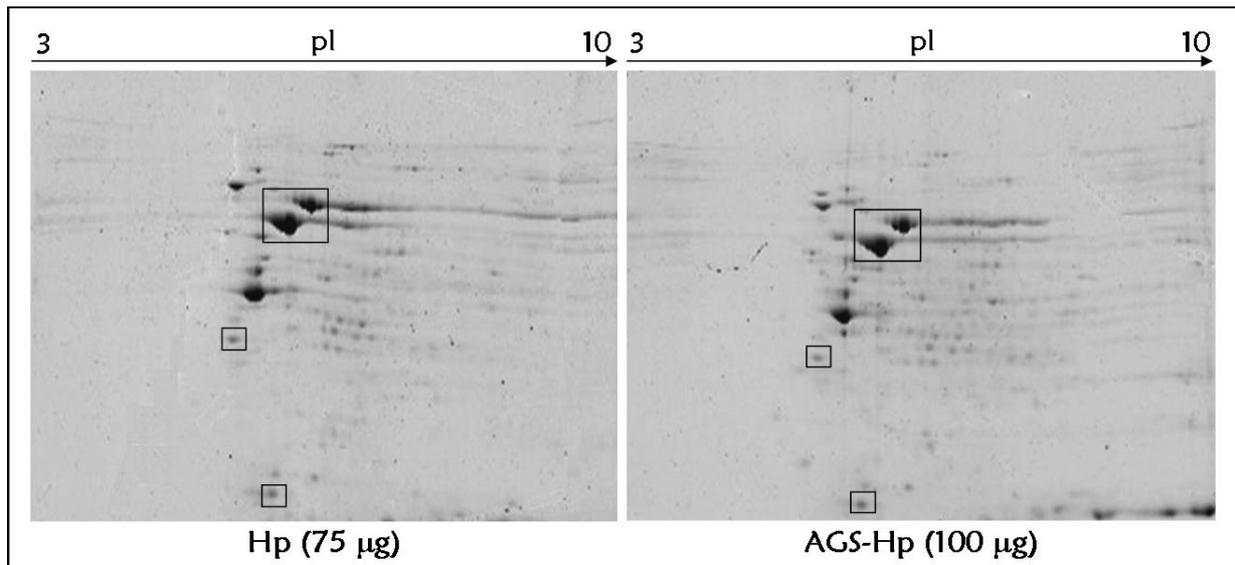


Figura 11. Geles 2-D de formato mediano (16 x 18 cm, tiras IPG 11 cm) teñidos con azul de coomassie coloidal. En los cuadros se muestran algunas proteínas que presentaron una intensidad semejante tanto en el cultivo puro de *H. pylori* (Hp) como en la infección (AGS-Hp) bajo las condiciones empleadas.

De esta manera, bajo las condiciones empleadas, los geles de doble dimensión (2-D) de formato mediano teñidos con azul de coomassie coloidal mostraron un patrón de proteínas de *H. pylori* cuya intensidad fue similar tanto en el cultivo puro de *H. pylori* como en la infección que pudo emplearse como referencia para detectar los patrones de incremento o disminución en la expresión proteica (figura 11).

La plantilla o el gel maestro de las células AGS infectadas con *H. pylori* 7C así como el de los cultivos puros respectivos, empleados como controles durante el análisis de la expresión proteica de *H. pylori*, se obtuvieron a partir de los extractos proteicos de dos ensayos independientes y geles de doble dimensión de gran formato (23 x 30 cm, tiras IPG 17 cm) teñidos con nitrato de plata, manteniendo las proporciones de concentración proteica antes descritas.

A través del análisis mediante el programa PD-QUEST se detectaron 468 manchas presentes en ambas réplicas de los geles 2-D de los cultivos individuales de *H. pylori* 7C y que, junto con las manchas detectadas sólo en una de las réplicas, integraron un gel maestro (gel Hp) con una cuenta total de 586 manchas (figura 12 y tabla 1). En el caso de las células AGS, el número de manchas presentes en ambas réplicas fue de 510, las cuales integraron un gel maestro (gel AGS) con un número total de manchas de 554 (figura 11 y tabla 2). Así mismo, el

número total de puntos presentes en el gel maestro de las células infectadas con *H. pylori* 7C (gel AGS-Hp) fue de 719, de los cuales 619 manchas fueron detectadas en ambas réplicas (figura 12 y tabla 1).

Como se observa en la figura 12, la mayoría de los puntos no comunes entre las réplicas de los cultivos individuales de *H. pylori* 7C corresponden a proteínas de alta masa molecular que forman parte de una serie de puntos localizados en forma horizontal o vertical por lo que pudieran corresponder a una misma proteína. Este patrón se observó también en los geles procedentes a la infección.

Tabla 1. Análisis de los geles de doble dimensión teñidos con nitrato de plata mediante el programa PD-QUEST.

Gel Maestro	<i>H. pylori</i> 7C	Células AGS	AGS- <i>H. pylori</i> 7C (Infección)
No. total de manchas	586	554	719
No. manchas en ambas réplicas	468	510	619
%CV*	17.4	7.9	3.9
Manchas detectadas en el gel de la infección	435 (60.5%)	253 (35.2%)	719 (100%)

*El grado de variación técnica entre cada uno de los ensayos fue determinado mediante el cálculo del coeficiente de variación a partir de los datos obtenidos de la normalización a través del número total de puntos válidos para cada réplica (%CV).

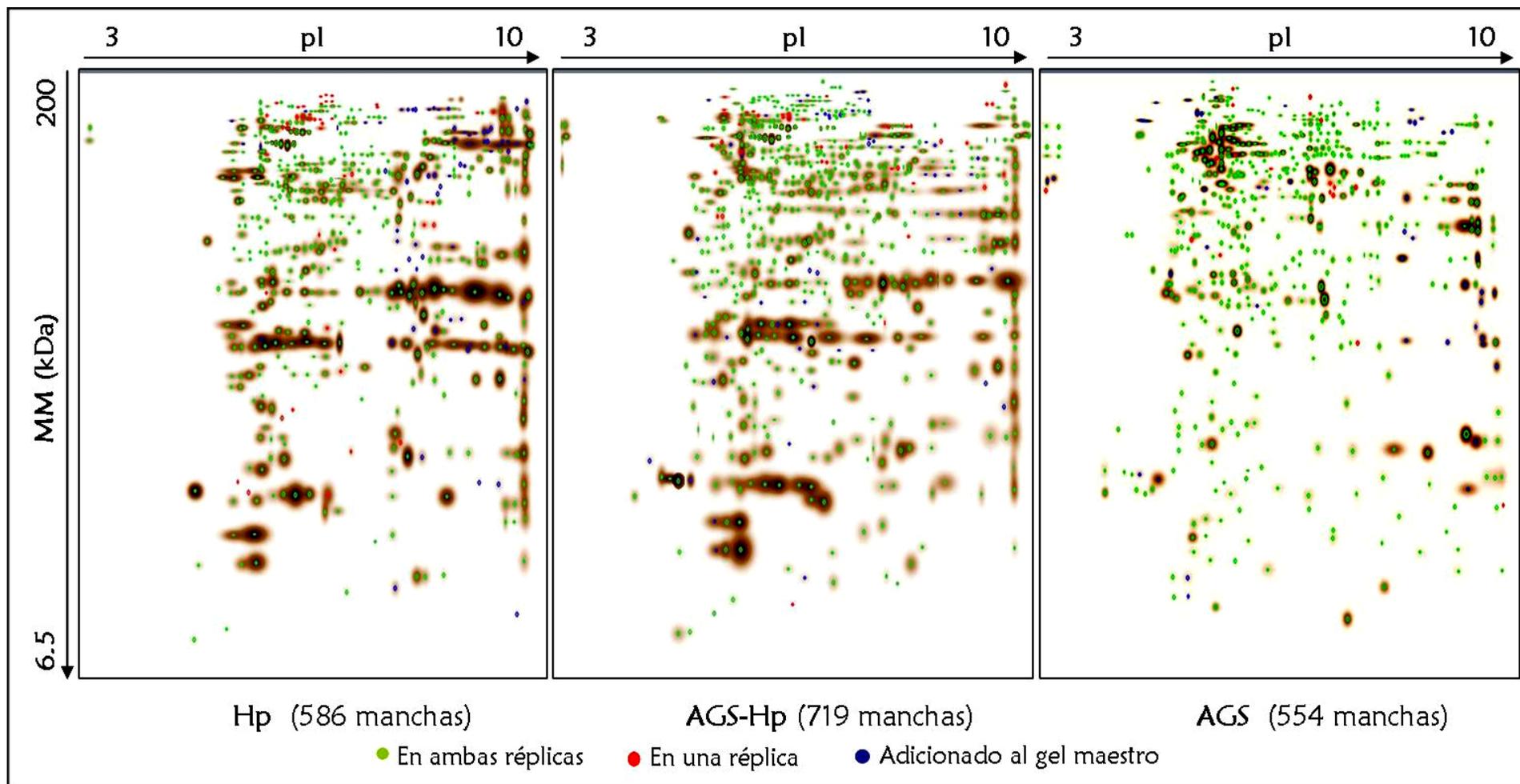


Figura 12. Geles maestro de los extractos proteicos obtenidos de *H. pylori* 7C (Hp), de las células AGS (AGS) y de la infección durante el evento de apoptosis inducido en las células AGS (AGS-Hp). pI, punto isoeléctrico; MM, masa molecular. En puntos verdes se muestran los puntos presentes en ambas réplicas para cada gel maestro, en puntos rojos se muestran los puntos presentes solo en una réplica y en puntos azules, los puntos adicionados al gel maestro procedentes de la otra réplica.

Las réplicas para cada caso fueron normalizadas de acuerdo al número de puntos válidos en el gel, antes de realizar la comparación entre los geles maestro, cuyos valores no presentaron un porcentaje del coeficiente de variación mayor al 30% (tabla 1).

Mediante la comparación de los geles maestros de los cultivos puros (AGS y Hp) con el gel maestro de la infección durante la apoptosis de las células AGS (AGS-Hp), se observó que aproximadamente el 35% del número total de manchas del gel maestro AGS-Hp correspondieron a las manchas detectadas en el gel maestro de las células AGS, mientras que el 60% se detectó también en el gel maestro de *H. pylori* 7C (tabla 1 y figura 13). Aproximadamente el 4% (~31 manchas) de las manchas detectadas en el gel maestro de la infección no se detectaron en ninguno de los geles de los cultivos individuales.

La distribución de las proteínas detectadas en los geles AGS-Hp tanto en masa molecular como en punto isoeléctrico fue, en su mayoría, de 21.0 a 50.9 kDa y en un intervalo de pH de 5.1 a 7.0. Las proteínas de las células AGS se localizaron principalmente en un intervalo de pH de 5.1 a 6.0 y de 31.0 a 40.9 kDa de masa molecular, mientras que las proteínas de *H. pylori* 7C se distribuyeron en un intervalo de pH de 6.1 a 7.0 y de 41 a 50.9 kDa (anexos I y II).

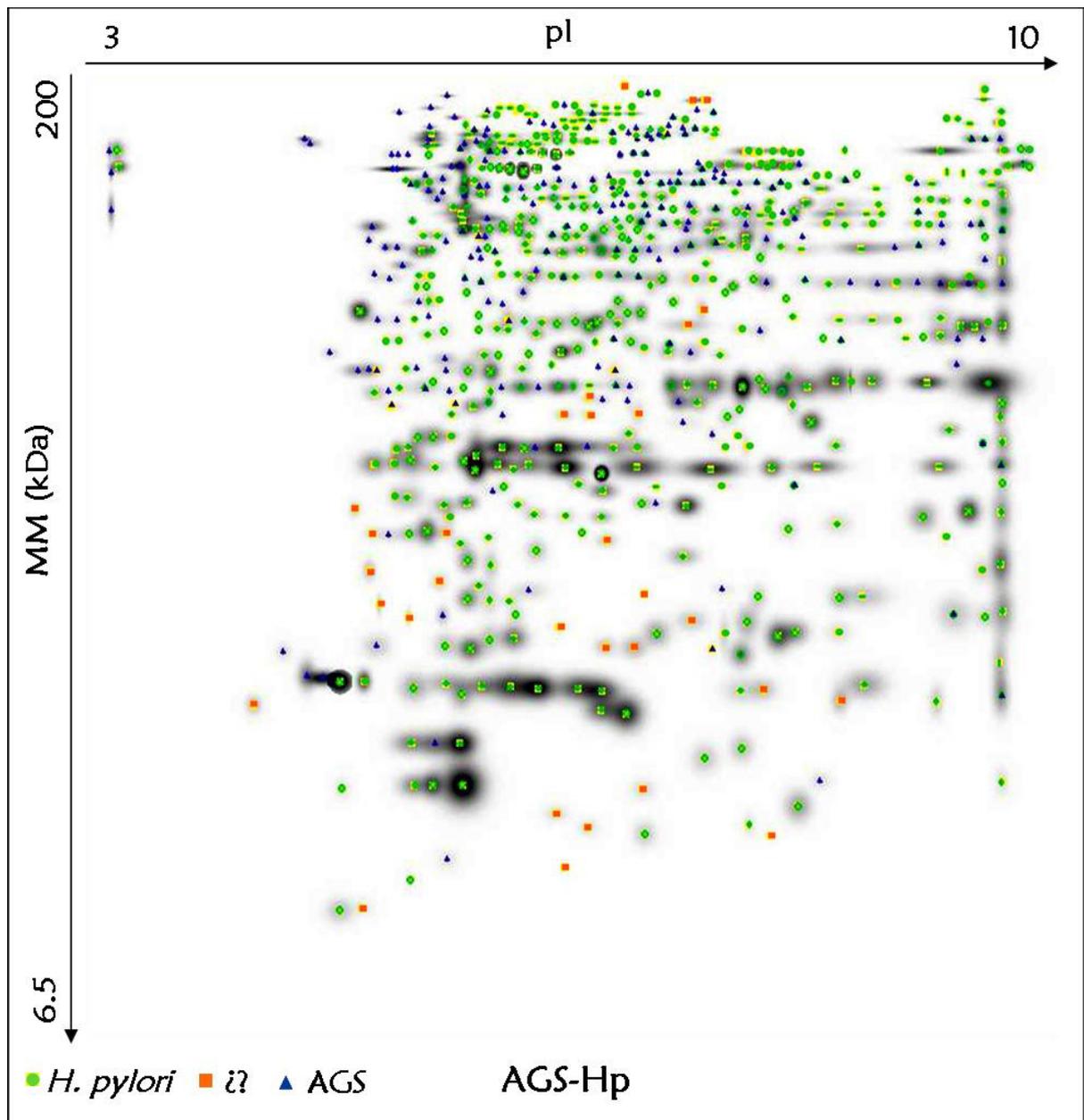


Figura 13. Análisis comparativo del gel maestro de la infección durante la apoptosis de las células AGS mediante el programa PD-Quest v 8.0. En cruces verdes se muestran los puntos correspondientes a *H. pylori* 7C; en cuadros amarillos están indicados los puntos presentes únicamente durante la inducción de la apoptosis en las células AGS (?) y, en triángulos azules, se muestran los puntos correspondientes a las células AGS.

Para la detección de las proteínas de *H. pylori* 7C, presentes durante la apoptosis de las células AGS expresadas cuantitativamente de forma diferencial, se realizó la tinción con azul de coomassie coloidal (G-250). Se detectaron 409 manchas en el gel maestro de la infección, de los cuales 250 (61%) correspondieron a *H. pylori* 7C. La normalización de cada una de las réplicas para ambos casos, se realizó mediante la densidad total del gel, cuyos valores no presentaron una variación mayor al 30% (tabla 2).

Tabla 2. Análisis de los geles de doble dimensión teñidos azul de coomassie coloidal (G-250) mediante el programa PD-QUEST.

Gel Maestro	<i>H. pylori</i> 7C	AGS- <i>H. pylori</i> 7C (Infección)
No. total de manchas	352	409
No. manchas en ambas réplicas	268	354
%CV*	22.8	5.6
Manchas detectadas en el gel de la infección	250 (61.1%)	409 (100%)

*El grado de variación técnica entre cada uno de los ensayos fue determinado mediante el cálculo del coeficiente de variación a partir de los datos obtenidos de la normalización de la densidad total del gel para cada réplica (%CV).

A partir de los 250 puntos correspondientes a *H. pylori* 7C en el gel maestro de la infección, se seleccionaron 203 puntos, los cuales fueron detectados en las réplicas de los cultivos individuales de *H. pylori* y en las réplicas de la infección, cumpliéndose así con el primer criterio establecido para el análisis de la expresión diferencial.

El número de manchas que mostraron una intensidad media mayor o igual a 2 veces en los geles de la infección en relación al gel de *H. pylori* 7C fue de 50 manchas (24.6% del total de las manchas de *H. pylori* analizados) que podrían comprender el patrón de sobreexpresión proteica de *H. pylori* durante la inducción de la apoptosis en las células AGS. Así mismo, se observó una disminución en la intensidad de 32 manchas (16%) de *H. pylori* 7C menor o igual a 2 veces en los geles de la infección, los cuales comprenderían un patrón de expresión disminuida (figura 14).

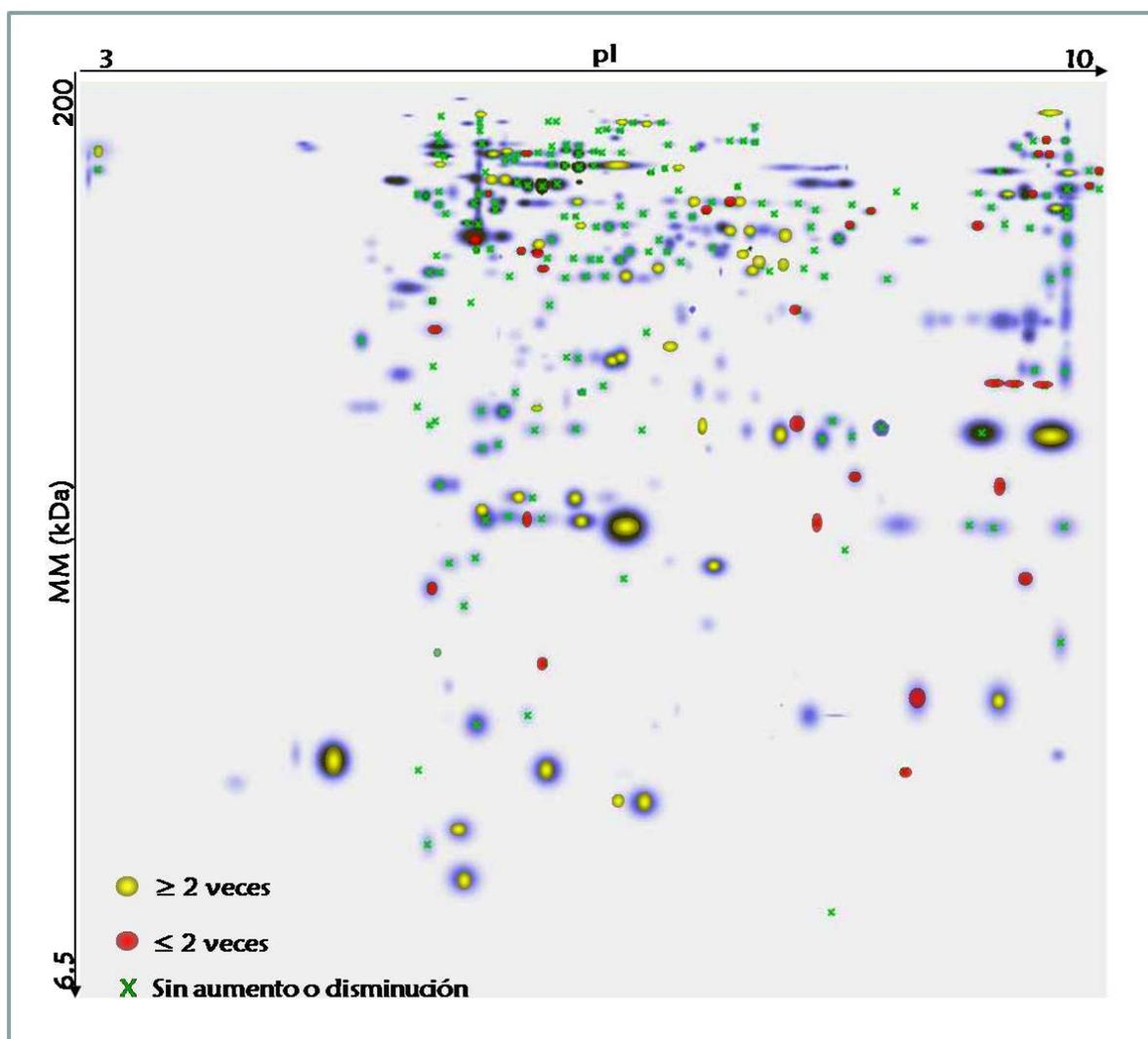


Figura 14. Manchas correspondientes a *H. pylori* 7C con un incremento (puntos amarillos) o disminución (puntos rojos) y sin ningún cambio (cruces verdes) en su intensidad media durante la inducción de la apoptosis de las células AGS con respecto al cultivo bacteriano individual. En la figura se muestra el gel maestro de la infección obtenido de dos gels de gran formato (20 x 23 cm) teñidos con azul de coomassie coloidal. Las manchas no marcadas son los correspondientes a las células AGS o fueron detectados sólo durante la infección.

Trece puntos correspondientes al perfil proteico de *H. pylori* 7C con un incremento en su intensidad media mayor o igual a 2 veces bajo las condiciones del evento apoptótico inducido en las células AGS se identificaron por espectrometría de masas. Así mismo, se seleccionaron 3 manchas cuya intensidad no fue mayor ni menor a 2 veces. La selección de dichas manchas se realizó con base a su fácil localización y a su separación de las proteínas pertenecientes a las células AGS, además de su incremento en la intensidad de forma visual

(figuras 14 y 15). Por tanto, como se puede observar en la figura 15, el incremento en la intensidad de las manchas seleccionadas para su identificación no se debió a la suma de las intensidades de las manchas de las proteínas procedentes de las células humanas enmascaradas por las proteínas bacterianas.

Cada uno de los péptidos secuenciados, se comparó tanto con la base de datos reportada para las células de humano como para los del reino *Eubacteria*. Ninguno de los péptidos secuenciados compartió una secuencia significativa con alguno de los péptidos reportados para las proteínas de células humanas de acuerdo con los criterios empleados. Cada una de las proteínas se identificó de acuerdo a la comparación de las secuencias obtenidas por espectrometría de masas con los péptidos reportados en la base de datos NCBI⁷⁹, los cuales obtuvieron un puntaje global mayor al establecido para cada péptido.

Algunas de las proteínas de *H. pylori* 7C identificadas fueron la flavodoxina (FldA), la tiorredoxina (TrxA), la subunidad alfa de la ureasa (UreA) y la proteína asociada a la citotoxina o antígeno inmunodominante asociado a citotoxicidad (CagA). Cuatro de las manchas seleccionadas correspondieron a dos proteínas diferentes (tabla 3).

Como se puede observar en la tabla 3, las proteínas identificadas se encuentran distribuidas en diferentes áreas celulares de *H. pylori*.

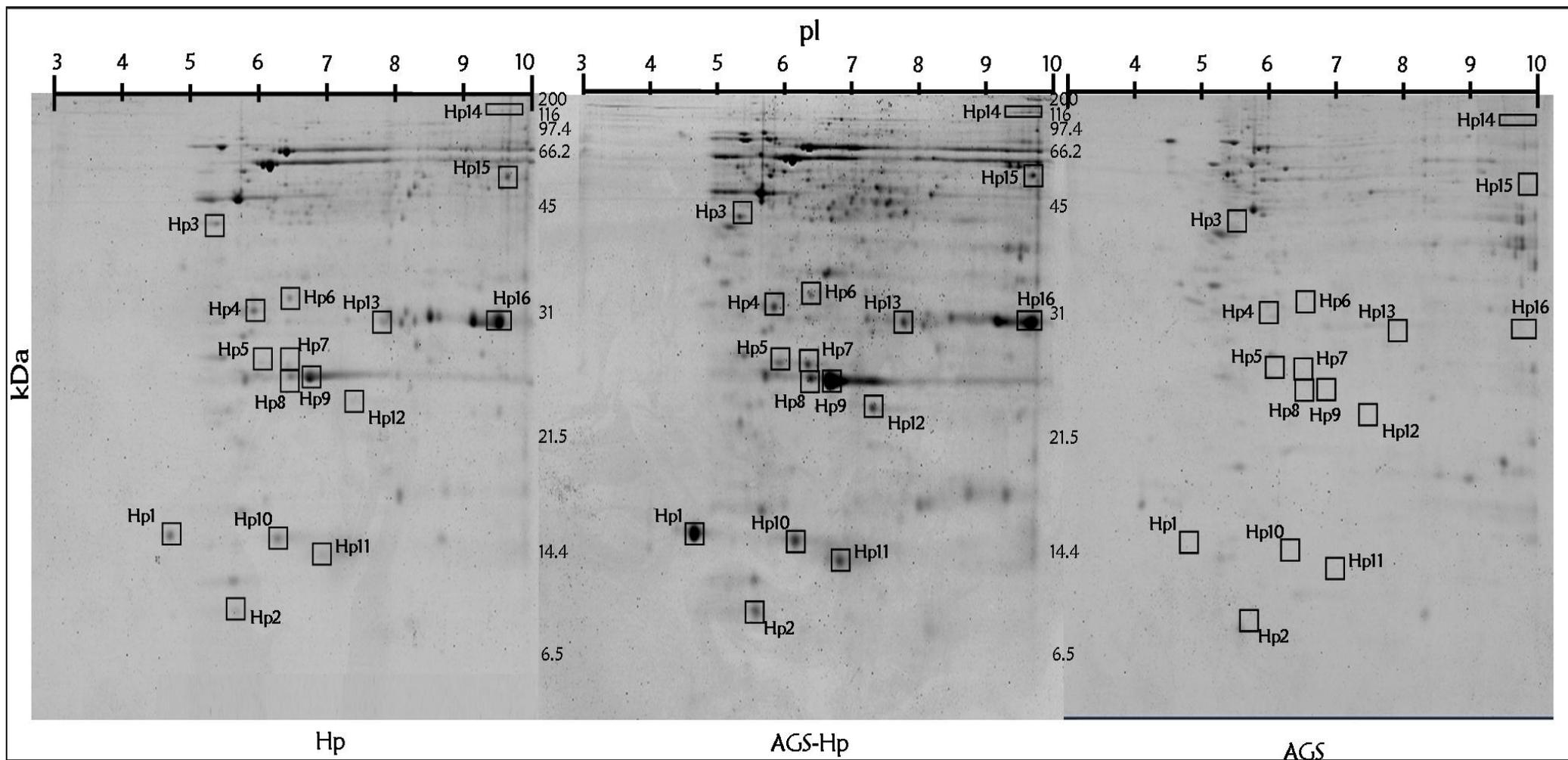


Figura 15. Geles de doble dimensión teñidos con azul de coomassie coloidal de *H. pylori* 7C (Hp) durante la inducción de la apoptosis en células AGS (AGS-Hp). En cuadros se muestran los puntos seleccionados para la identificación de proteínas por espectrometría de masas.

Tabla 3. Localización celular, función e incremento en la intensidad media de las proteínas de *H. pylori* 7C identificadas por espectrometría de masas (LC/MS/MS) durante la inducción de la apoptosis en las células AGS.

No. MANCHA	IDENTIDAD	PUNTAJE GLOBAL	No. PÉPTIDOS IDENTIFICADOS	%SECUENCIA	*FUNCIÓN	INCREMENTO
PROTEÍNAS LOCALIZADAS EN CITOSOL						
Hp3	Subunidad α de la RNA polimerasa	167	3	9	Almacenamiento de información y procesamiento	1.5
Hp4	Hidrogenasa HypB	123	2	8	Intermediario central del metabolismo	1.2
Hp10	Proteína activadora de neutrófilos (NapA)	450	8	49	Procesos celulares: desintoxicación	2.9
Hp11		133	2	19		7.0
Hp12	Proteína moduladora de la actividad de fármacos (Mda66)	78	1	6	Procesos celulares: producción de toxinas y resistencia	10.0
PROTEÍNAS LOCALIZADAS EN MEMBRANA CELULAR						
Hp5	Proteína de membrana externa (Omp22)	79	1	7	Estructura de membrana celular	8.1
Hp6	Proteína de unión a aminoácidos (CjaA)	166	3	14	Complejos de sistema de transporte periplásmico	1.5
Hp13	Homólogo de hemaglutinina de unión a neuraminil-lactosa (HpaA)	192	4	16	Estructura de superficie	3.0
PROTEÍNAS LOCALIZADAS EN CITOSOL Y ASOCIADAS A MEMBRANA CELULAR						
Hp7	Superóxido dismutasa (SodB)	246	3	15	Procesos celulares: desintoxicación	5.2

Tabla 3. (Continuación...)

No. MANCHA	IDENTIDAD	PUNTAJE GLOBAL	No. PÉPTIDOS IDENTIFICADOS	%SECUENCIA	*FUNCIÓN	INCREMENTO
Hp8	Alquilhidroxiperóxido reductasa (TsaA)	389	6	35	Procesos celulares: desintoxicación	2.6
Hp9		768	12	55		3.5
Hp16	Subunidad α de la ureasa (UreA)	537	9	30	Intermediario central del metabolismo	2.8
PROTEÍNAS DE SECRECIÓN						
Hp1	Flavodoxina (FldA)	149	4	25	Metabolismo energético: transporte de electrones	6.7
Hp2	Tiorredoxina (TrxA)	302	4	48	Procesos celulares y señalización	7.2
Hp14	Proteína asociada a la citotoxina (CagA)	162	3	7	Degradación de proteínas, péptidos y glicopéptidos	2.4
Hp15	Serina proteasa (HtrA)	82	2	2	Patogénesis	2.3

Las manchas 10 y 11 y 8 y 9 correspondieron a una misma proteína. *Clasificación establecida por el Instituto de Investigación Genómica (TIGR).

Como se puede observar en la figura 16, la mayoría de las proteínas de *H. pylori* 7C identificadas mostraron un patrón de sobre-expresión durante la apoptosis inducida en las células AGS; sin embargo, no todas cumplieron con el segundo criterio establecido para determinar la expresión diferencial. A partir de los 203 puntos presentes en las réplicas analizadas, se seleccionaron 79 puntos que tuvieron un coeficiente de variación menor o igual al 31.2%, valor que consideró que los efectos biológicos observados no se debieron a variaciones técnicas ⁷⁸.

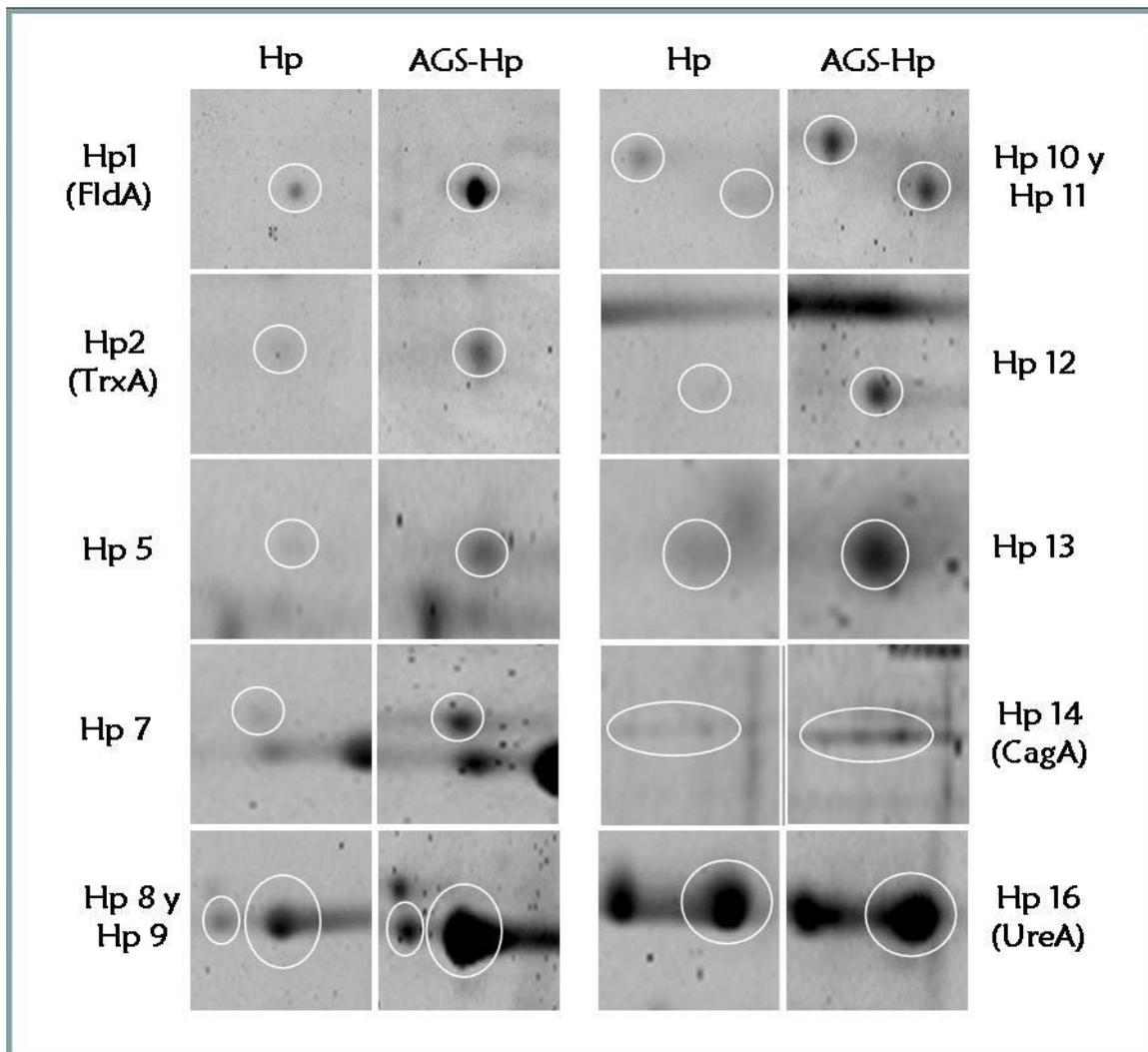


Figura 16. Proteínas de *H. pylori* 7C que mostraron una intensidad media mayor durante la inducción de la apoptosis de las células AGS y que fueron identificadas por espectrometría de masas.

De los 79 puntos seleccionados para la determinación de la expresión diferencial de *H. pylori*, se observó que 19 puntos mostraron un incremento y 5 una disminución en la intensidad media que fueron significativos y que incluyeron el patrón de sobre-expresión y de

reducción en la expresión de *H. pylori* 7C durante la inducción de la apoptosis de las células AGS. En la figura 17 se muestra la intensidad media de los puntos analizados correspondientes a los geles de los cultivos bacterianos individuales y a los ensayos de infección realizados, así como los puntos que presentaron diferencias significativas y que incluyeron a 6 puntos correspondientes a 5 de las proteínas identificadas (Hp1, Hp8-9, Hp13, Hp14 y Hp16).

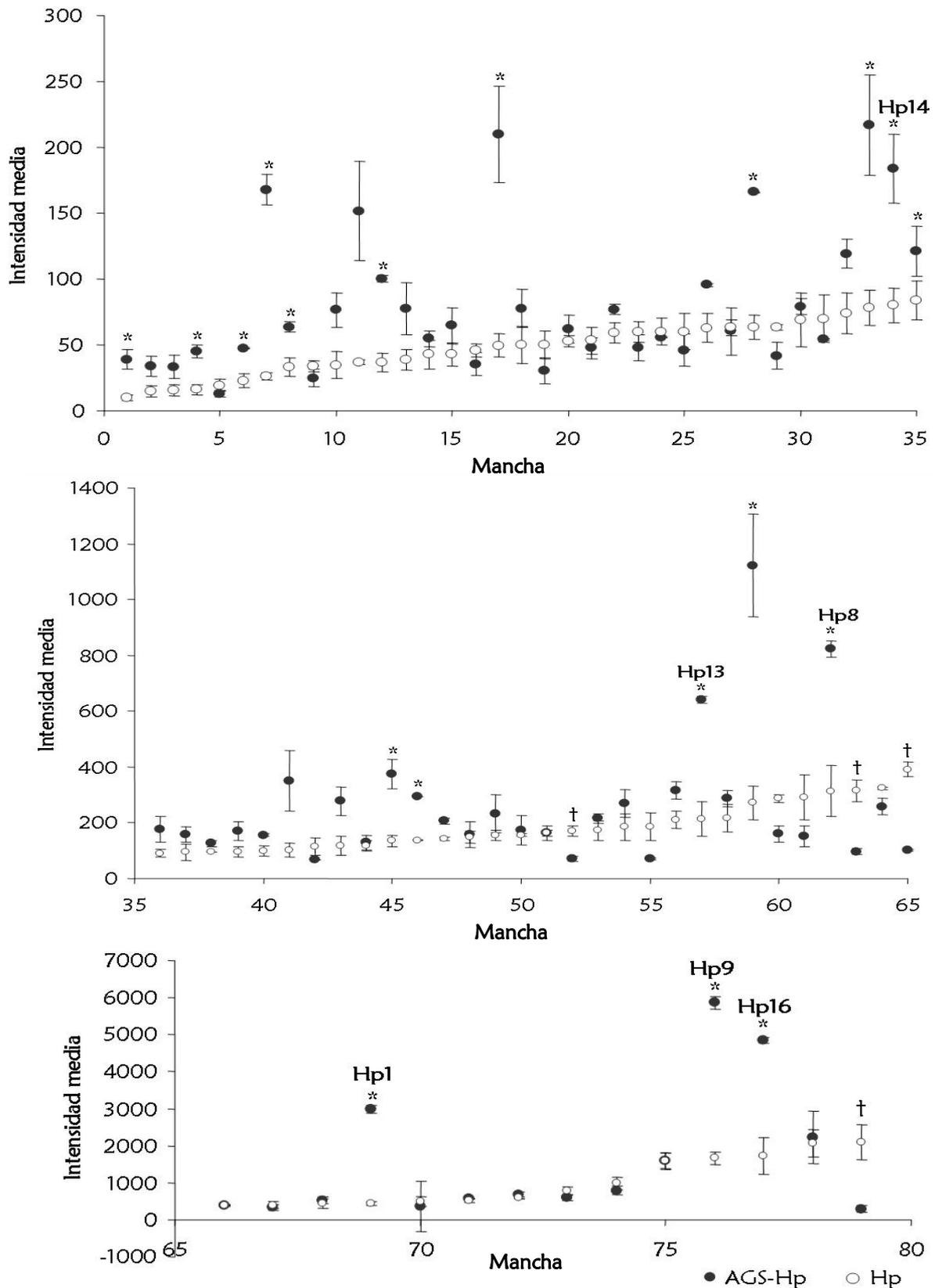


Figura 17. Manchas analizadas para la determinación de la expresión diferencial de *H. pylori* 7C durante la inducción de la apoptosis en las células AGS. * $p < 0.05$ en las manchas con incremento y † $p < 0.05$ en los puntos con disminución en la intensidad con respecto al cultivo bacteriano individual.

VII. DISCUSIÓN

Estudios *in vivo* han mostrado una asociación entre la infección por *H. pylori* y el incremento en la proliferación de células epiteliales gástricas como respuesta al daño y muerte celular^{82, 83}. Sin embargo, estudios *in vitro* han mostrado que la exposición directa de las células epiteliales gástricas a *H. pylori* está asociada con una inhibición en el crecimiento celular^{51 - 53}. La evidencia de que *H. pylori* induce apoptosis ha sido obtenida principalmente de dos tipos de estudios: la identificación de células apoptóticas en biopsias del epitelio gástrico de individuos infectados con *H. pylori*, y la inducción de apoptosis en células del epitelio gástrico cultivadas *in vitro*^{25, 53}. En el presente estudio se emplearon cultivos *in vitro* de la línea de células epiteliales gástricas AGS, la cual ha sido empleada en múltiples estudios para caracterizar la infección por *H. pylori*, así como los efectos de algunos de sus factores de virulencia. El empleo de líneas celulares como las AGS tiene algunas desventajas como el hecho de sólo permitir la observación de los efectos producidos por *H. pylori* durante un tiempo relativamente corto debido al tiempo de vida media de la línea celular en un ensayo de infección (~24 h); además, siendo líneas celulares tumorales que se encuentran aisladas de la interacción tridimensional normal con otras células y de la matriz extracelular, este tipo de células no son representativas de las células normales no transformadas del epitelio gástrico²⁵. Sin embargo, las células AGS y otras líneas celulares se han empleado por su capacidad de sobrevivir en placas de poliestireno para su cultivo, además de que los experimentos realizados con ellas han permitido el estudio de los efectos directos de *H. pylori in vitro* sin el proceso inflamatorio asociado. Lo que sugiere que *H. pylori* es capaz de inducir apoptosis en forma directa a las células epiteliales gástricas²⁵. Más aún, las respuestas apoptóticas de las líneas de células gástricas tumorales a *H. pylori* son similares a aquellas observadas a corto plazo en cultivos primarios de células epiteliales gástricas normales²⁵.

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que la cepa de *H. pylori* 7C fue capaz de incrementar el porcentaje de células AGS con condensación de cromatina, las cuales mostraron las características morfológicas de la apoptosis como cambios en la morfología celular, reducción en el tamaño celular, separación de las células vecinas además de la condensación de cromatina en la periferia nuclear. Dichas características fueron comparadas con las observadas en un control positivo de apoptosis constituido por células AGS expuestas a camptotecina, el cual es un inhibidor de la topoisomerasa I y es capaz de activar las caspasas⁸⁴. De esta manera, se logró diferenciar la condensación de la cromatina y los cambios morfológicos debidos a una división celular de aquellos presentes en el proceso apoptótico.

Para evitar la interferencia de las proteínas del SFB en la extracción de proteínas realizada posteriormente, los ensayos de infección se realizaron en medio RPMI 1640 sin dicho componente. Esta decisión pudo haber afectado la viabilidad de las células AGS e inducir por sí mismo la apoptosis; sin embargo, el uso de un control de células AGS sin infectar sometidas al mismo tratamiento que las células infectadas con *H. pylori* mostró que, aún cuando el porcentaje de células apoptóticas se incrementó gradualmente durante los ensayos debido a la falta de nutrientes proporcionados por el SFB, se logró observar la diferencia entre la apoptosis inducida por *H. pylori* y la apoptosis basal debida a las condiciones experimentales.

Por otro lado, mediante ensayos de infección en células AGS, Shibayama y cols.⁷¹ demostraron que el SFB podría contener sustancias antiapoptóticas como factores de crecimiento que pudieran inhibir la apoptosis inducida por *H. pylori*. Además debido a que la infección por *H. pylori* puede estimular vías de señalización antiapoptóticas vía tirosina cinasas y el factor de transcripción NF- κ B, se piensa que *H. pylori* podría expresar sustancias antiapoptóticas desconocidas hasta ahora en respuesta al SFB que estén involucradas en la inhibición de la apoptosis de las células AGS infectadas por *H. pylori*⁷¹.

El incremento de células AGS con condensación de cromatina producido por la infección con *H. pylori* 7C fue significativo a partir de las 12 horas, tiempo que fue seleccionado para los ensayos posteriores en los que las posibilidades de detectar proteínas de *H. pylori* que pudieran estar involucradas en el proceso de inducción de apoptosis en las células AGS fueran mayores.

Una de las moléculas efectoras más importantes de la apoptosis es la caspasa-3. Las caspasas son cisteína proteasas que se expresan en forma de proenzimas inactivas, su asociación con otros efectores permiten su activación y por consecuencia, su acción sobre diversas proteínas involucradas en el proceso apoptótico^{27, 85}. Ashktorab y cols.⁸² demostraron que tanto en células AGS como en tejidos gástricos de monos y humanos la infección con *H. pylori* estaba asociada con la activación *in vitro* e *in vivo* de las caspasas-3 y -8, cuya actividad máxima fue detectada a las 24 h post-infección. En el presente estudio, las células AGS infectadas con *H. pylori* 7C mostraron un incremento significativo en la actividad de la caspasa-3 en comparación con las células AGS sin infectar a las 12 h post-infección, lo que confirmó la inducción de la apoptosis observada en los ensayos de condensación de cromatina.

Durante los ensayos de infección se incluyeron cultivos de células AGS infectadas con la cepa *H. pylori* 7C no viable con el objetivo de saber si algún componente bacteriano de *H. pylori* era capaz por sí mismo de producir apoptosis. En estudios *in vitro*, empleando células de la mucosa gástrica de cerdos de guinea, Kamawhara y cols.⁴¹ demostraron que aún cuando el lipopolisacárido (LPS) de *H. pylori* presenta actividades inmunológicas y citotóxicas mucho más bajas que las de otros microorganismos como *E. coli* o *Salmonella enterica*, éste era capaz de activar las caspasas 9 y 3 y finalmente producir la apoptosis de dichas células. Sin embargo, en los resultados obtenidos mediante la detección de células con condensación de cromatina y la determinación de la actividad de la caspasa-3, se observó que los cultivos celulares infectados *H. pylori* 7C no viable no presentaron diferencias significativas en comparación con las células AGS sin infectar.

Estos resultados sugieren que *H. pylori* debe de encontrarse en su forma viable para inducir apoptosis a las células AGS. La presencia de formas cocoides en la suspensión bacteriana no viable empleada, sugiere que tampoco esta morfología de *H. pylori* fue capaz de inducir apoptosis aún cuando se observaron algunas formas cocoides adheridas a las células AGS además de las formas bacilares no viables. She y cols.⁸⁶ demostraron que las formas cocoides de *H. pylori* se adhieren en menor proporción a células epiteliales Hep-2 y que colonizan la mucosa gástrica de ratón con menor eficiencia en comparación con la forma bacilar. En un estudio posterior, Liu y cols.⁸⁷, observaron que las formas cocoides producen apoptosis de forma no significativa en células tumorales gástricas GES-1 con respecto a la forma bacilar. Por lo tanto, es probable que existan factores de *H. pylori* que son producidos por la forma bacilar viable durante o después de su contacto con las células AGS que pueden estar involucrados en la inducción de la apoptosis observada en los ensayos de infección realizados.

Una vez que se determinó el tiempo en el que se observó un incremento en la apoptosis inducida por *H. pylori* 7C en las células AGS, se realizó la búsqueda de los factores de *H. pylori* 7C que pudieran estar involucrados en la inducción del evento apoptótico mediante la extracción de las proteínas del extracto celular de dos ensayos independientes a las 12 horas post-infección.

El análisis de las réplicas de los geles de doble dimensión de cada uno de los extractos proteicos tanto de los cultivos individuales de las células AGS y de *H. pylori* 7C, como del

obtenido a partir de la infección, mostró un coeficiente de variación menor al 30% en la cantidad total de puntos válidos y en la densidad total de cada uno de los geles normalizados teñidos con nitrato de plata y azul de coomassie coloidal, respectivamente, lo que indicó que la cantidad de proteína presente no constituyó un factor de variación importante entre réplicas. Molloy y cols.⁷⁸ establecieron que un valor de coeficiente de variación inter-ensayo adecuado que considere la variación técnica en la realización de los geles de doble dimensión y la baja variación biológica en cultivos bacterianos clonales no debe ser mayor del 31.2%.

La normalización en la cuenta total de puntos válidos y el ajuste en la concentración de los extractos proteicos en los geles teñidos con nitrato de plata permitió la comparación entre los geles de los cultivos individuales de las células AGS y *H. pylori* con los de la infección. Aún cuando la variación en la cuenta total de puntos válidos no fue mayor al 20%, la cantidad de manchas comunes detectadas en las réplicas de los cultivos individuales de *H. pylori* 7C así como en las réplicas de la infección no fue el mismo. Los puntos no comunes se detectaron proporcionalmente en ambas réplicas y, en su mayoría, correspondieron a proteínas de alta masa molecular que formaron parte de una serie de manchas localizadas en forma horizontal o vertical que pueden corresponder a una misma proteína con diferentes isoformas o cambios post-traduccionales. La falta de detección de estas manchas entre las réplicas pudo deberse a diferencias en el tiempo del revelado con la tinción de plata, así como a una falta de resolución durante el isoelectroenfoco o durante la segunda dimensión, además del enmascaramiento de dichas manchas con otras proteínas de alta abundancia o por la formación del barrido horizontal formado por contaminantes del extracto proteico como lípidos o DNA.

Debido a que se ha comprobado que la intensidad de los puntos teñidos con nitrato de plata no correlaciona con la concentración de la proteína presente en los geles aún cuando este método presenta una sensibilidad hasta de 0.1 ng de proteína por punto⁸⁸, en los geles teñidos con nitrato de plata sólo se identificó un patrón de expresión proteica de “*novo*” constituido por puntos presentes específicamente durante la inducción de la apoptosis en las células AGS a las 12 h post-infección detectados, en su mayoría en ambas réplicas, y que se diferenciaron de las manchas correspondientes a las de las células AGS o de *H. pylori* 7C que se detectaron normalmente bajo las condiciones de incubación empleadas en los ensayos de infección como el medio de cultivo y las condiciones de aerobiosis, considerando que *H. pylori* es un microorganismo microaerófilo.

En un estudio en el que se evaluó la expresión de genes durante la adherencia de *H. pylori* a células AGS después de 4 h de infección, Kim y cols.⁸⁹ encontraron que de 1, 542 genes sólo 22 estaban sobre-expresados, mientras que la expresión de 21 genes estaba disminuida. Así mismo, Graham y cols.⁹⁰ demostraron que sólo del 4 al 7% de los genes de *H. pylori* se encuentran sobre-expresados durante la infección del tejido gástrico humano. En estos estudios no se detectó la expresión de “novo” de genes relacionados con cada uno de los eventos estudiados. De tal forma que, es importante considerar que el patrón proteico detectado específicamente durante la inducción de la apoptosis en las células AGS puede estar constituido por proteínas de *H. pylori* 7C o de las células AGS con modificaciones post-traduccionales que pudieron cambiar su masa molecular y/o punto isoeléctrico o isoformas de una misma proteína.

Por otro lado, como se pudo observar en las gráficas de distribución de los puntos detectados en base a su punto isoeléctrico y masa molecular para cada uno de los perfiles proteicos, existen algunos intervalos en los que varios de los puntos pertenecientes a las células AGS y de *H. pylori* 7C coinciden (21-60 kDa y pl 5-7) , por lo que la disminución o pérdida de algunos de los puntos presentes en los geles maestros de los cultivos puros celular y bacteriano y ausentes en el gel de la infección pudo deberse a una baja resolución en dichos puntos.

La determinación de la expresión diferencial de *H. pylori* 7C durante la apoptosis inducida en las células AGS requirió del análisis de la intensidad de los puntos correspondientes a *H. pylori* previa normalización de las réplicas mediante la densidad total de las imágenes adquiridas a partir de los geles teñidos con azul de coomassie coloidal. Estableciéndose como primer criterio de análisis la presencia de los puntos tanto en las réplicas de los cultivos bacterianos individuales como los de la infección, se observó que la mayoría de los puntos correspondientes a *H. pylori* 7C (60%) no mostraron diferencias en intensidad de al menos dos veces con respecto al cultivo individual.

En este estudio se seleccionaron 16 puntos para la identificación de las proteínas por espectrometría de masas, 13 de los cuales mostraron una intensidad mayor o igual a 2 veces durante el evento apoptótico de las células AGS en comparación con el cultivo individual de *H. pylori* 7C. Los péptidos obtenidos de cada uno de los puntos seleccionados se compararon con los péptidos reportados en la base de datos NCBI nr para las células humanas así como para el

grupo *Eubacteria*, obteniéndose para cada caso un puntaje global mayor al recomendado para establecer la identificación de las proteínas de *H. pylori* con un intervalo de confianza del 95%.

Aún cuando el incremento en la intensidad de las proteínas identificadas, así como de los puntos detectados correspondientes a *H. pylori* 7C durante la apoptosis de las células AGS fue visualmente evidente, la variabilidad entre réplicas de algunas de ellas fue mayor al 31.2%. Para evitar la posibilidad de que el incremento o disminución en la intensidad de los puntos detectados pudiera deberse a variaciones técnicas, se estableció como segundo criterio de análisis la selección de aquellos puntos que presentaran un coeficiente de variación entre réplicas menor o igual al 31.2%. A partir de dichos puntos, se determinó la expresión diferencial de *H. pylori* 7C durante la inducción de la apoptosis, mediante una prueba estadística, obteniéndose que el 24% de éstos mostraron un incremento significativo que definió el patrón de sobre-expresión proteica, mientras que el 6% definió el patrón de disminución en la expresión proteica. De esta manera, de las 14 proteínas de *H. pylori* 7C identificadas sólo 5 se incluyeron dentro del patrón de sobre-expresión definido de acuerdo a los criterios establecidos para el análisis. Dichas proteínas fueron la flavodoxina (FldA; Hp1), la alquilhidroxiperóxido reductasa (TsaA; Hp8 y Hp9), la proteína asociada a la citotoxina (CagA; Hp14), la proteína homóloga a la hemaglutinina de unión a la neuraminil-lactosa (HpaA, Hp13) y la subunidad alfa de la ureasa (UreA; Hp16).

Las 5 proteínas de *H. pylori* 7C identificadas que mostraron un patrón de sobre-expresión significativo son proteínas de alta abundancia, presentes en los diferentes aislamientos de *H. pylori* hasta ahora estudiados y son inmunogénicas⁹¹⁻⁹³. Además, se pueden encontrar asociadas a la membrana celular de manera interna como la NapA o de manera externa como UreA y HpaA o bien, pueden ser secretadas como CagA o FldA. Debido a que estas proteínas pueden participar en el contacto patógeno-hospedero, son buenos candidatos para realizar estudios posteriores que demuestren si se encuentran involucrados en la inducción de la apoptosis en las células epiteliales gástricas.

Hasta ahora, de las proteínas de *H. pylori* identificadas en este estudio, sólo CagA y la ureasa han sido descritas como probables factores involucrados en la inducción de la apoptosis en las células epiteliales gástricas.

CagA es un factor de virulencia de *H. pylori*, el cual es secretado e introducido a las células epiteliales gástricas mediante un sistema de secreción tipo IV ⁵⁰. Una vez dentro de la célula epitelial gástrica, CagA es capaz de interactuar con moléculas de diferentes vías de señalización que están involucradas en la regulación de la proliferación y movilidad celular así como con alteraciones en citoesqueleto ⁵⁰. La presencia de CagA en cepas de *H. pylori* ha sido asociada con un incremento en la apoptosis debido a que Cabral y cols. ⁹⁴ observaron un incremento en la expresión del regulador proapoptótico Bak en relación con los reguladores antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-x en las biopsias de tejido gástrico obtenidas de pacientes infectados con cepas *cagA*⁺ comparado con aquellos infectados con cepas *cagA*⁻. Sin embargo, su función como una proteína estimuladora de apoptosis en las células epiteliales gástricas ha sido controversial ya que diversos estudios han mostrado que, aunque la presencia de CagA se ha relacionado con las patologías de mayor gravedad, tanto mutantes en CagA como las respectivas cepas silvestres son capaces de inducir el mismo nivel de apoptosis *in vitro* ^{51, 94}. En otros estudios realizados *in vitro*, se ha demostrado que aislamientos de *H. pylori cagA*⁺ son capaces de estimular la activación de las MAP cinasas comparado con aislamientos *cagA*⁻, resultando en un estímulo de proliferación en células AGS ^{31, 43}. Por lo tanto, la actividad de CagA en las células gástricas epiteliales podría resultar en un incremento de la proliferación celular en un tiempo más tardío de la infección.

La ureasa se ha considerado como un importante factor de virulencia de *H. pylori*, debido a que hidroliza la urea, que obtiene en el tejido gástrico en amonio y dióxido de carbono, lo que le permite sobrevivir en el ambiente gástrico altamente ácido. Esta proteína está conformada por dos tipos de subunidades (UreA y UreB), además de proteínas accesorias que transportan el níquel requerido para su actividad ³⁵⁻³⁷. Fan y cols. ³⁸ demostraron que la ureasa de *H. pylori* purificada es capaz de unirse a células epiteliales gástricas (Kato III y AGS) y a células B a través del MHCII y de inducir un incremento en la apoptosis. Hasta ahora, no se ha definido si alguna de las subunidades de la ureasa puede participar de manera más importante en la inducción de la apoptosis; sin embargo, los resultados encontrados en el presente estudio sugieren que la subunidad UreA de *H. pylori* 7C podría estar participando en el evento apoptótico observado durante la infección de las células AGS. La subunidad α o UreA de la ureasa de *H. pylori* se localiza principalmente en citoplasma, aunque también se le ha detectado en la superficie celular y en sobrenadantes de cultivo debido a un mecanismo de autólisis programada que aún no ha sido bien caracterizada ⁹⁵. Esto indica que esta proteína podría interactuar de manera importante con el hospedero. Además, diversos estudios han demostrado que UreA es altamente

reconocido por los sueros de pacientes con úlcera duodenal en comparación con los sueros de pacientes con gastritis ⁹⁶. Más aún, Kohda y cols. ⁹⁶ encontraron que existe una correlación significativa entre la actividad de la ureasa de *H. pylori*, el nivel de apoptosis y la presencia de una úlcera duodenal activa.

La flavodoxina (FldA) es una proteína que funciona como un aceptor de electrones para el complejo piruvato óxidorreductasa que cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato ⁹⁷. Esta proteína ha sido detectada en geles de doble dimensión tanto de extractos celulares como de proteínas de secreción de *H. pylori* ⁶⁸. Por ser una proteína encontrada tanto en procariotes como eucariotes pero no en mamíferos, además de ser esencial para la sobrevivencia de *H. pylori*, la FldA ha sido estudiada como un blanco terapéutico para la erradicación de este microorganismo ⁹⁷. Actualmente, se ha propuesto que la FldA de *H. pylori* puede estar implicada en la patogénesis que lleva al desarrollo del linfoma gástrico tipo MALT ya que es reconocida de manera importante por sueros de pacientes con dicha patología en relación a pacientes con otras patologías relacionadas con la infección con *H. pylori*; sin embargo, su relación con la inducción de la apoptosis en las células epiteliales gástricas por *H. pylori* es desconocida y/o no ha sido estudiada ^{97, 98}.

Proteínas como la alquilhidroxiperóxido reductasa (TsaA) actúan de manera importante durante el estrés oxidativo generado por la respuesta inflamatoria como un mecanismo de defensa neutralizando las especies reactivas del oxígeno (ROS) o como chaperonas previniendo la desnaturalización de ciertas proteínas. En el sistema *in vitro* empleado no estuvieron presentes los componentes importantes que mediaran una respuesta inflamatoria debida a la infección con *H. pylori*; sin embargo, la sobre-expresión de TsaA pudo ser producto de la respuesta del microorganismo a la célula hospedera. En estudios realizados con células AGS se ha detectado la sobre-expresión de IL-8, la óxido nítrico sintasa y de la ciclooxigenasa-2, los cuales son mediadores de la respuesta inflamatoria inducida por la infección con *H. pylori* ^{13, 99}. Estos elementos celulares pudieron haber constituido un estímulo por parte de las células AGS para la sobre-expresión de proteínas bacterianas involucradas en la desintoxicación celular como una respuesta de preparación contra la producción de ROS y NO ausente en el sistema de experimentación empleado. Sin embargo, la participación de TsaA en la apoptosis inducida en las células AGS no debe ser excluida.

La proteína homóloga de la hemaglutinina de unión a la neuraminil-lactosa (HpaA) se encuentra localizada en la superficie de *H. pylori*, por lo que su función durante la colonización del tejido gástrico puede ser más importante que como una proteína inductora de apoptosis. No obstante, la colonización eficiente del tejido gástrico y la persistencia de *H. pylori* en contacto con la célula hospedera pueden ser importantes para la producción de otros factores bacterianos implicados en la inducción del evento apoptótico.

Finalmente, es importante señalar que, aunque este estudio estuvo enfocado principalmente a la búsqueda de proteínas del extracto celular de *H. pylori*, también existen proteínas insolubles bajo las condiciones de extracción y solubilización empleadas, así como proteínas de secreción que, siendo liberadas al medio de cultivo, no se detectaron en los geles de doble dimensión realizados. Además, sólo se seleccionaron las proteínas de *H. pylori* 7C que mostraron un patrón de sobre-expresión durante la apoptosis de las células AGS y no las proteínas sintetizadas de “*novo*” detectadas en los geles teñidos con nitrato de plata debido a su baja concentración y que pudieran ser importantes en la inducción de apoptosis a las células epiteliales gástricas. Más aún, las proteínas de *H. pylori* que reprimieron su expresión durante la infección de las células AGS pudieron ser parte de una regulación que implicara la disminución de ciertos factores para favorecer la expresión de otros factores bacterianos requeridos durante el evento estudiado. Sin embargo, debe considerarse la posibilidad de que la disminución en la cantidad de dichas proteínas en el extracto proteico se deba principalmente a la secreción de éstas al medio y no a una represión en la expresión.

Así mismo, la asociación directa o indirecta de las proteínas identificadas en este estudio con el evento apoptótico observado en las células AGS requiere todavía de estudios posteriores que confirmen dicha asociación.

VIII. CONCLUSIONES

La cepa 7C de *H. pylori* indujo un incremento significativo en la apoptosis de las células AGS a partir de las 12 h de infección.

El aumento de la apoptosis en las células AGS sólo se produjo durante la infección con *H. pylori* 7C en su forma viable, por lo tanto, la producción y/o el incremento en la expresión de factores de *H. pylori* involucrados se llevó a cabo durante la interacción con las células AGS.

En los geles de doble dimensión procedentes de los extractos proteicos obtenidos de la infección de las células AGS en apoptosis se observó un patrón específico correspondiente al 4% de las manchas detectadas que podrían corresponder a proteínas “de novo” de *H. pylori* o de las células AGS.

Así mismo, se observó un incremento en la expresión de aproximadamente el 20% de las manchas con bajo coeficiente de variación en comparación con el cultivo puro de *H. pylori* 7C incubado bajo las mismas condiciones que la infección.

Las proteínas de *H. pylori* 7C identificadas en este estudio que mostraron un incremento significativo en su expresión durante la apoptosis inducida en las células AGS pueden ser importantes en el contacto patógeno-hospedero debido a que pueden encontrarse asociadas a la membrana celular de forma interna o externa y algunas de ellas pueden ser secretadas.

IX. PERSPECTIVAS

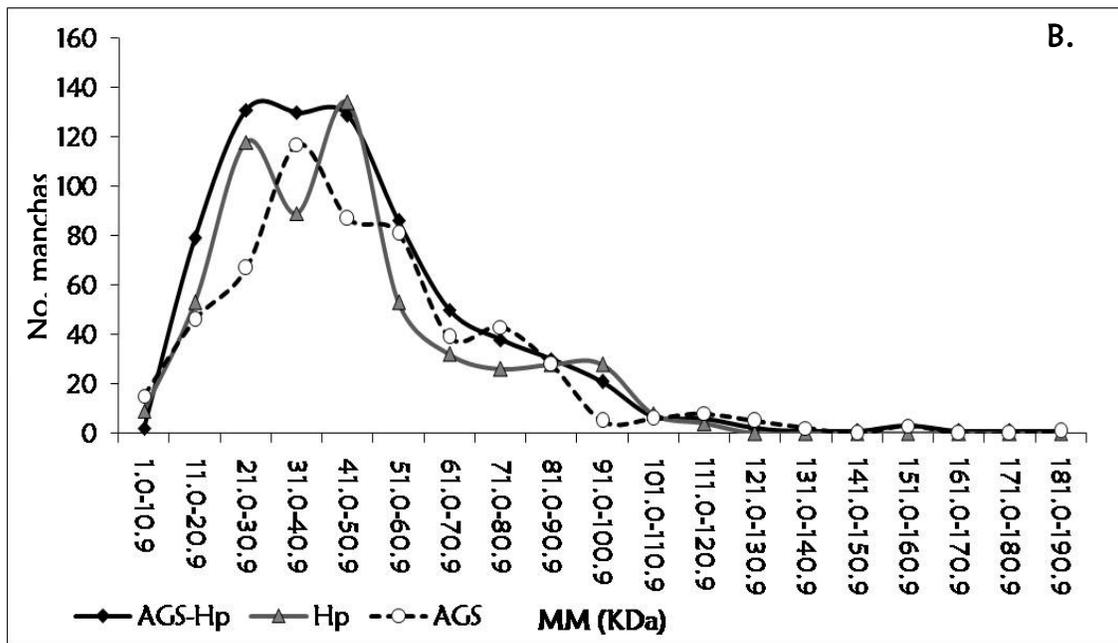
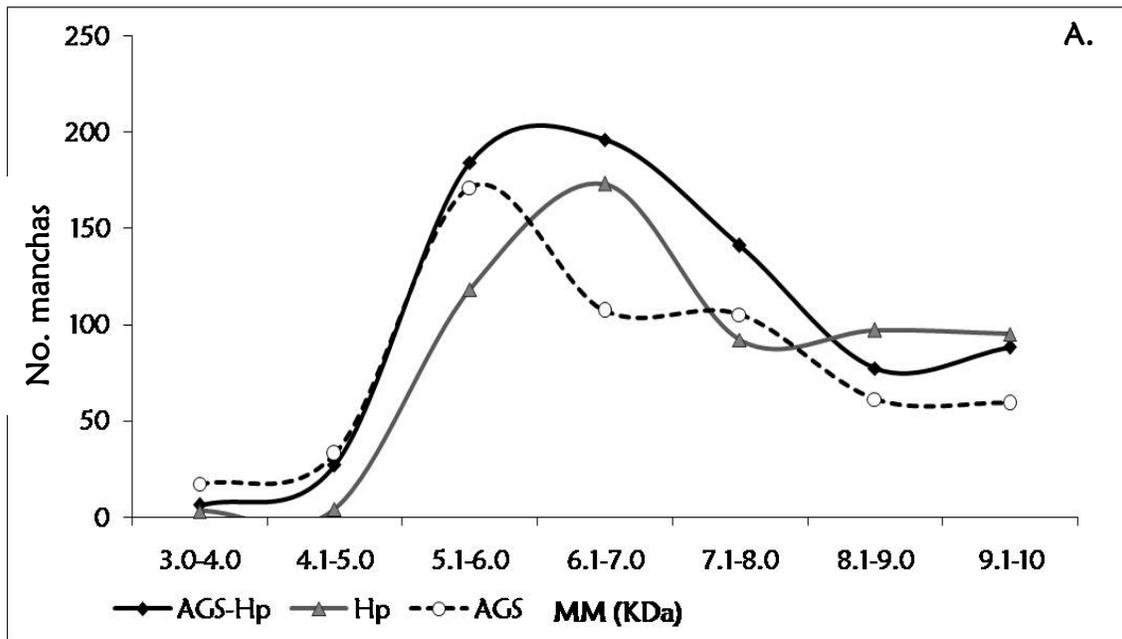
En este estudio se identificaron algunas de las proteínas de *H. pylori* 7C que mostraron un patrón de sobre-expresión durante el incremento en la apoptosis inducido en las células AGS por esta cepa; sin embargo, la realización de geles de doble dimensión empleando intervalos de pH más cortos así como una concentración de poliacrilamida más baja permitirá la separación de otras proteínas de *H. pylori* con este mismo patrón que podrían ser buenos candidatos de estudio.

Debido a que este estudio se enfocó a la búsqueda de las proteínas de extracto celular de *H. pylori* que pudieran estar involucradas en la inducción de la apoptosis en las células AGS, la aplicación de técnicas que permitan la obtención de proteínas insolubles bajo las condiciones de extracción proteica empleada, así como las proteínas de secreción de *H. pylori* incrementará el número de candidatos de estudio participantes en el balance normal apoptosis-proliferación de las células epiteliales gástricas.

La participación de las proteínas de *H. pylori* identificadas en este estudio como factores de virulencia involucrados en la inducción de la apoptosis en las células epiteliales gástricas requiere de estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestren su asociación directa o indirecta, así como sus mecanismos de acción.

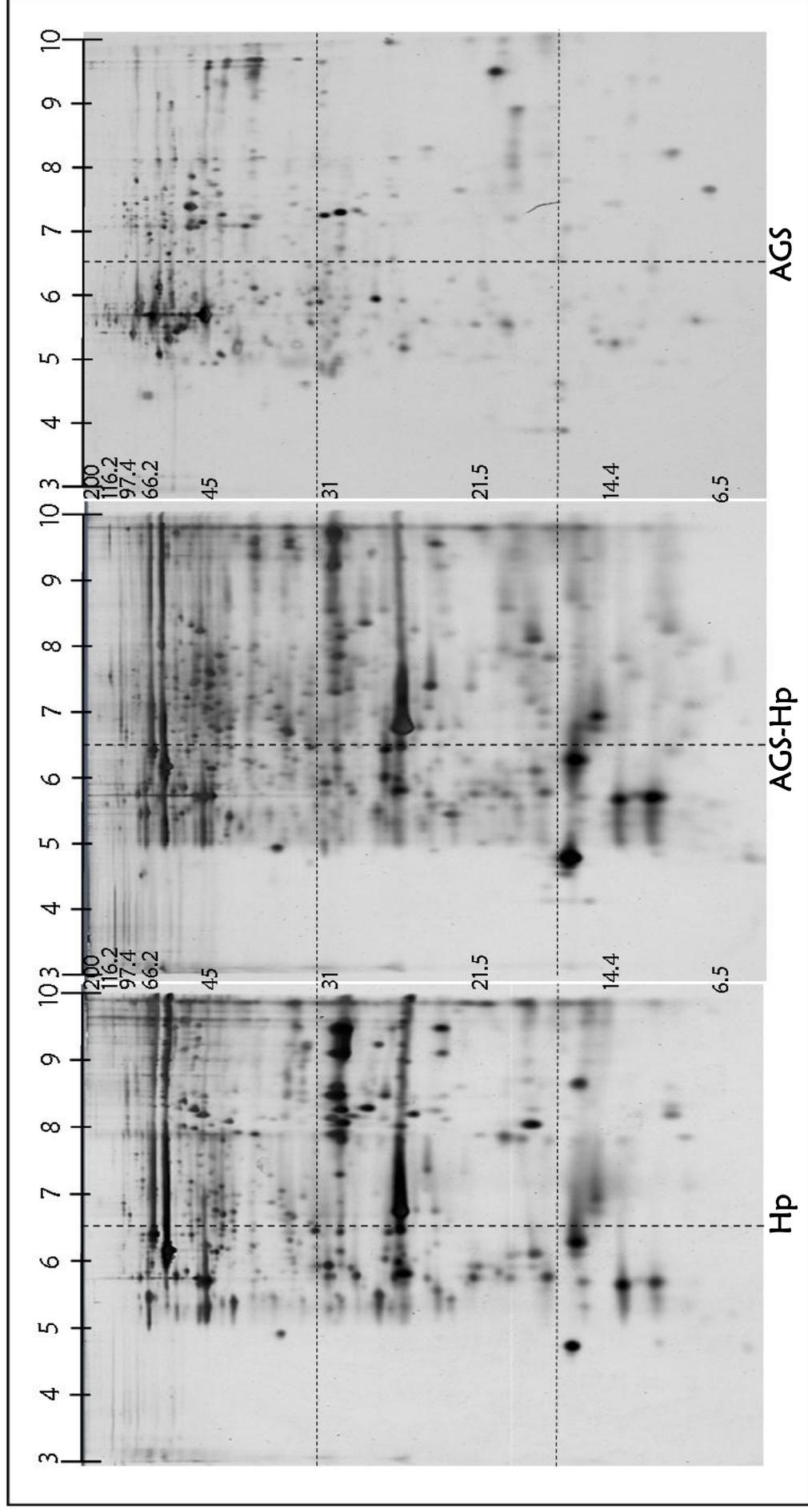
X. ANEXOS

ANEXO I



Distribución de las manchas detectadas por tinción con nitrato de plata en los gels de los cultivos puros de las células AGS (AGS) y de *H. pylori* 7C (Hp), así como de la infección durante la apoptosis de las células AGS (AGS-Hp) en base a: **A.** su punto isoelectrico (pI) y **B.** su masa molecular (MM).

ANEXO II



Geles de doble dimensión teñidos con nitrato de plata (IPG 17 cm; 23 x 30 cm; 15% poliacrilamida) de: **A.** *H. pylori* 7C (Hp), **B.** células AGS infectadas con *H. pylori* 7C durante su apoptosis (AGS-Hp), y **C.** Cultivo de células AGS (AGS).

XI. BIBLIOGRAFÍA

-
-
- 1) Dunn BE, H Cohen, MJ Blaser. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997;10:720-741.
 - 2) Morales EMR, GC Rojas, YL Vidal, A Cravioto. *Helicobacter pylori*. En Romero ME, JM Romero. Microbios en línea. Coordinación de la Investigación Científica, UNAM. México, D. F. 2001 pág. 199-219.
 - 3) Tytgat GN, LA Noach, EA Rawse. *Helicobacter pylori* infection and duodenal ulcer disease. Gastroenterol Clin North Am 1993;22:127-139.
 - 4) Mitchell HM. Epidemiology of Infection. In Mobley HLT, Mendz LG, Hazell LS. *Helicobacter pylori* physiology and genetics. ASM Press. Washington, DC. 2001;pág. 7-18.
 - 5) Stoicov C, R Saffari, X Cai, C Hasyagar, JM Houghton. Molecular biology of gastric cancer: *Helicobacter* infection and gastric adenocarcinoma: bacterial and host factors responsible for altered growth signaling. Gene 2004;341:1-17.
 - 6) Mazari MH, YL Vidal, GC Rojas, SP Leon, A Cravioto. *Helicobacter pylori* and other enteric bacteria in freshwater environments in Mexico City. Arch Med Res 2001;32:458-467.
 - 7) Peura DA. *Helicobacter pylori* and ulcerogenesis. Am J Med 1996;100:195-265.
 - 8) Aguilar GR, G Ayala, G Fierros. *Helicobacter pylori* Recent Advances in the study of its pathogenicity and prevention. Salud Pública de México 2001;43:237-247.
 - 9) Telford JL, A Covacci, P Chiara, C Montecucco, R Rappuolli. Unravelling the pathogenic role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer: potential new therapies and vaccines. TIBTECH 1994;12:420-425.
 - 10) Olbe L, L Fändriks, A Hamlet, AM Svennerholm, AC Thoreson. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori* induced duodenal ulcer disease: an overview. World J Gastroenterol 2000;6:619-623.
 - 11) Stolte M, E Bayerdörffer, A Morgner, B Alpen, T Wündisch, C Thiede, A Neubauer. *Helicobacter* and gastric MALT lymphoma. Gut 2002;50:19-24.
 - 12) Suerbaum S, P Michetti. *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med 2002;374:1175-1186.
 - 13) Konturek PC, J Kania, JW Konturek, A Nikiforuk, SJ Konturek, EG Hahn. *Helicobacter pylori* infection, atrophic gastritis, cytokines, gastrin, COX-2, PPAR γ and impaired apoptosis in gastric carcinogenesis. Med Sci Monit 2003;9:SR65-78.
 - 14) Correa P. The biological model of gastric carcinogenesis. IARC Sci Publ 2004;157:301-310.
-
-

-
-
- 15) Faller G, T Kirchner. Antigastric Autoimmunity and Pathology in *Helicobacter pylori* Gastritis. En Achtman M, S Suerbaum. *Helicobacter pylori: Molecular and Cellular Biology*. Horizon Scientific Press, Great Britain. 2001;pág. 53-62.
 - 16) Remacha B, A Lanas, R Sainz. *Helicobacter pylori* y úlcera refractaria. ANALES Sis San Navarra 1998;21(Suppl 2):27-35.
 - 17) Parkin M, P Pisan, J Ferlay. Global Cancer Statistics. CA Cancer J Clin 1999; 49:33-64.
 - 18) Correa P. *Helicobacter pylori* infection and Gastric Cancer. Cancer Epidemiol Biomark Prev 2003;12(Suppl):238s-241s.
 - 19) Torres J, L López, E Lazcano, M Camorlinga, L Flores, O Muñoz. Trends in *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Cancer in Mexico. Cancer Epidemiol Biomark Prev 2005;14:1874-1877.
 - 20) Asaka M, AR Sepulveda, T Sugiyama, DY Graham. Gastric Cancer. In Mobley HLT, Mendz LG, Hazell LS. *Helicobacter pylori* physiology and genetics. ASM Press. Washington, DC. 2001;pág. 481-496.
 - 21) Shibaya K, K Kamachi, N Nagata, T Yagi, T Nada, *et al.* A novel apoptosis-inducing protein form *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol 2003;47:443-451.
 - 22) Crabtree JE. Cytokine Responses in *Helicobacter pylori* Infection. En Achtman M, S Suerbaum. *Helicobacter pylori: Molecular and Cellular Biology*. Horizon Scientific Press, Great Britain. 2001;pág. 63-83.
 - 23) Kim H, JW Lim, KH Kim. *Helicobacter pylori*-induced Expression of Interleukin-8 and Cyclooxygenase-2 in AGS Gastric Epithelial Cells: Mediation by Nuclear Factor- κ B. Scand J Gastroenterol 2001;7:706-716.
 - 24) Rudi J, D Kuck, S Strand, A von Herbay, SM Mariani, PH Krammer, PR Galle, W Stremmel. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) Receptor and Ligand System in *Helicobacter pylori*-induced Gastric Epithelial Apoptosis. J Clin Invest 1998;102:1506-1514.
 - 25) Shirin H, SF Moss. *Helicobacter pylori* induced apoptosis. Gut 1998;43:592-594.
 - 26) Galmiche a, J Rassow, A Doye, S Cagnol, JC Chambard, *et al.* The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. The EMBO Journal 2000;19:6361-6370.
 - 27) McFarlane M, AC Williams. Apoptosis and disease: a life or death decision? EMBO Reports 2004;5:674-678.
 - 28) De Freitas D, M Urbano, MH Goulao, MM Donato, C Baldaia, MI Martins, P Souto, C Gregorio, P Figueiredo, H Gouveia, JM Romaozinho. The effect of *Helicobacter pylori*
-
-

-
-
- infection on apoptosis and cell proliferation in gastric epithelium. *Hepatogastroenterology* 2004;51:876-882.
- 29) Ikeno T, H Ota, A Sugiyama, K Ishida, T Katsuyama, RM Genta, S Kawasaki. *Helicobacter pylori*-induced Chronic Active Gastritis, Intestinal Metaplasia, and Gastric ulcer in Mongolian Gerbils. *Am J Pathol* 1999;154:951-960.
 - 30) Viala J, C Chaput, IG Boneca, A Cardona, SE Girardin, AP Moran, R Atchman, S Mémet, MR Huerre, AJ Coyle, PS DiStefano, PJ Sansonetti, A Labigne, J Bertin DJ Philpott, RL Ferrero. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *Nat Immunol* 2004;5:1166-1174.
 - 31) Keates S, AC Keates, M Warny, RM Peek, PG Murray, CP Kelly. Differential Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases in AGS Gastric Epithelial Cells by *cag*⁺ and *cag*⁻ *Helicobacter pylori*. *J Immunol* 1999;163:5552-5559.
 - 32) Sharma SA, MKR Tummuru, MJ Blaser, LD Kerr. Activation of IL-8 Gene Expression by *Helicobacter pylori* Is Regulated by Transcription Factor Nuclear Factor-kB in Gastric Epithelial Cells. *J Immunol* 1998;160:2401-2407.
 - 33) Naumann M, JE Crabtree. *Helicobacter pylori*-induced epithelial cell signalling in gastric carcinogenesis. *TRENDS in Microbiology* 2004;12:29-36.
 - 34) De Luca A, M De Falco, S Iaquinto, G Iaquinto. Effects of *Helicobacter pylori* Infection on Cell Cycle Progression and the Expression of Cell Cycle Regulatory Proteins. *J Cell Physiol* 2004;200:334-342.
 - 35) Castillo-Rojas G, M Mazari-Hiriart, Y López-Vidal. *Helicobacter pylori*: Focus on CagA and VacA major virulence factors. *Salud Pública de México*. 2004;46:538-548.
 - 36) Montecucco C, R Rappuoli. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Mol Cel Biol* 2001;2:457-466.
 - 37) Testerman TL, DJ McGee, HLT Mobley. Adherence and Colonization. In Mobley HLT, Mendz LG, Hazell LS. *Helicobacter pylori* physiology and genetics. ASM Press. Washington, DC. 2001;pág. 381-417.
 - 38) Fan X, H Gunasena, Z Cheng, R Espejo, SE Crowe, *et al.* *Helicobacter pylori* Urease binds to Class II MHC on Gastric Epithelial Cells and induces their Apoptosis. *J Immunol* 2000;165:1918-1924.
 - 39) Gonçalves Oliveira A, A Santos, J Becattini, G Aguiar, AM Camargos, C Affonso, MMD Álvares, AMM Ferreira, DM Magalhães. *babA2*- and *cagA*-Positive *Helicobacter pylori* Strains
-
-

-
-
- are associated with Duodenal Ulcer and Gastric Carcinoma in Brazil. *J Clin Microbiol* 2003;41:3946-3966.
- 40) Yu F, WK Leung, MYY Go, MCW Chan, KF To, EKW Ng, FKL Chan, TKW Ling, SCS Chung, JJY Sung. Relationship between *Helicobacter pylori babA2* status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions. *Gut* 2002;51:480-484.
 - 41) Kawahara T, S Teshima, Y Kuwano, A Oka, K Kishi, K Rokutan. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide induces apoptosis of cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G726-G734.
 - 42) Takenaka R, K Yokota, K Ayada, M Mizuno, Y Zhao, Y Fujinami, SN Lin, T Toyokawa, H Okada, Y Shiratori, K Oguma. *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces inflammatory responses through the Toll-like receptor-triggered pathway in cultured human gastric epithelial cells. *Microbiology* 2004;150:3913-3922.
 - 43) De Luca A, A Baldi, P Russo, A Todisco, L Altucci, N Giardullo, L Pasquale, S Iaquinto, V D'Onofrio, MC Parodi, MG Paggi, G Iaquinto. Coexpression of *Helicobacter pylori's* proteins CagA and HspB Induces Cell Proliferation in AGS Gastric Epithelial Cells, Independently from the Bacterial Infection. *Cancer Research* 2003;63:6350-6356.
 - 44) Cao P, MS McClain, MH Forsyth, TL Cover. Extracellular Release of Antigenic Proteins by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1998;66:2884-2986.
 - 45) Chevalier C, JM Thiberge, RL Ferrero, A Labigne. Essential role of *Helicobacter pylori* γ -glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. *Mol Microbiol* 1999;31:1359-1372.
 - 46) McGovern KJ, TG Blanchard, JA Gutierrez, SJ Czinn, S Krakowka, Y Youngman. γ -Glutamyltransferase is a *Helicobacter pylori* Virulence Factor but is not Essential for Colonization. *Infect Immun* 2001;69:4168-4173.
 - 47) Backert S, T Schwarz, S Miehle, C Kirsch, C Sommer, T Kwok, M Gerhard, UB Goebel, N Lehn, W Koenig, TF Meyer. Functional Analysis of *cag* Pathogenicity Island in *Helicobacter pylori* Isolates from Patients with Gastritis, Peptic Ulcer and Gastric Cancer. *Infect Immun* 2004;72:1043-1056.
 - 48) Bourzac KM, K Gillemain. *Helicobacter pylori*-host cell interactions mediated by type IV secretion. *Cell Microbiol* 2005;7:911-919.
 - 49) Azuma T, A Yamakawa, S Yamazaki, K Fukuta, M Ohtani, Y Ito, M Dojo, Y Yamazaki, M Kuriyama. Correlation between variation of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* and disease outcome in Japan. *J Infect Dis* 2002;186:1621-1630.
-
-

-
-
- 50) Blaser MJ, JC Atherton. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. J Clin Invest 2004;113:321-333.
 - 51) Peek RM, MJ Blaser, DJ Mays, MH Forsyth, TL Cover, *et al.* *Helicobacter pylori* Strain-specific Genotypes and Modulation of the Gastric Epithelial Cell Cycle. Cancer Res 1999;59:6124-6131.
 - 52) Shirin H, EM Sordillo, SH Oh, H Yamamoto, T Delohery, IB Weinstein, SF Moss. *Helicobacter pylori* Inhibits the G1 to S Transition in AGS Gastric Epithelial Cells. Cancer Res 1999;59:2277-2281.
 - 53) Ahmed A, D Smoot, G Littleton, R Tackey, CS Walters, F Kashanchi, CR Allen, H Ashktorab. *Helicobacter pylori* inhibits gastric cell cycle progression. Microb Infect 2000;2:1159-1169.
 - 54) Le' Negrate G, V Ricci, V Hofman, B Mograbi, P Hofman, B Rossi. Epithelial Intestinal Cell Apoptosis Induced by *Helicobacter pylori* depends on Expression of the *cag* Pathogenicity Island Phenotype. Infect Immun 2001;69:5001-5009.
 - 55) Kuck D, B Kolmerer, CI Konert, PH Krammer, W Stremmel, J Rudi. Vacuolizing Cytotoxin of *Helicobacter pylori* Induces Apoptosis in the Human Gastric Epithelial Cell Line AGS. Infect Immun 2001;69:5080-5087.
 - 56) Galmiche A, J Rassow, A Doye, S Cagnol, JC Chambard, S Contamin, V Thillot, I Just, V Ricci, E Solcia, EV Obberghen, P Boquet. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. EMBO 2000;19:6361-6370.
 - 57) Basak C, SK Pathak, A Bhattacharyya, S Pathak, J Basu, M Kundu. The Secreted Peptidyl Prolyl *cis,trans*-Isomerase HP0175 of *Helicobacter pylori* induces Apoptosis of Gastric Epithelial Cells in a TLR-4 and Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1-Dependent Manner. J Immunol 2005;174:5672-5680.
 - 58) Pardanani A, ED Wieben, TC Spelsberg, A Tefferi. Primer on Medical Genomics Part IV: Expression Proteomics. Mayo Clin Proc 2002;77:1185-1196.
 - 59) Görg A, W Wiss, MJ Dunn. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics 2004;4:3665-3685.
 - 60) Blackstock WP, MP Weir. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. Trends Biotechnol 1999;17:121-127.
 - 61) Washburn MP, JR Yates III. Analysis of the microbial proteome. Curr Opin Microbiol 2000;3:292-297.
-
-

-
-
- 62) Jungblut PR, D Bumann, G Hass, U Zimny-Arndt, P Holland, S Lamer, F Siejak, A Aebischer, TF Meyer. Comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol 2000;36:710-725.
 - 63) Krah A, F Schimdt, D Becher, M Schimd, D Albrecht, *et al.* Analysis of Automatically Generated Peptide Mass Fingerprints of Cellular Proteins and Antigens from *Helicobacter pylori* 26695 separated by Two-dimensional Electrophoresis. Mol Cel Proteomics 2003; 2:1271-1283.
 - 64) Oh JD, HK Bäckhed, M Giannakis, J Xu, RS Fulton, LA Fulton, HS Cordum, C Wang, G Elliott, J Edwards, ER Mardis, LG Engstrand, JI Gordon. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: Evolution during disease progression. PNAS 2006;103:9999-10004.
 - 65) Lock RA, SJ Cordwell, GW Coombs, BJ Walsh, GM Forbes. Proteome analysis of *Helicobacter pylori*: major proteins of type strain NCTC 11637. Pathol 2001;33:365-374.
 - 66) Bumann D, PR Jungblut, TF Meyer. *Helicobacter pylori* vaccine development based on combined subproteome analysis. Proteomics 2004;4:2843-2848.
 - 67) Backert S, T Kwok, M Schmid, M Selbach, S Moese, RM Peek Jr, W König, TF Meyer, PR Jungblut. Subproteomes of soluble and structure-bound *Helicobacter pylori* proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Proteomics 2005;5:1331-1345.
 - 68) Bumann D, S Aksu, M Wendland, K Janek, U Zimny-Arndt, N Sabarth, TF Meyer, PR Jungblut. Proteome Analysis of Secreted Proteins of the Gastric Pathogen *Helicobacter pylori*. Infect Immun 2002;70:3396-3403.
 - 69) Lim JW, H Kim, JM Kim, JS Kim, HC Jung, KH Kim. Cellular stress-related protein expression in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial AGS cells. IJBCB 2004;36:1624-1634.
 - 70) Vega Belmont A. Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Biológica. Susceptibilidad de *Helicobacter pylori* a amoxicilina por citometría de flujo. Facultad de Química, UNAM, 2005.
 - 71) Shibayama K, Y Doi, N Shibata, T Yagi, T Nada, Y Iinuma, Y Arakawa. Apoptotic Signaling Pathway Activated by *Helicobacter pylori* Infection and Increase of Apoptosis-Inducing Activity under Serum-Starved Conditions. Infect Immun 2001; 69:3181-3189.
 - 72) Thornberry NA. Interleukin-1 β Converting Enzyme. En: Methods in enzymology. Academic Press, Inc, Great Britain. 1994: pág. 616-623.
-
-

-
-
- 73) Uwins C, C Deitrich, E Argo, E Stewart, I Davidson, P Cash. Growth-induced changes in the proteome of *Helicobacter pylori*. Electrophoresis 2006;27:1136-1146.
 - 74) Berkelman T, T Stenstedt. 2-DE Electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles and Methods. Amersham biosciencies. UK. 2004; pág. 133-136.
 - 75) Candiano G, M Bruschi, L Musante, L Santucci, GM Ghigger, B Carnemolla, P Orecchia, L Zardi, PG Righetti. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. Electrophoresis 2004;25:1327-1333.
 - 76) Görg A. Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis (A laboratory manual). Technische Universität München 2003. pág. 1-77.
 - 77) Bio-Rad Laboratories. Normalization. En PD-Quest™ User Guide for version 7.4.0 Windows and Macintosh.2005; pág. 6.7-6.10.
 - 78) Molloy MP, EE Brzezinski, J Hang, MT McDowell, RA VanBogelen. Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics. Proteomics 2003; 3:1912-1919.
 - 79) Schevchenko A, M Wilm, O Vorm, M Mann. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. Anal Chem 1996;68:850-858.
 - 80) Häcker G. The morphology of apoptosis. Cell Tissue Res 2000; 301:5-17.
 - 81) Granville DJ, CM Carthy, DWC Hunt, BM McManus. Apoptosis: Molecular Aspects of Cell Death and Disease. Laboratory Investigation 1998; 78:893-907.
 - 82) Ashktorab H, M Neapolitano, C Bomma, C Allen, A Ahmed, A Dubois, T Naab, DT Smoot. In vivo and in vitro activation of caspasa-8 and -3 associated with *Helicobacter pylori* infection. Microbes and Infection 2002;4:713-722.
 - 83) Rokkas T, S Ladas, C Liatsos, E Petridou, G Papatheodorou, S Theocharis, A Karameris, S Raptis. Relationship of *Helicobacter pylori* CagA status to Gastric Cell Proliferation and Apoptosis. Digestive Diseases and Sciences 1999;44: 487-493.
 - 84) Lee S, HS Lee, M Baek, DY Lee, YJ Bang, HN Cho, YS Lee, JH Ha, HY Kim, DI Jeoung. MAPK Singaling is Involved in Camptothecin-induced Cell Death. Mol Cells 2002; 14:348-354.
 - 85) Shi Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. Protein Science 2004;13:1979-7987.
 - 86) She FF, JY Lin, JY Liu, C Huang, DH Su. Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and experimental infection in mice. World J Gastroenterol 2003;9:516-520.
 - 87) Liu ZF, CY Chen, W Tang, JY Zhang, YO Gong, JH Jia. Gene-expression profiles in gastric epithelial cells stimulated with spiral and coccoid *Helicobacter pylori*. Journal of Medical Microbiology 2006;55:1009-1015.
-
-

-
-
- 88) Smejkal GB, MH Robinson, A Lazarev. Comparison of fluorescent stains: Relative photostability and differential staining of proteins in two-dimensional gels. *Electrophoresis* 2004;25:2511-2519.
 - 89) Kim N, EA Marcus, Y Wen, DL Weeks, DR Scout, HC Jung, IS Song, G Sachs. Genes of *Helicobacter pylori* Regulated by Attachment to AGS cells. *Infect Immun* 2004;72:2358-2368.
 - 90) Graham JE, RM Peek Jr, U Krishna, TL Cover. Global Analysis of *Helicobacter pylori* Gene Expression in Human Gastric Mucosa. *Gastroenterology* 2002;123:1637-1648.
 - 91) Haas G, G Karaali, K Ebermayer, WG Metzger, S Lamer, UZ Arndt, S Diescher, UB Goebel, K Vogt, AB Roznowski, BJ Wiedenmann, TF Meyer, T Aebischer, PR Jungblut. Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease. *Proteomics* 2002;2:313-324.
 - 92) Yan J, YF Mao, ZX Shao. Frequencies of the expression of main protein antigens from *Helicobacter pylori* isolates and production of specific serum antibodies in infected patients. *World J Gastroenterol* 2005;11:421-425.
 - 93) Thoreson ACE, A Hamlet, J Celik, M Byström, S Nyström, L Olbe, AM Svennerholm. Differences in Surface-Exposed Antigen Expression between *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Duodenal Ulcer Patients and from Asymptomatic Subjects. *J Clin Microbiol* 2000;38:3436-3441.
 - 94) Cabral MM, CM Mendes, LP Castro, CT Cartelle, J Guerra, DM Queiroz, AM Nogueira. Apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis is related to *cagA* status. *Helicobacter* 2006;11:469-76.
 - 95) Vanet A, A Labigne. Evidence for Specific Secretion Rather than Autolysis in the Release of Some *Helicobacter pylori* Proteins. *Infect Immun* 1998;66:1023-1027.
 - 96) Kohda K, K Tanaka, Y Aiba, M Yasuda, T Miwa, Y Koga. Role of apoptosis induced by *Helicobacter pylori* infection in the development of duodenal ulcer. *Gut* 1999;44:456-62.
 - 97) Cremades N, M Bueno, M Toja, J Sancho. Towards a new therapeutic target: *Helicobacter pylori* flavodoxin. *Biophysical Chemistry* 2005;115:267-276.
 - 98) Freigang J, K Diederichs, KP Schafer, W Welte, R Paul. Crystal structure of oxidized flavodoxin, an essential protein in *Helicobacter pylori*. *Protein Sci* 2002; 11:253-61.
 - 99) Lim JW, H Kim, KH Kim. NF-kappaB, inducible nitric oxide synthase and apoptosis by *Helicobacter pylori* infection. *Free Radic Biol Med* 2001;31:355-66.
-
-