Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

"Detección de genes involucrados en apoptosis a partir de biopsias gástricas asociadas a la infección por *Helicobacter pylori*"

TESIS

Que para obtener el título de

Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

Presenta:

Villegas Bautista Alejandro

Director: M en C. Juan Carlos Bravata Alcántara

Co-asesora: Dra. Maritere Domínguez Rojas

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2021

UNAM
CUAUTITLÁN

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

VNIVERSIDAD NACIONAL AVTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Detección de genes involucrados en apoptosis a partir de biopsias gástricas asociadas a la infección por *Helicobacter pylori*

Que presenta el pasante: **Alejandro Villegas Bautista**
Con número de cuenta: **312234065** para obtener el título de: **Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Octubre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Verónica Ruíz Solorio	
VOCAL	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

VNIVERSIDAD NACIONAL AVTNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Detección de genes involucrados en apoptosis a partir de biopsias gástricas asociadas a la infección por *Helicobacter pylori*

Que presenta el pasante: **Alejandro Villegas Bautista**
Con número de cuenta: **312234065** para obtener el título de: **Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Octubre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Verónica Ruíz Solorio	
VOCAL	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

VNIVERSIDAD NACIONAL AVFNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Detección de genes involucrados en apoptosis a partir de biopsias gástricas asociadas a la infección por *Helicobacter pylori*

Que presenta el pasante: **Alejandro Villegas Bautista**
Con número de cuenta: **312234065** para obtener el título de: **Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Octubre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Verónica Ruíz Solorio	
VOCAL	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

VNIVERSIDAD NACIONAL AVTNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Detección de genes involucrados en apoptosis a partir de biopsias gástricas asociadas a la infección por *Helicobacter pylori*

Que presenta el pasante: **Alejandro Villegas Bautista**
Con número de cuenta: **312234065** para obtener el título de: **Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Octubre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Verónica Ruíz Solorio	
VOCAL	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

VNIVERSIDAD NACIONAL AVÍNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Detección de genes involucrados en apoptosis a partir de biopsias gástricas asociadas a la infección por *Helicobacter pylori*

Que presenta el pasante: Alejandro Villegas Bautista
Con número de cuenta: 312234065 para obtener el título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Octubre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Verónica Ruíz Solorio	
VOCAL	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

Agradecimientos

- Al M. en C. Juan Carlos Bravata Alcántara, por darme la oportunidad de ingresar al Laboratorio de Genética y Diagnóstico Molecular del Hospital Juárez de México y sobre todo, por hacerme formar parte del equipo de trabajo, por permitirme tomar este proyecto. Gracias.

- A la Dra. en C. Maritere Domínguez Rojas, por todo el aprendizaje que obtuve durante mi carrera en sus clases, por el apoyo que me brindó para poder realizar este trabajo, por su tiempo y aceptación, por todos los consejos que me otorgó para poder concluir este último paso en mi carrera universitaria.

- A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Genética y Diagnóstico Molecular, Gustavo, Montse y Ladislao, por todo el apoyo, porque sin ustedes esto no hubiera sido igual de divertido.

- Al Doctor Carlos Alberto Serrano Bello, por brindarme su ayuda y colaborar brindando todo du conocimiento para este trabajo.

- A mis amigos de la carrera (Miguel, Cinthya, Karen, Alejandro y Edwin), por enseñarme la importancia de una amistad a lo largo de la universidad. Por cada momento que pasamos juntos, sin duda, son lo mejor que me pudo pasar en la universidad. Gracias por sus consejos y enseñanzas a lo largo de esta etapa.

- A todos mis profesores, que sin duda han dejado una huella en mí como profesional, no solo en cuestión de conocimientos sino como las excelentes personas que son.

- Agradecimiento especial para mis padres, Araceli Bautista y Arturo Villegas, sin ustedes yo no estaría en donde estoy. ¡Éste logro es suyo!

- A la UNAM y principalmente a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, mi alma máter.

Dedicatoria

A mis padres Araceli y Arturo

Dedico este trabajo a ustedes, porque no es más que el reflejo y culminación de todo su esfuerzo, amor, tiempo, atención y sustento. Gracias a ustedes he podido terminar esta etapa de mi vida con gran satisfacción. Gracias por su cariño y apoyo incondicional, son el pilar de mi vida y espero algún día poder ser tan grandioso como lo son ustedes.

A mi hermano Mauricio

Eres mi mayor inspiración, la fuerza que me hace querer ser una mejor persona y mejor ejemplo para ti.

A mi abuelo Santiago

Por ser siempre un segundo padre para mí, por su atención, preocupación y cariño a lo largo de mi vida.

¡GRACIAS, LOS AMO!

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras 4

Índice de tablas 6

Índice de gráficas 8

1. INTRODUCCIÓN 9
2. MARCO TEÓRICO 11
2.1. Enfermedades gástricas 11
2.2. Etiología de los padecimientos gástricos 12
2.3. Generalidades de *Helicobacter pylori* 13
2.4. Epidemiología de *H. pylori* 13
2.5. Patogenicidad de *H. pylori* 14
2.6. Factores de virulencia propios de *H. pylori* 15
2.6.1. Ureasa 16
2.6.2. Sistemas antioxidantes 17
2.6.3. Flagelos 18
2.6.4. Adhesinas 19
2.6.5. Isla de patogenicidad CagA (CagPAI) 21
2.6.6. CagA (Citotoxina asociada al gen del antígeno A) 21
2.6.7. VacA (Citotoxina de vacuolización A) 23
2.6.8. IceA (Inducido por contacto al epitelio) 25
2.6.9. DupA (Gen promotor de úlcera duodenal) 25
2.7. Factores adicionales a la virulencia de *H. pylori* 26
2.7.1. Factores del hospedero 26
2.7.2. Factores ambientales 26
2.8. Muerte celular 28
2.9. Apoptosis 28
2.10. Caspasas 31
2.11. Vías de apoptosis 37
2.11.1. Vía de apoptosis intrínseca o mitocondrial 39
2.11.2. Vía de apoptosis extrínseca o de receptores de muerte 44

2.12. *H. pylori* y apoptosis 49
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 58
4. HIPÓTESIS 60
5. OBJETIVO GENERAL 60
5.1. Objetivos particulares 60
6. DISEÑO EXPERIMENTAL 61
6.1. Tipo de estudio 61
6.2. Población de estudio 61
6.3. Criterios de inclusión 61
6.4. Criterios de exclusión 61
6.5. Materiales 62
6.5.1. Material biológico 62
6.5.2. Reactivos 62
6.5.3. Equipos 62
6.6. Métodos 63
6.6.1. Diagrama experimental 63
6.6.2. Diseño y validación de oligonucleótidos 64
6.6.3. Preparación de oligonucleótidos 68
6.6.4. Recolección y almacenamiento de muestras 69
6.6.5. Extracción de ácidos nucleicos (DNA/RNA) a partir de biopsias gástricas frescas 70
6.6.6. Cuantificación de ácidos nucleicos (DNA/RNA) 73
6.6.7. PCR de punto final para detección de los genes *16S, glmM, vacA m1 y cagA* 74
6.6.8. RT-PCR para detección de los genes *gapdh, b-actina, bcl-2, bcl-xl, bax, caspasa 3, 8 y 10* 76
6.6.9. qPCR para detección de los genes *gapdh, b-actina, bcl-2 y caspasa 10* 78
6.6.10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% 80
6.6.11. Análisis estadístico 81
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 82

7.1. Consulta de expedientes 82
7.2. Validación de oligonucleótidos para la detección de los genes codificantes a los principales factores de virulencia de H. pylori y los involucrados en apoptosis 89
7.3. PCR de punto final para detección de los genes 16S, glmM, vacA m1 y cagA en muestras de biopsias gástricas a partir de DNA 89
7.4. RT-PCR para detección de los genes *gapdh, bcl-2, bcl-xl, bax, caspasa 3, 8 y 10* a partir de RNA 109
7.5. Cuantificación relativa por qPCR de los genes *bcl-2 y caspasa 10* 112
8. CONCLUSIONES 126
9. REFERENCIAS 126

Índice de figuras

Figura 1. Rol de la ureasa para la colonización por *H. pylori* 17

Figura 2. Mecanismos de colonización y factores de virulencia de *H. pylori* ...25

Figura 3. Estructura general de las procaspasas 31

Figura 4. Estructura del dominio y clasificación función de las caspasas placentarias de mamíferos 32

Figura 5. Caspasas en vías de muerte celular 34

Figura 6. Reclutamiento, oligomerización y autoproteólisis de las caspasas de clase I para su activación 35

Figura 7. Vías de señalización de apoptosis 38

Figura 8. La vía apoptótica mitocondrial 39

Figura 9. Regulación de la integridad de la membrana externa mitocondrial por la familia de proteínas Bcl-2 41

Figura 10. Vía de señalización del receptor de muerte 45

Figura 11. Esquema de las principales vías de señalización que conducen a la apoptosis o supervivencia de las células 48

Figura 12. Interacción física y funcional entre *H. pylori* CagA y SHP-2 50

Figura 13. Inducción a apoptosis mediada por TRAIL mediante la regulación de la proteína inhibidora de FLICE (FLIP) 55

Figura 14. Secuencia FASTA obtenida de *<H. sapiens bcl-xL ARNm>* en GenBank 64

Figura 15. Plataforma bioinformática Primer3Plus 65

Figura 16. Plataforma bioinformática IDT, OligoAnalyzer 65

Figura 17. Resultados del análisis de oligonucleótidos en OligoAnalyzer 66

Figura 18. Programa empleado para la estandarización de cada par de primers ……..69

Figura 19. Representación anatómica de los sitios de biopsia establecidos para la detección de cáncer gástrico y lesiones premalignas según protocolo Sydney ……...70

Figura 20. Electroforesis para detectar el gen *16S* ……90

Figura 21. Electroforesis para detectar el gen *glmM* ……..91

Figura 22. Electroforesis para detectar el gen *vacA m1* ……92

Figura 23. Electroforesis para detectar el gen *cagA* ……..93

Figura 24. Electroforesis para detectar el gen *gapdh* ……94

Figura 25. Electroforesis para detectar el gen *bcl-2* ……..96

Figura 26. Electroforesis para detectar el gen *bcl-xL* ……97

Figura 27. Electroforesis para detectar el gen *bax* ……..98

Figura 28. Electroforesis para detectar el gen *caspasa 3* ……99

Figura 29. Electroforesis para detectar el gen *caspasa 8* ……100

Figura 30. Electroforesis para detectar el gen *caspasa 10* ……101

Figura 31. Curvas de amplificación correspondiente al gen *b-actina* ……..102

Figura 32. Curva de amplificación correspondiente al gen *gapdh* ……...103

Figura 33. Curva de amplificación correspondiente al gen *bcl-2* ……..104

Figura 34. Curva de amplificación correspondiente al gen *caspasa 10* …....104

Figura 35. Curvas de disociación de los genes A) *bcl-2* y B) *caspasa 10* a 63.2°C ……....105

Índice de tablas

Tabla 1. Interacciones entre caspasas de clase I y adaptadores, a través de sus dominios 36

Tabla 2. Oligonucleótidos obtenidos para la detección de cada uno de los genes 67

Tabla 3. Cantidades de reactivos utilizados para la identificación da patógenos mediante PCR de punto final 68

Tabla 4. Mezcla de reacción para PCR de los genes *16S, glmM, vacA m1 y cagA* 74

Tabla 5. Condiciones de PCR para el gen *16 S y glmM* (PCR dúplex) 75

Tabla 6. Condiciones de PCR para el gen *vacA m1* 75

Tabla 7. Condiciones de PCR para el gen *cagA* 75

Tabla 8. Preparación de Master Mix para PCR 77

Tabla 9. Condiciones de PCR para los genes *gapdh y b-actina* 77

Tabla 10. Condiciones de PCR para genes *bcl-2, bcl-xl, bax, caspasa 3, 8 y 10* 77

Tabla 11. Mezcla de reacción para qPCR de los genes *b-actina, gapdh, bcl-2, y caspasa 10* 78

Tabla 12. Condiciones de qPCR para el gen *gapdh y b-actina* 79

Tabla 13. Condiciones de qPCR para el gen *bcl-2* 79

Tabla 14. Condiciones de qPCR para el gen *caspasa 10* 79

Tabla 15. Clasificación de los diagnósticos histopatológicos de acuerdo a su nivel de gravedad 87

Tabla 16. Resultados obtenidos para la detección mediante PCR de punto final para la detección de los genes *16 S, glmM, vacA m1 y cagA y* combinaciones posibles de los factores de virulencia ……106

Tabla 17. Resultados obtenidos para la detección mediante RT-PCR para la detección de los genes *gapdh, bcl-2, bcl-xL, bax, caspasa 3, 8 y 10* ……..109

Tabla 18. Resumen de los Ct obtenidos mediante qPCR para el gen *gapdh* y su análisis mediante el método $2^{-(\Delta Ct)}$ en muestras agrupadas por padecimiento (Benigno, intermedio y maligno) ……...114

Tabla 19. Resumen de los Ct obtenidos mediante qPCR para el gen *b-actina* y su análisis mediante el método $2^{-(\Delta Ct)}$ en muestras agrupadas por padecimiento (Benigno, intermedio y maligno) ……...115

Tabla 20. Resumen de los Ct obtenidos mediante qPCR para el gen *gapdh* y su análisis mediante el método $2^{-(\Delta Ct)}$ en muestras agrupadas por presencia del factor de virulencia vacA ……..117

Tabla 21. Resumen de los Ct obtenidos mediante qPCR para el gen *b-actina* y su análisis mediante el método $2^{-(\Delta Ct)}$ en muestras agrupadas por presencia del factor de virulencia vacA ……..118

Tabla 22. Resumen de los Ct obtenidos mediante qPCR para el gen *bcl-2* y *caspasa 10* y su análisis mediante el método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ en muestras agrupadas por padecimiento (Benigno, intermedio y maligno) ……121

Tabla 23. Resumen de los Ct obtenidos mediante qPCR para el gen *bcl-2* y *caspasa 10* y su análisis mediante el método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ en muestras agrupadas por presencia del factor de virulencia vacA ……...124

Índice de gráficas

Gráfica 1. Proporción de muestras asociado al sexo del paciente ……..83

Gráfica 2. Agrupamiento de las edades de los pacientes ……...84

Gráfica 3. Motivo de estudio de las muestras de biopsia gástrica ……85

Gráfica 4. Diagnósticos endoscópicos de las biopsias gástricas ……..86

Gráfica 5. Presencia de *H. pylori* en las muestras de biopsia gástrica ……..88

Gráfico 6. Aplicación del método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ para la selección del control endógeno en muestras agrupadas por padecimiento ……116

Gráfico 7. Aplicación del método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ para la selección del control endógeno en muestras agrupadas por presencia del factor de virulencia vacA ……..119

Gráfico 8. Aplicación del método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ para la determinación de expresión relativa en muestras agrupadas por padecimiento ……..122

Gráfico 9. Resultados obtenidos por medio de la aplicación del método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ para la determinación de expresión relativa del gen *caspasa 10* en muestras agrupadas por padecimiento ……122

Gráfico 10. Aplicación del método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ para la determinación de expresión relativa en muestras agrupadas por presencia del factor de virulencia vacA ……..125

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, casi el 70% de la población mundial presenta infección por la bacteria *H. pylori*, muchos de estos casos son asintomáticos y principalmente se manifiestan en países en vías de desarrollo (Torres Jiménez and Torres Bayona 2016). Esta bacteria presenta diferentes factores de virulencia como cagA y vacA, los cuales desencadenan un daño que a largo plazo puede generar adenocarcinoma. En México el adenocarcinoma gástrico es la tercera causa de muerte en personas mayores de edad, por lo cual debe de tomarse en cuenta de manera importante y ver la asociación a *H. pylori*, que bien es sabido, esta bacteria no es el principal factor etiológico del cáncer gástrico, pero si es un agente carcinogénico comprobado.

Cuando *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica, desencadena una respuesta inflamatoria en el paciente y a su vez modifica vías de señalización, una de ellas es la apoptosis, por efectos de las proteínas CagA y VacA. No todas las cepas tienen los genes que codifican a estas proteínas, pero de ser el caso, presentan un mayor riesgo para el paciente infectado.

Se ha estudiado el efecto de los principales factores de virulencia, las cepas menos virulentas, H. pylori cagA -/ vacA-, aumentan tanto la replicación celular como la apoptosis, mientras que las cepas cagA + / vacA+, aumentan la replicación pero no la apoptosis (Hatakeyama and Higashi 2005).

Por lo tanto, en este estudio se busca obtener información acerca de cómo se puede ver alterada la vía de señalización, detectando los niveles de expresión de genes como *bcl-2 y caspasa 10,* ambos involucrados en apoptosis, mediante una técnica sensible como lo es la qPCR.

Para este objetivo se trabajaron 20 biopsias gástricas como muestras biológicas, las cuales fueron sometidas a una extracción de ácidos nucleicos, DNA y RNA, para posteriormente hacer la detección a partir de DNA de la bacteria y sus factores de virulencia, y posteriormente con el RNA, realizar RT-PCR y detectar la presencia de los genes *bcl-2, bcl-xL, bax, caspasa 3, caspasa 8 y caspasa 10.*

Los variación de los niveles de expresión se realizó mediante qPCR para detectar los genes *bcl-2 y caspasa 10*, utilizando un método de cuantificación relativa, el método del $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ el cual permite comparar que tanto se expresan los genes de interés, comparando el tipo de padecimiento que presentaron los pacientes a los cuales se les tomo muestra, dichos padecimientos incluye gastritis crónica, metaplasia intestinal y adenocarcinoma gástrico, o bien, comparando la presencia y ausencia del factor de virulencia vacA.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Enfermedades gástricas

Las enfermedades gástricas o también referidas como enfermedades gastrointestinales (EGI) son padecimientos a consecuencia a una infección asociada a bacterias, virus o parásitos, así como también alimentos y algunos medicamentos que pueden llegar a provocarlos (Cecilia, Guadalupe et al. 2011).

Este tipo de acontecimientos deben ser tratados médicamente para resolverlos empleando diferentes tratamientos, de lo contrario podría generarse otros de mayor severidad que traigan más daños y molestias para la salud del paciente.

Los principales síntomas cuando se da una enfermedad gástrica son el sangrado, distensión, estreñimiento, náuseas, vómito, acidez estomacal, dolor o inflamación estomacal, diarrea y por consecuencia deshidratación, así como también la pérdida o ganancia de peso (Vinaccia, Contreras et al. 2004).

Una forma de evitar una enfermedad gástrica es cuidar nuestra dieta e higiene de la comida que ingerimos, hacer un correcto aseo de manos cada que sea necesario y siempre antes de comer, desinfectar alimentos de origen vegetal y tomar agua embotellada o en su defecto hervida con la finalidad de eliminar todo microorganismo que pueda presentarse.

Debe tenerse en cuenta que las personas con mayor predisposición a pasar por una enfermedad gastrointestinal son aquellos niños menores de 5 años, adultos mayores, mujeres embarazadas, personas con enfermedades crónicas o personas que viven en condiciones antihigiénicas (Maroto Castillo and Logroño Ruiz 2010).

Representan en México una de las principales razones de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte en el país y el mundo. Por ello son un problema de salud pública a nivel mundial.

2.2. Etiología de los padecimientos gástricos

Las EGI infecciosas son con gran frecuencia causadas por *Escherichia coli, Salmonella, Shigella y Helicobacter pylori*, parásitos como *Giardia lamblia* y amibas, y virus, tal como Rotavirus y virus Norwalk, recordando que estas enfermedades se transmiten vía fecal-oral o bien, debido al consumo de alimentos y bebidas contaminadas (Cecilia, Guadalupe et al. 2011).

Afectan principalmente a niños pequeños debido a las condiciones y exposiciones con objetos sucios y personas adultas, ya que no presentan las mismas capacidades inmunológicas que puedan hacerle frente a los agentes infecciosos. La prevalencia de la enfermedad dependerá del nivel socioeconómico del paciente (Salido and Fernández 2004).

Aunque muchas veces se trata de un ligero contratiempo en los adultos sanos, un desequilibrio electrolítico puede provocar una deshidratación en las personas muy enfermas, en niños y ancianos. En Latinoamérica, dependiendo de factores socioeconómicos y nutricionales, la probabilidad de que un niño muera antes de los 5 años por estas causas puede llegar al 50% (Martínez, Gómez et al. 2008).

Helicobacter pylori, denominada *H. pylori*, es una bacteria que causa gastritis y se ha asociado con el desarrollo de úlceras gástricas y duodenales. Puede causar dolor estomacal o náuseas, pero en muchos casos no tiene síntomas. Las personas infectadas tienen un riesgo del 10 % al 20 % de desarrollar úlceras pépticas a lo largo de su vida y un riesgo del 1 % al 2 % de cáncer de estómago (Harris, Godoy et al. 2001).

2.3. Generalidades de *Helicobacter pylori*

H. pylori es una bacteria espiral, microaerofílica, gram negativa, se observa con terminales redondeados en biopsias gástricas. Cuando es cultivada en medio sólido tiene forma de varilla y las formas espirales son infrecuentes o ausentes. Después de cultivo prolongado en medio sólido o líquido, las formas cocoides son las que predominan (Cava and Cobas 2003).

Es una bacteria no fermentadora, no oxidante, tiene un tamaño de 2.5 a 4 micras de longitud por 0.5 a 1 micra de ancho, presenta flagelos lofótricos que dan gran movilidad, respecto a sus formas cocoides. Se han postulado tres posibilidades respecto a su morfología cocoide: una de que son formas de resistencia implicadas en la transmisión, que son formas viables pero no cultivables, o de que son formas de bacterias muertas.

Como bacteria gram negativa, cuentan con la presencia de una membrana plasmática y una membrana externa; su composición interna se caracteriza por un complejo constituido por elementos fibrilares nucleares y ribosomas, que se entremezclan entre sí, pudiendo mostrar en ocasiones bacteriófagos; como hecho importante es de que la vaina de sus flagelos tiene una estructura lipídica exactamente igual a la de la membrana externa, con la misión de proteger a los flagelos de la degradación del ácido (Valadez, Menéndez et al. 2010).

2.4. Epidemiología de *H. pylori*

La infección por *H. pylori* es el proceso de colonización bacteriana más común a nivel mundial. Casi dos tercios de la población mundial albergan la bacteria, y los índices de infección son mucho más elevados en los países en vía de desarrollo a diferencia de los desarrollados. (Torres Jiménez and Torres Bayona 2016).

En la última década ha disminuido en forma importante la prevalencia (hasta en un 20%); en la población mexicana estos factores de riesgo son frecuentes. En la actualidad, la colonización del estómago por *H. pylori* se considera un factor de riesgo para el desarrollo de úlcera péptica, gastritis crónica, adenocarcinoma

gástrico, linfoma gástrico de tejido linfoide asociado a mucosa (Maltoma), entre otras gastropatías (Torres Jiménez and Torres Bayona 2016).

En México, el cáncer gástrico es la tercera causa de muerte por cáncer en personas mayores de 20 años de edad. Existen múltiples factores relacionados con el desarrollo del cáncer gástrico, uno de ellos, la infección por *H. pylori*, que aumenta el riesgo de desarrollar esta neoplasia (Cruz, Apolinar et al. 2017).

2.5. Patogenicidad de *H. pylori*

H. pylori ingresa por la boca, desciende al tubo digestivo y con la ayuda de sus flagelos llega hasta la superficie del mucus de las células epiteliales de la mucosa gástrica del fundus y antro pilórico preferiblemente (Bai, Li et al. 2010). *H. pylori* posee adhesinas para la unión a las células foveolares superficiales (Mahdavi, Sondén et al. 2002). La colonización se facilita por la inhibición de la producción de ácido clorhídrico (HCl) y la neutralización de éste por el amonio producido por la acción de la ureasa bacteriana (Dunn, Vakil et al. 1997). *H. pylori* provoca citotoxicidad a nivel de la mucosa gástrica debido a un sistema de secreción tipo IV, codificado por genes ubicados en una región genómica de 37 kb denominada “Isla de patogenicidad CagA o Cag-PAI”, permitiendo la inyección de proteínas con actividad citopática como CagA y Vac A, respectivamente. *H. pylori* posee fosfolipasas, lo cual conlleva a la liberación de lisolecitinas, las cuales constituyen un factor ulcerogénico. También posee lipopolisacáridos (LPS), peptidoglucanos, tetrapéptidos, entre otros PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) que estimulan a una gran variedad de receptores extra e intracelulares como el Nod 1, los cuales ejercen un importante efecto quimiotáctico sobre los eosinófilos y neutrófilos, y facilitan su reclutamiento y proliferación. Estas células al activarse provocan la liberación de citoquinas, lo cual desencadena una respuesta inflamatoria amplificante, la cual lesiona aún más la mucosa mediante la liberación de mediadores inflamatorios (Torres Jiménez and Torres Bayona 2016).

2.6. Factores de virulencia propios de *H. pylori*

Aunque la infección con *H. pylori* promueve la aparición de diferentes enfermedades gastroduodenales, la mayoría de las personas infectadas no presentan síntomas ni desarrollan esas afecciones y la incidencia de dichas enfermedades varía considerablemente entre las diferentes regiones geográficas, esto se debe a que la patogénesis está determinada por la compleja interacción de factores del hospedero, ambientales y bacterianos. Los factores de virulencia de la bacteria pueden causar daño a las células epiteliales directamente o estimular la producción de citocinas proinflamatorias, así se produce un proceso de inflamación que también ocasiona lesiones al tejido gástrico. Este hecho depende a su vez de la predisposición genética del hospedero para dar esta respuesta inmune, así como de las condiciones ambientales en las que se desarrolla el paciente infectado (González López and Rodríguez González 2011).

H. pylori posee gran diversidad genética entre aislados clínicos, la presencia de determinados genotipos es considerada como una ventaja selectiva así como una herramienta importante para predecir las diferentes afecciones gástricas. Los principales genes de virulencia de *H. pylori* son generalmente clasificados en 3 categorías: 1. Los genes cepa-específicos, como los de la isla de patogenicidad cag (cagPAI) y los localizados en las regiones de plasticidad (Ej: jhp0947 y dupA); 2. Los genes de fase variable (Ej: babA, oipA, sabA y hopZ) y 3. Los genes de estructura variable (Ej: vacA y la región hipervariable del gen cagA). Los principales estudios de los factores de patogenia de *H. pylori* han centrado su atención fundamentalmente en aquellos que aparecen y se expresan diferencialmente en las cepas más patogénicas. Entre estos, los más estudiados han sido: las proteínas CagA y VacA; las diferentes OMPs que contribuyen a la virulencia; así como recientemente los genes de las zonas de plasticidad (González López and Rodríguez González 2011).

De una manera más simple, pueden clasificarse en dos grupos, los factores de virulencia que contribuyen a la colonización de la bacteria (ureasa, sistemas antioxidantes, flagelos y adhesinas) y los que favorecen el daño a la mucosa

gástrica (cagPAI, cagA, vacA, IceA, DupA, etc). A continuación de describe cada uno de los principales factores de virulencia de *H. pylori*:

2.6.1. Ureasa

H. pylori produce una gran cantidad de ureasa, esta neutraliza el ácido gástrico al producir amoníaco para la supervivencia de la bacteria (Ha, Oh et al. 2001).

Hidroliza la urea [CO $(NH_{2)2}$] en amonio (NH_4^+) y dióxido de carbono (CO_2). Proporciona un pH neutro alrededor del microorganismo, así le permite evadir las propiedades bactericidas del ácido clorhídrico (HCl). Los iones amonio inhiben los trasportadores gástricos de bicarbonato, con lo cual se impide la alcalinización de la mucosa gástrica (Hatakeyama 2009). El amonio producido aumenta el pH, elevándolo hasta 6 o 7 en su entorno. De este modo puede alcanzar la superficie de las células de la mucosa, donde el pH es prácticamente neutro. El NH_4^+ produce una serie de daños que afectan a la microcirculación y a las células epiteliales superficiales y origina una necrotización del tejido (Torres Jiménez and Torres Bayona 2016).

La actividad ureasa de *H. pylori* desempeña un papel importante en su patogenicidad, y la inhibición de esta actividad enzimática puede tener potencial terapéutico (Smoot, Mobley et al. 1990).

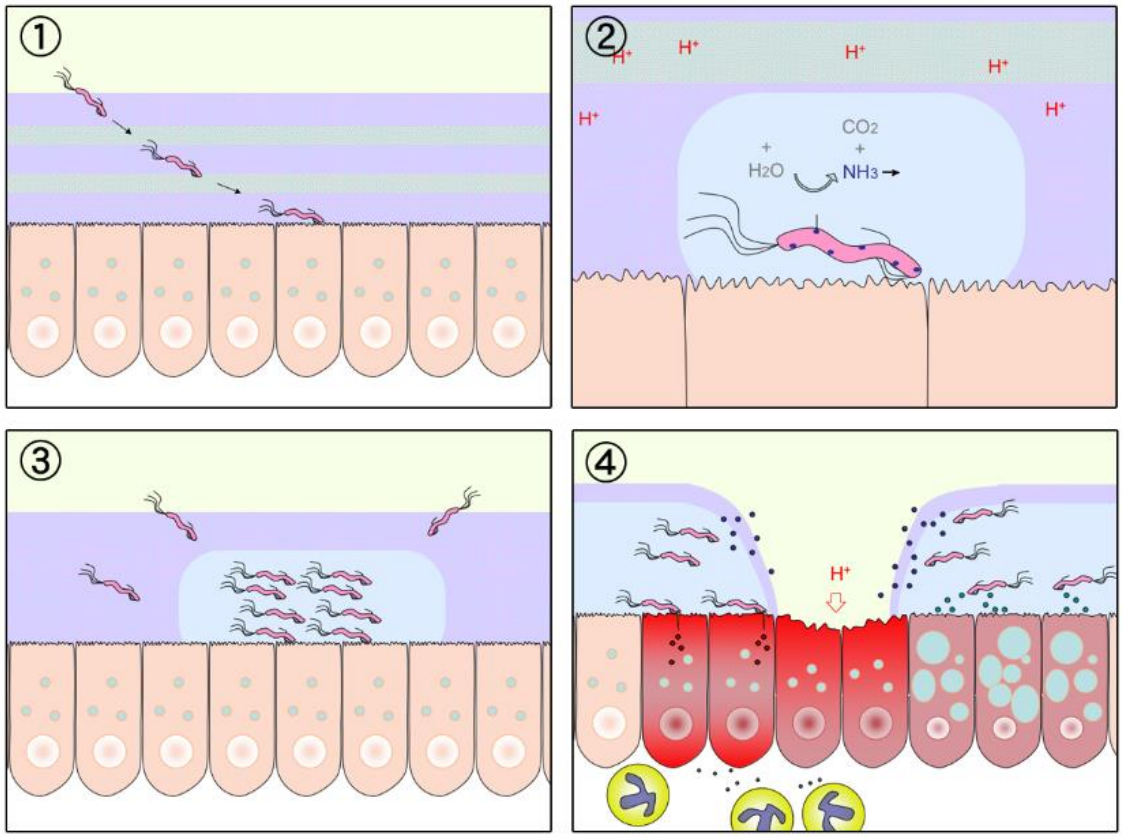


Figura 1. Rol de la ureasa para la colonización por *H. pylori*. Se muestran los pasos 1) Por acción de sus flagelos se desplaza hasta la zona de la mucosa gástrica, 2) La ureasa hidroliza la urea en NH_3 y CO_2, 3) El medio se vuelve neutro y se facilita la colonización y 4) El NH_4^+ produce una serie de daños a las células epiteliales y originan necrotización del tejido (Khan, Karim et al. 2009)

2.6.2. Sistemas antioxidantes

H. pylori induce una fuerte respuesta inflamatoria por la infiltración de las células del huésped. Esta defensa está mediada por neutrófilos y macrófagos, que culmina en la generación de grandes cantidades de ROS / RNS presentadas al patógeno persistente (Wang, Alamuri et al. 2006).

H. pylori cuenta con mecanismos para la detoxificación de estos metabolitos, así como para la reparación de los daños sufridos que favorecen su supervivencia en el tejido inflamado (De Falco, Lucariello et al. 2015).

Entre los sistemas enzimáticos de detoxificación están: la enzima superóxido dismutasa (cataliza la transformación del superóxido en peróxido de hidrogeno), la catalasa o peroxidasa (cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en agua y oxigeno gaseoso). También facilita la evasión de la fagocitosis realizada por macrófagos ubicados en el epitelio superficial; las peroxirredoxinas (catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno, peroxinitrito y otros hidroperóxidos orgánicos a sus correspondientes alcoholes), la flavoproteína MdaB, una NADPH quinona reductasa, que *H. pylori* expresa cuando debe compensar la pérdida de los principales componentes antioxidantes. La proteína NAP (Neutrophil activating protein), codificada por el gen napA, tiene función de bacterioferritina para captar los iones ferrosos libres intracelulares que pueden dañar el DNA de *H. pylori* y protege a éste del estrés oxidativo. Puede actuar como adhesina cuando se secreta o se expresa en la superficie bacteriana, pues tiene afinidad por las ceramidas presentes en las membranas plasmáticas celulares y por el grupo sanguíneo Lewis (Jiménez and Bayona 2016).

2.6.3. Flagelos

Facilitan la penetración y la adherencia en el epitelio superficial de la mucosa gástrica. *H. pylori* posee alrededor de 2 a 6 flagelos monopolares. Cada flagelo está compuesto por dos flagelinas, FlaA y FlaB. FlaB se localiza en la base del flagelo, mientras que la más abundante, FlaA, se encuentra en el exterior (Jiménez and Bayona 2016).

2.6.4. Adhesinas

H. pylori se une a las células del huésped de forma específica mediante un elevado número de adhesinas (Cervantes-García 2016).

Las adhesinas involucradas en la fisiopatología de la infección por *H. pylori son*:

HpaA (Adhesina A de *Helicobacter pylori*)

Es una de las principales proteínas de la membrana externa. HpaA media la unión a glicoconjugados con ácido siálico (N-acetil-neuraminillactosa) presentes en la superficie de las células epiteliales gástricas y neutrófilos (Nyström and Svennerholm 2007).

BabA (Adhesina de unión al antígeno del grupo sanguíneo)

Es la adhesina más estudiada y caracterizada, es codificada por los genes babA1 y babA2 (Jiménez and Bayona 2016); interactúa con las células epiteliales a través de los antígenos de Lewis B (Leb) fucosilados de los grupos sanguíneos ABO del humano. Aunque se han identificado tres alelos bab (babA1, babA2, y babB), sólo el gen babA2 es funcionalmente activo (Cervantes-García 2016).

Las características de unión de las cepas de *H. pylori* sugieren que la proteína BabA está involucrada en la glicosilación de la mucosa del hospedero (Figura 2) que le permite a *H. pylori* adaptarse para colonizar y persistir (Cervantes-García 2016).

Esta unión promueve una respuesta inmune no específica con producción de autoanticuerpos dirigidos a las células productoras de HCl, lo cual contribuye a la gastritis crónica y a la pérdida de células parietales (Jiménez and Bayona 2016).

Algunos estudios han sugerido que BabA2 está asociada con un riesgo mayor de desarrollar enfermedades más severas, como úlcera duodenal y adenocarcinoma, cuando se encuentra unida a cagA y vacAs1. BabA unida a los antígenos de Le^b induce el rompimiento de la doble cadena de DNA, aumentando la adherencia y habilitando el contacto del aparato de secreción tipo IV a las células del hospedero, desarrollando una respuesta inflamatoria fuerte. *H. pylori* se une a las células receptoras del hospedero e induce cambios inmediatos mediante señales de

transducción, permitiendo la infiltración de células inflamatorias y estableciendo mecanismos para evadir la respuesta inmune y crear una infección persistente (Cervantes-García 2016).

SabA (Adhesina de unión al ácido siálico)

Proteína de adhesión al ácido siálico, se une a los receptores con el ácido siálico de los neutrófilos y origina la activación de su respuesta oxidativa (Rad, Gerhard et al. 2002). (Figura 2)

HopP y PME17 se unen a los receptores del ácido siálico de los antígenos de Lewis-syalyl expresados en el tejido gástrico inflamado. SabA+ se asocia con el desarrollo de metaplasia intestinal, atrofia gástrica y cáncer gástrico. Las cepas de *H. pilori* SabA no opsonizadas se unen específicamente a neutrófilos a través de carbohidratos sializados, estimulándolos para inducir la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que causa daño oxidativo en el epitelio gástrico y muestra a SabA como un factor de virulencia importante (Cervantes-García 2016).

OipA (Proteína inflamatoria externa)

Todas las cepas poseen el gen, pero solo algunas la expresan (Yamaoka, Kikuchi et al. 2002). Su expresión está asociada a una mayor producción de IL-8 y otras citoquinas proinflamatorias, aunque no se sabe cuál es su contribución real en la inflamación gástrica, porque está asociada a las cepas cagA+. OipA también está involucrada con el desarrollo de úlcera duodenal y gastritis (Yamaoka, Kwon et al. 2000).

2.6.5. Isla de patogenicidad CagA (CagPAI)

Locus genómico de 40 kb, contiene 27 a 31 genes codificantes para el sistema de secreción tipo IV (T4SS); considerado como una “Jeringa molecular”. Los genes de la CagPAI no se expresan constitutivamente. Están regulados por mecanismos complejos que pueden activar o inhibir, dependiendo de condiciones microambientales como el nivel de oxígeno, la osmolaridad, la fase de crecimiento bacteriano, el pH, presencia o no de ácidos grasos volátiles de cadena corta, entre otras condiciones. La CagPAI codifica un sistema de secreción de proteínas tipo IV que inyecta CagA y peptidoglucanos en las células epiteliales del hospedador. La translocación de cagA depende de la presencia de un canal de urea protón dependiente UreI. Ante un descenso de pH, cagA se mueve del centro a la porción periférica del citoplasma. La proteína inyectada interactúa con diversas moléculas de la célula hospedadora. La proteína CagA translocada aumenta la producción de IL-8. Así mismo, los productos de la CagPAI están asociados con un aumento de la producción de otras citoquinas como la IL-1β, TNF-α y la molécula NF-κβ (Pachathundikandi, Brandt et al. 2011). (Figura 2)

2.6.6. CagA (Citotoxina asociada al gen del antígeno A)

Se considera el principal factor de virulencia de *H. pylori* (Backert, Ziska et al. 2000). Cuando esta proteína ingresa a la célula es fosforilada por la acción de tirosinas kinasas intracelulares, lo cual genera alteraciones en la traducción de señales, conduciendo a cambios proliferativos e inflamatorios asociados con el desarrollo de úlcera y cáncer (Figura 2). No todas las cepas de *H. pylori* presentan este factor de virulencia. La diana molecular de CagA es una fosfatasa SHP-2 (proteína tyrosine phospatase) (Higashi, Nakaya et al. 2004). En el gen CagA se han encontrado mutaciones y polimorfismos que están relacionados con la carcinogénesis gástrica (Higashi, Nakaya et al. 2004). La propia activación de SHP-2 por CagA puede contribuir a la proliferación celular excesiva; además, los cambios que se producen en la expresión génica en las células epiteliales tras la infección por *H. pylori* suelen ser dependientes de este sistema de secreción codificado por la CagPAI. CagA puede variar de tamaño entre las distintas cepas de *H. pylori*. Esta variación

proviene de la presencia de un número de repeticiones de una secuencia aminoacídica del extremo C-terminal y puede influir en la patogenicidad de las distintas cepas cagA+, debido a que la variación en el número de sitios de fosforilación implica una distinta efectividad en su unión a SHP-2, y por tanto una distinta activación (Odenbreit, Püls et al. 2000). La variabilidad en la región C-terminal de la proteína cagA consiste en el número de repeticiones de la secuencia Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala, llamado “Motivo EPIYA”; algunas cepas cagA+ carecen de él. La secuenciación de este motivo ha revelado que la región que flanquea esta secuencia de aminoácidos presenta cuatro segmentos distintos, conocidos como EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C y EPIYA-D (Panayotopoulou, Sgouras et al. 2007). EPIYA-A y B están presentes en casi todas las cepas cagA+. EPIYA-C es característico de cepas de *H. pylori* cagA+ presentes en Europa, Norteamérica y Australia, por lo cual es llamado “cagA Occidental” (Truong, Mai et al. 2009). EPIYA-D es específico de cepas circulantes en países de Asia Oriental, como Korea, Mongolia, Japón y China; por lo tanto se conoce como “cagA de Asia Oriental” (33). Los estudios sobre la proteómica de la oncoproteína cagA han revelado que el motivo EPIYA puede repetirse hasta tres veces, sin embargo, el número puede variar desde uno hasta siete repeticiones. La cepa que contiene el segmento EPIYA-D tiene un mayor potencial oncogénico que la cepa EPIYA-C. Sin embargo, se ha demostrado que cepas que contienen el genotipo Occidental presentan gran poder de fosforilación y oncogénico dependiendo del número de repeticiones del motivo EPIYA-C (Truong, Mai et al. 2009). Por lo anterior se ha postulado que las distintas isoformas de la oncoproteína cagA pueden influir en las diferentes tasas de cáncer gástrico observadas en países orientales y occidentales.

2.6.7. VacA (Citotoxina de vacuolización A)

La proteína VacA induce la formación de vacuolas dentro de la célula (Figura 2), también impide la fagocitosis, altera la presentación antigénica y promueve la apoptosis de la célula epitelial (Basso, Zambon et al. 2008). Está asociada al desarrollo de úlcera y adenocarcinoma gástrico. Distinto de lo que sucede con el gen cagA, todas las cepas de *H. pylori* son vacA positivas, aunque solo casi el 50 % de estas expresan la proteína. VacA posee una estructura hexamérica y se ensambla en la bicapa lipídica celular del hospedador formando un canal selectivo de aniones. Produce un gradiente de pH que atrae sustancias alcalinas al interior haciendo que se capte agua por ósmosis, lo cual origina una vacuolización alrededor del núcleo y más tarde el estallido y muerte celular (Yang, Cho et al. 2011). El gen vacA es altamente polimórfico, y presenta diversidad en algunas regiones de la estructura molecular (Rhead, Letley et al. 2007). Por ejemplo: a nivel de la secuencia señal 5´ terminal se han identificado los alelos s1a, s1b, s1c y s2. En la región media los alelos m1 y m2, y en la región intermedia los alelos i1 e i2. Esta diversidad genética causa variación en la actividad citotóxica de la proteína VacA. Las cepas s1m1 y s1m2 son altamente toxigénicas, mientras las cepas con la combinación s2m2 producen muy poca citotoxicidad. Las cepas que contienen la isoforma i1 están asociadas con un alto riesgo de desarrollar adenocarcinoma gástrico (Rhead, Letley et al. 2007). La cepa VacA s1a predomina en el norte de Europa, la s1b en la península ibérica y Latinoamérica, mientras que la cepa s1c se encuentra en el suroriente de Asia. En Colombia se ha demostrado la presencia de la cepa que contiene los alelos s1m1, al igual que en Japón, siendo ambos países regiones con una alta tasa de cáncer gástrico (Trujillo, Martínez et al. 2014). VacA puede promover la apoptosis de forma independiente a la vacuolización, pues induce la liberación de citocromo c mitocondrial a través de la activación de proteínas proapoptóticas Bax y Bak, al igual que la activación del receptor Fas/CD95 (Allen, Schlesinger et al. 2000). La presencia de vacA puede inducir la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y provocar el desarrollo de procesos tumorigénicos. El VEGF está implicado en la neoangiogénesis y se encuentra sobreexpresado en carcinomas humanos que contienen cepas vacA+

(Blaser, Perez-Perez et al. 1995). Además, VacA amplifica la respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica aumentando la expresión de ciclooxigenasa 2 en las células T, neutrófilos y macrófagos, que a su vez pueden activar la producción del factor de crecimiento vascular endotelial y provocar el desarrollo de procesos tumorigénicos. Aunque no están perfectamente definidos los mecanismos por los que la respuesta inmune inducida por *H. pylori* contribuye a la carcinogénesis gástrica, la sobreexpresión de COX-2 y VEGF, sumado a la activación de NF-κβ y citoquinas proinflamatorias, originan alteraciones morfológicas que llevan al desarrollo de gastritis atrófica y metaplasia gastrointestinal (Ando, Goto et al. 2007). VacA también está implicada en la alteración de las funciones mediadas por integrinas al interactuar con la fibronectina y la modulación de la respuesta inmunitaria de granulocitos, monocitos, células B y T, ya que inhibe la presentación de antígenos y la proliferación de células T.

Por otro lado, interrumpe la maduración de los fagosomas en los macrófagos, por lo que la bacteria sobrevive dentro de los mismos (Wilson and Crabtree 2007). Otro aspecto relevante de VacA es que inhibe la activación del factor de transcripción NFAT (Factor Nuclear Activador de la Transcripción), una molécula importante para la expresión de genes implicados en la expansión de linfocitos T activados por antígenos bacterianos. Asegurando así la evasión del *H. pylori* por parte de la respuesta inmune celular adaptativa (Sundrud, Torres et al. 2004).

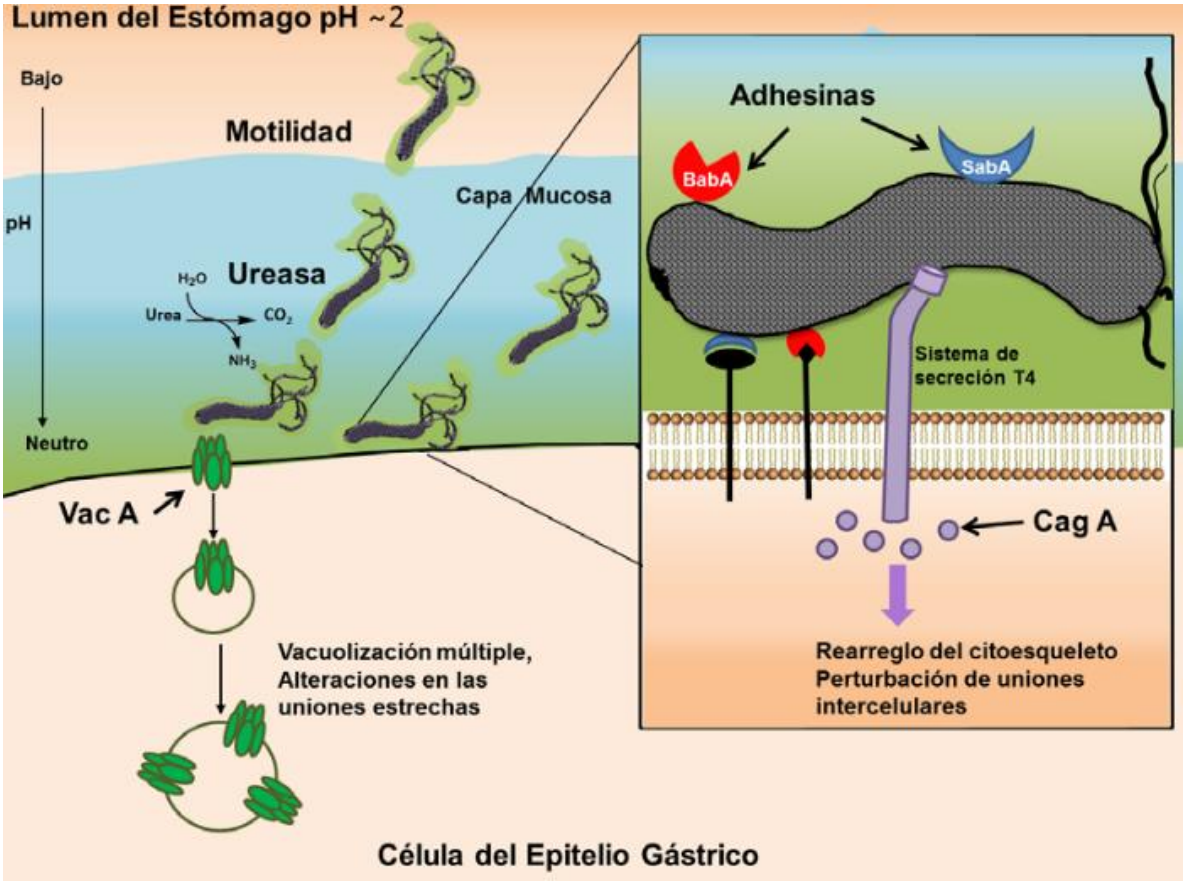


Figura 2. Mecanismos de colonización y factores de virulencia de *H. pylori.* Tomada de (Sundrud, Torres et al. 2004)

2.6.8. IceA (Inducido por contacto al epitelio)

Factor de virulencia inducido por contacto con el epitelio, es codificado por el gen IceA, el cual posee dos variantes, el iceA1 e iceA2. La variante iceA1 está asociada con el desarrollo de úlcera péptica, mientras que la variante iceA2 todavía no tiene asociación definida (Peek, Thompson et al. 1998).

2.6.9. DupA (Gen promotor de úlcera duodenal)

Factor de virulencia que promueve la formación de ulcera duodenal, tiene un alto potencial patogénico (Shiota, Matsunari et al. 2010).

2.7. Factores adicionales a la virulencia de *H. pylori*

2.7.1. Factores del hospedero

H. pylori genera la inducción de una respuesta inflamatoria mucosal persistente, dada por la activación e infiltración de células mononucleares y neutrófilos, así como sus productos, en la mucosa gástrica infectada. Además, la estimulación de la transcripción y la síntesis de varias citocinas proinflamatorias (Ej: IL-1ß, IL-2, IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a) y antiinflamatorias (Ej: IL-4 e IL-10) es también un hecho relevante en la patogénesis de la enfermedad. Se plantea que la intensidad de la misma se incrementa con el desbalance entre estos mediadores de la inflamación y, por tanto, el daño severo en el tejido gástrico. De esta forma, se reconoce la existencia de una predisposición genética ante el desarrollo de atrofia gástrica y cáncer, dado fundamentalmente por la presencia de polimorfismos en los genes para algunas de estas citocinas (González López and Rodríguez González 2011).

2.7.2. Factores ambientales

Durante la inflamación producida por *H. pylori,* gran cantidad de radicales libres, que incluyen especies reactivas del oxígeno, son producidos por células del sistema inmune en los tejidos afectados. El exceso de estos compuestos, causa gran daño histológico ya que afecta la estructura de moléculas como el DNA y las proteínas.

Las vitaminas antioxidantes tienen la capacidad de reducir los niveles de radicales libres en estos tejidos ya que previenen la formación de agentes cancerígenos como las nitrosaminas y neutralizan la acción de los que ya se han formado, lo cual a su vez reduce el riesgo de formación de tumores. Las dietas bajas en vitaminas antioxidantes y otros micronutrientes presentes en frutas y vegetales frescos se han reconocido como un importante factor nutricional en el desarrollo de gastritis atrófica. Por el contario, el excesivo consumo de sales en los alimentos, sobre todo de carnes curadas con sales de nitrógeno, contribuye a la formación de estos agentes cancerígenos, lo cual a su vez potencia el daño al epitelio gástrico producido por *H. pylori*. Así mismo ocurre con el hábito de fumar, hay una

asociación positiva del cigarro y las diferentes enfermedades gastrointestinales, por el fuerte daño oxidativo que produce el humo del cigarro al DNA (González López and Rodríguez González 2011).

La atrofia gástrica, la metaplasia intestinal y el cáncer gástrico están asociados con una vigorosa respuesta inmune del tipo celular (Th1), que resulta en una inflamación crónica que causa gran daño al epitelio gástrico. Se ha observado que la coinfección de *H. pylori* con determinados helmintos u otros tipos de parásitos, puede balancear esta respuesta hacia el tipo humoral (Th2), efecto que a su vez disminuye el riesgo de aparición de afecciones severas como las mencionadas anteriormente.

2.8. Muerte celular

En organismos multicelulares, la muerte celular es un proceso crítico y activo que mantiene la homeostasis de los tejidos y elimina las células potencialmente dañinas. Hay tres tipos principales de muerte celular morfológicamente distinta: apoptosis (muerte celular tipo I), muerte celular autofágica (tipo II) y necrosis (tipo III). Los tres pueden ejecutarse a través de vías de señalización distintas, y a veces superpuestas, que se dedican en respuesta a estímulos específicos. La apoptosis se desencadena cuando los receptores de muerte de la superficie celular como Fas están unidos por sus ligandos (la vía extrínseca) o cuando las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl2 causan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (la vía intrínseca). Ambas vías convergen en la activación de la familia de la proteasa caspasa, que es responsable en última instancia del desmantelamiento de la célula (Green and Llambi 2015).

2.9. Apoptosis

La apoptosis o también conocida como muerte celular programada, es un proceso celular fundamental para el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos. Su misión es eliminar las células dañadas, infectadas o transformadas. Se realiza mediante la activación de un programa intrínseco y se caracteriza por el mantenimiento de las membranas celulares intactas permitiendo así su eliminación por fagocitosis. Las células que sufren apoptosis exhiben una morfología característica que incluye condensación citoplasmática y nuclear, la rotura específica de proteínas celulares, la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos, y la rotura endolítica del DNA en fragmentos oligonucleosómicos. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos o incluso por células vecinas. Las señales que desencadenan la apoptosis incluyen, daño celular causado por radiaciones ionizantes, infección vírica o señales extracelulares (Galluzzi, Vitale et al. 2012).

La apoptosis se caracteriza por la contracción celular, la formación de ampollas en la membrana y la condensación de la cromatina (picnosis). Se puede definir como la muerte celular acompañada de la activación de las cistein-proteasas,

denominadas caspasas. Dos vías principales de señalización desencadenan la muerte celular apoptótica: la vía mitocondrial (la intrínseca) y la vía del receptor de la muerte (extrínseca). Por otra parte, la apoptosis puede ser inducida por oncogenes (por ejemplo, Myc) como un mecanismo de protección contra el desarrollo del cáncer. Este proceso está controlado en parte por una vía apoptótica dependiente de p53, que se activa en respuesta a señales mitogénicas aberrantes resultantes de la sobreexpresión o mutación del oncogén (Green and Llambi 2015)

De manera más específica, las células que son inducidas a apoptosis presentan las características siguientes: reducen su tamaño, sus mitocondrias se abren y dejan salir el citocromo c, se degrada la cromatina (DNA y proteínas) de sus núcleos, la cual se rompen en fragmentos rodeados de membrana denominados cuerpos apoptóticos, la fosfatidil serina que se encuentra en la cara interna de la membrana se expone en la superficie, posteriormente se une a receptores de las células fagocíticas (macrófagos y células dendríticas) que fagocitan los cuerpos apoptóticos, las células fagocíticas segregan citoquinas que inhiben la inflamación (Holczer, Márton et al. 2015).

En la muerte por apoptosis, la serie de acontecimientos sucede de manera tan ordenada, pueden diferenciarse varias fases en la apoptosis:

- Fase efectora: Se caracteriza por el aumento en el contenido de Ca^{+2} intracelular, que origina la activación de ciertos grupos enzimáticos (endonucleasas y proteasas -caspasas), junto con cambios en el citoesqueleto celular que producen cambios en el tamaño y forma celular.
- Fase degradativa: Se degradan las proteínas y los ácidos nucleicos y hay cambios en la membrana celular. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos impidiendo la salida del contenido celular al exterior y evitando inflamación. En esta fase las endonucleasas se encargan de fragmentar el DNA, las caspasas degradan las proteínas, se producen cambios marcados en el citoesqueleto, y se condensa la cromatina.

- Fase de eliminación: Los macrófagos fagocitan los cuerpos apoptóticos, atraídos por ligandos específicos de la fosfatidilserina, presentes en la superficie de las células apoptóticas (Green and Llambi 2015).

Los procesos apoptóticos pueden ser activados por una inducción negativa (como la pérdida de una actividad supresora, la falta de factores de crecimiento o la disminución de los contactos con las células que la rodean) o por una inducción positiva como es el resultado de la unión de un ligando a un receptor o la recepción de señales conflictivas. Las señales de muerte que conducen a la apoptosis son muy diversas: elevados niveles de oxidantes en el interior de la célula; lesión del DNA por oxidantes, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, fármacos quimioterapéuticos, etc.; moléculas que se unen a receptores específicos en la superficie de la célula y transmiten señales para iniciar el programa apoptótico. Entre estos activadores de muerte se encuentran el TNFD que se une al TNFR, el ligando Fas (FasL) que se une al receptor Fas, denominado también CD95, etc. (Angosto 2003).

Los receptores que participan en los procesos de muerte celular se pueden clasificar en dos grupos: aquellos cuya activación siempre conduce a la muerte de la célula, conocidos como “receptores de muerte” (receptor Fas y receptor del factor de necrosis tumoral (TNF)) y aquellos que desempeñan una función fisiológica, pero su sobreactivación puede conducir también a la muerte (receptores de glutamato, de trombina y canales iónicos dependientes de voltaje) (Jordán 2003, Dickens, Powley et al. 2012).

La proteína transmembrana Fas, en su porción intracelular, enlaza con FADD (factor associated death domain), activa las caspasas 8 y 10. Este receptor y su ligando desempeñan un papel importante en modelos apoptóticos como son la supresión periférica de las células T maduras al final de una respuesta inmune, la muerte de células diana (células infectadas por virus), la destrucción de células cancerosas mediada por células T citotóxicas y por natural killer, así como la eliminación de las células inmunes reactivas a tumores que expresan constitutivamente el ligando de Fas (Jordán 2003, Newton and Dixit 2012).

El receptor para el TNF conecta con complejos como el TRADD (TNFR-associated death domain) que actúa como una plataforma de adaptación para reclutar moléculas de señalización, como la proteína de interacción con el receptor, y activa factores de transcripción (NFk B y el JNK/AP-1). A diferencia de Fas, el receptor de TNF raramente activa procesos de apoptosis, a menos que la síntesis de proteínas se encuentre bloqueada, sugiriendo la existencia de factores celulares que suprimen los estímulos apoptóticos generados por el TNF (Jordán 2003).

2.10. Caspasas

Las procaspasas (30-50 kD) son una familia de cisteín-proteasas que se encuentran como moléculas precursoras inactivas (zimógenos) que al recibir la señal apoptogénica sufren un rompimiento proteolítico y dan lugar a dos subunidades que constituyen la enzima activa o caspasa. Las procaspasas constan de un prodominio N-terminal y dos subunidades, una grande (p20) y otra pequeña (p10) (Elinos-Báez, Maldonado et al. 2003).

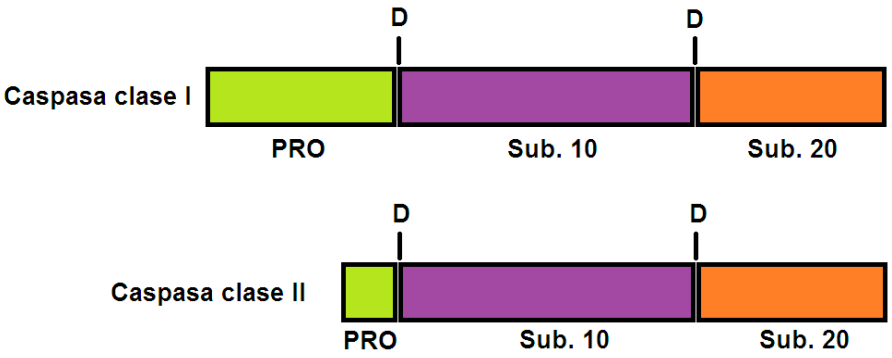


Figura 3. Estructura general de las procaspasas. Las caspasas se sintetizan como procaspasas y constan de un dominio N-terminal (PRO) y dos subunidades, una grande p20 y otra menor p10. Se indica la posición de los ácidos aspárticos (D) de escisión de la procaspasa para activarse a caspasa. Tomada y modificada de Elinos-Báez, Maldonado et al. 2003.

Según su función, las caspasas-2, -3, -7, -8, -9 y -10 de los mamíferos son caspasas apoptóticas, mientras que las caspasa-1, -4, -5, -11 y -12 están involucradas en la inflamación. Las caspasas apoptóticas se subdividen en los iniciadores y los efectores en función de la presencia o ausencia de dominios de interacción específicos de proteínas hacia el extremo N (Figura 4). Las caspasas iniciadoras comprenden dominios efectores de muerte (DED; caspase-8 y -10) o dominios de reclutamiento de caspasa (CARD; caspase-2, -9, -1 y -11), que median su dimerización y / o reclutamiento en complejos más grandes para facilitar su activación (Shalini, Dorstyn et al. 2015).

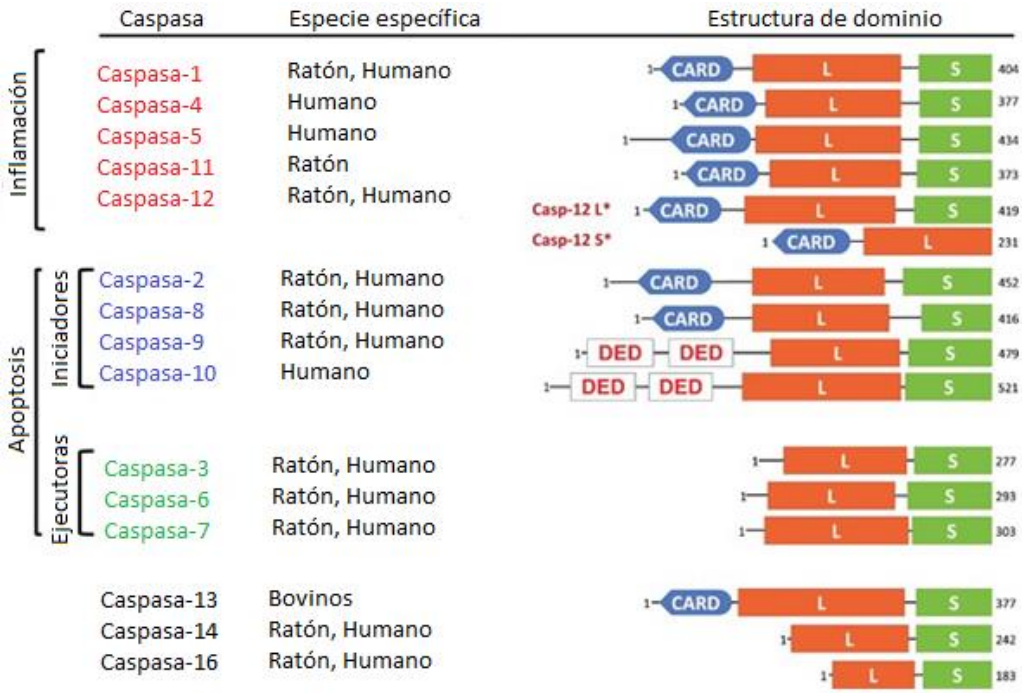


Figura 4. Estructura del dominio y clasificación funcional de las caspasas placentarias de mamíferos. Caspasa-1, -4, -5, -11 y -12 son caspasas inflamatorias. Las caspasas apoptóticas-2, -8, -9 y -10 son iniciadores, mientras que las caspasas-3, -6 y -7 son caspasas ejecutoras clave. CARD, dominio de reclutamiento de caspasa; DED, dominio efector de la muerte; L, subunidad grande; S, pequeña subunidad; S *, forma corta; L *, forma larga (Shalini, Dorstyn et al. 2015)

La activación de la caspasa del iniciador durante la apoptosis está mediada por dos vías principales; la vía mitocondrial o regulada por Bcl-2 (intrínseca) y la vía del receptor de muerte (extrínseca) (Figura 5). La vía intrínseca se activa en respuesta al estrés celular (p. Ej., Fármacos citotóxicos, daño en el DNA) y está regulada por la familia de proteínas Bcl-2. Esta vía implica la activación de los efectores pro-apoptóticos BAX y BAK, que inducen la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) y la liberación de citocromo C. Apaf-1 (factor de activación de la proteasa apoptótica 1) se asocia con el citocromo c en un gran complejo multimérico llamado apoptosoma para activar la caspasa-9. La apoptosis mediada por el receptor de la muerte se inicia después de la unión del ligando y la activación de la superfamilia de receptores de necrosis tumoral que contiene el dominio de la muerte (por ejemplo, TNFR, Fas, TRAIL). Esto media el reclutamiento y la activación de caspasa-8 o -10, a través del complejo de señalización inductor de muerte (DISC) que comprende la proteína del dominio de la muerte asociada a FAS (FADD) y / o la proteína del dominio de la muerte asociada a TNFR (TRADD) y otros componentes. La caspasa-8 también divide el BID en una forma truncada (tBID), que activa la vía mitocondrial para amplificar la respuesta apoptótica. Una vez que las caspasas iniciadoras se activan a través de las vías de apoptosis extrínseca o intrínseca, median la activación de las caspasas efectoras-3, -6 y -7 (Shalini, Dorstyn et al. 2015).

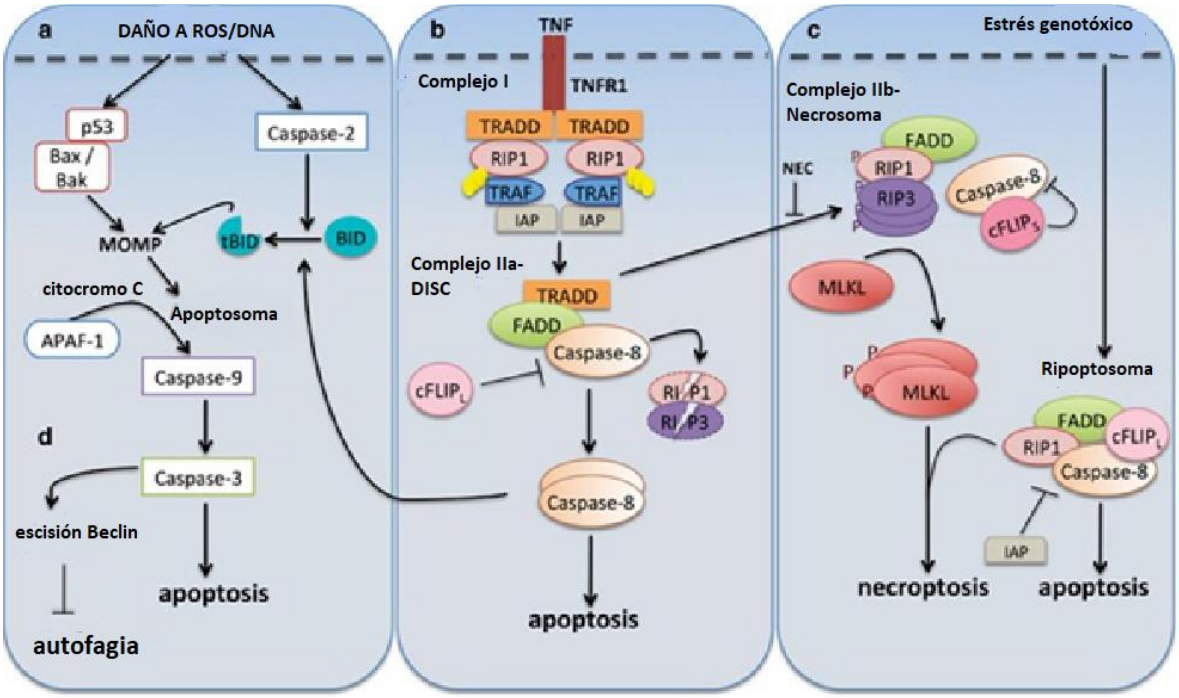


Figura 5. Caspasas en vías de muerte celular. Las caspasas se han implicado en apoptosis, necroptosis y autofagia. La apoptosis puede proceder de dos maneras: intrínseca o extrínseca. (a) La apoptosis intrínseca se inicia mediante un estímulo inductor de muerte, que provoca la activación de p53 y proteínas Bcl-2 proapoptóticas como Bax y Bak. Esto conduce a MOMP y a la activación de una plataforma inductora de muerte llamada apoptosoma. Después de esta caspasa-9 se escinde y activa otras caspasas efectoras como la caspasa-3. Alternativamente, la caspasa-2 se activa después del daño en el ADN y causa MOMP al dividir a Bid. (b) La apoptosis extrínseca o mediada por el receptor implica la formación compleja por proteínas que contienen el dominio de la muerte (llamadas DISC), la activación de la caspasa-8, que inicia la apoptosis activando directamente las caspasas efectoras. Caspase-8 también escinde Bid y esto provoca la liberación de citocromo c, amplificando aún más la apoptosis a través de la vía mitocondrial / intrínseca. Dependiendo de los ligandos (TNF y Fas) se forman diferentes complejos. TNF estimula TNFR1 que recluta TRADD, RIP1, TRAF e IAP en un complejo llamado complejo dependiente de TRADD I. La posterior eliminación de poliubiquitina en RIP1, disocia este complejo y le permite interactuar con TRADD, procaspasa-8, FADD y cFLIP como complejo IIa /DESCT. Esto da como resultado la activación de caspasa-8, que conduce a la apoptosis. (c) Cuando la actividad de la caspasa está bloqueada, RIP1, FADD y el heterodímero FLIP L -caspasa-8, forman un gran complejo multiproteico llamado 'ripoptosoma' después del estrés genotóxico. (d) Algunas caspasas como la caspasa-3, median la escisión de proteínas autofágicas cruciales y, por lo tanto, controlan indirectamente la autofagia. (Shalini, Dorstyn et al. 2015)

Por otro lado, tomando en cuenta la estructura primaria, se pueden agrupar en dos clases: la clase I; las procaspasas que tienen un prodominio N-terminal grande, como las procaspasas-1, -2, -8, -9 y –10, y las procaspasas de clase II el prodominio N-terminal pequeño o que carecen de él, pertenecen a esta clase las procaspasas-3, -6, y -7 (Elinos-Báez, Maldonado et al. 2003).

Los prodominios de las procaspasas de clase I contienen dominios de interacción proteína-proteína que propician la formación de complejos homodiméricos. Estos complejos están compuestos por tetrámeros de dos subunidades grandes y dos pequeñas que favorecen su rompimiento autoproteolítico en sitios específicos de residuos de ácido aspártico (D), (Figura 6) (Elinos-Báez, Maldonado et al. 2003).

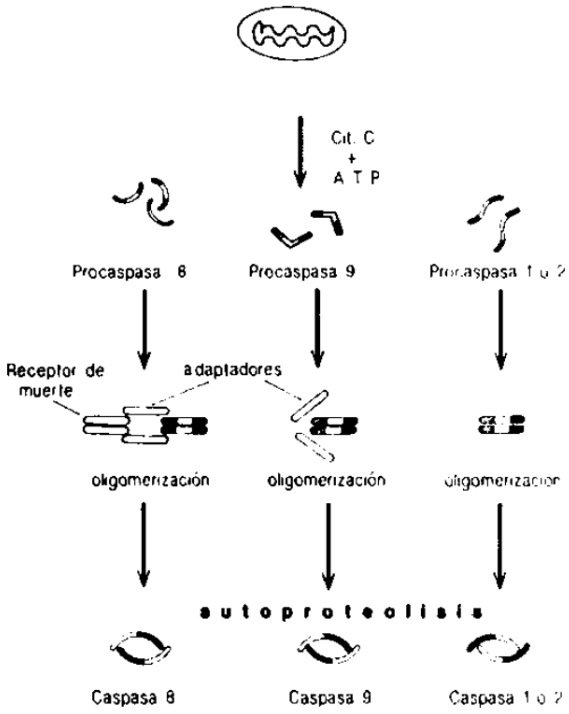


Figura 6. Reclutamiento, oligomerización y autoproteóisis de las caspasas de clase I para su activación. Al recibir la célula una señal de muerte las procaspasas de clase I pueden interaccionar con los adaptadores para su reclutamiento y activación, esto sucede con la caspasa-8. Otras señales liberan citocromo c de mitocondria con dATP que se une a Apaf-1 activando a caspasa-9. Las procaspasas -1 y -2 no necesitan adaptadores para su activación. Tomada de Elinos-Báez, Maldonado et al. 2003

Todas estas moléculas constan de 6 alfa hélices anfipáticas y antiparalelas las cuales están muy empaquetadas formando un centro hidrofóbico originando interacciones hidrofóbicas entre los DEDs e interacciones electrostáticas entre los CARDs (Tabla 1) (Elinos-Báez, Maldonado et al. 2003).

Tabla 1. Interacciones entre caspasas de clase I y adaptadores, a través de sus dominios.

Caspasas	Adaptador	Interacción	Tipo de interacción
Caspasa-1	CARD	CARD-CARD	Electroestática
Caspasa-2	RAID	CARD-CARD	Electroestática
Caspasa-8	FADD	DED-DED	Hidrófoba
Caspasa-9	APAF-1	CARD-CARD	Electroestática
Caspasa-10	FADD	DED-DED	Hidrófoba

Tomada y modificada de (Elinos-Báez, Maldonado et al. 2003).

La autoactivación de las caspasas de clase I las dirige al citoplasma para activar a las procaspasas de clase II, que no tienen la capacidad de autoproteolizarse y durante su activación forman complejos heterodiméricos que favorecen su rompimiento proteolítico. En estas condiciones las caspasas activas inician los mecanismos apoptóticos hidrolizando a las diversas proteínas, del citoesqueleto, nucleares, proteínas que intervienen en la división celular, en el control del ciclo celular, reparación, replicación y transcripción del DNA. La capacidad proteolítica de las caspasas activas conduce a la degradación de una serie de proteínas y lleva consigo el cortar contactos con células vecinas, reorganizar el citoesqueleto, activar las endonucleasas (fragmentación del DNA), desmantelar las láminas nucleares (condensación), expresar señales de fagocitosis (fosfatidilserina), y activar proteínas específicas para preparar a la célula para el cese de las funciones metabólicas (Angosto 2003).

2.11. Vías de apoptosis

La muerte celular apoptótica se inicia predominantemente por la vía DR o mitocondrial, aunque existen vías adicionales. Los DR, por ejemplo, Fas (también conocido como CD95), receptor Trail (TRAIL-R) o TNFR1, inducen apoptosis al reclutar directamente una plataforma de activación de caspasa al unirse a su ligando respectivo. La vía mitocondrial de la apoptosis, por otro lado, se desencadena cuando se pierde la integridad de la membrana externa mitocondrial, lo que permite la liberación de factores proapoptóticos (p. Ej., Citocromo c) desde la mitocondria al citosol. Este proceso está controlado por la familia de proteínas Bcl2. Una vez en el citosol, el citocromo c induce el ensamblaje de un complejo de activación de caspasa: el apoptosoma. Ambas vías culminan en la activación de las proteasas de caspasa y la escisión de las proteínas intracelulares, lo que finalmente conduce al desmantelamiento de la célula (Green and Llambi 2015).

.

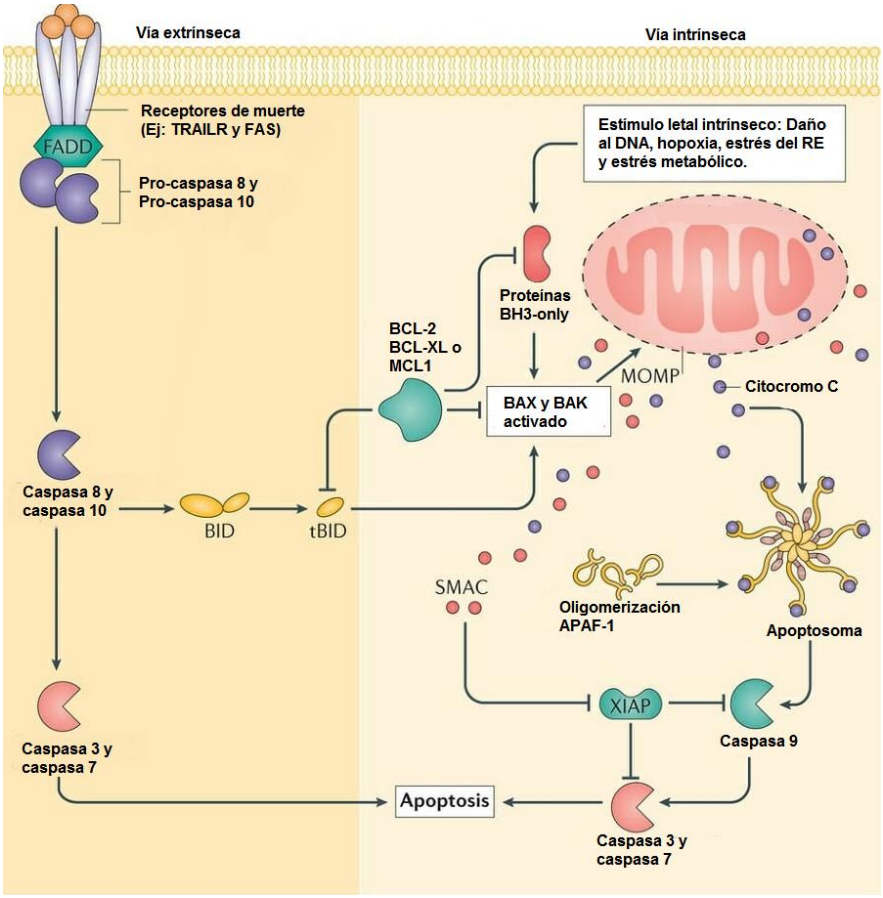


Figura 7. Vías de señalización de apoptosis. Vía extrínseca: Una molécula externa se une a un receptor en el exterior de la membrana celular (FAS y TRAIL). Los receptores que se unen a FAS y TRAIL se denominan "FASR" para "Receptor FAS" o "TRAILR" para "Receptor TRAIL". En respuesta a los cambios en el dominio intracelular de TRAILR o FASR, FADD también cambia e interactúa con dos proteínas adicionales, pro-caspasa 8 y pro-caspasa 10, que pasan a su estado activo caspasa 8 y caspasa 10, se dispersan a través del citoplasma y desencadenan cambios, activando a BID que pasa a ser tBID y se desplaza a la mitocondria activando a BAX y BAK. (De este punto en adelante se comparten pasos entre vía extrínseca e intrínseca). Vía intrínseca: Inicia por el estrés o daño a la célula, en respuesta activa a las proteínas BH3-only, que regulan si hay o no apoptosis, las pro-apoptóticas activan a BAX y BAK (mismas que se activan por tBID), que causan MOMP (Permeabilidad de la membrana externa mitocondrial) y se considera como un punto de no retorno. MOMP permite la liberación de Citocromo C en el citoplasma y actuar como una molécula de señalización que provoca la formación del "apoptosoma", un complejo de proteínas que realiza el paso final para comenzar la descomposición celular. El apoptosoma, una vez que se forma, convierte la pro-caspasa-9 en caspasa-9 que puede desencadenar más cambios en toda la célula como la activación de caspasas 3 y 7. Una vez activadas, las caspasas 3 y 7 comienzan la descomposición de los materiales celulares. La caspasa 3 se condensa y descompone el DNA de la célula. (Tomada y modificada de Angosto, 2003)

2.11.1. Vía de apoptosis intrínseca o mitocondrial

La vía mitocondrial de la apoptosis, también llamada vía intrínseca, es el mecanismo más común de apoptosis en los vertebrados. Se activa en respuesta a una variedad de tensiones celulares, incluido el daño del DNA, la privación del factor de crecimiento, el estrés de la sala de emergencias y las señales de desarrollo. En esta vía, las caspasas ejecutoras se cortan y activan mediante la caspasa-9, que a su vez se activa mediante una plataforma de activación de caspasas llamada apoptosoma (Figura. 8) (Green and Llambi 2015).

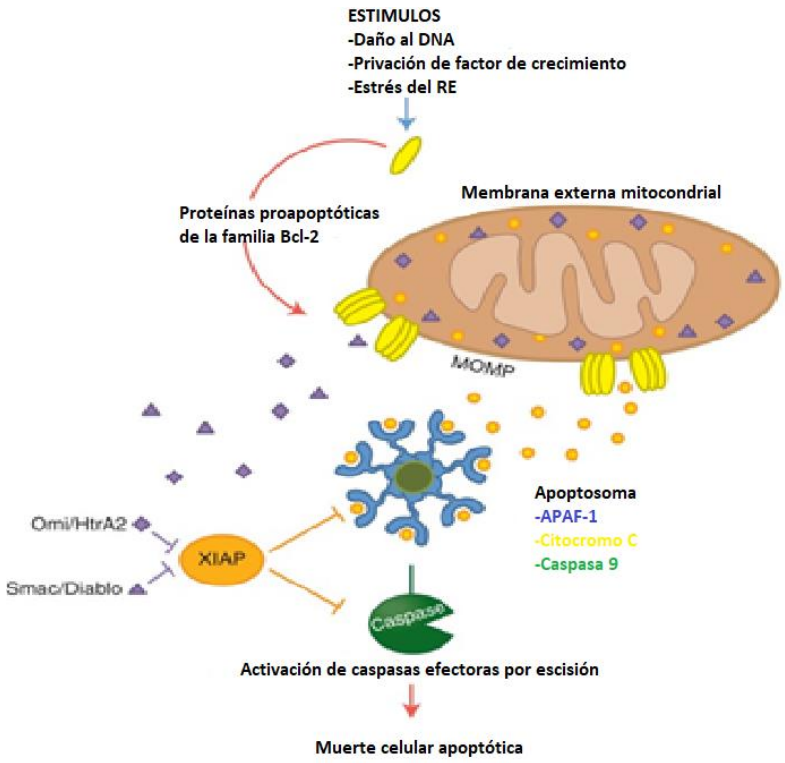


Figura 8. La vía apoptótica mitocondrial. En respuesta a diversas tensiones celulares, los miembros proapoptóticos de la familia Bcl2 inducen la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), lo que permite la liberación en el citosol de factores proapoptóticos que normalmente están secuestrados en el espacio intermembrana de las mitocondrias (incluidos el citocromo *c*, Smac y Omi). En el citosol, citocromo *c* se une a APAF1 y desencadena su oligomerización. Caspase-9 es reclutada y activada por esta plataforma, conocida como apoptosoma. La caspasa-9 catalíticamente activa escinde y activa las caspasas-3 y -7 del verdugo. Tras la liberación en el citosol, Smac y Omi se unen e inhiben el inhibidor de la apoptosis ligado al X del inhibidor de caspasa (XIAP). Al hacerlo, alivian la inhibición de XIAP de caspasa-9, caspasa-3 y caspasa-7, y potencian la activación general de la caspasa por el apoptosoma (Green and Llambi 2015).

El factor de activación de la proteasa apoptótica 1 (APAF1) constituye el armazón alrededor del cual se ensambla el apoptosoma. Durante la apoptosis intrínseca, el citocromo *c* se libera de las mitocondrias al citosol y se une a Apaf1. Esta interacción desencadena la hidrólisis del cofactor Apaf1 dATP a dADP (Green and Llambi 2015). El intercambio posterior de dADP con dATP exógeno permite la oligomerización de siete unidades APAF1-dATP-citocromo- *c* en un apoptosoma activo. En el centro del apoptosoma, las CARD expuestas en APAF1 se unen a la CARD de caspasa-9, acercando así los monómeros de caspasa-9 inactivos para su activación y autoprocesamiento (Yuan, Yu et al. 2010). Debido a su mayor afinidad por el apoptosoma, la caspasa-9 de longitud completa desplaza la forma procesada, creando un ciclo continuo de reclutamiento, activación, procesamiento y liberación de caspasa-9 (Green and Llambi 2015). Debido a que la caspasa-9 solo mantiene la actividad catalítica en este estado unido, el apoptosoma funciona como un temporizador molecular en el que su vida útil es directamente proporcional a la cantidad de no procesado caspasa-9 presente (Green and Llambi 2015).

En las células sanas, el citocromo *c* se encuentra solo en el espacio intermembrana mitocondrial. Para que interactúe con APAF1, debe ocurrir la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) desencadenada por estímulos apoptóticos (Tait and Green 2010). MOMP induce la liberación de todas las proteínas solubles del espacio intermembrana mitocondrial en el citosol. Además del citocromo *c*, se liberan otras dos proteínas proapoptóticas durante ese proceso: Smac (también conocido como Diablo) y Omi (también conocido como HtrA2). Smac y Omi potencian la actividad del apoptosoma al antagonizar el inhibidor de la caspasa inhibidor de la apoptosis ligado a X (XIAP) (Figura 8) En ausencia de Smac y Omi, XIAP se une e inhibe la actividad catalítica del iniciador caspasa-9 y el ejecutor caspasas-3 y -7. XIAP amortigua aún más la inducción de apoptosis intrínseca a través de la ubiquitilación directa y la degradación proteosómica de las caspasas activas (Green and Llambi 2015).

MOMP es un evento estrictamente regulado controlado por miembros de la familia Bcl2. Estos comparten una o más regiones de homología Bcl2 (BH) definidas por

secuencia, estructura y función (Figura 9-A). Hay tres clases amplias de proteínas Bcl2: las proteínas efectoras proapoptóticas (Bax y Bak), que son necesarias y suficientes para MOMP; las proteínas antiapoptóticas Bcl2 (p. ej., Bcl2, Bcl-xL y Mcl1), que bloquean MOMP; y las proteínas de BH3 only (p. ej., Bid, Bim, Bad y Noxa), que activan los efectores proapoptóticos y / o neutralizan las proteínas Bcl2 antiapoptóticas. Las proteínas Bcl2 también controlan varios otros procesos celulares, incluida la fusión mitocondrial, la autofagia y el flujo de calcio de la sala de emergencias (Chipuk, Moldoveanu et al. 2010, Green and Llambi 2015).

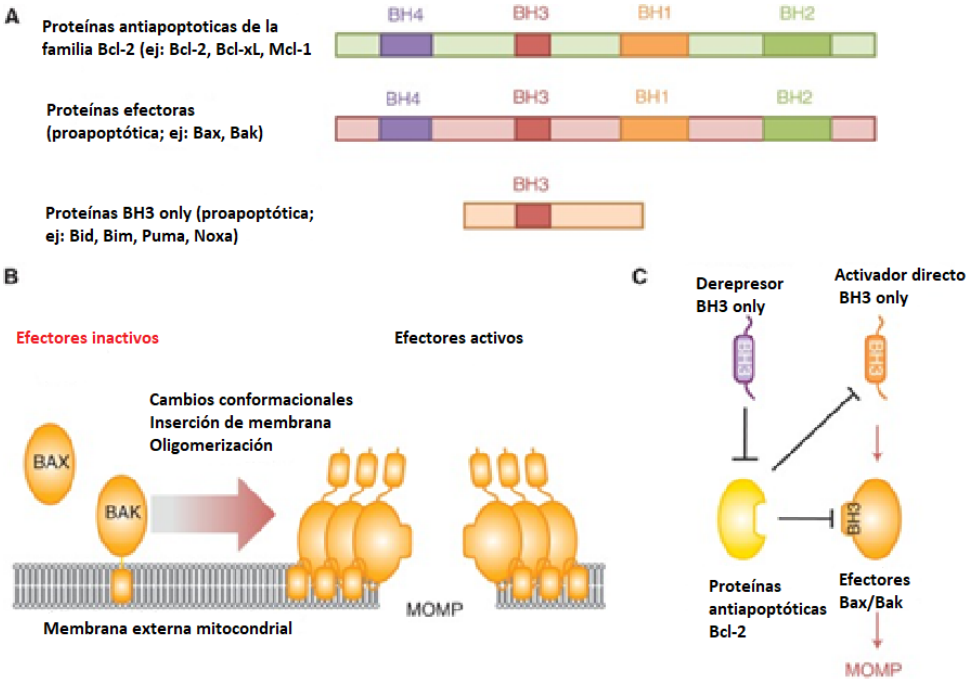


Figura 9. Regulación de la integridad de la membrana externa mitocondrial por la familia de proteínas Bcl2. (*A*) Los miembros de la familia de proteínas Bcl2 se caracterizan por la presencia de una o más regiones de homología de Bcl2 (BH). Las proteínas Bcl2 antiapoptóticas (p. Ej., Bcl2, Bcl-xL y Mcl1) y los efectores proapoptóticos (p. Ej., Bax y Bak) comparten cuatro regiones BH y una estructura globular similar. Las proteínas BH3 only (p. Ej., Bid, Bim, Bad y Noxa) se caracterizan por una sola región BH (BH3). (B) Los efectores proapoptóticos residen en las células en formas inactivas atadas a la membrana mitocondrial externa (Bak) o solubles en el citosol (Bax). Tras la activación, Bax y Bak se oligomerizan y se insertan más en la membrana, causando permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) y, por lo tanto, apoptosis. (C) La activación de Bax / Bak se activa después de la unión transitoria de un subconjunto de proteínas de activación directa BH3 only (p. Ej., Bid y Bim). Las proteínas Bcl2 antiapoptóticas inhiben MOMP secuestrando las proteínas activadoras directas y / o los efectores. Otro grupo de proteínas BH3 only, llamadas sensibilizadores o despresores (p. Ej., Bad y Noxa) promueven MOMP al antagonizar las proteínas Bcl2 antiapoptóticas, liberando de este modo tanto las proteínas BH3 activadoras directas como Bax / Bak. (Green and Llambi 2015)

Bax y Bak son directamente responsables de la pérdida de la integridad de la membrana externa mitocondrial (Figura 9-B). Tras la activación, forman grandes oligómeros que se insertan en la membrana externa mitocondrial, interrumpiéndola. La naturaleza precisa de la disrupción sigue sin estar clara, pero permite la liberación casi simultánea de todas las proteínas del espacio intermembrana (Muñoz-Pinedo, Guío-Carrión et al. 2006, Green and Llambi 2015).

Bax y Bak actúan de forma redundante en MOMP y se requiere al menos uno de ellos para permeabilizar las mitocondrias. En las células vivas, estas proteínas generalmente están inactivas, pero se activan en respuesta a eventos aguas arriba. Al menos dos de las proteínas BH3 (Bim y Bid activa) activan Bax y Bak a través de la interacción transitoria (Figura 9-C), aunque otras condiciones (como el calor, los cambios en el pH y los cambios en el medio lipídico) pueden activar los efectores independientemente de las proteínas BH3 only (Green and Llambi 2015).

MOMP es antagonizado por las proteínas antiapoptóticas Bcl2, que se unen e inhiben tanto a Bax / Bak como a las proteínas BH3 solo al interactuar con sus dominios BH3 (Llambi, Moldoveanu et al. 2011) (Figura 9-C). Las proteínas Bcl2 antiapoptóticas también están reguladas tanto a nivel transcripcional como postraduccional. En particular, la degradación de Mcl1 por el sistema ubiquitina-proteasoma participa en la inducción de apoptosis después de varias tensiones celulares. Ante el daño del ADN, la proteína que contiene el dominio BH3 Mcl1 ubiquitina ligasa E3 (MULE) se une directamente a Mcl1 y cataliza su ubiquitilación y degradación (Green and Llambi 2015).

Las proteínas de la familia Bcl2 integran señales pro y antiapoptóticas en células sanas y estresadas y, por lo tanto, constituyen uno de los principales nodos de señalización en la decisión de vida o muerte. Dentro de esta familia, las proteínas BH3 only constituyen los principales sensores aguas arriba de la vía apoptótica mitocondrial. Una amplia variedad de vías de señalización convergen en la familia de proteínas BH3 only regulan su nivel de expresión y actividad tanto transcripcional como postranscripcional (Yuan, Yu et al. 2010).

La respuesta apoptótica al estrés genotóxico es realizada, en parte, por Puma y Noxa. Ambos son objetivos transcripcionales directos del supresor tumoral p53, aunque otros estímulos regulan sus niveles de expresión. Bim también es un factor apoptótico importante de la vía de estrés ER que se involucra en respuesta a la acumulación de proteínas desplegadas. Finalmente, la mala actividad se regula negativamente a través de la fosforilación de varias quinasas, como Akt, que induce su secuestro por las proteínas 14-3-3. Tras la privación del factor de crecimiento y la pérdida de la señalización de Akt, se libera Bad y antagoniza las proteínas Bcl2 antiapoptóticas (Green and Llambi 2015).

MOMP a menudo condena la muerte de una célula incluso si la activación de caspasa está bloqueada o interrumpida (Tait and Green 2010). Esta es probablemente la consecuencia de una pérdida catastrófica de la función mitocondrial que resulta en una falla bioenergética. Sin embargo, bajo estas condiciones, algunas células pueden recuperarse de MOMP y sobrevivir (Tait and Green 2010). Por lo tanto, la regulación de la activación de caspasa aguas abajo de MOMP puede ser importante en algunos entornos. Por ejemplo, después de la unión del citocromo *c* a APAF1, el fracaso para reemplazar dADP hidrolizado por dATP exógeno desencadena la agregación no funcional y la inactivación irreversible de APAF1. El intercambio de nucleótidos, y por lo tanto el ensamblaje funcional del apoptosoma, se ve facilitado por un complejo compuesto por la proteína de choque térmico 70 (Hsp70), la proteína de susceptibilidad a la apoptosis celular (CAS) y la supuesta proteína I asociada a HLA-DR (PHAPI). En consecuencia, los niveles celulares de estas proteínas modulan la eficiencia de activación de caspasa durante la apoptosis intrínseca. Los niveles de ARNt también regulan la actividad del apoptosoma al unirse al citocromo *c*, bloqueando su interacción con APAF1. Finalmente, la apoptosis intrínseca puede ser perturbada aguas abajo de MOMP a través de la fosforilación e inhibición de la caspasa-9 (Green and Llambi 2015).

2.11.2. Vía de apoptosis extrínseca o de receptores de muerte

Caspase-8 se activa predominantemente por la vía DR de la apoptosis de vertebrados. Los DR son un subconjunto de la superfamilia TNFR e incluyen TNFR1, Fas y TRAIL-R1 / 2 (Dickens, Powley et al. 2012). Contienen un DD en sus regiones intracelulares. A través de una serie de interacciones homotípicas, estas inician el ensamblaje de grandes complejos macromoleculares que reclutan y activan la caspasa-8 para la señalización apoptótica, así como otras moléculas de señalización que controlan procesos como la inflamación y la adhesión celular (Newton and Dixit 2012).

Cuando Fas o un TRAIL-R está unido por su ligando, la agrupación de los receptores recluta una molécula adaptadora que contiene DD, FADD, a través de interacciones DD-DD (Figura 10-A). Esto expone otro dominio de pliegue mortal en FADD, su DED. El complejo representa una plataforma de activación de caspasa llamada complejo de señalización inductor de muerte (DISC), ya que los DED de FADD se unen a los DED en el prodominio de caspasa-8. Esto lleva a los monómeros de caspasa-8 muy cerca, lo que desencadena su actividad proteasa. La caspasa-8 experimenta entonces una escisión autocatalítica tanto entre las subunidades grandes y pequeñas como entre la subunidad grande y el prodominio. La primera escisión estabiliza el dímero activo (y se requiere para la actividad del homodímero en esta ruta); la segunda división lo libera del DISC (Green and Llambi 2015).

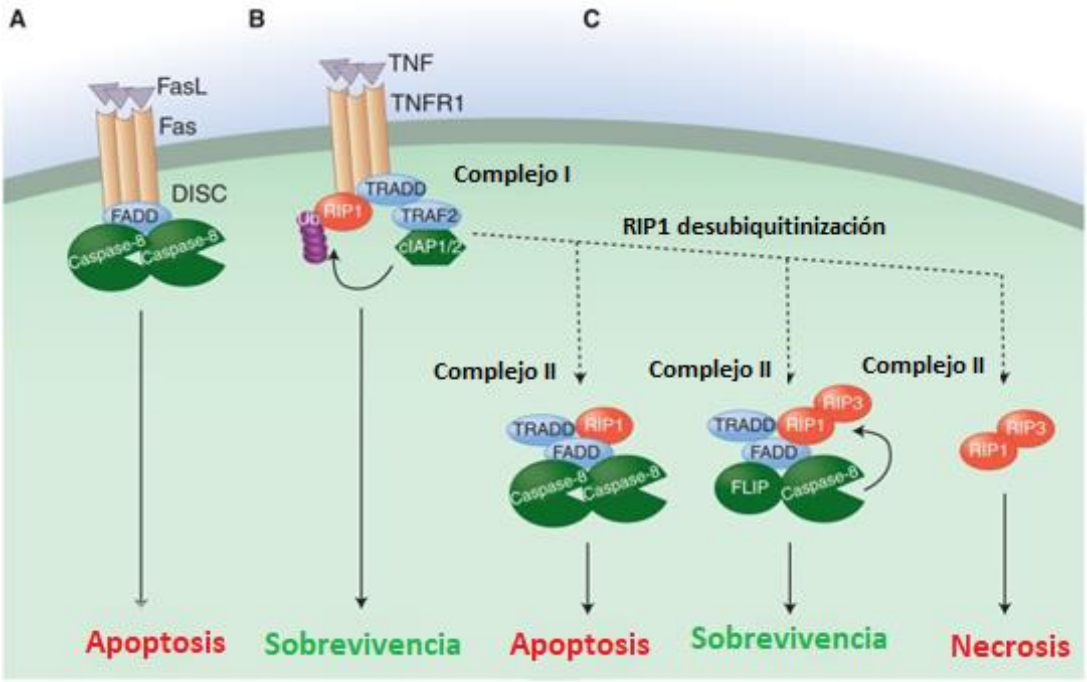


Figura 10. Vía de señalización del receptor de muerte. La vía de señalización del receptor de muerte se desencadena por la ligadura de un receptor de muerte (TNFR1, Fas o TRAIL-R1 / 2) y potencialmente conduce a tres resultados diferentes: supervivencia, apoptosis o necrosis. (*A*) Tras la ligadura (por FasL y TRAIL, respectivamente), Fas / CD95 y TRAIL-Rs montan una plataforma de activación de caspasa llamada DISC. Esta plataforma recluta y activa la caspasa-8 a través de la proteína adaptadora FADD y, por lo tanto, activa la vía apoptótica extrínseca. (*B*) Al unirse al TNF, TNFR1 recluta la proteína adaptadora TRADD y la quinasa RIP1, que a su vez moviliza socios adicionales, como las ubiquitinas ligasas TRAF2 y cIAP1 / 2. Estos catalizan la ubiquitilación no degradante de RIP1, así como otros componentes del complejo de proteínas, lo que resulta en la estabilización de una plataforma de señalización proinflamatoria y de supervivencia llamada complejo I. (C) La eliminación de las cadenas de ubiquitina de RIP1 mediante la inhibición de cIAP1 / 2 o mediante la acción de las deubiquitilasas desestabiliza el complejo I, permitiendo así la liberación de TRADD y RIP1. TRADD y RIP1 promueven la formación de una serie de complejos citosólicos (complejo II) que pueden iniciar la muerte celular apoptótica o necrótica. En la configuración proapoptótica del complejo, TRADD y RIP1 reclutan FADD y caspasa-8, lo que resulta en la activación de la caspasa y la apoptosis. Cuando FADD o caspasa-8 están ausentes, o cuando la actividad de caspasa está bloqueada, RIP1 se une y activa RIP3, lo que desencadena la muerte celular necrótica. La expresión de la proteína inhibidora similar a FLICE (FLIP) inhibe la actividad de ambos complejos. FLIP forma un heterodímero con caspasa-8 que no puede inducir apoptosis pero aún muestra actividad catalítica, y esta actividad antagoniza la activación de RIP3. Por lo tanto, los complejos que contienen heterodímeros FLIP-caspasa-8 bloquean simultáneamente la apoptosis y la necrosis dependiente de RIP (Green and Llambi 2015).

En algunas células (llamadas células tipo I), la caspasa-8 activa promueve la apoptosis al escindir y activar la caspasa-3 y la caspasa-7. Sin embargo, en muchos tipos de células (células tipo II), las caspasas ejecutoras activas son inhibidas por XIAP, y por lo tanto la apoptosis está bloqueada. En estos casos, entra en juego otro sustrato de caspasa-8, la proteína BH3 exclusiva. La escisión mediada por

Caspase-8 activa Bid, que a su vez activa Bax y Bak para promover MOMP. Los antagonistas de IAP Smac y Omi se liberan, y estos neutralizan XIAP para permitir que continúe la apoptosis (Shalini, Dorstyn et al. 2015).

Las vías de señalización activadas aguas abajo del TNFR1 son más complejas y potencialmente conducen a tres resultados diferentes: supervivencia, apoptosis o necrosis (Figura 10-B). Tras la ligadura con TNFR1, primero se recluta un adaptador diferente que contiene DD, proteína de dominio de muerte asociada a TNFR (TRADD). TRADD no se une o activa directamente a la caspasa-8, sino que actúa como un andamio de enlace de membrana para el reclutamiento de moléculas de señalización adicionales, que incluyen una quinasa, la proteína 1 que interactúa con el receptor (RIP1) y las ubiquitina ligasas TRAF2 y cIAP1 / 2. Los componentes de este complejo, incluido RIP1, se modifican por una serie compleja de eventos de ubiquitilación no degradantes realizados por los cIAP y el complejo de ensamblaje de ubiquitina lineal (LUBAC). El ensamblaje y la ubiquitilación de esta plataforma de señalización (denominado complejo I) culmina en la activación de la vía de señalización NF-κB y una respuesta inflamatoria en lugar de la muerte celular (Newton and Dixit 2012).

La ligadura de TNFR1 conduce a la muerte celular cuando la ubiquitilación de RIP1 se ve comprometida por la inhibición de las ubiquitina ligasas contenidas en el complejo I (p. Ej., CIAP1 / 2) o por la desubiquitilación directa de RIP1 por enzimas como CYLD. RIP1 y TRADD luego se liberan de TNFR1 para formar una serie de plataformas de señalización citosólica dinámica (denominadas colectivamente complejo II) que tienen el potencial de causar la muerte celular tanto apoptótica como necrótica (Figura 10-C). TRADT citosólico recluta a FADD (a través de la interacción DD-DD), que a su vez puede unirse y activar caspasa-8 de manera similar al DISC (Figura 10-C, panel izquierdo) (Newton and Dixit 2012). En esta configuración, la formación del complejo II conduce a la muerte celular apoptótica. Sin embargo, en muchos casos, la apoptosis no se produce después de la ligadura de TNFR1, al menos en parte porque la activación de NF-κB induce la expresión de la proteína inhibidora FLICE similar a la proteína similar a la caspasa-

8 (FLIP) (Shalini, Dorstyn et al. 2015). FLIP tiene una estructura de dominio similar a la de la caspasa-8, pero carece de una cisteína catalítica. Se une preferentemente a FADD (a través de interacciones DED-DED) y un monómero de caspasa-8. El heterodímero caspase-8-FLIP es catalíticamente activo, pero no promueve la apoptosis. Por qué esto sigue siendo oscuro, pero puede estar relacionado con una degradación más rápida del complejo. En consecuencia, el ensamblaje del complejo II en condiciones de señalización activa de NF-κB y, por lo tanto, expresión de FLIP, conduce a un resultado de supervivencia (Figura 10-C, panel central). Finalmente, la formación del complejo II puede comprometer una forma necrótica de muerte celular (Green and Llambi 2015).

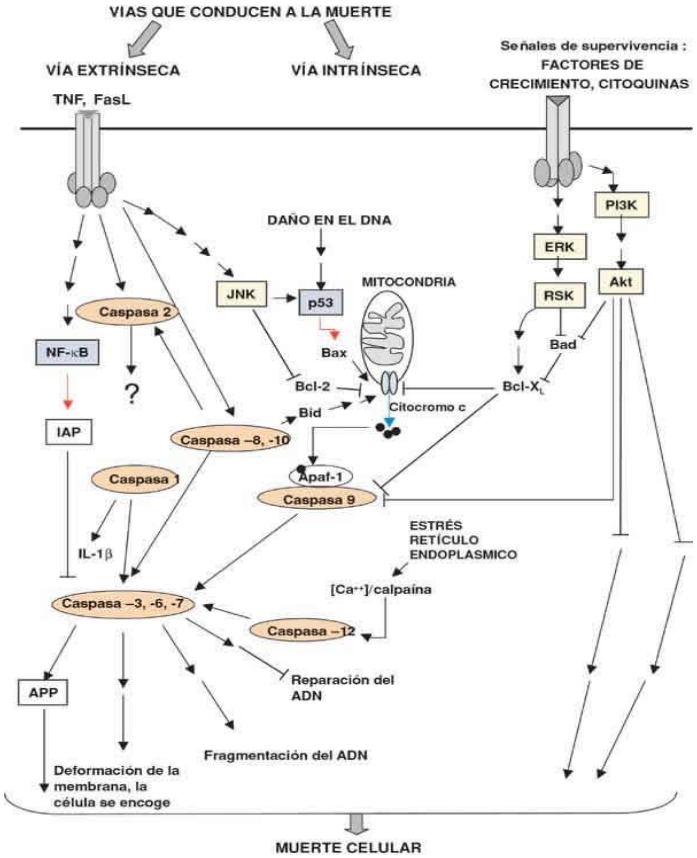


Figura 11. Esquema de las principales vías de señalización que conducen a la apoptosis o supervivencia de las células. Los estímulos que conducen a la apoptosis de la célula pueden ser intracelulares (vía intrínseca) o extracelulares (vía extrínseca). Un paso clave en la vía intrínseca es la salida de citocromo c desde la mitocondrial y, por lo tanto la salida de citocromo c desde la mitocondria está regulada por miembros de la familia Bcl-2, alguno de estos miembros son pro-apoptóticos como Bid y Bax mientras que otros son antiapoptóticos (Bcl-XL y Bcl-2). Otro mecanismo de apoptosis desencadenada por estímulos intracelulares se produce por estrés del retículo endoplásmico. Este proceso está mediado por caspasa 12. La vía extrínseca se activa tras la unión de un ligando, polipéptido de la familia del TNF, a su receptor esto activa a las caspasas iniciadoras (2, 8, 10). Una vez activadas, estas caspasas escinden y activan otras caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7) que en última instancia son las responsables de la escisión de proteínas del cito-esqueleto y proteínas nucleares, lo que conduce a la apoptosis de las células. Los ligandos antiapoptótico, entre los que se incluyen los factores de crecimiento y las citoquinas activan Akt y RSK, inhibiendo Bad y evitando la salida de citocromo c. El receptor de TNF puede inhibir la apoptosis mediante una vía mediada por NF-kB que incluye la inducción del inhibidor de apoptosis (IAP) que inhibe directamente las caspasas 3, 7 y 9. Abreviaturas: Apaf-1: Factor activador de la proteasa apoptótica. APP: Proteína precursora ß-amiloide. Ask: Quinasa reguladora de la señal de apoptosis. Bcl-2: proto-oncogen del linfoma de los linfocitos B, ErK: Quinasa regulada por señales extracelulares. IAP: Inhibidor de apoptosis. JNK: Jun quinasa N-terminal. RSK: quinasa ribosómica S6 90 kDa. TNF: Factor de necrosis tumoral. NF-kB: Factor nuclear kappa B. P13K: Fosfoinositido 3 quinasa. En amarillo se muestran las moléculas que actúan como quinasas y en azul los factores de transcripción. Las flechas sencillas muestran las acciones directas mientras que las flechas dobles muestran un efecto en varios pasos. Las flechas acabadas en punta: efecto activador, las terminadas con una línea: efecto inhibidor. La flecha azul indica translocación y la roja estimulación de la transcripción (García and Vecino 2003).

2.12. H. pylori y apoptosis

Helicobacter pylori (*H. pylori*) juega un papel importante en la patogénesis de la gastritis crónica y las enfermedades de úlcera péptica. Además, los estudios epidemiológicos y clínicos han identificado sistemáticamente una asociación entre la infección por *H pylori* y el posterior desarrollo de cáncer gástrico. La infección crónica y persistente con *H pylori* se considera uno de los primeros pasos en la carcinogénesis gástrica. *H pylori* ha sido clasificado recientemente como un carcinógeno del grupo I por un grupo de trabajo de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer. Se ha encontrado que está involucrado en la evolución del tejido gástrico de gastritis normal a superficial, gastritis atrófica multifocal, metaplasia intestinal y displasia gástrica, y finalmente a adenocarcinoma Sin embargo, los mecanismos subyacentes al potencial carcinogénico de *H pylori* aún no se han entendido completamente (Liu, Liu et al. 2005).

Las cepas de *H. pylori* se pueden dividir en dos subpoblaciones principales en función de su capacidad para producir la proteína inmunodominante de 120–145 kDa llamada antígeno del gen A (CagA) asociado a la citotoxina (Hatakeyama and Higashi 2005). El gen *cagA* que codifica CagA se localiza en un extremo del *cag*PAI, un segmento de ADN de 40 kb que probablemente se incorporó al genoma de *H. pylori* mediante un proceso de transferencia horizontal. Aproximadamente el 60% de las cepas de *H. pylori* aisladas en países occidentales portan *cag*PAI, mientras que casi todos los aislamientos de Asia Oriental son *cag*PAI-positivos. Clínicamente, la infección con la cepa de *H. pylori positiva para* cagA se ha asociado con grados más altos de inflamación de la mucosa gástrica, así como gastritis atrófica severa, y se ha sugerido que juega un papel importante en el desarrollo del carcinoma gástrico (Hatakeyama and Higashi 2005).

Tras la unión de *H. pylori cagA*-positivo a la célula epitelial gástrica, la proteína CagA se inyecta directamente en la célula a través de la *cag* sistema de secreción de tipo IV codificada-PAI (Figura 12) (Hatakeyama and Higashi 2005). La CagA translocada luego se localiza en la superficie interna de la membrana plasmática, donde se somete a fosforilación de tirosina por parte de varios miembros de las quinasas de

la familia Src (SFK) como c-Src, Fyn, Lyn y Yes (Hatakeyama and Higashi 2005). La fosforilación de CagA por SFK ocurre en ausencia de estímulos, lo que indica que SFK se activa constitutivamente en las células epiteliales gástricas. En general, la fosforilación de tirosina juega un papel crucial en la transmisión de la señalización intracelular para el crecimiento, el movimiento o la diferenciación en las células de mamíferos. En consecuencia, el hallazgo planteó la posibilidad intrigante de que, tras la fosforilación de la tirosina, la proteína bacteriana perturba la transducción de señales y, por lo tanto, provoca una disfunción celular que finalmente conduce a la transformación celular (Liu, Liu et al. 2005).

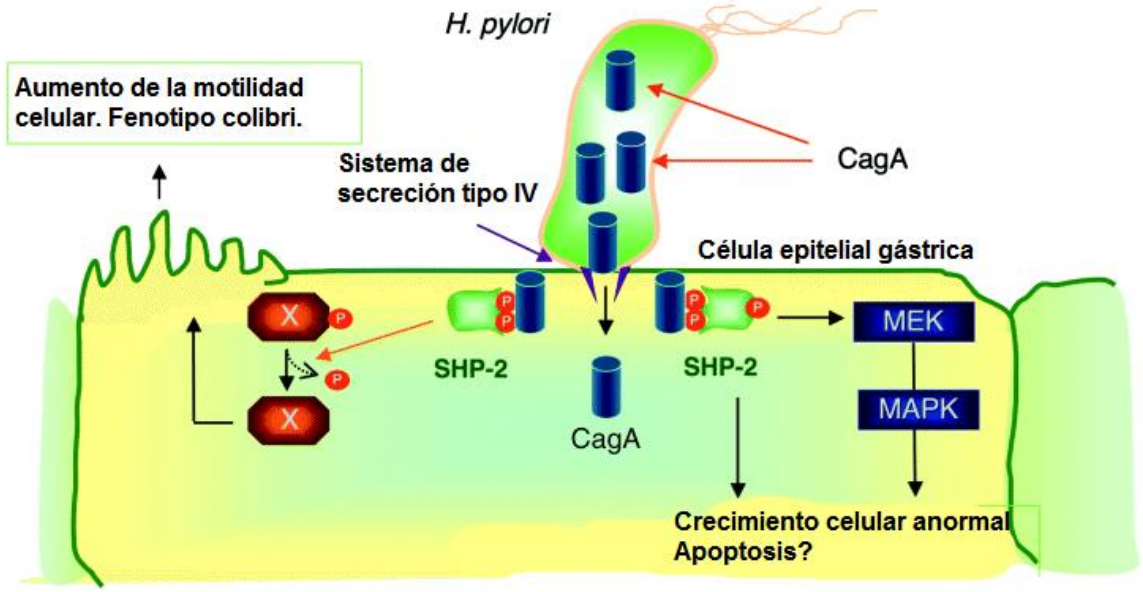


Figura 12. Interacción física y funcional entre *H. pylori* CagA y SHP-2. CagA se transloca célula a célula epitelial gástrica, unidas mediante el sistema de secreción bacteriana tipo IV. La proteína CagA translocada se localiza en la superficie interna de la membrana plasmática y sufre fosforilación de tirosina por las quinasas de la familia Src. Tras la fosforilación de la tirosina, CagA se une específicamente a la tirosina fosfatasa SHP-2 que contiene el dominio SH2 y activa la actividad fosfatasa. El SHP-2 activado por CagA potencia la actividad de la quinasa MAP de Erk, que regula tanto el crecimiento celular como la morfología celular. SHP-2 también desfosforila un sustrato celular (que se muestra como X en la figura), que está involucrado en la inducción del fenotipo del colibrí que está asociado con una elevada movilidad celular. (Hatakeyama and Higashi 2005).

Las cepas menos virulentas, caracterizadas como CagA- y VacA-, aumentan tanto la replicación celular como la apoptosis. Se ha propuesto que estos cambios provocan una alteración equilibrada, dado que se produce un mayor número de células y simultáneamente se pierde un mayor número de ellas a causa de una muerte celular programada. Lo anterior contrasta con las cepas VacA s1a y CagA+ que aumentan la replicación celular e incluso en mayor grado que las VacA-, pero no aumentan la apoptosis y por consiguiente conducen a un exceso desequilibrado de la producción de células sin aumento en su pérdida. El efecto diferencial sobre la apoptosis puede proporcionar un esquema para estudios sobre los mediadores específicos del proceso apoptótico, tales como p53 y bcl-2. Si se producen más células que las que se pierden, éstas se irían acumulando en una cantidad excesiva, hecho que podría dar lugar a una hipertrofia de la mucosa o a la formación de pólipos en el tracto gastrointestinal o al menos se puede producir un número excesivo de células con un DNA dañado que pasen por ciclos celulares repetidos (Hatakeyama and Higashi 2005).

Estudios previos han indicado que la proliferación celular y la apoptosis son eventos esenciales en el recambio celular del tejido gástrico. La infección *por H. pylori* se asoció con un aumento de la apoptosis. La regulación anormal de la apoptosis puede desempeñar un papel importante en la patogénesis del carcinoma gástrico. El gen Bax es un importante gen regulador de la apoptosis (Liu, Liu et al. 2005).

La infección *por H. pylori* provoca trastornos entre la proliferación de células epiteliales gástricas y la apoptosis, lo que aumenta el riesgo de carcinogénesis gástrica. Entre las moléculas relacionadas con el proceso apoptótico, las proteínas de la familia Bcl-2 son reguladores importantes y críticos en una variedad de contextos fisiológicos y patológicos. Bcl-2 y Bax son miembros de la familia Bcl-2, a su vez, Bcl-2 previene la muerte de las células a través de una variedad de mecanismos, mientras que la sobreexpresión de la proteína Bax aumenta la susceptibilidad de las células a la apoptosis. Aunque Bax y Bcl-2 tienen diferentes funciones, comparten estructuras similares. Bax es una proteína homóloga de Bcl-2 y posee dos regiones conservadas, BH1 y BH2 que parecen ser importantes para la unión de Bax / Bcl-2. Bax y Bcl-2 pueden formar homodímeros (Bax / Bax o Bcl-

2 / Bcl-2) o heterodímeros (Bax / Bcl-2). Se ha demostrado que la proteína Bcl-2 previene la apoptosis y puede desempeñar un papel importante en la regulación del crecimiento del cáncer gástrico (Liu, Liu et al. 2005).

Desde el año 2005 se ha estudiado el efecto que puede generar la infección por *H. pylori* en la apoptosis y se ha descubierto que la proteína Bax se expresa de manera diferente en la metaplasia intestinal y la displasia gástrica. La positividad de la expresión de la proteína Bax en las lesiones precancerosas gástricas positivas para *H pylori* es significativamente mayor en comparación con las lesiones precancerosas gástricas negativas para *H. pylori.* Una vez que se erradica *H pylori*, la positividad de la expresión de la proteína Bax disminuye significativamente en las lesiones precancerosas gástricas positivas para *H. pylori*. Sin embargo, en los pacientes persistentes infectados con *H pylori*, la positividad de la expresión de la proteína Bax se mantiene igual. (Liu, Liu et al. 2005).

Por lo tanto, los resultados del estudio de Liu en 2005 demostraron que la infección por *H. pylori* podría aumentar la expresión de la proteína Bax en la metaplasia intestinal y la displasia gástrica, lo que sugiere uno de los mecanismos de la apoptosis de las células epiteliales gástricas inducida *por H pylori*. Sin embargo, el mecanismo para la estimulación de la acumulación de proteína Bax aún se desconoce. Varios estudios han sugerido que *H pylori* produce diversas toxinas, y la mucosa gástrica puede aumentar algunas citocinas, óxido nitroso sintasa y radicales de oxígeno liberados después de *la* infección *por H. pylori*. Al mismo tiempo, *la* infección *por H. pylori* puede disminuir la capacidad antioxidante gástrica. Todos esos factores dañan el DNA o aumentan la susceptibilidad del daño del ADN y la mutación genética (Liu, Liu et al. 2005).

Por otro lado la apoptosis inducida por infecciones microbianas está implicada en la patogénesis de la sensibilidad a la apoptosis mediada por el ligando inductor de apoptosis inducida por el factor de necrosis tumoral (TRAIL) en células epiteliales gástricas (Tsai and Hsu 2017).

La toxina de vacío (VacA) induce la apoptosis de las células epiteliales gástricas, pero el gen A (CagA) asociado a la citotoxina atenúa la apoptosis en las células epiteliales gástricas. Los factores virulentos bacterianos pueden contribuir directamente a la apoptosis en las células epiteliales, mientras que la inducción de sensibilidad a la apoptosis mediada por el receptor de la muerte por *H. pylori* es independiente de los factores virulentos de *H. pylori* VacA y CagA , lo que sugiere factores inmunes, además de factores bacterianos, también son importantes para determinar el grado de daño de la mucosa gástrica durante *la* infección *por H. pylori* (Liu, Liu et al. 2005).

La infección *por H. pylori* también podría inducir daño a la mucosa gástrica al aumentar la expresión de Fas en las células epiteliales gástricas, lo que lleva a la apoptosis de las células epiteliales gástricas a través de la interacción del ligando Fas / Fas (FasL) con las células T infiltrantes (Lin, Tsai et al. 2014). Estos hallazgos sugieren un papel para la apoptosis inmunomediada de las células epiteliales gástricas durante la infección *por H. pylori*. Además, *H. pylori* desencadena directamente la muerte celular por citotoxinas después de interactuar con las células epiteliales gástricas (Munari, Fassan et al. 2014). Además, *H. pylori* transloca CagA en células epiteliales gástricas por secreción de Tipo IV, induciendo fosforilación de proteínas intracelulares y vías de transducción de señales desreguladoras dentro de las células huésped (Tsai and Hsu 2017).

El ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL; también llamado Apo2L) es un nuevo miembro de la súper familia del TNF con una fuerte homología con FasL que es capaz de inducir apoptosis en una variedad de líneas celulares transformadas *in vitro.* Las células T pueden matar las células diana a través de la interacción TRAIL / TRAIL-receptor, lo que indica que TRAIL podría servir como una molécula efectora citotóxica en las células T activadas*in vivo*. Estos hallazgos sugieren que la interacción TRAIL / TRAIL-receptor está involucrada en la interacción entre las células T infiltrantes y el epitelio gástrico durante la gastritis por *H. pylori* (Tsai and Hsu 2017).

Estudios recientes demostraron que las células epiteliales gástricas humanas sensibilizadas a *H. pylori* confieren susceptibilidad a la apoptosis mediada por TRAIL, lo que sugiere un papel para la apoptosis mediada por el sistema inmune en las células epiteliales gástricas al infiltrarse en las células T durante la infección por *Helicobacter* (Lin, Tsai et al. 2014).

La inducción de la sensibilidad TRAIL por *H. pylori* depende del contacto de las células bacterianas , independientemente de la expresión de factores virulentos de *H. pylori*. La apoptosis inducida por TRAIL ocurre a través de una cascada de señalización de caspasa , y la resistencia a TRAIL está controlada por reguladores intracelulares de apoptosis (Lin, Tsai et al. 2014).

Estudios previos demostraron que la apoptosis inducida por TRAIL podría ser mejorada por *Helicobacter* y las proteínas centrales del virus de la hepatitis C; sin embargo, los mecanismos que conducen a la sensibilidad TRAIL inducida por microbios siguen sin estar claros (Tsai and Hsu 2017).

La sensibilidad inducida por *H. pylori* a la apoptosis mediada por TRAIL en las células epiteliales gástricas depende de la activación de la ruta de la caspasa-8 aguas abajo para el transporte de señales de muerte a las mitocondrias , lo que resulta en la activación de las vías mitocondriales y elimina la resistencia a la apoptosis. *H. pylori* también induce sensibilidad a la apoptosis mediada por TRAIL mediante la regulación de la proteína inhibidora de FLICE (FLIP) y el ensamblaje de DISC, que inicia la activación de caspasa y promueve la apoptosis, proporcionando así una visión de la patogénesis del daño gástrico durante la infección por *Helicobacter* (Figura 13) (Tsai and Hsu 2017).

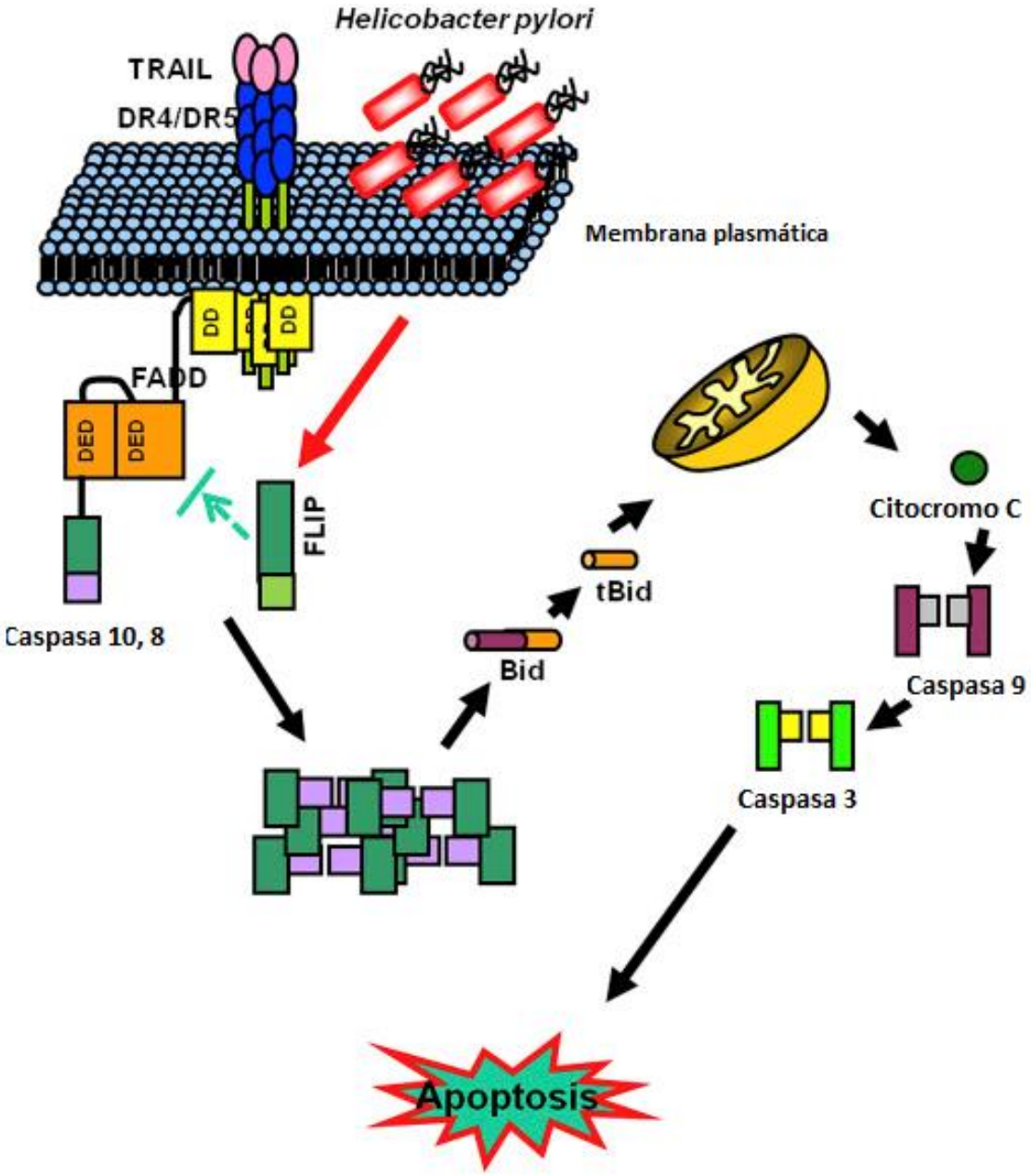


Figura 13. Inducción a apoptosis mediada por TRAIL mediante la regulación de la proteína inhibidora de FLICE (FLIP). Helicobacter *pylori* modula la apoptosis mediada por TRAIL en células epiteliales gástricas. *H. pylori* mejora el ensamblaje del complejo de señalización inductora de muerte TRAIL (DISC) a través de la regulación negativa de FLIP después de la activación de TRAIL, para activar la escisión de caspasa 8 y transmitir la señal de muerte a las mitocondrias a través de la escisión de Bid, lo que conduce a la activación de la vía mitocondrial y a romper la resistencia a la apoptosis. DED = dominio efector de muerte ; DD = dominio de muerte; DR4 = receptor de muerte 4; DR5 = receptor de muerte 5; FADD = proteína de dominio de muerte asociada a Fas ; FLIP = Proteína inhibidora de FLICE ; TRAIL = ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (Tsai and Hsu 2017).

Durante la infección *por* H. *pylori* , el grado de apoptosis inducida en el estómago se ve afectado por la respuesta inflamatoria. *La* infección *por H. pylori* induce una respuesta de células T , así como una serie de mediadores inflamatorios , incluidas las citocinas y las quimiocinas (Munari, Fassan et al. 2014).

Estas células T infiltrantes pueden entonces atacar y destruir células gástricas a través de la interacción TRAIL / TRAIL-receptor. Además de su papel en la inducción de apoptosis al unirse a los receptores de muerte, TRAIL puede estimular directamente las células T uniéndose a los receptores TRAIL y transduciendo una señal inversa a las células T junto con el compromiso del receptor de las células T , lo que resulta en la proliferación de las células T y aumenta la secreción de IFN-γ. Por lo tanto, estos resultados apoyan un papel funcional de TRAIL en *la* apoptosis inducida *por H. pylori*. Entonces, el grado de apoptosis durante *la* infección *por H. pylori* también puede estar relacionado con la respuesta inflamatoria asociada. Además de la virulencia de *H. pylori*, el daño a la mucosa también puede verse afectado por la respuesta inflamatoria inducida por *H. pylori* dentro del epitelio gástrico (Tsai and Hsu 2017).

La inflamación de la mucosa gástrica se desarrolla en respuesta a la reacción inmune del huésped contra los patógenos. La estimulación de las células epiteliales por *H. pylori* contribuye al reclutamiento de neutrófilos y linfocitos . Como se describe, las características de la respuesta inmune inflamatoria inducida *por H. pylori* se orquestan mediante la elaboración secuencial de citocinas proinflamatorias , incluidas la interleucina (IL) -10, IFN-γ, TNF-α e IL-1β (Tsai and Hsu 2017).

Las células epiteliales gástricas humanas sensibilizadas a H. *pylori* confieren susceptibilidad a la apoptosis mediada por TRAIL , y la inducción de la sensibilidad de TRAIL por *H. pylori* depende de la activación de caspasa-8 y su vía aguas abajo a través del ensamblaje mejorado del TRAIL DISC a través de la regulación descendente de FLIP celular. El grado de daño de la mucosa también se ve afectado por la respuesta inflamatoria inducida por *H. pylori* dentro del epitelio gástrico. Estos resultados sugieren un papel para la apoptosis inmunitaria y el daño de la mucosa al infiltrarse en las células T durante la infección por *Helicobacter* (Tsai and Hsu 2017).

H. pylori aumenta la susceptibilidad de las células epiteliales gástricas a la apoptosis mediada por TRAIL a través de la modulación de la señalización del receptor de muerte . La modulación de la apoptosis de la célula huésped por interacción bacteriana agrega una nueva dimensión a la patogénesis inmune asociada con la infección crónica por *Helicobacter* (Tsai and Hsu 2017).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De las enfermedades con mayor tasa de incidencia sobre la población mexicana se encuentran los padecimientos gástricos, estos en ocasiones están asociados a *Helicobacter pylori*, presente en alrededor del 70% del total de los casos en México. (Cruz, Apolinar et al. 2017). Esta infección bacteriana es una de las más comunes y afecta al 50% de la población mundial, se sabe que conduce a la inflamación de la pared gástrica, aunque se desconoce el mecanismo de manera exacta (Sung, Coker et al. 2020). Reside principalmente en el estómago y por lo tanto, tiene capacidad de dañar el epitelio, siendo el principal agente generador de gastritis crónica y en casos más graves, si no se trata a largo plazo, puede provocar complicaciones, se ve asociado al desarrollo de úlceras, atrofia, metaplasia intestinal y displasia que junto con otros factores, pueden desencadenar en adenocarcinoma (Jiménez and Bayona 2016),

Se ha reportado que en su mayoría, los casos pueden ser asintomáticos, lo que representa mayor riesgo a padecer alguna enfermedad o complicación de tipo gástrico en un futuro. Al ser un agente carcinógeno comprobado, se ha visto como modifica la señalización celular que lleva a los mecanismos de muerte, en específico, la apoptosis, esto se genera a causa de poseer diferentes factores de virulencia los cuales le confieren capacidad de alterar dichos procesos, proceso del cual se busca poder brindar mayor información, de manera específica en proteínas como Bcl-2 y caspasas. Estas proteínas se han estudiado durante mucho tiempo y en diversas situaciones, ya sea en distintas patologías gástricas, en diferentes poblaciones, y por distintos métodos, ya que son pieza fundamental en el progreso o no del proceso de señalización de muerte celular.

Tanto cagA como vacA, tienen la capacidad de llevar a cabo cambios dentro de las células gástricas, en conjunto a otros factores de virulencia, desencadenando un daño a nivel de la pared gástrica generando una respuesta inmunológica y cambios en las señales, afectando principalmente la expresión de los moduladores de la apoptosis, por lo tanto, dentro de este estudio se busca obtener información al respecto de cómo se ven alteradas dichas moléculas de acuerdo a la presencia de

los principales factores de virulencia de *H. pylori*, aunado al tipo de patología que presenta el paciente a estudiar con la finalidad de buscar y dar mayor información respecto a cómo son los niveles de expresión en las vías de señalización que llevan a las células a la muerte celular en pacientes con algún padecimiento gástrico asociado a *Helicobacter pylori*. Todo esto por medio de una técnica altamente sensible y específica como la RT-PCR y qPCR, la cual proporcionará datos sobre los principales genes de interés para proporcionar mayor conocimiento y apoyar a comprender el proceso de apoptosis.

4. HIPÓTESIS

Al ser *Helicobacter pylori* un agente carcinógeno, si se detecta la bacteria junto a sus principales genes de virulencia (CagA+/VacA), los cuales tienen influencia en las vías de señalización que llevan a la apoptosis, en muestras de pacientes con algún padecimiento gástrico, se verá alterada la vía de señalización y modificará la manera en que se expresan los principales genes apoptóticos.

5. OBJETIVO GENERAL

Detectar genes involucrados en la apoptosis a partir de biopsias gástricas provenientes de pacientes con infección por *Helicobacter pylori*, mediante pruebas de biología molecular, para determinar si los principales factores de virulencia de la bacteria tienen implicación en las vías de señalización de muerte celular en diferentes patologías gástricas.

5.1. Objetivos particulares

- Obtener DNA y RNA de biopsias gástricas con sospecha de infección por *Helicobacter pylori*
- Diseñar y validar los oligonucleótidos para la detección de los genes codificantes a los principales factores de virulencia de *H. pylori* y los involucrados en apoptosis mediante herramientas bioinformáticas y PCR.
- Detectar la presencia de *Helicobacter pylori* y los genes de virulencia más relevantes, *CagA y VacA,* a partir de DNA.
- Detectar los genes *apoptóticos bcl-xL, bcl-2, bax, caspasa 3, 8 y 10* a partir de RNA extraído de las biopsias gástricas empleando RT-PCR,
- Determinar la expresión del gen que codifica a *bcl-2 y caspasa 10* por qPCR para ver si existe una diferencia relevante en las vías de señalización de apoptosis.
- Correlacionar los datos clínicos con los resultados moleculares obtenidos.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1. Tipo de estudio

Descriptivo-prospectivo-transversal.

6.2. Población de estudio

Adultos con 18 años de edad o más, de sexo indistinto, con presencia de algún padecimiento gástrico diagnosticado por el servicio de Endoscopía, con diagnóstico previo o sospecha de *Helicobacter pylori,* sin estar bajo algún tratamiento con antibióticos y que hayan aceptado firmar una carta de consentimiento informado.

Se diagnosticó mediante PCR la presencia de *Helicobacter pylori* y se clasifico las muestras en dos grupos: a) Con *Helicobacter pylori* y b) Sin *Helicobacter pylori*; posteriormente se obtuvo el diagnóstico del servicio de Histopatología para poder clasificar las muestras con base al tipo de padecimiento gástrico, de modo que se clasificó en tres grupos I) Gastritis crónica, II) Metaplasia intestinal y III) Adenocarcinoma gástrico.

6.3. Criterios de inclusión

- Mayores de 18 años
- Sexo indistinto
- Diagnóstico de infección por *Helicobacter pylori o sospecha*
- Presencia de algún padecimiento gástrico diagnosticado por el servicio de endoscopia.

6.4. Criterios de exclusión

- Pacientes con tratamiento antibiótico
- Muestra insuficiente
- Pacientes sin datos clínicos
- Pacientes sin diagnóstico de gastritis crónica, metaplasia intestinal, displasia o adenocarcinoma.

6.5. Material

6.5.1. Material biológico

Biopsias gástricas

6.5.2. Reactivos

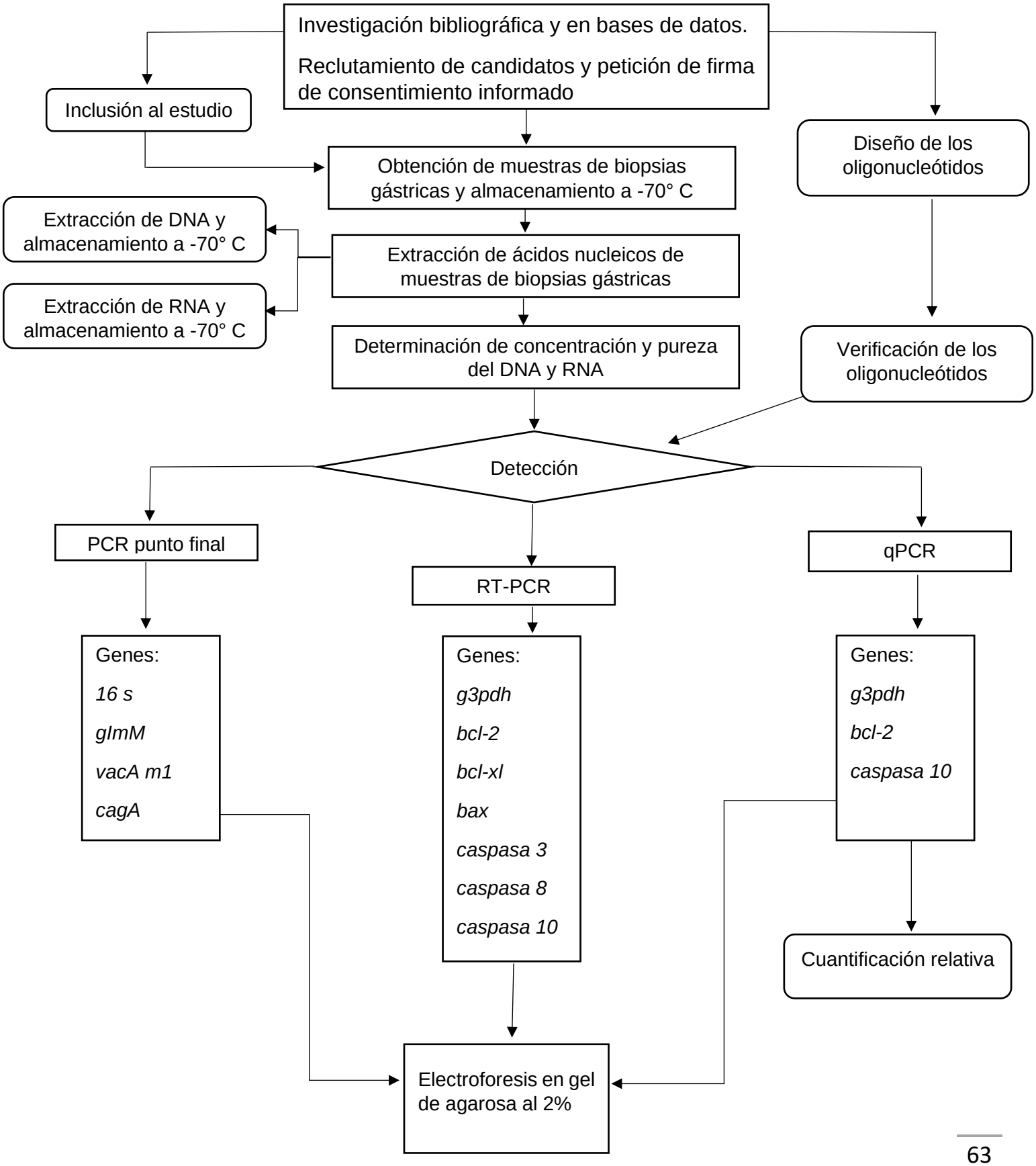
- ✓ MagMAXTM FFPE DNA/RNA Ultrakit de ThermoFisher SCIENTIFICTM
- ✓ One Taq ® RT-PCR Kit de New England BioLabs®Inc.
- ✓ Oligonucleótidos sintetizados por T4OLIGO® y Sondas Taqman de Thermofisher®
- ✓ H_2O grado biología molecular marca Lonza
- ✓ Taq 2X Master Mix marca New England BioLabs®Inc
- ✓ Agarosa grado biología molecular marca ThermoFisher SCIENTIFICTM
- ✓ Solución de Bromuro de Etidio (10 mg/ml) marca InvitrogenTM
- ✓ Gel loading dye Purple (6X), no SDS marca New England BioLabs®Inc.
- ✓ 50 pb DNA Ladder marca New England BioLabs®Inc.
- ✓ Buffer TBE (Tris Borato EDTA) 10X marca Roche®

6.5.3. Equipos

- ✓ Cabina de flujo laminar Clase II A/B3
- ✓ Mini dry bath para tubos de 1.5 mL marca Genetics
- ✓ Vortex-Genie2 marca Scientific Industries
- ✓ Microcentrífuga con refrigeración mod. 1730R marca GYROZEN
- ✓ Espectrofotómetro EPOCH serie 130125D marca BioTekIntrument Inc.
- ✓ Nanofotómetro Pearl marca Implent modelo Implent GmbH serie 3122
- ✓ Mini Vortex V-1 plus marca bioSan
- ✓ MS 3 Vortexer marca IKA®
- ✓ Mini centrífuga modelo NG002G marca Nippon Genetics Europe
- ✓ Mini centrífuga para tira de tubos de qPCR marca DRAGONLAB
- ✓ Termociclador para PCR de punto final SEE AMPTM
- ✓ Termociclador CFX96TM Real-Time System marca BIO-RAD®
- ✓ Balanza analítica Mettler Toledo
- ✓ Sistema de electroforesis ENDURO marca Labnet international
- ✓ Gel DocTM EZ Imager marca BIO-RAD®

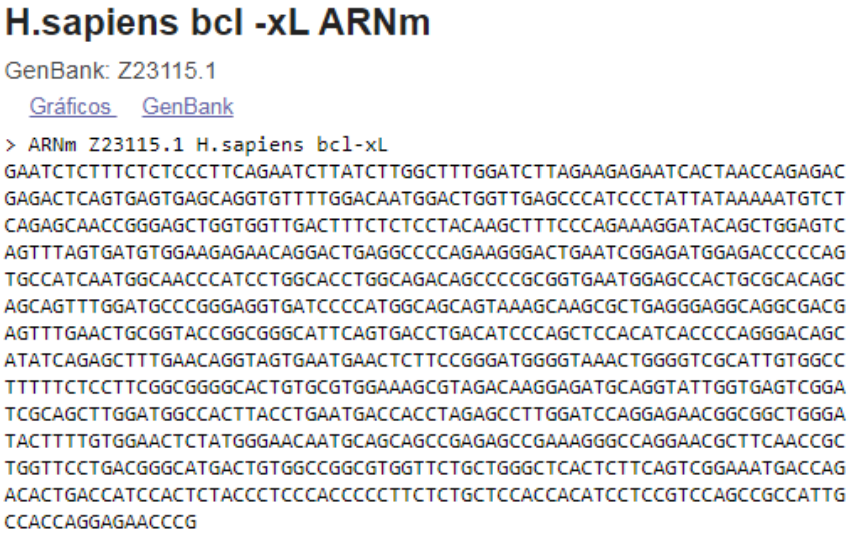
6.6. Métodos

6.6.1. Diagrama experimental



6.6.2. Diseño y validación de oligonucleótidos.

Para el diseño de cada oligonucleotido se realizó una búsqueda en bases bioinformáticas como GenBank de NCBI (National Center For Biotecnology Information, por sus siglas en inglés), para obtener la secuencia para cada gen, se tomó la secuencia FASTA y posteriormente se diseñaron los oligonucleótidos en Primer3Plus, finalmente se validaron empleando plataformas como PCR *in sillico* y OligoAnalyzer de IDT (Integrated DNA Technologies) para verificar la región de hibridación de cada uno de los pares y sus temperaturas de alineamiento. A continuación, se ejemplifica el procedimiento para el diseño de los oligonucleótidos del gen *bcl-xl.*



H.sapiens bcl -xL ARNm

GenBank: Z23115.1

Gráficos GenBank

```
> ARNm Z23115.1 H.sapiens bcl-xL
GAATCTCTTTCTCTCCCTTCAGAATCTTATCTTGGCTTTGGATCTTAGAAGAGAATCACTAACCAGAGAC
GAGACTCAGTGAGTGAGCAGGTGTTTTGGACAATGGACTGGTTGAGCCCATCCCTATTATAAAAATGTCT
CAGAGCAACCGGGAGCTGGTGGTTGACTTTCTCTCCTACAAGCTTTCCCAGAAAGGATACAGCTGGAGTC
AGTTTAGTGATGTGGAAGAGAACAGGACTGAGGCCCCAGAAGGGACTGAATCGGAGATGGAGACCCCCAG
TGCCATCAATGGCAACCCATCCTGGCACCTGGCAGACAGCCCCGCGGTGAATGGAGCCACTGCGCACAGC
AGCAGTTTGGATGCCCGGGAGGTGATCCCCATGGCAGCAGTAAAGCAAGCGCTGAGGGAGGCAGGCGACG
AGTTTGAACTGCGGTACCGGCGGGCATTCAGTGACCTGACATCCCAGCTCCACATCACCCCAGGGACAGC
ATATCAGAGCTTTGAACAGGTAGTGAATGAACTCTTCCGGGATGGGGTAAACTGGGGTCGCATTGTGGCC
TTTTTCTCCTTCGGCGGGGCACTGTGCGTGGAAAGCGTAGACAAGGAGATGCAGGTATTGGTGAGTCGGA
TCGCAGCTTGGATGGCCACTTACCTGAATGACCACCTAGAGCCTTGGATCCAGGAGAACGGCGGCTGGGA
TACTTTTGTGGAACTCTATGGGAACAATGCAGCAGCCGAGAGCCGAAAGGGCCAGGAACGCTTCAACCGC
TGGTTCCTGACGGGCATGACTGTGGCCGGCGTGGTTCTGCTGGGCTCACTCTTCAGTCGGAAATGACCAG
ACACTGACCATCCACTCTACCCTCCCACCCCCTTCTCTGCTCCACCACATCCTCCGTCCAGCCGCCATTG
CCACCAGGAGAACCCG
```

Figura 14. Secuencia FASTA obtenida de <*H. sapiens bcl –xL ARNm*> en GenBank. La secuencia debe ser copiada e ingresada en cualquier plataforma que sea útil para diseñar los oligonucleótidos, como Primer3Plus, que fue la elegida para elaborarlos.

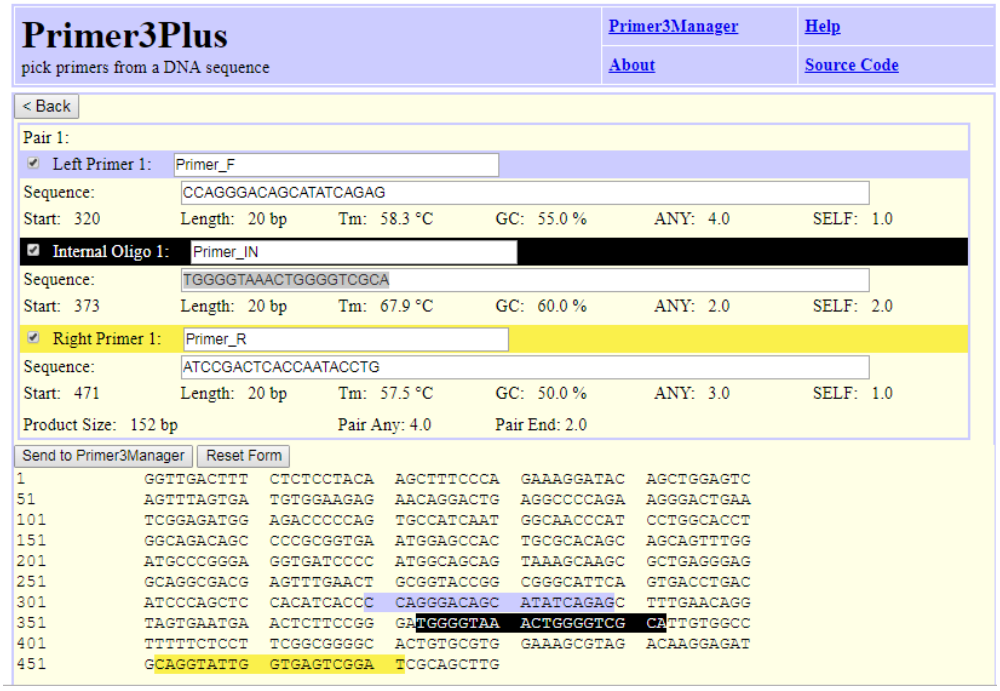


Figura 15. Plataforma bioinformática Primer3Plus. En la página de inicio se debe pegar la secuencia FASTA del gen a estudiar, posteriormente se configuran los ajustes de diseño y se selecciona la opción de “pick primers”. A continuación, aparecerán los posibles pares funcionales de oligonucleótidos.

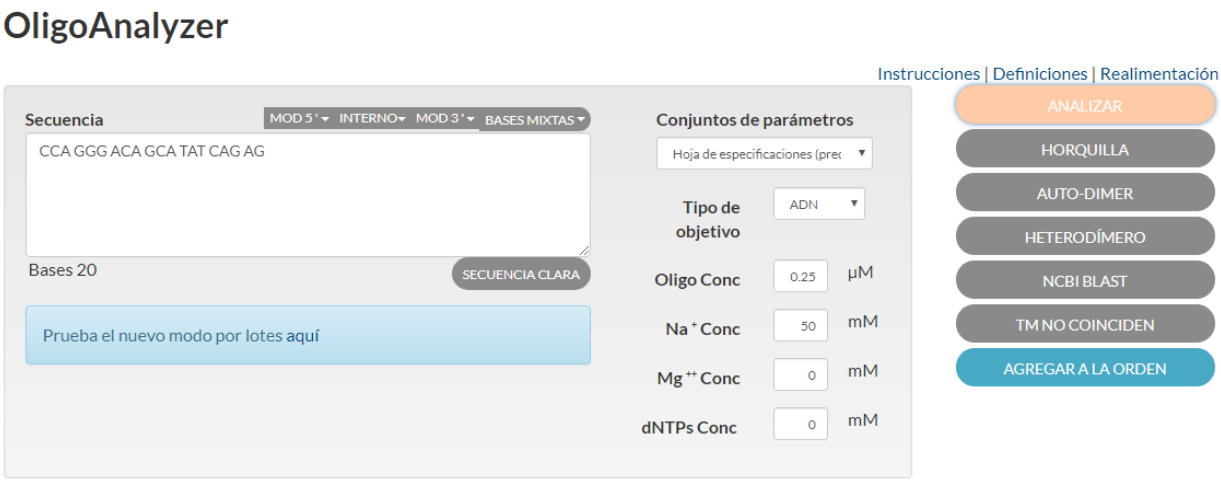


Figura 16. Plataforma bioinformática IDT, OligoAnalyzer. Herramienta funcional para el análisis fisicoquímico de los oligonucleótidos y su posible formación de auto dímero y heterodímeros. Se debe pegar cada uno de los oligonucleótidos (Forward, Reverse y oligo interno en caso de PCR en tiempo real) y seleccionar la opción “Analizar”.

Resultados

RESUSPENSIÓN DILUCIÓN

SECUENCIA	5'- CCA GGG ACA GCA TAT CAG AG -3 '
COMPLEMENTO	5'- CTC TGA TAT GCT GTC CCT GG -3 '
LONGITUD	20
CONTENIDO DE GC	55%
TEMPERATURA	54.7 °C
PESO MOLECULAR	6160.1 g / mol
COEFICIENTE DE EXTINCIÓN	204700 L / (mol · cm)
nmole / OD_{260} :	4.89
µg / OD_{260} :	30,09

CONFIGURACIÓN DE TEMPERATURA DE FUSIÓN

TIPO DE OBJETIVO	ADN
OLIGO CONC	0.25 µM
Na^+ CONC	Sal monovalente 50 mM
Mg^{++} CONC	Sal divalente 0 mM
dNTPs CONC	0 mM nucleótido trifosfato

Figura 17. Resultados del análisis de oligonucleótido en OligoAnalyzer.

Tabla 2. Oligonucleótidos obtenidos para la detección de cada uno de los genes.

Gen	Oligonucleótidos 5' → 3'	Tamaño de amplicón (pb)
b-actina	**Forward:** CCTCCCTGGAGAAGAGCTAC **Reverse:** GATGTCCACGTCACACTTCA **Oligo interno:** CTGCCTGACGGCCAGGTCAT	167
gapdh	**Forward:** CCGTCCACAGACAATTCGAA **Reverse:** TTGAGCTGGATCTCTTTCAGCTT	160
16 s	**Forward:** GATTAGATACCCTGGTAGTCCAC **Reverse:** CCCGGGAACGTATTCACCG	608
gimm	**Forward:** TCTAAAAACGCCCTTTCTTCTCA **Reverse:** ATTCGCTCACAAACTTATCCC	130
vac a m1	**Forward:** GCGCTGTTAATCTTGATGAG **Reverse:** AGGGGGATTTTATCAAC	162
cag a	**Forward:** TAAGGAAGCAAGAGCGGTCG **Reverse:** CAACCCGTTACCGACTAGGG	529
bcl-2	**Forward:** GGTCGCATTGTGGCCTTT **Reverse:** TCCTTGTCTACGCTTTCCACG **Oligo interno:** TCTCCTTCGGCGGGGCACTGT	62
bcl-xl	**Forward:** CCAGGGACAGCATATCAGAG **Reverse:** ATCCGACTCACCAATACCTG	152
bax	**Forward:** CAAGAAGCTGAGCGAGTGTC **Reverse:** GTTGAAGTTGCCGTCAGAAA	511
caspasa 3	**Forward:** CTGGTTTTCGGTGGGTGT **Reverse:** CCAGGGATATTCCAGAGTCC	163
caspasa 8	**Forward:** GAGTCTGTGCCCAAATCAAC **Reverse:** TCTTGGAGAGTCCGAGATTG	155
caspasa 10	**Forward:** CCCTAAGTTTCCTGGCATTT **Reverse:** CAGGAGGTGTCACTATCTGGA **Oligo interno:** CATGCCTGGAGGACCTCTGCA	156

6.6.3. Preparación de oligonucleótidos

Los primers se cuantificaron a 230 y 280 nm mediante un nanofotómetro Pearl marca Implent modelo Implent GmbH serie 3122; los mismos se prepararon a una concentración final de 10 pmol y se llevaron almacenamiento de -20ºC hasta su uso.

Cada par de oligonucleótidos se probó de forma individual mediante PCR de punto final para verificar su funcionamiento. Se realizó un gradiente en cada caso para encontrar la Tm experimental con mejor resultado. Se usaron cepas American Type Culture Collection (ATTC) como controles positivos, una cepa de referencia citotóxica (CagA + y VacA +) de *H pylori*, NCTC 11637, que sirvieron para comprobar que los oligonucleótidos amplificaban adecuadamente.

Las cantidades utilizadas para la PCR se observan en la Tabla 3 y para el caso de los testigos negativos se utilizó un volumen de 7 µL de H_2O ya que no se cargaba muestra de DNA.

Tabla 3. Cantidades de reactivos utilizados para la identificación da patógenos mediante PCR de punto final.

Reactivo	**Cantidad**
Master Mix	10 µL
Primer Forward	1 µL
Primer Reverse	1 µL
Agua libre de endonucleasas	3 µL
DNA muestra	5 µL
Total	20 µL

Las temperaturas empleadas para la estandarización se programaron considerándose **X** como la Ta a encontrar según los resultados obtenidos por cada reacción (Figura 18).

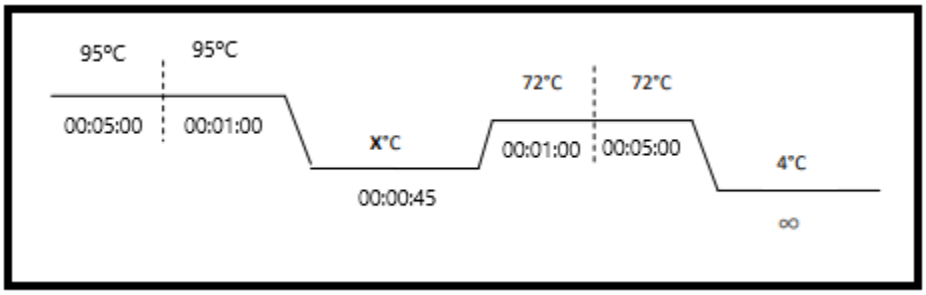


Figura 18. Programa empleado para la estandarización de cada par de primers.

6.6.4. Recolección y almacenamiento de muestras

Con ayuda de los médicos especialistas en endoscopía se tomaron biopsias gástricas a cada uno de los pacientes participantes siguiendo el procedimiento del protocolo Sydney, el cual consiste en tomar al menos 5 biopsias de las siguientes zonas (Figura 19): (2) Curvatura mayor y menor distal al antro (A1 y A2), (1) Curvatura menor a nivel del ángulo (A3) y (2) Pared anterior y posterior del cuerpo proximal (C1 y C2). Dichas biopsias fueron depositadas en un tubo de cristal con tapa el cual contenía solución salina fisiológica, fueron rotuladas con los datos del paciente y fecha de recolección. Las muestras recolectadas fueron trasladadas en una hielera hasta el servicio de Genética y diagnóstico molecular, donde fueron procesadas posterior a su toma y en casos de no ser procesadas de manera inmediata, fueron almacenadas a -70° C hasta su extracción (no más de 24 horas).

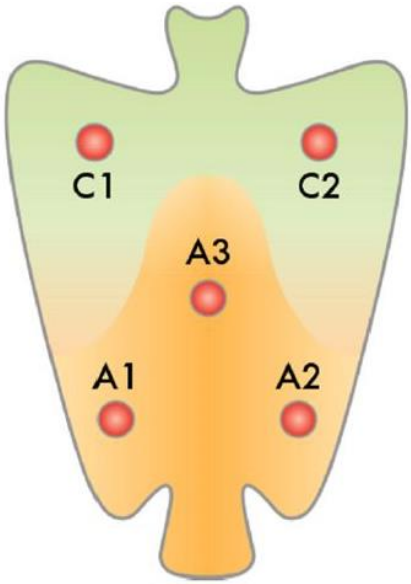


Figura 19. Representación anatómica de los sitios de biopsia establecidos para la detección de cáncer gástrico y lesiones premalignas según protocolo Sydney. (2) Curvatura mayor y menor distal al antro (A1 y A2), (1) Curvatura menor a nivel del ángulo (A3) y (2) Pared anterior y posterior del cuerpo proximal (C1 y C2) (Latorre, Jiménez et al. 2016).

6.6.5. Extracción de ácidos nucleicos (DNA/RNA) a partir de biopsias gástricas frescas

Se utilizó el kit MagMAX™ FFPE DNA/RNA Ultrakit de ThermoFisher SCIENTIFIC y se siguió el procedimiento del fabricante.

Se descongelaron las muestras de biopsias gástricas, posteriormente se colocó cada una de las muestras en un tuvo Eppendorf™ con 0.5 mL de solución salina fisiológica, respectivamente etiquetado con el número de muestra asignado, con ayuda de un aparato eléctrico para moler, se disgrego completamente la muestra hasta tener un aspecto homogéneo.

A continuación, se siguió con el protocolo indicado según el fabricante:

Se agregó 110 uL de solución de proteasa, que consiste en adicionar 10 uL de proteasa y 100 uL de Protease Digestion Buffer. Se mezcló por vortex vigorosamente para asegurar que todo el tejido molido se sumergiera en la solución.

Se incubo a 55° C durante una hora en un termoblock. Posteriormente se elevó la temperatura del termoblock hasta 90° C y se mantuvo incubando 1 hora más.

Se retiró el tubo del termoblock y se agregó 155 uL de la solución DNA Binding Buffer, que consiste en adicionar 135 uL de Binding Solution y 20 uL de Nucleic Acid Binding Beads. Se mezcló el tubo por vortex durante 30 segundos o hasta que la mezcla se tornara de un color café homogéneo, posteriormente, se colocó el tubo en una gradilla con placa magnética por 2 minutos o hasta que la solución se aclarara y las perlas formaran un pellet del lado del magneto.

Cuidadosamente, se transfirió el sobrenadante a otro tubo respectivamente rotulado, sin tocar el pellet, este sobrenadante contiene el RNA de la muestra**,** por lo que fue almacenado a -70° C hasta el momento de su extracción. Acto seguido se continuó trabajando la extracción de DNA con el tubo que contiene el pellet.

Después, se realizaron lavados, por lo que se agregó 200 uL de DNA Wash Buffer, se mezcló por vortex durante 30 segundos o hasta que la mezcla se tornara de un color café homogéneo. Posteriormente, se colocó el tubo en una gradilla con placa magnética por 2 minutos o hasta que la solución se aclarara y las perlas formaran un pellet. Cuidadosamente se descartó el sobrenadante y se deposita en un frasco para desechos. Este paso se realizó por duplicado.

Posteriormente se realizó un lavado con 200 uL de la solución Wash Solution 2, se mezcló por vortex durante 30 segundos o hasta que la mezcla se tornara de un color café homogéneo, después, se colocó el tubo en una gradilla con placa magnética por 2 minutos o hasta que la solución se aclarara y las perlas formaran un pellet, cuidadosamente se descartó el sobrenadante y se depositó en un frasco para desechos. Este paso se realizó por duplicado.

Se dejaron secar las perlas y se agregó 50 uL de Elution Solution a las perlas, se mezcló por vortex durante 2 minutos o hasta que la mezcla se tornara de un color café homogéneo, a continuación se colocó el tubo en una gradilla con placa magnética por 2 minutos o hasta que la solución se aclarara y las perlas formaran un pellet. Cuidadosamente se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo ya que

este contiene el DNA purificado, se rotulo y almacenó a -70° C hasta su uso y análisis.

Después, se inició la extracción de RNA, se agregó al tubo que contiene el sobrenadante 20 uL de Nucleic Acid Binding Beads. Se adicionó 400 uL de RNA Binding Buffer que consiste en mezclar 100 uL de Binding Solution y 300 uL de Isopropanol. Se mezcló el tubo por vortex durante 60 segundos o hasta que la mezcla se tornara de un color café homogéneo. A continuación, se colocó el tubo en una gradilla con placa magnética por 2 minutos o hasta que la solución se aclarara y las perlas formaran un pellet del lado del magneto. Cuidadosamente se descartó el sobrenadante y se depositó en un frasco para desechos

Se realizó un lavado con 500 uL de RNA Wash Buffer, se mezcló por vortex durante 30 segundos o hasta que la mezcla se tornara de un color café homogéneo. A continuación se colocó el tubo en una gradilla con placa magnética por 2 minutos o hasta que la solución se aclarara y las perlas formaran un pellet. Cuidadosamente se descartó el sobrenadante y se deposita en un frasco para desechos.

Posteriormente se realizó un lavado con 500 uL de la solución Wash Solution 2, se mezcló por vortex durante 30 segundos o hasta que la mezcla se tornara de un color café homogéneo. A continuación se colocó el tubo en una gradilla con placa magnética por 2 minutos o hasta que la solución se aclarara y las perlas formaran un pellet, cuidadosamente se descartó el sobrenadante y se depositó en un frasco para desechos.

Se agregó 100 uL de DNase Solution a las perlas, que consiste en mezclar 10 uL de DNase Buffer, 20 uL de DNase y 70 uL de Nuclease- Free Water. Se mezcló en vortex y se incubo en termoblock a 37° C durante 20 minutos, se mezcló por vortex cada 5 minutos hasta alcanzar los 20 minutos de incubación. Posteriormente se agregó 450 uL de RNA Rebinding Buffer, que consiste en mezclar 200 uL de Binding Solution y 250 uL de Isopropanol. Se mezcló por vortex durante 30 segundos o hasta que la mezcla se tornara de un color café homogéneo, posteriormente, se colocó el tubo en una gradilla con placa magnética por 2 minutos o hasta que la

solución se aclarara y las perlas formaran un pellet, cuidadosamente se descartó el sobrenadante y se depositó en un frasco para desechos.

Se realizó un lavado con 500 uL de RNA Wash Buffer, se mezcló por vortex durante 30 segundos o hasta que la mezcla se tornara de un color café homogéneo. A continuación se colocó el tubo en una gradilla con placa magnética por 2 minutos o hasta que la solución se aclarara y las perlas formaran un pellet, cuidadosamente se descartó el sobrenadante y se depositó en un frasco para desechos.

Se agregó 500 uL de Wash Solution 2 para lavar las perlas, se mezcló por vortex durante 30 segundos o hasta que la mezcla se tornara de un color café homogéneo, a continuación, se colocó el tubo en una gradilla con placa magnética por 2 minutos o hasta que la solución se aclarara y las perlas formaran un pellet, cuidadosamente se descartó el sobrenadante y se depositó en un frasco para desechos. Este paso se realizó por duplicado.

Se agregó 50 uL de Elution Solution a las perlas, se mezcló por vortex durante 2 minutos o hasta que la mezcla se tornara de un color café homogéneo. A continuación, se colocó el tubo en una gradilla con placa magnética por 2 minutos o hasta que la solución se aclarara y las perlas formaran un pellet, cuidadosamente se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo ya que este contiene el RNA purificado, se rotulo y almacenó a -70° C hasta su uso y análisis.

6.6.6. Cuantificación de ácidos nucleicos (DNA/ RNA)

Se usó un espectrofotómetro modelo EPOCH marca BioTekIntrument Inc. para determinar la concentración de ácidos nucleicos en la muestra a una absorbancia de 260 nm (A260). También se estimó la pureza de la muestra mediante la proporción A260/A280. Para ello, se realizó el siguiente protocolo:

Se programaron las condiciones dependiendo la cuantificación de DNA o RNA en el programa Gen 5 2.01. Se calibró el espectrofotómetro con agua inyectable, se colocó 1uL en cada pozo de la placa, asegurándose de cubrir perfectamente la trayectoria de la luz y evitando la formación de burbujas. Posteriormente se colocó

1 uL de la muestra de DNA o RNA en el pozo donde se vaya a realizar la lectura. Una vez cuantificadas las muestras, se hicieron los ajustes de concentración necesarios, dependiendo las metodologías siguientes, empleando como diluyente H_2O grado biología molecular.

6.6.7. PCR de punto final para detección de los genes *16S, gImM, vacA m1 y cagA*

Para realizar las mezclas de reacción de PCR se trabajó en la cabina de flujo laminar Clase II A/B3, se empleó una Taq 2X Master Mix de la marca New England BioLabs®Inc, además de los T4OLIGO®. Se descongelaron los reactivos y se colocaron en un cooler para que se mantuvieran en frio durante su uso. Posteriormente, se siguió el protocolo indicado por el fabricante:

Se preparó la siguiente mezcla en un tubo de PCR de 0.2 mL.

Tabla 4. Mezcla de reacción para PCR de los genes *16S, gImM, vacA m1 y cagA*

Reactivo	Cantidad
Taq 2X Master Mix	10 µL
Primer Forward (10 uM)	1 µL
Primer Reverse (10 uM)	1 µL
Agua libre de endonucleasas	Variable µL
DNA (1000 ng)	Variable µL
Total	20 µL

Posteriormente se mezcló por vortex y se dio spin por 10 segundos a 3000 rpm. El tubo se llevó al termociclador con las siguientes condiciones dependiendo el gen a detectar:

Tabla 5. Condiciones de PCR para el gen *16 S y gImM* (PCR dúplex)

95°C por 5 minutos	
35 ciclos	95°C por 1 minuto
	60°C por 50 segundos
	72°C por 1 minuto
72°C por 5 minutos	
4°C HOLD	

Tabla 6. Condiciones de PCR para el gen *vacA m1.*

95°C por 5 minutos	
35 ciclos	95°C por 1 minuto
	52.5°C por 40 segundos
	72°C por 1 minuto
72°C por 5 minutos	
4°C HOLD	

Tabla 7. Condiciones de PCR para el gen *cagA.*

95°C por 5 minutos	
35 ciclos	95°C por 1 minuto
	60°C por 50 segundos
	72°C por 1 minuto
72°C por 10 minutos	
4°C HOLD	

6.6.8. RT-PCR para detección de los genes *gapdh, b-actina, bcl-2, bcl-xl, bax, caspasa 3, 8 y 10*.

Para realizar las mezclas de reacción de RT-PCR se trabajó en la cabina de flujo laminar Clase II A/B3, se empleó el kit One Taq RT-PCR Kit de la marca New England BioLabs®Inc y los oligonucleótidos sintetizados por T4OLIGO®. Se descongelaron los reactivos y se colocaron en un cooler para que se mantuvieran en frio durante su uso. Después, se siguió el protocolo indicado por el fabricante:

Síntesis de cDNA

En un tubo de PCR de 0.2 mL se adicionaron 2µL de $d(T)_{23}$ VN oligo (50 µM) y posteriormente 1000 ng de RNA de la muestra, en un volumen de no más de 6 µL, se adicionó los µL necesarios de Nuclease-free H_2O para tener un volumen total de 8 µL.

Se mezcló por vortex y se dio spin por 10 segundos a 3000 rpm. El tubo se llevó al termociclador a 70°C por 5 minutos un ciclo. A continuación, al mismo tubo se le agregaron 10 µL de M-MuLV Reaction Mix y 2µL de M-MuLV Enzyme Mix, se mezcló por vortex y spin por 10 segundos a 3000 rpm. El tubo se llevó al termociclador a 42°C por 1 hora un ciclo y 80°C por 4 minutos un ciclo.

El cDNA sintetizado se diluyó en 30µL de H_2O grado biología molecular, se le dio vortex por 10 segundos y spin a 3000 rpm/min y se guardó a -20°C para pruebas posteriores.

PCR

El mix para la reacción de PCR por punto final se preparó con las siguientes cantidades de reactivo por cada muestra a analizar.

Tabla 8. Preparación de Master Mix para PCR.

Reactivo	Cantidad
Taq 2X Master Mix	10 µL
Primer Forward (10 uM)	1 µL
Primer Reverse (10 uM)	1 µL
Agua libre de endonucleasas	Variable µL
cDNA (1000 ng)	Variable µL
Total	20 µL

Las condiciones de la PCR que fueron utilizadas se presentan a continuación:

Tabla 9. Condiciones de PCR para los genes *gapdh y b-actina*.

95°C por 5 minutos	
30 ciclos	95°C por 1 minuto
	59.5°C por 1 minuto
	72°C por 1 minuto
72°C por 10 minutos	
4°C HOLD	

Tabla 10. Condiciones de PCR para genes *bcl-2, bcl-xl, bax, caspasa 3, 8 y 10.*

95°C por 30 segundos	
30 ciclos	95°C por 30 segundos
	60°C por 30 segundos
	72°C por 1 minuto
72°C por 5 minutos	
4°C HOLD	

6.6.9. qPCR para detección de los genes *gapdh, b-actina, bcl-2 y caspasa 10*.

Se utilizaron sondas TaqMan para la qPCR, estas fueron elaboradas por Thermofisher® para la detección de los genes *gadph, b-actina, bcl-2 y caspasa 10.*

Mezcla de reacción

Para realizar las mezclas de reacción de qPCR se trabajó en la cabina de flujo laminar Clase II A/B3, se empleó una Taq 2X Master Mix de la marca New England BioLabs®Inc, además de los T4OLIGO® Se descongelaron los reactivos y se colocaron en un cooler para que se mantuvieran en frio durante su uso. A continuación, se siguió el protocolo indicado por el fabricante:

Se preparó la siguiente mezcla en tubos de qPCR de 0.2 mL

Tabla 11. Mezcla de reacción para qPCR de los genes *b-actina, gapdh, bcl-2, y caspasa 10.*

Reactivo	Cantidad
Taq 2X Master Mix	10 µL
Mix Primers (10 uM)	1 µL
Agua libre de endonucleasas	Variable µL
cDNA (1000 ng)	Variable µL
Total	20 µL

NOTA: Con el fin de determinar la variación en los niveles de expresión de bcl-2 y caspasa 10, se realizó un pool por cada grupo en los cuales se clasificaron los pacientes (Clasificación A: 1) benigno 2) intermedio y 3) maligno; Clasificación B: 1) vacA+ y 2) vacA -), se tomó la cantidad necesaria de cada muestra para adicionar 1000 ng del cDNA previamente sintetizado. De este modo, el pool de cada uno de los grupos fueron los sometidos a qPCR.

Posteriormente se mezcló por vortex y se dio spin por 10 segundos a 3000 rpm. El tubo se llevó al termociclador con las siguientes condiciones dependiendo el gen a detectar:

Tabla 12. Condiciones de qPCR para el gen *gapdh y b-actina*.

95°C por 5 minutos	
40 ciclos	95°C por 15 segundos
	58°C por 1 minuto
	Plato de lectura

Tabla 13. Condiciones de qPCR para el gen *bcl-2.*

50°C por 2 minutos	
95 ° por 10 minutos	
40 ciclos	94°C por 15 segundos
	63.2°C por 1 minuto
	Plato de lectura

Tabla 14. Condiciones de qPCR para el gen *caspasa 10.*

50°C por 2 minutos	
95 ° por 10 minutos	
40 ciclos	94°C por 15 segundos
	63.2°C por 1 minuto
	Plato de lectura

6.6.10. Electroforesis en gel de agarosa al 2%

Para poder revelar e identificar los productos de la PCR empleada para identificar los genes propios de la bacteria a partir de DNA y los genes estudiados por RT-PCR, además de poder verificar la formación de un solo producto de amplificación en caso de la qPCR, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2% brevemente descrita a continuación:

Se pesó 1 g de agarosa y se disolvió en 50 mL de buffer TBE 1X, se calentó la mezcla durante un minuto en agitación constante. Una vez disuelta la agarosa, se agregó 1 uL de Bromuro de Etidio, mezclando ligeramente evitando la formación de burbujas.

Se vertió la mezcla en el molde para formar el gen y se colocó el peine para la formación de los pozos que contendrían las muestras, se dejó solidificar el gel aproximadamente 15-20 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el peine una vez solidificado el gel.

Se colocó y conecto la cámara de electroforesis a la fuente de poder, se adicionó la cantidad suficiente de Buffer TBE 1X a la cámara para cubrir el gel y se configuró 80 volts por 2 horas.

Posteriormente se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular de 50 pb y se inició la electroforesis.

Una vez terminada la electroforesis se colocó el gel en la placa del transiluminador para observar las bandas.

6.6.11. Análisis estadístico

Se utilizó el software Startical Product and Service Solutions (SPSS) version 20. Se realizó ANOVA para los datos clasificados por padecimientos que presentaba el paciente y la prueba t de Student para la clasificación acorde a la presencia del factor de virulencia vac A, con la finalidad de calcular el valor de p, y así poder determinar si existe una variación significativa entre los valores obtenidos mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para los distintos genes estudiados. Se consideran resultados no significativos si el valor de p es menor a 0.05.

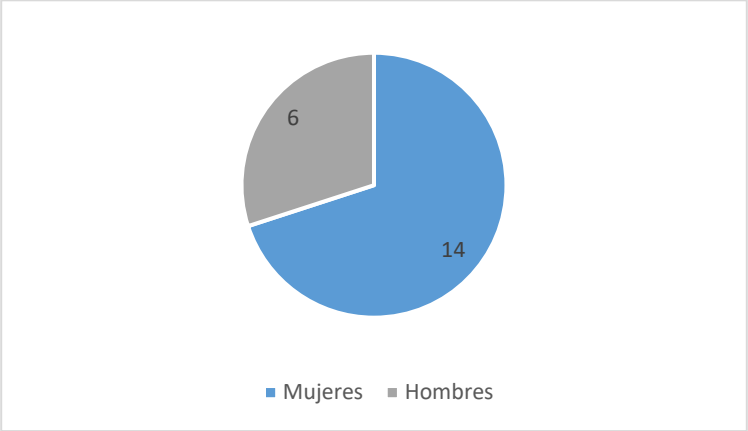
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La finalidad del estudio fue poder describir cómo se ven expresados diferentes genes asociados en la señalización apoptótica y relacionar los niveles de expresión con base a la presencia de los principales factores de virulencia de la bacteria *H. pylori*, vacA y cagA, también el enlazar los datos clínicos del paciente, como el diagnostico endoscópico e histopatológico, con nuestros resultados acerca de la presencia de *H. pylori* y sus factores de virulencia. A continuación, se muestran los resultados obtenidos:

7.1. Consulta de expedientes

Se trabajó con un total de 20 muestras de biopsias gástricas del servicio de Endoscopía, las cuales fueron tomadas de acuerdo al protocolo Sídney. Se realizó una consulta de los expedientes de los 20 pacientes de los cuales se obtuvo muestra con el fin de obtener información acerca de los motivos de estudio diagnóstico endoscópico, la identificación de *H. pylori* y diagnostico histopatológico. A continuación, se presentan los datos recopilados de las muestras:

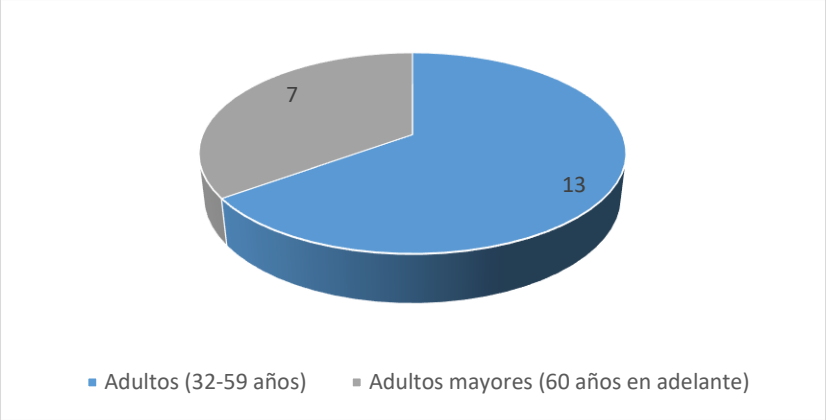
De las 20 muestras, 14 fueron de pacientes de sexo femenino y 6 del sexo masculino.



Gráfica 1. Proporción de muestras asociado al sexo del paciente.

En el 2015, Sánchez-Cuén y colaboradores realizaron un estudio en el estado de Culiacán, México y describe que en su población de 108 pacientes positivos a la infección con *H. pylori*, 80 eran mujeres (74.1 %) mientras que los 28 restantes hombres (25.9%) por lo que se puede observar que existe una mayor incidencia en personas del sexo femenino (Sánchez-Cuén, Canizalez-Román et al. 2015), caso similar sucede en nuestro estudio, donde a pesar de tener una *n* inferior (20 pacientes) se refleja el mismo patrón, encontrando el 70% de pacientes femeninas (14 pacientes) y el 30% restante (6 pacientes) del sexo masculino (Gráfica 1). Todos los pacientes fueron mayores de edad en su mayoría pacientes de la tercera edad (Gráfico 2).

Los pacientes presentaron edades desde los 32 hasta los 83 años. Se agruparon las edades en dos grupos; adultos (de 32-59 años) y adultos mayores (60 años en adelante).

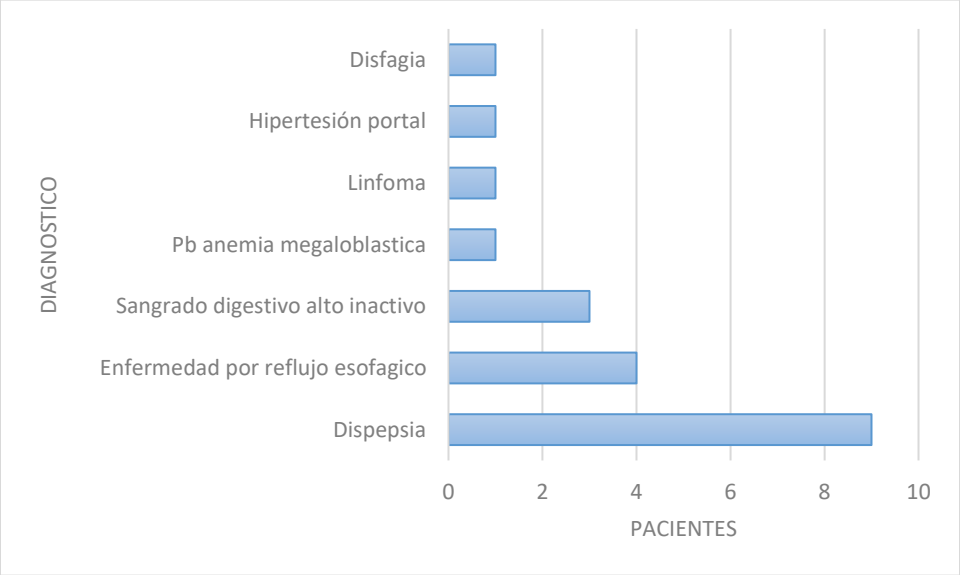


Gráfica 2. Agrupamiento de las edades de los pacientes.

En general, de los pacientes estudiados el 65% (13 pacientes) son adultos que tienen de 32 a 59 años, mientras que el 53% restante (7 pacientes) son adultos mayores de edad.

- Motivo de inicio de estudio endoscópico de las muestras

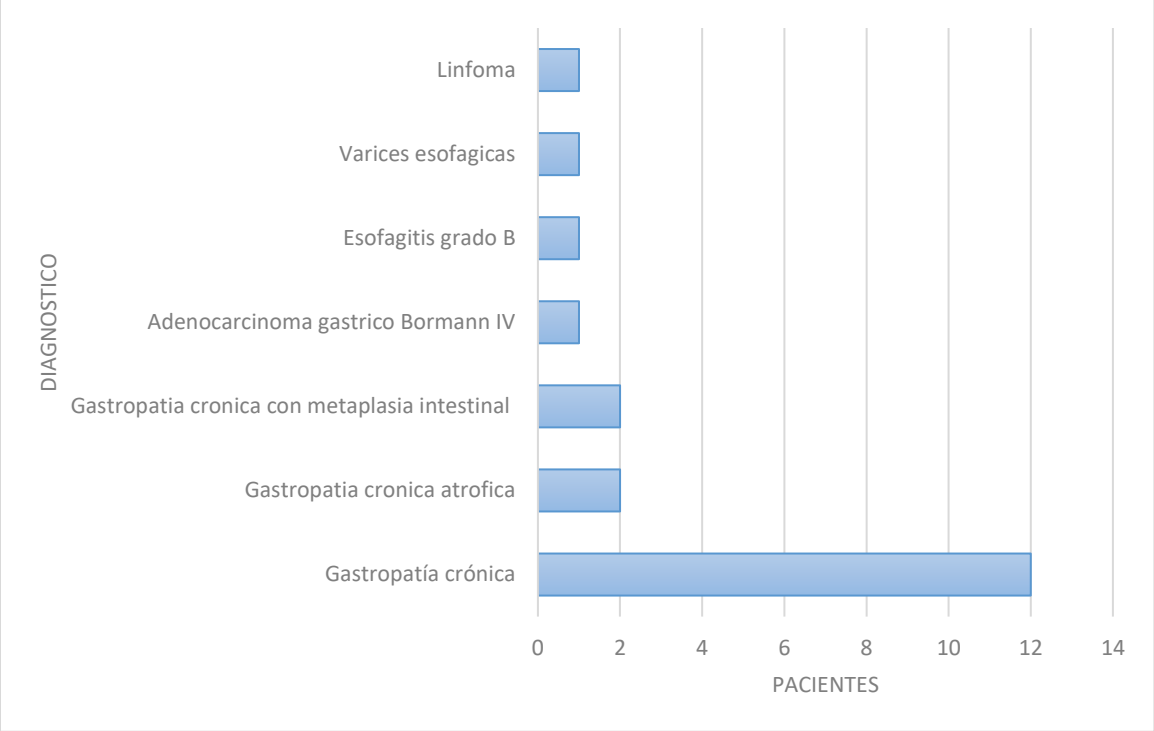
Los pacientes de los cuales se tomaron las biopsias se presentaron al servicio de endoscopía con diferentes motivos de estudio, del total de los pacientes, nueve acudieron por Dispepsia, cuatro por enfermedad por reflujo gastroesofágico, tres por sangrado digestivo alto inactivo, uno respectivamente por probable anemia megaloblástica, linfoma, hipertensión portal y varices grandes de baveno y disfagia. El autor Sánchez-Cuén y colaboradores en 2015 reportan que la dispepsia no investigada (52.8%) y la ulcera gástrica (24.1%) son los más recurrentes en su población, seguidos por el sangrado digestivo alto, anemia ferropénica y disfagia (Sánchez-Cuén, Canizalez-Román et al. 2015). En comparación a nuestro estudio (Gráfica 3) la dispepsia fue el motivo de estudio más común (45%), seguido de enfermedad por reflujo esofágico (20%) y sangrado gástrico alto (15%), por lo que se puede observar que los motivos de estudio en general son similares en ambos casos.



Gráfica 3. Motivo de estudio de las muestras de biopsia gástrica

- Diagnóstico endoscópico de las muestras de biopsia gástrica.

Una vez recolectadas las biopsias de acuerdo a lo indicado en el protocolo Sídney para la detección de *Helicobacter pylori,* se obtuvo el diagnostico endoscópico que a continuación se muestra:



Gráfica 4. Diagnósticos endoscópicos de las biopsias gástricas.

Los diagnósticos se agruparon y resultó que 12 pacientes manifestaron gastropatía crónica, 2 gastropatía crónica atrófica, 2 gastropatía crónica con metaplasia intestinal y los cuatro pacientes restantes con adenocarcinoma gástrico Bormann IV, esofagitis grado b de los ángeles con neoplasia en antro, varices esofágicas grandes de baveno y linfoma, respectivamente.

De este modo se observa que la gastritis es el padecimiento con mayor incidencia (80% en total, cabe mencionar que los diagnósticos son variados, dado que el diagnóstico fue proporcionado por diferentes médicos endoscopistas y en algunos casos reportaban solo gastritis crónica, diferenciándola si es atrófica o difusa, o bien en conjunto a metaplasia intestinal), seguido de adenocarcinoma gástrico, esofagitis grado B, varices esofágicas y linfoma.

- Diagnóstico histopatológico

Posterior a que las muestras fueron tomadas por el servicio de endoscopia, éstas se enviaron a Patología para darles seguimiento y determinar un diagnóstico más preciso, se pudo identificar el tipo de gastritis crónica; folicular y difusa, también su actividad; leve, moderada o intensa, si presentaba metaplasia intestinal o no y de presentarla si era completa o incompleta, así como el tipo de adenocarcinoma; de tipo intestinal o difuso, finalmente, si presentaba o no *Helicobacter pylori*; +, ++ o +++. Para fines prácticos se agrupó el diagnóstico patológico en tres grupos: 1) benigno; Gastritis crónica folicular y gastritis crónica difusa, 2) intermedio; Metaplasia completa y metaplasia incompleta y 3) maligno; Adenocarcinoma de tipo intestinal y adenocarcinoma de tipo difuso. De modo que los grupos quedaron de la siguiente manera:

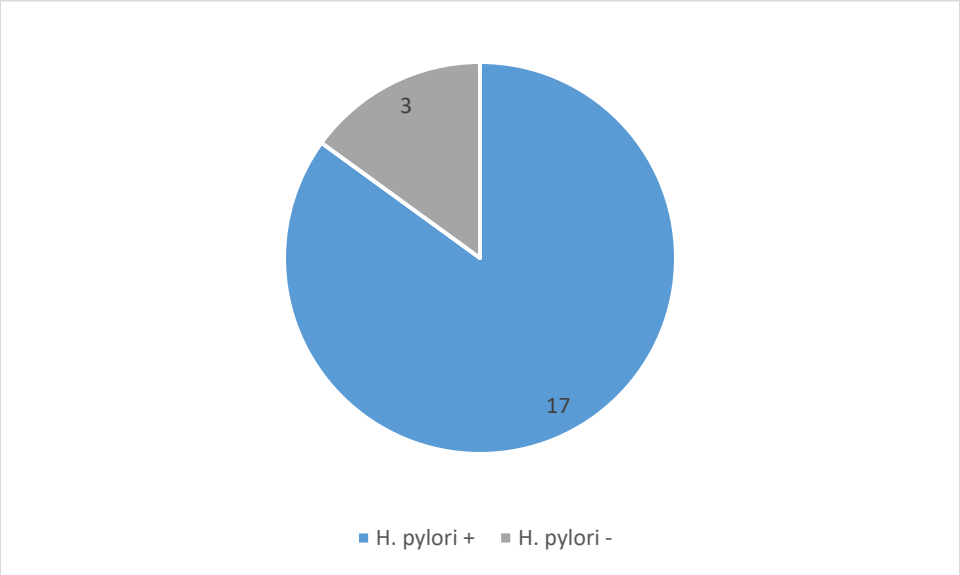
Tabla 15. Clasificación de los diagnósticos histopatológicos de acuerdo a su nivel de gravedad.

Grupo	Padecimiento	Pacientes	Pacientes totales
Benigno	GCF	9	10
	GCD	1	
Intermedio	MII	4	8
	MIC	4	
Maligno	AGI	1	2
	AGD	1	

Las proporciones entre estos tres grupos quedaron de la siguiente forma: El grupo de padecimientos benignos abarco el 50% de las muestras totales; GCF 45% y GCD 5%, el grupo de padecimientos intermedios abarco el 40% de las muestras totales; MII 20% y MIC 20% y el grupo de padecimientos malignos solo abarco el 10% de total de muestras; AGI 10% y AGD 10%. En comparación al estudio de Sánchez-Cuén y colaboradores, ellos obtienen que el 66.7% de sus muestras presentan

gastritis crónica, siendo éste el padecimiento con mayor incidencia, tal y como se obtuvo en nuestro estudio, seguido de manera decreciente de padecimientos como inflamación mínima de la mucosa gástrica con 21.3%, posteriormente gastritis crónica/metaplasia, después gastritis atrófica y al final gastritis crónica/ metaplasia/ displasia (Sánchez-Cuén, Canizalez-Román et al. 2015). Por lo que se puede decir que aunque se aplican distintas clasificaciones o agrupación de los resultados, los diagnósticos obtenidos se ven similares en incidencia.

Posteriormente se pudo clasificar los resultados con base a la presencia de *Helicobacter pylori* en las muestras.



Gráfica 5. Presencia de *H. pylori* en las muestras de biopsia gástrica.

Respecto a estos datos de detección de H. pylori, se realizó mediante la técnica de PCR en punto final y se verificó mediante una corrida de electroforesis la presencia de la banda correspondiente al amplicón del gen *glmM*. Los resultados obtenidos fueron que del total de las muestras, 17 presentaron a la bacteria, o sea el 85%. Cabe mencionar que se encontró el mismo número de muestra detectados por servicio de Patología, como por la técnica de PCR.

7.2. Validación de oligonucleótidos para la detección de los genes codificantes a los principales factores de virulencia de *H. pylori* y los involucrados en apoptosis

Se realizaron PCR piloto para verificar el funcionamiento adecuado de los cebadores, se extrajo el DNA y RNA de biopsias gástricas las cuales no fueron introducidas al estudio y meramente fueron empleadas con fines de validar cada gen a estudiar y adecuar las condiciones de PCR/qPCR, además de un control positivo; la cepa ATTC *Helicobacter pylori* 43504^{TM}, para la validación de los genes propios de la bacteria como glmM, vacA m1 y cagA. Para las validaciones de gapdh, bcl-2, bcl-xL, bax, caspasa 3, caspasa 8, caspasa 10 se empleó una línea celular de cáncer gástrico.

Las temperaturas de alineamiento ideal fueron las siguientes: *16S*: 60°C, *glmM*: 60°C, *vacA m1*: 60°C, *cagA*: 60°C, *gapdh*: 59.5°C, *bcl-2*: 60°C, *bcl-xL*: 59.5°C, *bax*: 59.5°C, *caspasa 3*: 59.5°C, *caspasa 8*: 59.5°C y *caspasa 10*: 59.5°C. A continuación, se describen a detalle.

16 S

Se validó el gen que codifica a la región 16 S, esto con la finalidad de investigar si la muestra contiene ácidos nucleicos pertenecientes a alguna bacteria, se realizó con las siguientes condiciones de PCR: Ciclo 1: 1 x [95°C, 5'], Ciclo 2: 35 x [95°C, 1' / 60°C, 1' / 72°C, 1'], Ciclo 3: 1 x [72°C, 5'] y Ciclo 4: [4°C, infinito]. Los oligonucleótidos diseñados para la detección del gen que codifica a la región 16 S son los siguientes: Primer Forward: GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC AC/ Primer reverse: CCC GGG AAC GTA TTC ACC G. El amplicón esperado corresponde a 608 pb y no se observan productos inespecíficos.

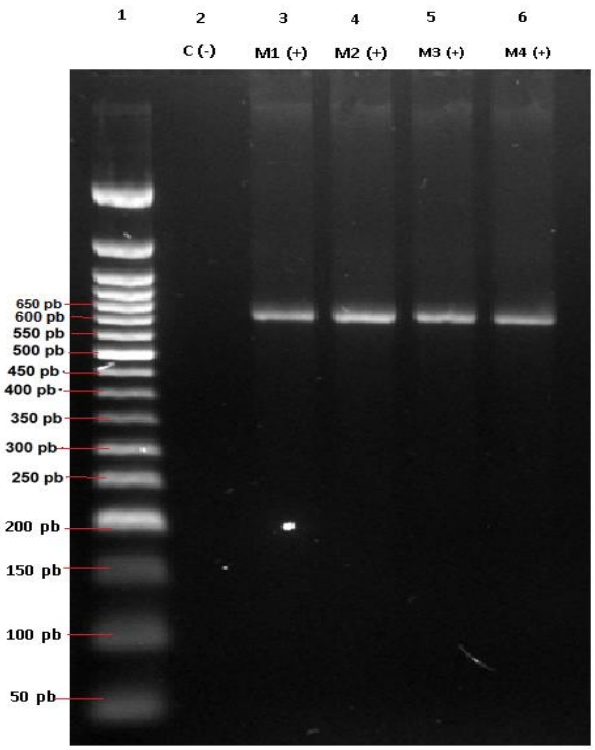


Figura 20. Electroforesis para detectar el gen *16 S*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% aplicando 100 volts por 1 hora para revelar los amplicones correspondientes al gen 16 S (608 pb). Identidad de los carriles numerados: Carril 1: Marcador de peso molecular (50 pb DNA Ladder marca New England BioLabs®Inc), carril 2: Control negativo que contiene Taq 2X Master Mix marca New England BioLabs®Inc, Oligonucleótidos sintetizados y H_2O grado biología molecular marca Lonza, carril 3: muestra 1 positiva, carril 4: muestra 2 positiva, carril 5: muestra 3 positiva y carril 6: muestra 4 positiva (Las muestras positivas contienen los mismos reactivos que el control negativo, adicionalmente 5 uL de DNA muestra).

gImM

Una vez que se sabe si las muestras tienen presencia de alguna bacteria, se continua con el gen gImM, el cual es constitutivo de *H. pylori*, de este modo se confirma la infección o se asocia a alguna otra bacteria. Se realizó con las siguientes condiciones de PCR: Ciclo 1: 1 x [95°C, 5'], Ciclo 2: 35 x [95°C, 1' / 60°C, 1' / 72°C, 1'], Ciclo 3: 1 x [72°C, 5'] y Ciclo 4: [4°C, infinito]. Los oligonucleótidos diseñados para la detección del gen que codifica a gImM son los siguientes: Primer Forward: TCT AAA AAC GCC CTT TCT TCT CA/ Primer reverse: ATT CGC TCA CAA ACT TAT CCC C. El amplicón esperado corresponde a 130 pb y no se observan productos inespecíficos.

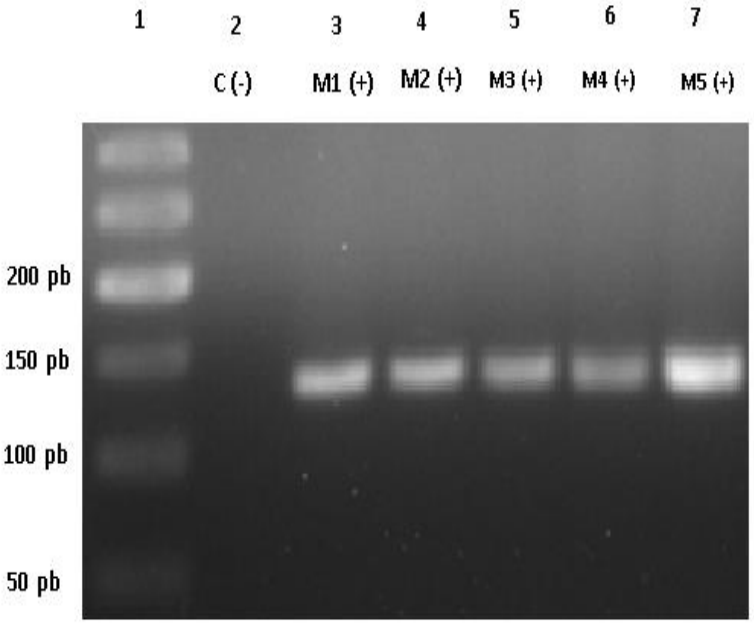


Figura 21. Electroforesis para detectar el gen *gImM*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% aplicando 100 volts por 1 hora para revelar los amplicones correspondientes al gen gMIM (130 pb). Identidad de los carriles numerados: Carril 1: Marcador de peso molecular (50 pb DNA Ladder marca New England BioLabs®Inc), carril 2: Control negativo que contiene Taq 2X Master Mix marca New England BioLabs®Inc, Oligonucleótidos sintetizados y H_2O grado biología molecular marca Lonza, carril 3: muestra 1 positiva, carril 4: muestra 2 positiva, carril 5: muestra 3 positiva, carril 6: muestra 4 positiva y carril 7: muestra 5 positiva (Las muestras positivas contienen los mismos reactivos que el control negativo, adicionalmente 5 uL de DNA muestra).

vacA m1

Posteriormente se realizó la detección de la variante VacA m1 con las siguientes condiciones de PCR: Ciclo 1: 1 x [95°C, 5'], Ciclo 2: 35 x [95°C, 1' / 60°C, 40'' / 72°C, 1'], Ciclo 3: 1 x [72°C, 10'] y Ciclo 4: [4°C, infinito]. Los oligonucleótidos diseñados para la detección del gen que codifica a VacA m1 son los siguientes: Primer Forward: GCG CTG TTA ATC TTG ATG AG / Primer reverse: AGG GGG ATT TTA TCA AC. El amplicón esperado corresponde a 162 pb y no se observan productos inespecíficos.

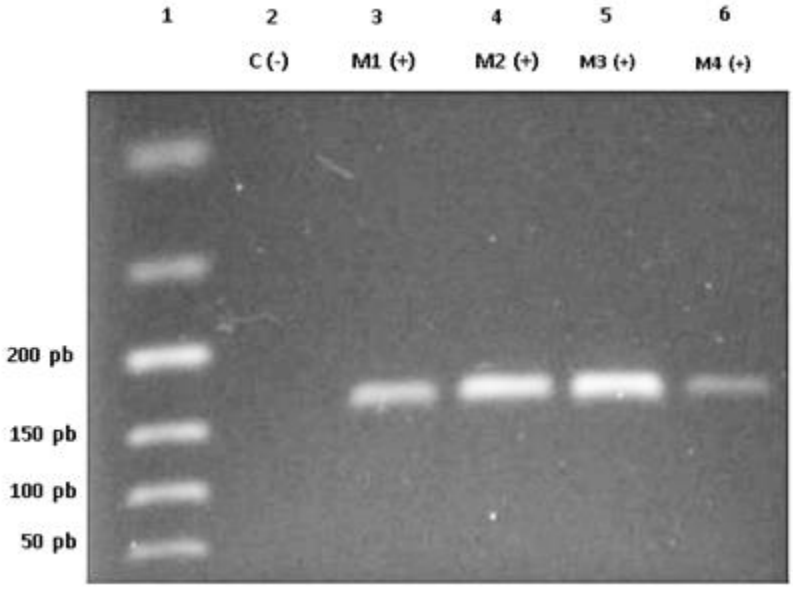


Figura 22. Electroforesis para detectar el gen *vacA m1*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% aplicando 100 volts por 1 hora para revelar los amplicones correspondientes al gen VacA m1 (162 pb). Identidad de los carriles numerados: Carril 1: Marcador de peso molecular (50 pb DNA Ladder marca New England BioLabs®Inc), carril 2: Control negativo que contiene Taq 2X Master Mix marca New England BioLabs®Inc, Oligonucleótidos sintetizados y H_2O grado biología molecular marca Lonza, carril 3: muestra 1 positiva, carril 4: muestra 2 positiva, carril 5: muestra 3 positiva y carril 6: muestra 4 positiva (Las muestras positivas contienen los mismos reactivos que el control negativo, adicionalmente 5 uL de DNA muestra).

cagA

Después se validó la PCR para detectar el principal factor de virulencia, CagA, con las siguientes condiciones de PCR: Ciclo 1: 1 x [95°C, 5'], Ciclo 2: 35 x [95°C, 1' / 60°C, 50'' / 72°C, 1'], Ciclo 3: 1 x [72°C, 10'] y Ciclo 4: [4°C, infinito]. Los oligonucleótidos diseñados para la detección del gen que codifica a CagA son los siguientes: Primer Forward: TAA GGA AGC AAG AGC GGT CG / Primer reverse: CAA CCC GTT ACC GAC TAG GG. El amplicón esperado corresponde a 529 pb y no se observan productos inespecíficos.

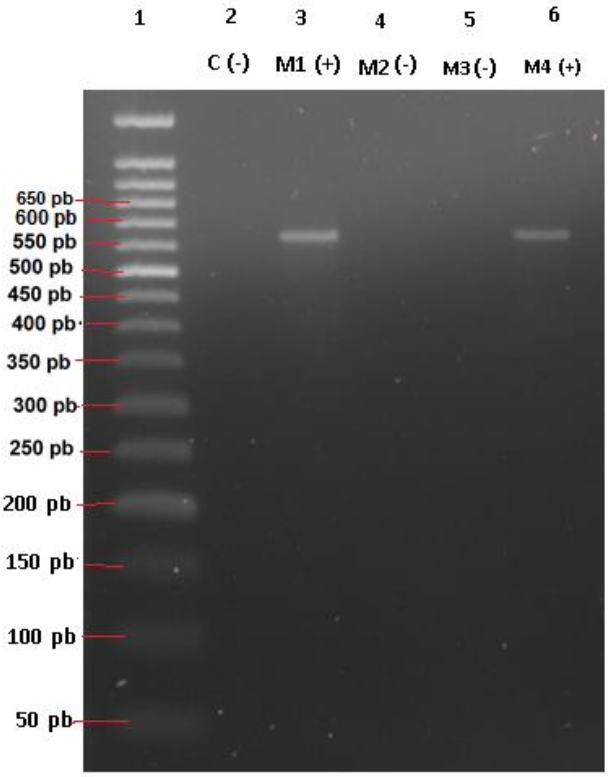


Figura 23. Electroforesis para detectar el gen *cagA*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% aplicando 100 volts por 1 hora para revelar los amplicones correspondientes al gen CagA (529 pb). Identidad de los carriles numerados: Carril 1: Marcador de peso molecular (50 pb DNA Ladder marca New England BioLabs®Inc), carril 2: Control negativo que contiene Taq 2X Master Mix marca New England BioLabs®Inc, Oligonucleótidos sintetizados y H_2O grado biología molecular marca Lonza, carril 3: muestra 1 positiva, carril 4: muestra 2 negativa, carril 5: muestra 3 negativa y carril 6: muestra 4 positiva (Las muestras positivas y negativas contienen los mismos reactivos que el control negativo, adicionalmente 5 uL de DNA muestra).

gapdh

Posteriormente se validó *gapdh*, el cual se empleó como control interno o gen constitutivo para corroborar que los ácidos nucleicos extraídos y purificados fueron funcionales y las PCR se hicieran de manera viable. La PCR se llevó a cabo con las siguientes condiciones: Ciclo 1: 1 x [95°C, 5'], Ciclo 2: 30 x [95°C, 1' / 59.5°C, 1' / 72°C, 1'], Ciclo 3: 1 x [72°C, 10'] y Ciclo 4: [4°C, infinito]. Los oligonucleótidos diseñados para la detección del gen que codifica a G3PDH son los siguientes: Primer Forward: CCG TCC ACA GAC AAT TCG AA / Primer reverse: TTG AGC TGG ATC TCT TTC AGC TT. El amplicón esperado corresponde a 160 pb y no se observan productos inespecíficos.

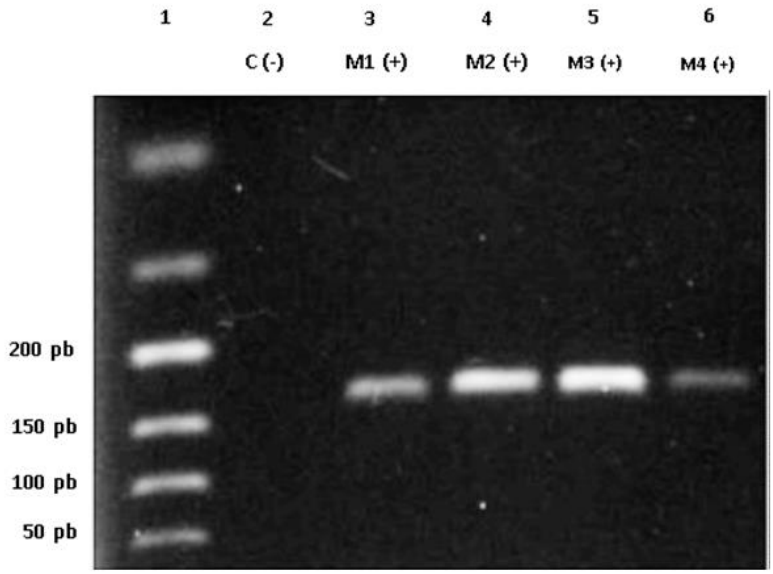


Figura 24. Electroforesis para detectar el gen *gapdh*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% aplicando 100 volts por 1 hora para revelar los amplicones correspondientes al gen g3pdh (160 pb). Identidad de los carriles numerados: Carril 1: Marcador de peso molecular (50 pb DNA Ladder marca New England BioLabs®Inc), carril 2: Control negativo que contiene Taq 2X Master Mix marca New England BioLabs®Inc, Oligonucleótidos sintetizados y H_2O grado biología molecular marca Lonza, carril 3: muestra 1 positiva, carril 4: muestra 2 positiva, carril 5: muestra 3 positiva y carril 6: muestra 4 positiva (Las muestras positivas contienen los mismos reactivos que el control negativo, adicionalmente 5 uL de DNA muestra).

A continuación, se realizaron las validaciones correspondientes a los genes estudiados para ver la respuesta a nivel de apoptosis, se realizaron mediante RT-PCR, partiendo de un RNA extraído y purificado de las muestras de biopsias gástricas.

bcl-2

La primera validación fue para el gen Bcl-2 con las siguientes condiciones de PCR: Ciclo 1: 1 x [95°C, 30''], Ciclo 2: 30 x [95°C, 30'' / 60°C, 30'' / 72°C, 30''], Ciclo 3: 1 x [72°C, 5'] y Ciclo 4: [4°C, infinito]. Los oligonucleótidos diseñados para la detección del gen que codifica a Bcl-2 son los siguientes: Primer Forward: GGT CGC ATT GTG GCC TTT / Primer reverse: TCC TTG TCT ACG CTT TCC ACG. El amplicón esperado corresponde a 62 pb y no se observan productos inespecíficos.

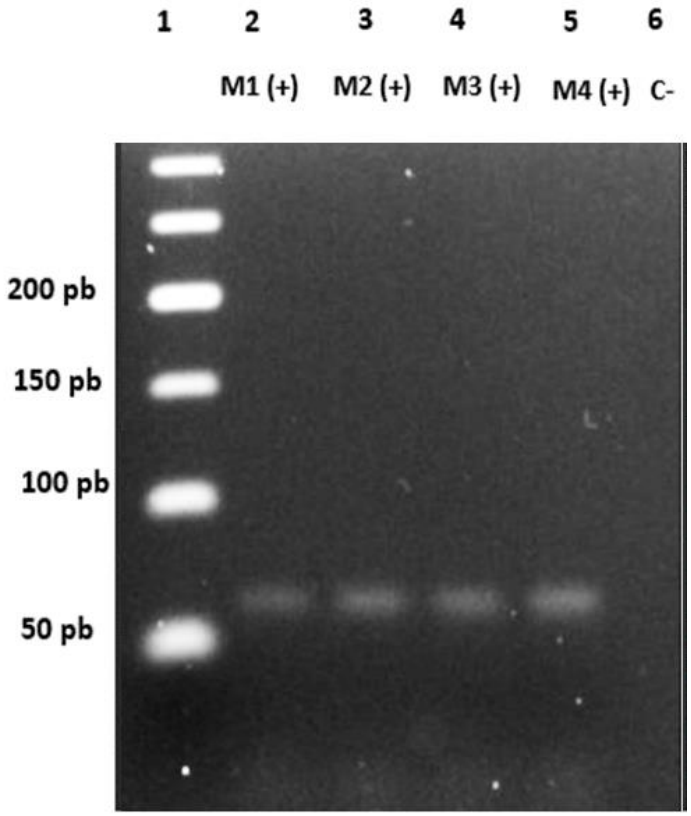


Figura 25. Electroforesis para detectar el gen *bcl-2.* Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% aplicando 100 volts por 1 hora para revelar los amplicones correspondientes a Bcl-2 (62 pb). Identidad de los carriles numerados: Carril 1: Marcador de peso molecular (50 pb DNA Ladder marca New England BioLabs®Inc), carril 2: muestra 1 positiva, carril 3: muestra 2 positiva, carril 4: muestra 3 positiva, carril 5: muestra 4 positiva (Las muestras positivas contienen los mismos reactivos que el control negativo, adicionalmente 5 uL de DNA muestra), carril 6: control negativo que contiene Taq 2X Master Mix marca New England BioLabs®Inc, Oligonucleótidos sintetizados y H_2O grado biología molecular marca Lonza.

bcl-xL

Seguido, se realizó la validación para detectar el gen Bcl-xL con las siguientes condiciones de PCR: Ciclo 1: 1 x [95°C, 5'], Ciclo 2: 30 x [95°C, 1' / 59.5°C, 1' / 72°C, 1'], Ciclo 3: 1 x [72°C, 10'] y Ciclo 4: [4°C, infinito]. Los oligonucleótidos diseñados para la detección del gen que codifica a Bcl-xL son los siguientes: Primer Forward: CCA GGG ACA GCA TAT CAG AG / Primer reverse: ATC CGA CTC ACC AAT ACC TG. El amplicón esperado corresponde a 152 pb y no se observan productos inespecíficos.

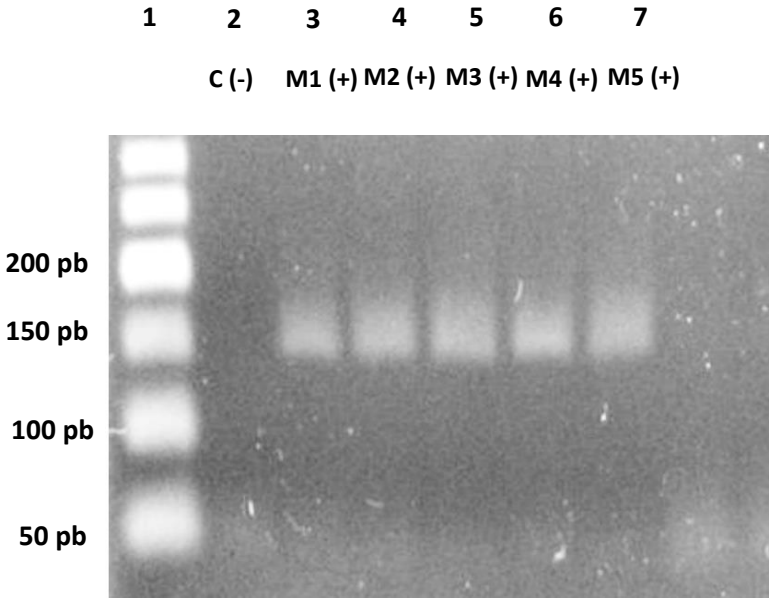


Figura 26. Electroforesis para detectar el gen *bcl-xL.* Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% aplicando 100 volts por 1 hora para revelar los amplicones correspondientes a Bcl-xL (152 pb). Identidad de los carriles numerados: Carril 1: Marcador de peso molecular (50 pb DNA Ladder marca New England BioLabs®Inc), carril 2: Control negativo que contiene Taq 2X Master Mix marca New England BioLabs®Inc, Oligonucleótidos sintetizados y H_2O grado biología molecular marca Lonza, carril 3: muestra 1 positiva, carril 4: muestra 2 positiva, carril 5: muestra 3 positiva, carril 6: muestra 4 positiva y carril 7: muestra 5 positiva (Las muestras positivas contienen los mismos reactivos que el control negativo, adicionalmente 5 uL de DNA muestra).

bax

Después se validó la PCR para detección del gen que codifica a Bax con las siguientes condiciones: Ciclo 1: 1 x [95°C, 5'], Ciclo 2: 30 x [95°C, 1' / 59.5°C, 1' / 72°C, 1'], Ciclo 3: 1 x [72°C, 10'] y Ciclo 4: [4°C, infinito]. Los oligonucleótidos diseñados para la detección del gen que codifica a Bax son los siguientes: Primer Forward: CAA GAA GCT GAG CGA GTG TC / Primer reverse: GTT GAA GTT GCC GTC AGA AA. El amplicón esperado corresponde a 511 pb y no se observan productos inespecíficos.

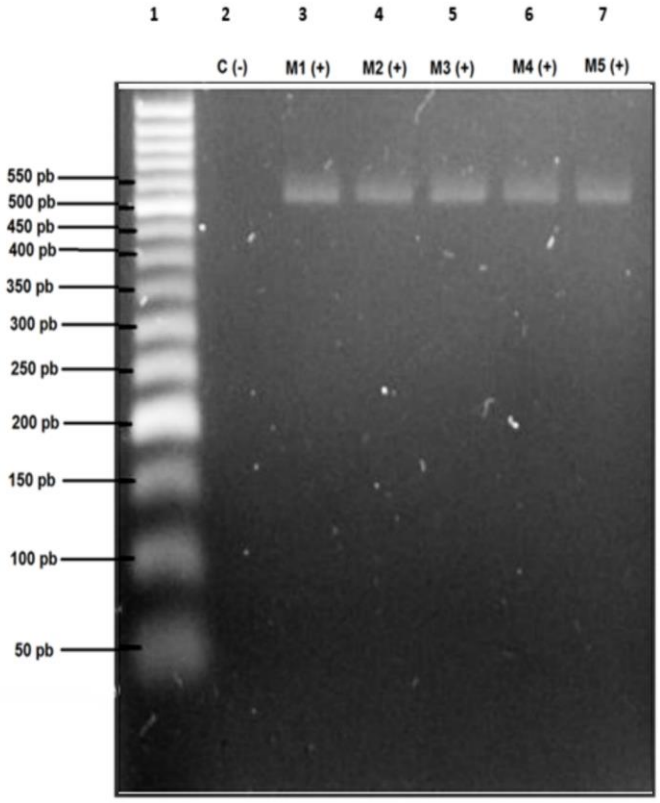


Figura 27. Electroforesis para detectar el gen *bax.* Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% aplicando 100 volts por 1 hora para revelar los amplicones correspondientes a Bax (511 pb). Identidad de los carriles numerados: Carril 1: Marcador de peso molecular (50 pb DNA Ladder marca New England BioLabs®Inc), carril 2: Control negativo que contiene Taq 2X Master Mix marca New England BioLabs®Inc, Oligonucleótidos sintetizados y H_2O grado biología molecular marca Lonza, carril 3: muestra 1 positiva, carril 4: muestra 2 positiva, carril 5: muestra 3 positiva, carril 6: muestra 4 positiva y carril 7: muestra 5 positiva (Las muestras positivas contienen los mismos reactivos que el control negativo, adicionalmente 5 uL de DNA muestra).

caspasa 3

La validación para detectar Caspasa 3 se realizó con las siguientes condiciones de PCR: Ciclo 1: 1 x [95°C, 5'], Ciclo 2: 30 x [95°C, 1' / 59.5°C, 1' / 72°C, 1'], Ciclo 3: 1 x [72°C, 10'] y Ciclo 4: [4°C, infinito]. Los oligonucleótidos diseñados para la detección del gen que codifica a Caspasa 3 son los siguientes: Primer Forward: CTG GTT TTC GGT GGG TGT / Primer reverse: CCA GGG ATA TTC CAG AGT CC.). El amplicón esperado corresponde a 163 pb y no se observan productos inespecíficos.

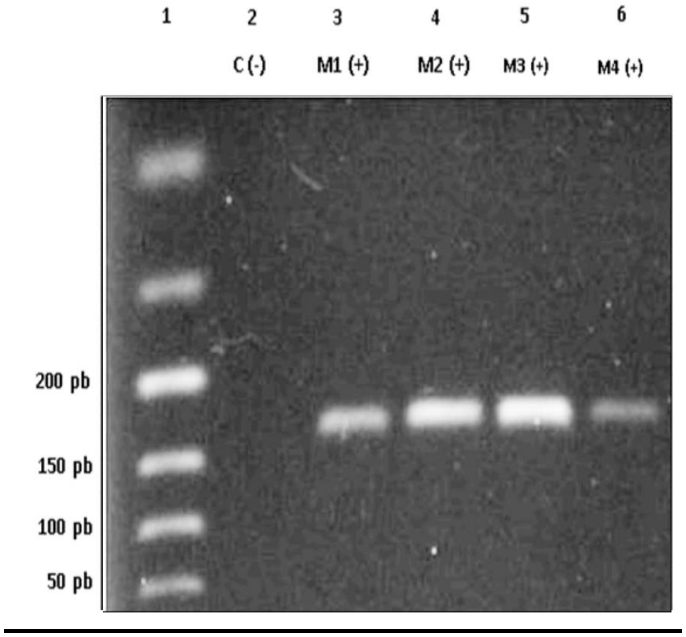


Figura 28. Electroforesis para detectar el gen *caspasa 3.* Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% aplicando 100 volts por 1 hora para revelar los amplicones correspondientes a Caspasa 3 (163 pb). Identidad de los carriles numerados: Carril 1: Marcador de peso molecular (50 pb DNA Ladder marca New England BioLabs®Inc), carril 2: Control negativo que contiene Taq 2X Master Mix marca New England BioLabs®Inc, Oligonucleótidos sintetizados y H_2O grado biología molecular marca Lonza, carril 3: muestra 1 positiva, carril 4: muestra 2 positiva, carril 5: muestra 3 positiva y carril 6: muestra 4 (Las muestras positivas contienen los mismos reactivos que el control negativo, adicionalmente 5 uL de DNA muestra).

caspasa 8

La detección de Caspasa 8 se validó utilizando las siguientes condiciones de PCR: Ciclo 1: 1 x [95°C, 5'], Ciclo 2: 30 x [95°C, 1' / 59.5°C, 1' / 72°C, 1'], Ciclo 3: 1 x [72°C, 10'] y Ciclo 4: [4°C, infinito]. Los oligonucleótidos diseñados para la detección del gen que codifica a Caspasa 8 son los siguientes: Primer Forward: GAG TCT GTG CCC AAA TCA AC / Primer reverse: TCT TGG AGA GTC CGA GAT TG. El amplicón esperado corresponde a 155 pb y no se observan productos inespecíficos.

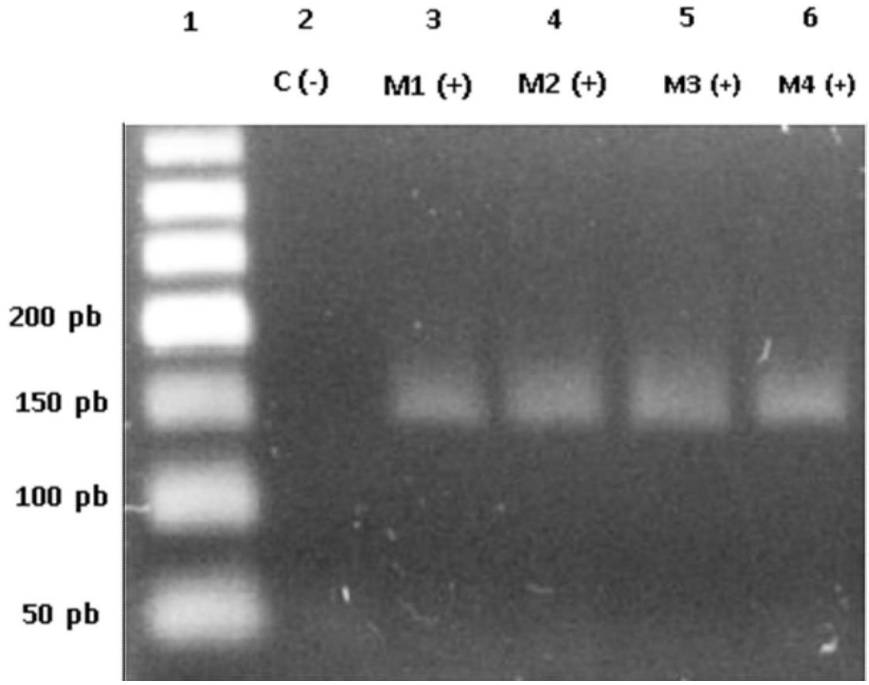


Figura 29. Electroforesis para detectar el gen *caspasa 8.*

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% aplicando 100 volts por 1 hora para revelar los amplicones correspondientes a Caspasa 8 (155 pb). Identidad de los carriles numerados: Carril 1: Marcador de peso molecular (50 pb DNA Ladder marca New England BioLabs®Inc), carril 2: Control negativo que contiene Taq 2X Master Mix marca New England BioLabs®Inc, Oligonucleótidos sintetizados y H_2O grado biología molecular marca Lonza, carril 3: muestra 1 positiva, carril 4: muestra 2 positiva, carril 5: muestra 3 positiva y carril 6: muestra 4 (Las muestras positivas contienen los mismos reactivos que el control negativo, adicionalmente 5 uL de DNA muestra).

caspasa 10

Finalmente se validó la detección del gen para Caspasa 10 con las siguientes condiciones de PCR: Ciclo 1: 1 x [95°C, 5'], Ciclo 2: 30 x [95°C, 1' / 59.5°C, 1' / 72°C, 1'], Ciclo 3: 1 x [72°C, 10'] y Ciclo 4: [4°C, infinito]. Los oligonucleótidos diseñados para la detección del gen que codifica a Caspasa 10 son los siguientes: Primer Forward: CCC TAA GTT TCC TGG CAT TT/ Primer reverse: CAG GAG GTG TCA CTA TCT GGA. El amplicón esperado corresponde a 156 pb y no se observan productos inespecíficos.

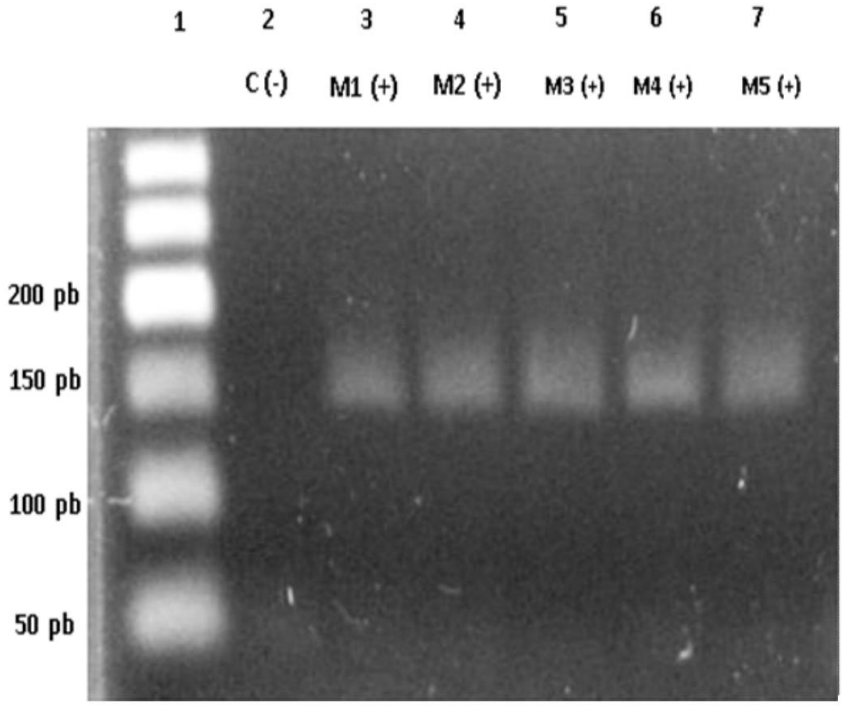


Figura 30. Electroforesis para detectar el gen *caspasa 10.* Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% aplicando 100 volts por 1 hora para revelar los amplicones correspondientes a Caspasa 10 (156 pb). Identidad de los carriles numerados: Carril 1: Marcador de peso molecular (50 pb DNA Ladder marca New England BioLabs®Inc), carril 2: Control negativo que contiene Taq 2X Master Mix marca New England BioLabs®Inc, Oligonucleótidos sintetizados y H_2O grado biología molecular marca Lonza, carril 3: muestra 1 positiva, carril 4: muestra 2 positiva, carril 5: muestra 3 positiva, carril 6: muestra 4 y carril 7: muestra 5 positiva (Las muestras positivas contienen los mismos reactivos que el control negativo, adicionalmente 5 uL de DNA muestra).

Para la validación de los genes estudiados mediante qPCR, se realizaron experimentos piloto. Se realizo qPCR para el gen g3pdh y b-actina (gen endógeno), bcl-2 y caspasa 10, y de este modo corroborar que los ácidos nucleicos de todas las muestras fueran funcionales para el estudio. Para esto se nos proporcionó 5 muestra adicionales al estudio de pacientes los cuales no se les tomó sus datos y unicamente se tomó muestra con fines de validar los oligonucleotidos, a éstos se les realizó el procedimiento ya establecido de extracción de ácidos nucleicos, el RNA fue sometido a RT-qPCR, la prueba se realizó por triplicado y una vez que se logro realizar y obtener su Tm ideal, se llevo a cabo con las muestras incluidas en el estudio para corroborar que hubiera curvas de amplificación y se pudiera replicar las veces necesarias. A continuación, se muestran ejemplos de las curvas de amplificación obtenidas en la validación de los oligonucleotidos.

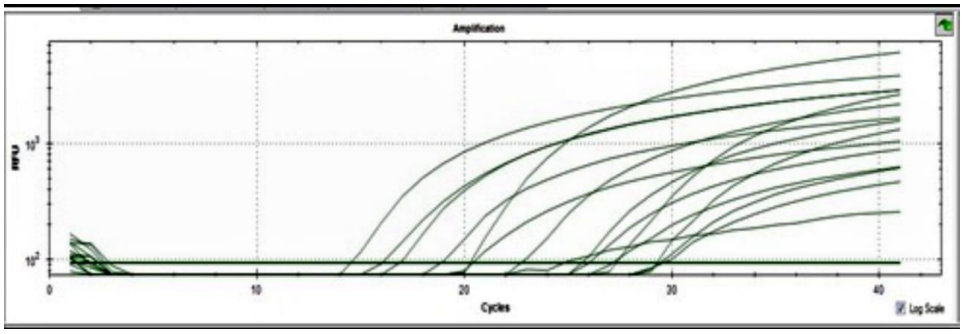


Figura 31. Curvas de amplificación correspondiente al gen *b-actina.* Se extrajo el RNA de 5 muestras adicionales al estudio, todas provenientes de biopsia gástrica, proporcionadas con fines de realizar la validación de los oligonucleótidos, cada muestra de RNA fue sometida al estudio de qPCR por triplicado, en la cual se observa la curva de amplificación para cada una de ellas. Posteriormente y una vez ya validada la técnica, se realizó la qPCR para las muestras en estudio. El gen *b-actina* es clave para poder identificar si los ácidos nucleicos presentes en la muestra se encuentran en condiciones óptimas de integridad para posteriormente realizar los demás estudios. En esta imagen se puede apreciar que el valor de Ct es muy variable entre las muestras, sin embargo, todas muestran presentar expresado el gen.

.

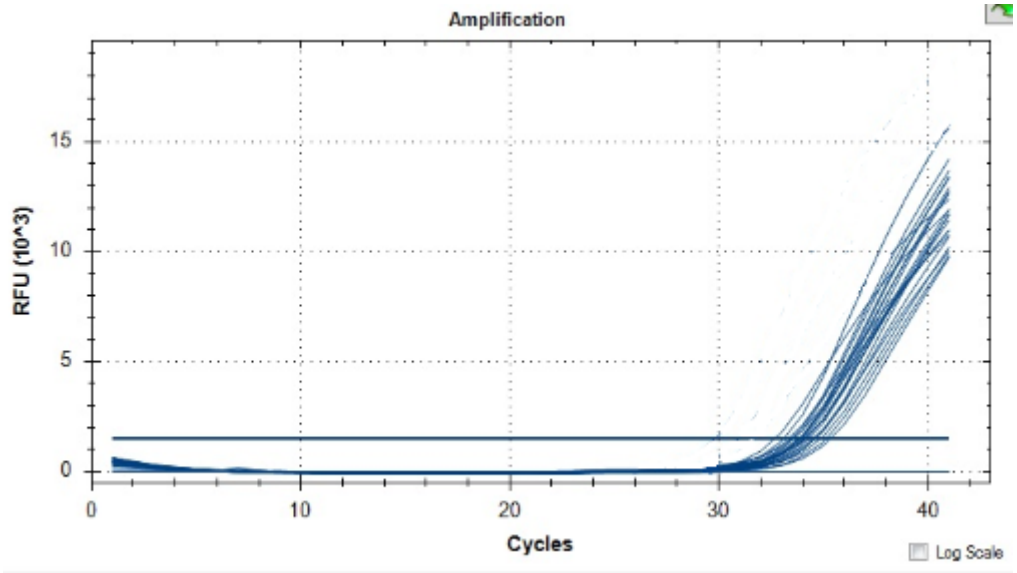


Figura 32. Curva de amplificación correspondiente al gen *gapdh.* En la imagen se muestran las curvas de amplificación de las muestras proporcionadas fuera del estudio para la validación, posterior al haber realizado la RT-qPCR para el gen gapdh, el comportamiento de las muestras en estudio fue muy similar entre ellas, cada muestra de RNA fue sometida al estudio de qPCR por triplicado. El gen *gapdh* es utilizado comúnmente como gen endógeno o control interno, de esta forma garantizar la integridad de los ácidos nucleicos para posteriormente realizar los demás estudios. En esta imagen se puede apreciar que todas las muestras expresan el gen *gapdh* y además el valor de Ct es muy similar entre las muestras.

Posterior a la validación de los genes endógenos se realizaron las qPCR de prueba para detectar los genes de interés para el estudio; *bcl-2 y caspasa 10.* Del mismo modo se trabajó con las 5 muestras destinadas para el proceso de validación y los resultados fueron los siguientes:

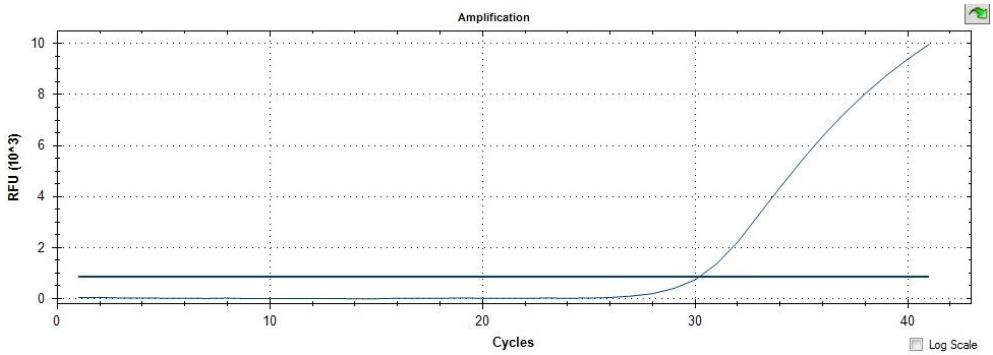


Figura 33. **Curva de amplificación correspondiente al gen *bcl-2.*** En la imagen se puede apreciar una sola curva de amplificación de una de las muestras con las cuales se llevó a cabo la validación de la RT-qPCR para el gen *bcl-2*, esto debido a que no todas las muestras mostraron amplificación, además, es posible que para el instante en que se realizó, el RNA ya estuviera degradado y eso influyera en el resultado. Se empieza a ver la amplificación de la muestra antes del ciclo 30.

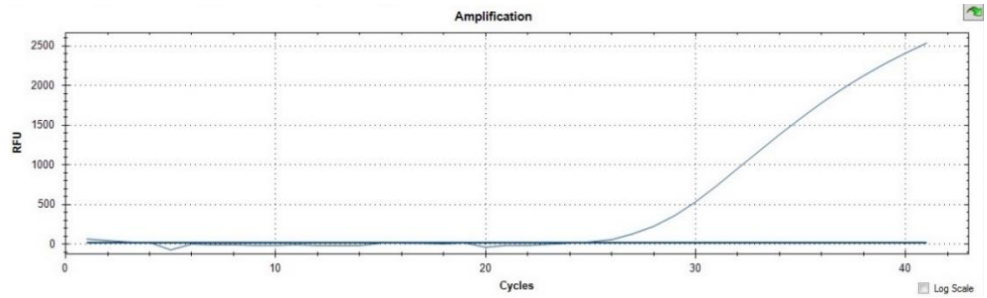


Figura 34. Curva de amplificación correspondiente al gen *caspasa 10.* En la imagen se puede observar la curva correspondiente a la amplificación para el gen caspasa 10, de una sola muestra, debido a que por la posible degradación del RNA, no amplificaron todas las muestras empleadas para la validación de los oligonucleótidos. Se puede apreciar que amplifica la muestra desde el ciclo 25 aproximadamente.

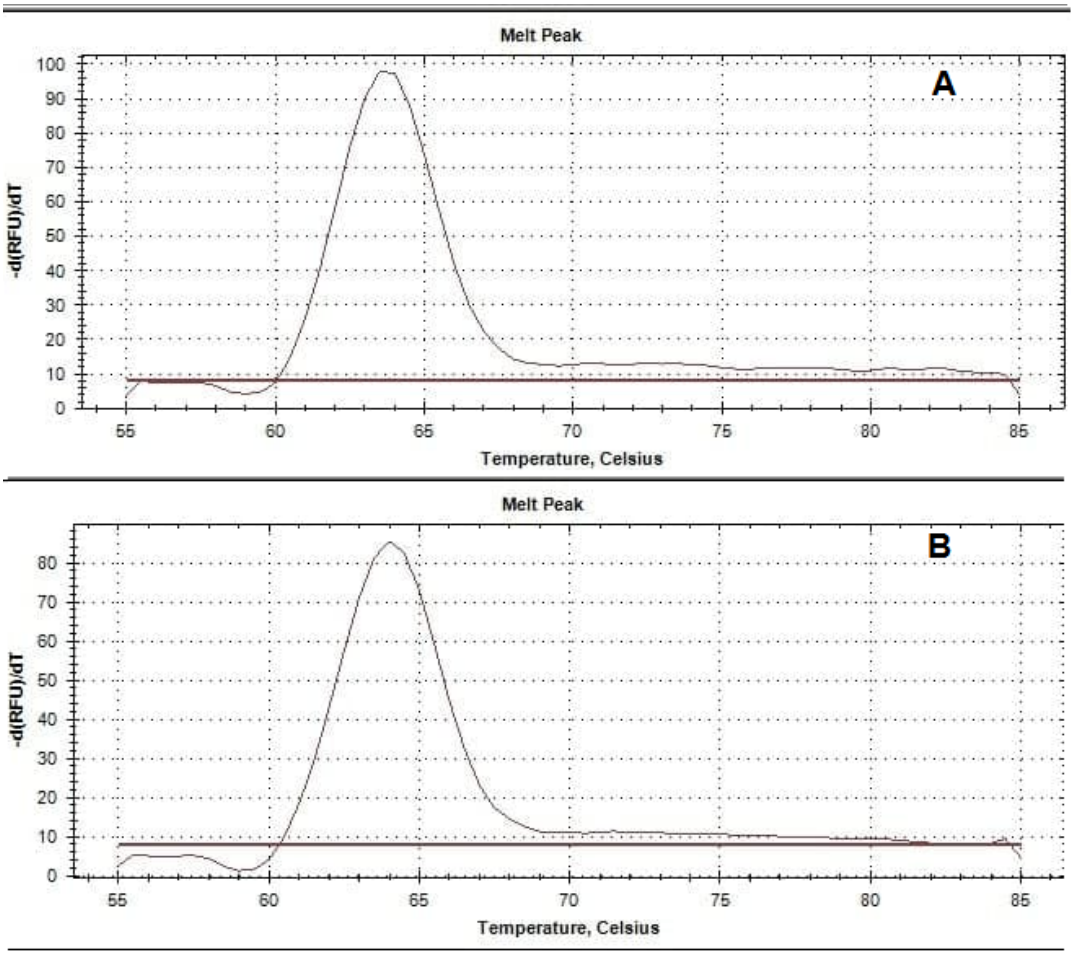


Figura 35. Curvas de disociación de los genes A) *bcl-2* y B) *caspasa 10* a 63.2°C. Para comprobar que las RT-qPCR realizadas para los genes bcl-2 y caspasa 10 son válidas y que no solo demuestran que el RNA está integro si no que solo presentan un único producto de amplificación se obtuvieron las curvas de disociación para cada uno de los genes, A) bcl-2 y B) caspasa 10, ambas coinciden en tener su temperatura máxima de 63.2° C.

7.3. PCR de punto final para detección de los genes *16S, gImM, vacA m1 y cagA* en muestras de biopsias gástricas a partir de DNA.

Una vez validadas las PCR, se dio paso a la detección de los genes ya en las muestras biológicas, es decir, en los ácidos nucleicos extraídos y purificados de las biopsias gástricas. Se llevó a cabo un algoritmo de trabajo, en el cual se realizó un primer filtro, que constó en la detección de la región 16 S, en caso de ser detectado, se detectó el gen gImM para asegurar si esa bacteria presente podía ser *H. pylori*, una vez que se comprobó, se realizaron las PCR para detectar sus factores de virulencia. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 16. Resultados obtenidos para la detección mediante PCR de punto final para la detección de los genes *16 S, gImM, vacA m1 y cagA y* combinaciones posibles de los factores de virulencia.

Gen	**Detectado**	**No detectado**
16 S	17	3
gImM	17	3
VacA m1	6	14
CagA	1	19

Combinación cagA/vacA m1	**Pacientes**
-/-	14
-/+	5
+/+	1

El rARN 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos codificado por el gen *rrs*, también denominado DNA ribosomal 16S (Valenzuela-González, Casillas-Hernández et al. 2015), característico de bacterias, por lo que se utilizó con la finalidad de identificar la presencia o no de alguna bacteria en la biopsia y de este modo descartar falsos negativos, de las 20 muestras trabajadas 17 fueron positivas al gen 16 S lo que implica que hay presencia de alguna bacteria.

El gen *ureC* codifica para una fosfoglucosamina mutasa; este gen no está relacionado con la producción de ureasa, por lo que pasó a llamarse *glmM*. Este gen se considera un gen de "mantenimiento" y participa directamente en la síntesis de la pared celular (Espinoza, Vazquez et al. 2011). Se realizó la PCR para el gen constitutivo *glmM,* de este modo, corroborar que la bacteria presente es *H. pylori,* de las 17 biopsias positivas al gen 16S, todas resultaron presentar el gen glmM.

En el año 2012, en un estudio realizado en Chile, compararon el genotipo de virulencia (genes *cagA* y *vacA* m1) de *H. pylori,* incluyeron muestras de biopsias gástricas de 18 pacientes. Los genes de virulencia *cagA* y *vacA* m1 fueron estudiados con RT-PCR. Los resultados obtenidos fueron que se pudieron diferenciar 4 combinaciones diferentes entre las muestras de biopsias gástricas respecto a la detección de *cagA y vacA m1; cagA -/ vacA m1* – (9 pacientes), *cagA -/ vacA m1* + (5 pacientes), *cagA +/ vacA m1 – (*2 pacientes) y *cagA +/ vacA m1* + (2 pacientes). Estos resultados sugieren que existe una variedad de genotipos de virulencia en *H. pylori* en el estómago, predominando en los pacientes incluidos en su estudio las cepas con genotipos asociados a menor virulencia *(cagA-, vacA* m1). (Sepúlveda, Moreno et al. 2012). En nuestro estudio, con una población de 17 biopsias positivas a *H. pylori*, 6 fueron positivas al gen *vacA m1* y solo 1 al gen *cagA* (Tabla 16)*,* comparándolo con el anterior mencionado, se encontró tres posibles combinaciones entre cagA y vacA m1; cagA -/ vacA m1 – (14 pacientes), cagA -/ vacA m1 + (5 pacientes) y cagA +/ vacA m1 - (1 pacientes). No se encontró la combinación cagA +/ vacA m1 –, que no significa que no exista y más bien se puede deber al muestreo de las biopsias, dado que solo se estudió 20 muestras, se sugiere como prospectiva de este proyecto el estudiar más genes asociados a la virulencia

de la bacteria como dupA, o bien las demás variantes de vacA y aumentar el número de la población de estudio. De similar manera se puede observar que la cepa más común en la población es la menos virulenta cagA -/ vacA m1 –, seguido de la cepa cagA -/ vacA m1 + y cagA +/ vacA m1 +. Estudios previos revelan que las cepas menos virulentas suelen verse presentes en los pacientes asintomáticos, a diferencia de las cepas cagA +/ vacA m1 +, donde se ven síntomas y está asociado a presentar padecimientos gastroduodenales. (Sepúlveda, Moreno et al. 2012). La coexistencia de cepas con diferentes genotipos de vacA puede ser explicada de diferentes formas. Una de ellas radicaría en que los genotipos diferentes de vacA, podrían ofrecer ventajas no competitivas a las cepas. La segunda de ellas sería que diferentes genotipos, podrían conferir diferentes ventajas que permitirían que las cepas sobrevivieran en nichos ecológicos diferentes dentro de la mucosa gástrica y la posibilidad de recidivas de la infección, después del tratamiento. (Perrone, González-Valencia et al. 2009)

7.4. RT-PCR para detección de los genes *gapdh, bcl-2, bcl-xl, bax, caspasa 3, 8 y 10* a partir de RNA.

Seguido a la detección de *H. pylori* y sus factores de virulencia, mediante RT-PCR y a partir de RNA extraído de las muestras de biopsia gástrica, se detectaron los genes involucrados en la apoptosis, tanto proteínas que tienen función pro-apoptótica como Bax, o bien con función anti-apoptótica como son Bcl-2 y Bcl-xL. Además de caspasas iniciadoras del proceso de apoptosis como caspasa 8 y 10, y caspasas ejecutoras como caspasa 3. Cabe mencionar que primero se realizó la RT-PCR para detección de g3pdh y corroborar la funcionalidad de las muestras. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 17. Resultados obtenidos para la detección mediante RT-PCR para la detección de los genes *gapdh, bcl-2, bcl-xL, bax, caspasa 3, 8 y 10.*

Gen	Detectado	No detectado
gapdh	20	0
Bcl-2	16	4
Bcl-xL	16	4
Bax	16	4
Caspasa 3	0	20
Caspasa 8	0	20
Caspasa 10	0	20

El gen *gapdh* se empleó como control interno o de mantenimiento, para así poder asegurar que el RNA que se extrajo de las muestras era funcional para las PCR, se realizó una electroforesis para poder capturar la imagen de las bandas que corrieron en el gel, y se obtuvo que las 20 muestras sometidas al estudio amplificaron al gen. Un control interno como lo es *gapdh*, es un sistema para la detección de los falsos negativos ya que se basa en la detección paralela de un fragmento de algún gen diferente al del patógeno o al gen causante del padecimiento por estudiar, que

independientemente de la presencia o no del patógeno en la muestra, siempre debe detectarse en condiciones normales.

Los genes *bcl-2, bcl-xL y bax* fueron detectados en 16 de las 20 muestras totales (Tabla 17), cabe mencionar que en las 16 muestras identificadas se vio esta combinación, es decir que fueron *bcl-2* + / *bcl-xL* + / *bax* + y que en las 4 muestras restantes no se detectó ninguno de los tres genes. Es bien sabido que las proteínas de la familia *bcl-2* son reguladores centrales de la apoptosis y que los miembros de esta familia actúan como puntos de control a través de los cuales pasan las señales de supervivencia y muerte antes de determinar el destino de la célula (Chen, Cao et al. 2008). La infección por *H. pylori* conduce a diversas enfermedades gastroduodenales. Se ha demostrado que esto induce a apoptosis en las células epiteliales gástricas, posteriormente, da como resultado un aumento en la proliferación celular como una respuesta del huésped a la apoptosis. Sin embargo, la apoptosis inducida por *la* infección por *H. pylori* que no se acompaña de un aumento similar en la proliferación celular dará como resultado la pérdida de la integridad de la mucosa, lo que provocará erosión gástrica y ulceración, o la pérdida de las glándulas gástricas, lo que provocará atrofia gástrica. Alternativamente, si la respuesta a la apoptosis es una gran proliferación celular, esto aumentará la proliferación de la mucosa gástrica, lo que se cree que aumenta el riesgo de desarrollar neoplasia gástrica (Yang, Deng et al. 2003).

En nuestro estudio, podemos explicar que la presencia de *H. pylori* es capaz tanto de regular negativamente el factor antiapoptótico bcl-xL como de aumentar el factor proapoptótico Bax, aumentando así la relación Bax / Bcl-xL y eliminando la apoptosis. Curiosamente, bcl-2 se mantuvo presente, lo que desplaza la relación Bax / Bcl-2 hacia la apoptosis. (Chen, Cao et al. 2008). La detección de *bcl-2, bcl-xL y bax* también puede explicarse debido a que pueden estar presentes de manera constitutiva, y al realizar una PCR para la detección del gen que codifica para estas proteínas, evidentemente serán identificados, al solo haber realizado la fotografía de los geles usando el foto-documentador, no se puede determinar variaciones para poder decir si hay una sobreexpresión o subexpresión de estos.

Por otra parte, se detectó también la presencia de caspasa 3, caspasa 8 y caspasa 10, importantes moléculas dentro del proceso de la apoptosis, las cuales son una familia de cisteína proteasas que modulan la respuesta apoptótica. Caspasa 3 es un ejecutor clave de la apoptosis, que se activa mediante una caspasa iniciadora como la caspasa 9. Estas caspasas activadas cortan muchos sustratos celulares, lo que finalmente conduce a la muerte celular (Chen, Cao et al. 2008). En contraste a los demás genes estudiados, en ninguna de las 20 muestras se detectó alguna de las caspasas (Tabla 17). Este acontecimiento rechazaría la idea mencionada anteriormente donde se explicaba la relación Bax / Bcl-2 lleva hacia la apoptosis, considerando que caspasa 8 y 10 son caspasas del tipo iniciadoras, y que se ven involucradas en la vía extrínseca de apoptosis, podrían quedar descartadas dado que podría llevarse a cabo mayormente vía intrínseca, pero para poder llevarse a cabo toda la señalización se debió al menos poder detectar la caspasa 3, ya que esta es una caspasa de tipo ejecutora y se activa previamente a la culminación del proceso de destrucción de la célula. Probablemente, la técnica de PCR por punto final no fue lo suficientemente sensible para detectar los genes.

7.5. Cuantificación relativa por qPCR de los genes *bcl-2 y caspasa 10.*

Para poder detectar los niveles de expresión de los genes *bcl-2* y *caspasa 10*, se empleó un método de cuantificación relativa, el método de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$. Para poder realizar esta cuantificación es necesario realizar las respectivas qPCR para cada uno de los genes a estudiar y adicionalmente también realizar una qPCR de un control endógeno, el cual no se module en ninguna de las circunstancias a analizar.

La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) que, mediante un termociclador acoplado a un espectrofluorómetro y haciendo uso de un agente intercalante fluorescente como el SYBR Green o el uso de sondas Taqman cuya fluorescencia aumenta proporcionalmente con el aumento en la cantidad de DNA, nos permite cuantificar simultáneamente (en tiempo real) el número de copias que se están generando en cada ciclo de amplificación. Existen dos variantes de qPCR, la primera es la qPCR de cuantificación absoluta que se basa en la elaboración de una curva de calibración que se construye mediante la determinación del ciclo umbral en diluciones conocidas de DNA y la segunda es la qPCR de cuantificación relativa que se basa en la relación entre los niveles de expresión de un gen de interés (GOI ó "Gene of Interest") con respecto a los niveles de expresión de un gen de referencia (Ref) que se expresa constitutivamente, esta última estrategia de cuantificación es conveniente para investigar los cambios fisiológicos en los niveles de expresión génica (de Alba Aguayo and Rueda 2013). Por lo tanto, la cuantificación relativa fue el método que se utilizó para nuestra RT-qPCR e inicialmente se tuvo que elegir cúal era mejor control endógeno entre *b-actina y gapdh* bajo nuestras condiciones y factores que posiblemente afectaran la expresión de estos genes.

Las qPCR se realizaron por triplicado y de los valores obtenidos se calculó su promedio a cada muestra.

Se mostrará un resumen de los Ct obtenidos en las respectivas qPCR para posteriormente aplicar el método de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$.

El primer paso es elegir el gen endógeno con el que se trabajaran los valores, por lo que se compararon los genes *g3pdh* y *b-actina.* A continuación se muestran los Ct obtenidos de las qPCR para ambos genes y como se realizó la elección del control endógeno usando el método $2^{-(\Delta Ct)}$.

Con la finalidad de poder obtener mayor información, se clasificaron las muestras de dos formas, por la severidad del padecimiento gástrico; benigno, intermedio y maligno, y por presencia del factor de virulencia *vacA m1; vacA m1+ y vacA m1 -*. Para esto se realizó la RT-qPCR de todas las muestras trabajadas tanto para *b-actina* como para *gapdh*. Se obtuvo el Ct y se realizó el método de $2^{-\Delta Ct}$. Primero se evaluó considerando la severidad de los padecimientos (Tabla 18 y 19). Como paso inicial en esta metodología de cuantificación relativa, se calculó el promedio del Ct de todas las muestras (Promedio Ct= 20.9235 para RT-qPCR de *gapdh* y Promedio Ct= 25.01 para RT-qPCR de *b-actina*), posteriormente a cada Ct se le resto el promedio de los Ct, lo cual se denomina ΔCt. Una vez hecho esto, se calculó $2^{-\Delta Ct}$ para cada uno de los valores de ΔCt y finalmente para obtener la expresión relativa se promedió por grupo sus $2^{-\Delta Ct}$. De este modo se obtuvo que para el gen *gapdh*, la expresión relativa fue: benigno: 1.1994, intermedio 1.0150 y maligno: 1.0490, mientras que para el gen *b-actina* fue: benigno: 5.2868, intermedio 0.7097 y maligno: 1.2049.

Tabla 18. Resumen de los Ct obtenidos mediante qPCR para el gen *gapdh* y su análisis mediante el método $2^{-(\Delta Ct)}$ en muestras agrupadas por padecimiento (Benigno, intermedio y maligno).

	gapdh				
	Ct	**Promedio Ct**	**∆Ct**	**2ˆ-(∆Ct)**	**Exp Relativa**
Benigno	21.3	20.9235	0.3765	0.7703041	1.19949375
	21.54	20.9235	0.6165	0.65225138	
	20.65	20.9235	-0.2735	1.20873669	
	21.9	20.9235	0.9765	0.50821117	
	20.3	20.9235	-0.6235	1.54060819	
	19.7	20.9235	-1.2235	2.33512536	
	20.13	20.9235	-0.7935	1.73327432	
	20.7	20.9235	-0.2235	1.16756268	
	21.61	20.9235	0.6865	0.62135945	
	20.38	20.9235	-0.5435	1.45750416	
Intermedio	21.97	20.9235	1.0465	0.48414127	1.01505196
	20.37	20.9235	-0.5535	1.4676419	
	20.45	20.9235	-0.4735	1.38847384	
	21.75	20.9235	0.8265	0.5638956	
	21.9	20.9235	0.9765	0.50821117	
	20.43	20.9235	-0.4935	1.40785622	
	20.97	20.9235	0.0465	0.96828255	
	20.51	20.9235	-0.4135	1.33191314	
Maligno	21.5	20.9235	0.5765	0.67058866	1.04904891
	20.41	20.9235	-0.5135	1.42750916	

Tabla 19. Resumen de los Ct obtenidos mediante qPCR para el gen *b-actina* y su análisis mediante el método $2^{-(\Delta Ct)}$ en muestras agrupadas por padecimiento (Benigno, intermedio y maligno).

b-actina					
	Ct	**Promedio Ct**	**∆Ct**	**2ˆ-(∆Ct)**	**Exp relativa**
Benigno	21.56	25.01	-3.45	10.9283221	5.28687113
	23.94	25.01	-1.07	2.09943337	
	21.34	25.01	-3.67	12.7285837	
	24.21	25.01	-0.8	1.74110113	
	23.55	25.01	-1.46	2.75108364	
	21.81	25.01	-3.2	9.18958684	
	23.04	25.01	-1.97	3.91768119	
	24.77	25.01	-0.24	1.18099266	
	22.15	25.01	-2.86	7.26015324	
	24.91	25.01	-0.1	1.07177346	
Intermedio	24.66	25.01	-0.35	1.27456063	0.70977521
	26.14	25.01	1.13	0.45691573	
	23.75	25.01	-1.26	2.39495741	
	29.63	25.01	4.62	0.04066693	
	28.56	25.01	3.55	0.08537752	
	24.79	25.01	-0.22	1.16473359	
	29.31	25.01	4.3	0.05076577	
	27.26	25.01	2.25	0.2102241	
Maligno	23.75	25.01	-1.26	2.39495741	1.20497296
	31.07	25.01	6.06	0.0149885	

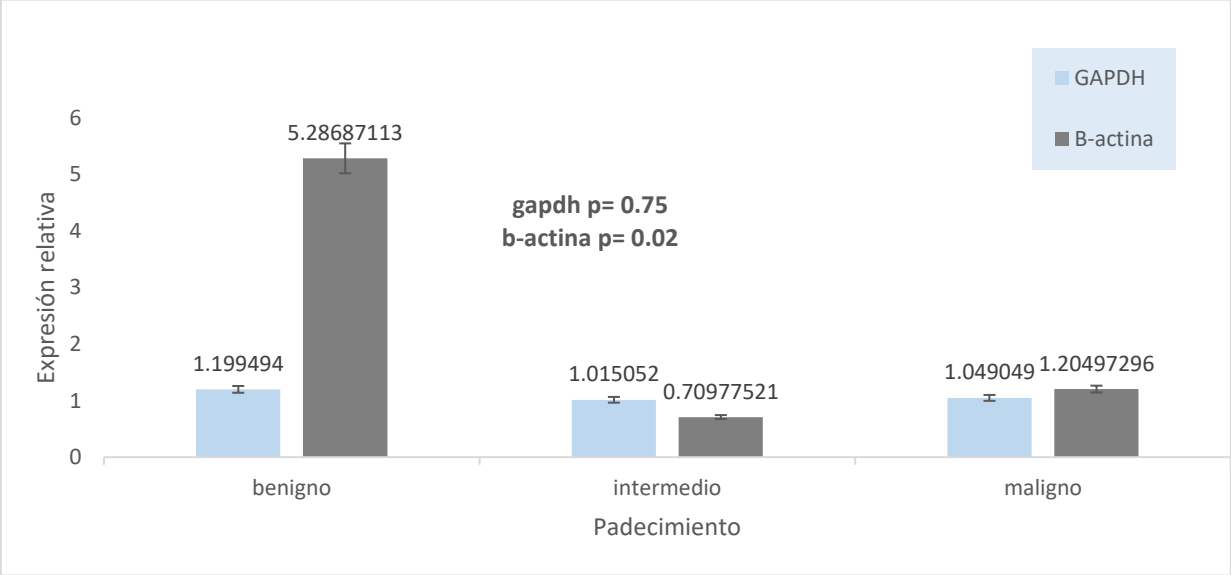


Gráfico 6. Aplicación del método $2^{-(\Delta Ct)}$ para la selección del control endógeno en muestras agrupadas por padecimiento.

Como se puede ver en el gráfico 6, cuando se evalúan los genes b-actina y gapdh en muestras agrupadas por severidad del padecimiento, el gen gapdh mantiene valores cercanos de expresión relativa de: B: 1.1994, I: 1.0150 y M: 1.0490, para poder ver si existe una variación significativa estadísticamente se realizó ANOVA para obtener el valor de p, que para este grupo de datos fue de 0.75, lo que significa que no existe variación entre los valores de expresión de los diferentes grupos.

A diferencia, para el gen b-actina, donde específicamente en el grupo de padecimientos benignos, donde se incluye la GCF y GCD, se puede ver una variación importante en la expresión relativa, ya que se obtuvo un valor de 5.2868, a diferencia de los grupos intermedio; que su expresión fue de 0.7097, que también se ve disminuido, y maligno con 1.2049 de expresión relativa. Con estos datos se calculó el valor de p y resulto ser de 0.02 lo que nos indica que estos datos tienen una variación estadística significativa, esto implica que la expresión de b-actina si se modula dependiendo el tipo de padecimiento que manifiesta el paciente.

Paso seguido, se realizó el mismo método de $2^{-\Delta Ct}$ considerando ahora la clasificación basada en la presencia del factor de virulencia *vacA m1* (Tabla 20 y 21). De igual forma se calculó el promedio del Ct de todas las muestras (mismos promedios que para la clasificación por severidad del padecimiento gástrico), se obtuvo el ΔCt. Se realizó el cálculo de $2^{-\Delta Ct}$ para cada uno de los valores de ΔCt y finalmente para obtener la expresión relativa se promedió por grupo sus $2^{-\Delta Ct}$. De este modo se obtuvo que para el gen *gapdh*, la expresión relativa fue: *vacA m1*+: 1.2568 y *vacA m1* -: 1.0480, mientras que para el gen *b-actina* fue: *vacA m1*+: 3.3444 y *vacA m1*-: 2.9179.

Tabla 20. Resumen de los Ct obtenidos mediante qPCR para el gen *gapdh* y su análisis mediante el método $2^{-(\Delta Ct)}$ en muestras agrupadas por presencia del factor de virulencia vacA.

	gapdh				
	Ct	**$\overline{X}$Ct**	**ΔCt**	**2ˆ-(ΔCt)**	**Exp Relativa**
vacA (+)	20.37	20.9235	-0.5535	1.4676419	1.25686349
	20.45	20.9235	-0.4735	1.38847384	
	20.65	20.9235	-0.2735	1.20873669	
	21.9	20.9235	0.9765	0.50821117	
	20.3	20.9235	-0.6235	1.54060819	
	20.41	20.9235	-0.5135	1.42750916	
vacA (-)	21.5	20.9235	0.5765	0.67058866	1.04801929
	21.3	20.9235	0.3765	0.7703041	
	21.97	20.9235	1.0465	0.48414127	
	21.75	20.9235	0.8265	0.5638956	
	21.54	20.9235	0.6165	0.65225138	
	21.9	20.9235	0.9765	0.50821117	
	20.43	20.9235	-0.4935	1.40785622	
	19.7	20.9235	-1.2235	2.33512536	
	20.13	20.9235	-0.7935	1.73327432	
	20.97	20.9235	0.0465	0.96828255	
	20.7	20.9235	-0.2235	1.16756268	
	20.51	20.9235	-0.4135	1.33191314	
	21.61	20.9235	0.6865	0.62135945	
	20.38	20.9235	-0.5435	1.45750416	

Tabla 21. Resumen de los Ct obtenidos mediante qPCR para el gen *b-actina* y su análisis mediante el método $2^{-(\Delta Ct)}$ en muestras agrupadas por presencia del factor de virulencia vacA.

b-actina					
	Ct	$\overline{X}$**Ct**	**∆Ct**	**2ˆ-(∆Ct)**	**Exp Relativa**
vacA (+)	26.14	25.0085	1.1315	0.45644091	3.34445924
	23.75	25.0085	-1.2585	2.39246862	
	21.34	25.0085	-3.6685	12.7153564	
	24.21	25.0085	-0.7985	1.73929181	
	23.55	25.0085	-1.4585	2.74822476	
	31.07	25.0085	6.0615	0.01497293	
vacA (-)	23.75	25.0085	-1.2585	2.39246862	2.91794331
	21.56	25.0085	-3.4485	10.9169656	
	24.66	25.0085	-0.3485	1.27323613	
	29.63	25.0085	4.6215	0.04062467	
	23.94	25.0085	-1.0685	2.09725168	
	28.56	25.0085	3.5515	0.08528879	
	24.76	25.0085	-0.2485	1.18797131	
	21.81	25.0085	-3.1985	9.1800372	
	23.04	25.0085	-1.9685	3.91361001	
	29.31	25.0085	4.3015	0.05071302	
	24.77	25.0085	-0.2385	1.1797654	
	27.26	25.0085	2.2515	0.21000564	
	22.15	25.0085	-2.8585	7.25260863	
	24.91	25.0085	-0.0985	1.0706597	

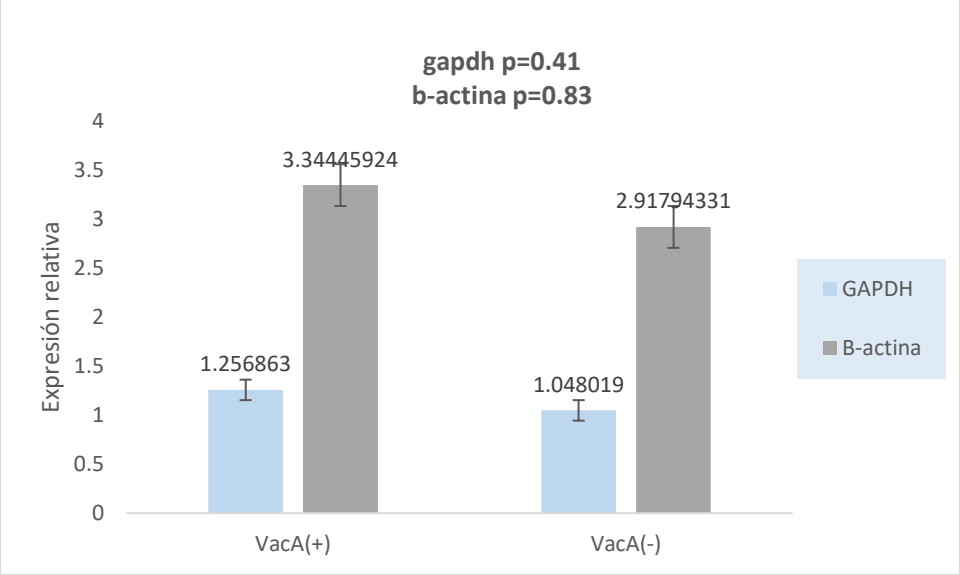


Gráfico 7. Aplicación del método $2^{-(\Delta Ct)}$ para la selección del control endógeno en muestras agrupadas por presencia del factor de virulencia vacA.

Al evaluar estos mismos genes pero clasificándolos por presencia del factor de virulencia vacA m1, como se puede observar en el gráfico 7, sucede algo similar ya que para el gen gapdh se obtuvieron valores de expresión relativa de: 1.2568 para el grupo vacA m1 + y 1.0480 para el grupo vaca m1 -, y como sucedió empleando la clasificación por padecimiento, no existe una variación grande, esto se corroboró calculando el valor de p mediante la prueba t de Student, que resultó ser de 0.41, y esto indica que la diferencia no es significativa.

Respecto a la expresión relativa obtenida para el gen b-actina empleando esta clasificación por presencia del factor de virulencia vacA m1, se observó que se ven alterados los niveles de expresión relativa, similar a lo acontecido empleando la clasificación por severidad del padecimiento, ya que para el grupo vacA m1 + la expresión relativa fue de 3.3445 mientras que para el grupo vacA m1– fue de 2.9179. Por lo tanto, al calcular el valor de p, se obtuvo un valor de 0.83, lo que indica que estos datos a pesar de no coincidir a diferencia de los otros casos, la diferencia no es estadísticamente significativa.

De esta forma es que se eligió a gapdh como el gen endógeno con el cual se realizó el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$ para evaluar la expresión de los genes de interés; bcl-2 y caspasa

10, ya que al manifestar variación en la expresión del gen b-actina quiere decir que las condiciones evaluadas, ya sea el padecimiento que presenta la muestra o la presencia del factor de virulencia vacA m1, si son factores relevantes y alteran su expresión natural. Esto se puede explicar debido a que b-actina es una de las dos actinas citoesqueléticas no musculares. Las actinas son proteínas altamente conservadas que están involucradas en la motilidad celular, estructura e integridad. Por lo tanto, al haber alteraciones en la célula, en este caso, algún padecimiento que lleve al cáncer, puede verse alterada la expresión, estudios han revelado que el nivel de β-actina se encuentra significativamente mayor en los tejidos de cáncer gástrico que en la mucosa normal correspondiente. Lo que demostró que β-actina, la proteína más conservadora y dinámica, se sobreexpresa en los tejidos de cáncer gástrico y puede desempeñar un papel crucial en la metástasis del cáncer gástrico (Xu, Zhang et al. 2013).

Una vez identificado el gen endógeno, se procedió a realizar la RT-qPCR para los genes bcl-2 y caspasa 10 y de este modo identificar si había variación en la expresión de estos. Se evaluaron ambos genes empleando ambas clasificaciones antes mencionadas; por severidad de padecimiento y por presencia del factor de virulencia vacA m1. En el primer caso, como lo indica el gráfico 8, se obtuvo que la expresión relativa al gen bcl 2- para el grupo benigno fue de 1.2348, 1.4114 para el intermedio y 1.5204 para el maligno. Por otro lado, la expresión relativa del gen caspasa 10 fue de 1.2769 para el grupo benigno, 3.187 para el intermedio y 14.2358 para el maligno. Estos datos fueron analizados mediante ANOVA, con lo que se obtuvo un valor de p=0.87 para bcl-2 y p=0.03 para caspasa 10 (Gráfico 9). A primera instancia se pueden ver que los valores obtenidos de expresión relativa de bcl-2 en los diferentes grupos no son muy variantes, pues se mantiene dentro de un rango que va del 1.0 al 1.5, mientras que los valores obtenidos de expresión relativa para caspasa 10 si muestra variabilidad entre ellos, esto se comprueba al realizar el ANOVA para caspasa 10 ya que al ser el valor de p menor a 0.05, se rechaza la hipótesis nula y se afirma que la media de algún grupo es diferente a la de los demás, por lo tanto, se demuestra que el padecimiento que manifiesta el paciente si influye en la expresión del gen caspasa 10.

Tabla 22. Resumen de los Ct obtenidos mediante qPCR para el gen *bcl-2* y *caspasa 10* y su análisis mediante el método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ en muestras agrupadas por padecimiento (Benigno, intermedio y maligno).

bcl-2							
Grupo	**bcl2**	**gapdh**	**ΔCt**	**Promedio Ct Benigno**	**ΔΔCt**	**2^(ΔΔCt)**	**Exp relativa**
benigno	33.47	21.3	12.17	12.664	-0.494	1.40834423	1.23487083
benigno	33.6	21.54	12.06	12.664	-0.604	1.51992486	
benigno	33.33	21.9	11.43	12.664	-1.234	2.3521825	
benigno	33.42	19.7	13.72	12.664	1.056	0.48096373	
benigno	34.07	20.13	13.94	12.664	1.276	0.41293883	
intermedio	33.57	21.97	11.6	12.664	-1.064	2.0907202	1.41145919
intermedio	34.19	20.37	13.82	12.664	1.156	0.44875503	
intermedio	33.12	21.75	11.37	12.664	-1.294	2.45206972	
intermedio	33.94	20.43	13.51	12.664	0.846	0.55632506	
intermedio	33.04	20.97	12.07	12.664	-0.594	1.50942597	
maligno	32.66	21.5	11.16	12.664	-1.504	2.83628007	1.52043003
maligno	34.19	20.41	13.78	12.664	1.116	0.46137125	
maligno	33.51	21.34	12.17	12.664	-0.494	1.40834423	
maligno	33.79	21.64	12.15	12.664	-0.514	1.42800398	
maligno	33.48	21.37	12.11	12.664	-0.554	1.46815064	
caspasa 10							
Grupo	**caspasa 10**	**gapdh**	**ΔCt**	**Promedio Ct Benigno**	**ΔΔCt**	**2^(ΔΔCt)**	**Exp relativa**
benigno	34.9	21.3	13.6	11.542	2.058	0.24014872	1.27699149
benigno	31.79	20.13	11.66	11.542	0.118	0.92146419	
benigno	31.05	20.7	10.35	11.542	-1.192	2.28469249	
benigno	33.09	21.61	11.48	11.542	-0.062	1.04391193	
benigno	31	20.38	10.62	11.542	-0.922	1.89474014	
intermedio	30.8	21.97	8.83	11.542	-2.712	6.55229358	3.18700402
intermedio	32.19	20.37	11.82	11.542	0.278	0.82473355	
intermedio	29.56	20.45	9.11	11.542	-2.432	5.39641014	
intermedio	35.85	21.9	13.95	11.542	2.408	0.18841686	
intermedio	30.94	20.97	9.97	11.542	-1.572	2.97316597	
maligno	28.06	21.5	6.56	11.542	-4.982	31.6032276	14.2358144
maligno	29.31	20.53	8.78	11.542	-2.762	6.78335972	
maligno	28.65	21.68	6.97	11.542	-4.572	23.7853278	
maligno	30.73	21.74	8.99	11.542	-2.552	5.86446703	
maligno	30.82	20.93	9.89	11.542	-1.652	3.14269007	

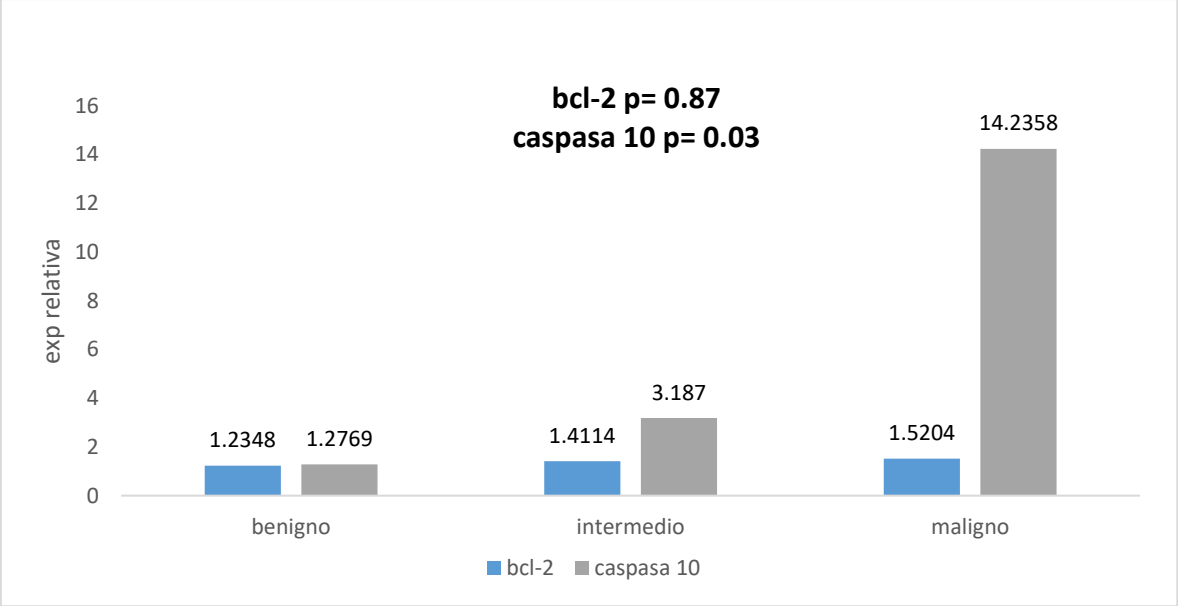


Gráfico 8. Aplicación del método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ para la determinación de expresión relativa en muestras agrupadas por padecimiento.

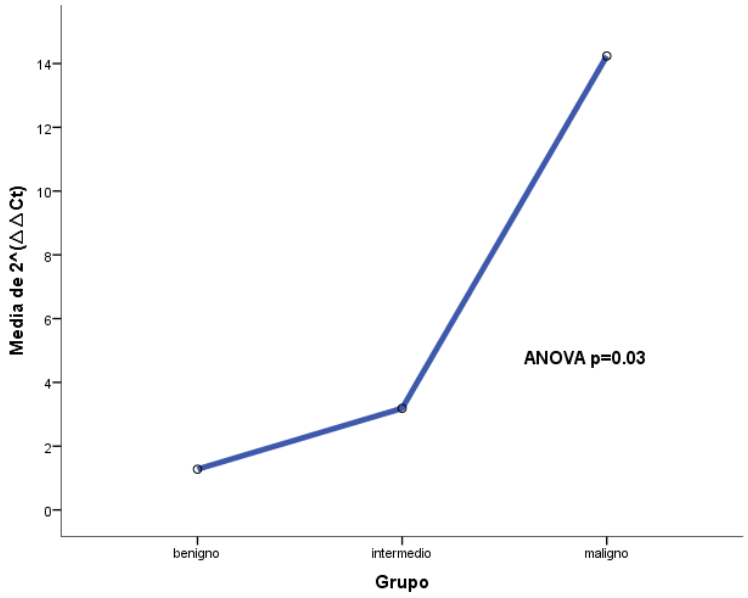


Gráfico 9. Resultados obtenidos por medio de la aplicación del método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ para la determinación de expresión relativa del gen *caspasa 10* en muestras agrupadas por padecimiento.

Por otra parte, al realizar la RT-qPCR para los genes bcl-2 y caspasa 10 empleando la clasificación por presencia del factor de virulencia vacA m1, se obtuvieron valores de expresión relativa al gen bcl-2 de 1.0534 para el grupo vacA negativo y 0.6057 para el grupo vacA, mientras que para el gen caspasa 10 se obtuvieron valores de 1.2752 para el grupo vacA negativo y 5.0488 para el grupo vacA positivo (Tabla 23). Para validar si la diferencia es significativa estadísticamente se realizó la prueba t de Student en la cual se encontró un valor de p=0.05 para el gen bcl-2 y para el gen caspasa 10 fue de p=0.18 (Grafico 10). Esto implica que estadísticamente las variaciones no son significativas y aunque es grande la diferencia en el caso de la expresión de caspasa 10, probablemente el número de muestras estudiadas fue un factor determinante para que resultara así, de poder incrementar el número de muestras podría haber variación significativa.

Debido a las pocas muestras positivas al factor de virulencia cagA, no se pudo realizar una comparación para encontrar si la presencia de este es relevante en la expresión de los genes estudiados, por otra parte, bcl-2 no se vio alterado bajo ningún factor mientras que caspasa 10 demostró comportarse de manera anormal si existe la presencia del factor de virulencia vacA m1, así como también el tipo de padecimiento gástrico que presente el paciente.

Tabla 23. Resumen de los Ct obtenidos mediante qPCR para el gen *bcl-2* y *caspasa 10* y su análisis mediante el método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ en muestras agrupadas por presencia del factor de virulencia vacA.

bcl-2							
Grupo	**bcl-2**	**gapdh**	**ΔCt**	**Promedio Ct Vac -**	**ΔΔCt**	**2^(ΔΔCt)**	**Exp relativa**
VacA+	33.6	20.37	13.23	12.18	1.05	0.48296816	0.60572444
	33.33	20.45	12.88	12.18	0.7	0.61557221	
	33.4	20.65	12.75	12.18	0.57	0.67361679	
	34.19	21.9	12.29	12.18	0.11	0.92658806	
	34.19	20.41	13.78	12.18	1.6	0.32987698	
VacA-	33.47	21.5	11.97	12.18	-0.21	1.15668818	1.05343987
	33.6	21.3	12.3	12.18	0.12	0.92018765	
	33.42	21.97	11.45	12.18	-0.73	1.65863909	
	34.07	21.75	12.32	12.18	0.14	0.90751916	
	34.4	21.54	12.86	12.18	0.68	0.62416527	
caspasa 10							
Grupo	**caspasa 10**	**gapdh**	**ΔCt**	**Promedio Ct Vac -**	**ΔΔCt**	**2^(ΔΔCt)**	**Exp relativa**
VacA+	29.55	20.37	9.18	11.232	-2.052	4.1468044	5.0488635
	27.78	20.45	7.33	11.232	-3.902	14.9492376	
	33.6	20.65	12.95	11.232	1.718	0.30396982	
	32.19	21.9	10.29	11.232	-0.942	1.92118973	
	29.56	20.3	9.26	11.232	-1.972	3.92311602	
VacA-	34.9	21.5	13.4	11.232	2.168	0.22251893	1.27521595
	31.79	21.75	10.04	11.232	-1.192	2.28469249	
	33.09	21.9	11.19	11.232	-0.042	1.02954008	
	30.8	19.7	11.1	11.232	-0.132	1.09581177	
	30.94	20.51	10.43	11.232	-0.802	1.74351648	

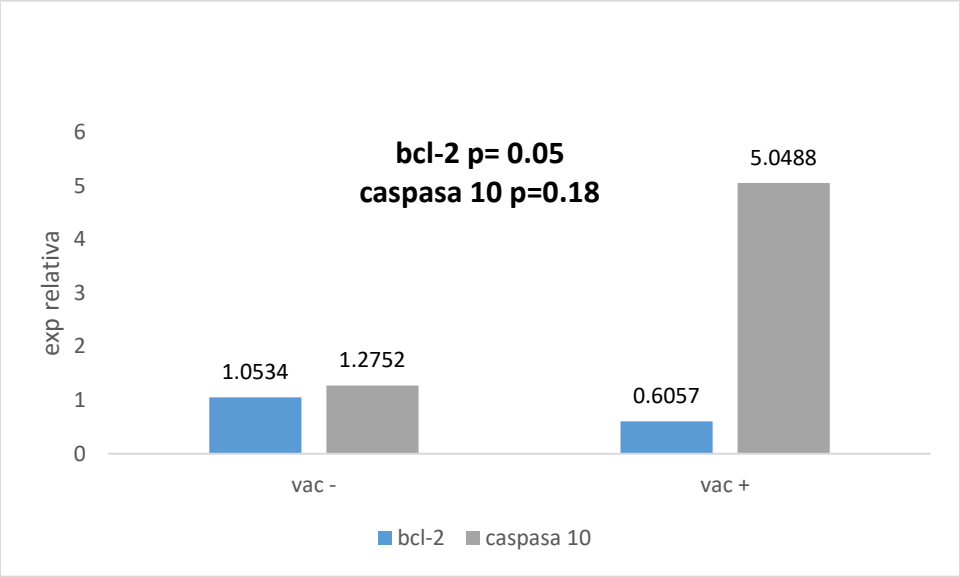


Gráfico 10. Aplicación del método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ para la determinación de expresión relativa en muestras agrupadas por presencia del factor de virulencia vacA.

El principal objetivo de este estudio fue encontrar la relación que tienen los principales factores de virulencia de *H. pylori* en la cascada de señalización de la apoptosis, mediante la identificación de cambios en algunas moléculas involucradas en muerte celular. Para el futuro, las perspectivas que se tienen de este proyecto son poder identificar las variantes del gen *vacA m1/m2* y *vacA s1/s2,* para poder correlacionarlo al gen *cagA*, además de detectar *p53* y *caspasa 3* mediante qPCR y aumentar el número de muestras para poder dar información más representativa.

8. CONCLUSIÓN

Helicobacter pylori posee dos factores de virulencia, cagA y vacA, donde la variante vacA m1 demostró que afecta la manera en la que se expresa la casapasa 10, elevando sus niveles de expresión.

El padecimiento gástrico que manifieste el paciente resultó ser influyente en la expresión de caspasa 10, entre mayor severidad, el nivel de expresión se ve aumentado más drásticamente, por esto se reafirma que es de suma importancia el temprano diagnóstico y tratamiento de *Helicobacter pylori,* además de identificar la presencia de sus principales factores de virulencia.

Al no poder identificar mediante PCR de punto final las bandas correspondientes a caspasa 3, 8 y 10 se sostuvo el estudio basándose en los resultados de la RT-qPCR donde se encontró variación en la señalización celular apoptótica, de poder incrementar el número de las muestras es probable que los resultados obtenidos mediante las pruebas ANOVA y t de Student cambien y se demuestre que la diferencia en la expresión es significativa.

9. REFERENCIAS

Allen, L.-A. H., et al. (2000). "Virulent strains of Helicobacter pylori demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages." Journal of Experimental Medicine **191**(1): 115-128.

Ando, T., et al. (2007). "The interaction of host genetic factors and Helicobacter pylori infection." Inflammopharmacology **15**(1): 10-14.

Angosto, M. C. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Backert, S., et al. (2000). "Translocation of the Helicobacter pylori CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus." Cellular microbiology **2**(2): 155-164.

Bai, H., et al. (2010). "Characteristics and interactions of Helicobacter pylori and H. pylori-infected human gastroduodenal epithelium in peptic ulcer: a transmission electron microscopy study." Digestive diseases and sciences **55**(1): 82.

Basso, D., et al. (2008). "Clinical relevance of Helicobacter pylori cagA and vacA gene polymorphisms." Gastroenterology **135**(1): 91-99.

Blaser, M. J., et al. (1995). "Infection with Helicobacter pylori strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach." Cancer research **55**(10): 2111-2115.

Cava, F. and G. Cobas (2003). "Dos décadas de Helicobacter pylori." VacciMonitor **12**(1): 1-10.

Cecilia, H. C., et al. (2011). "Situación de las enfermedades gastrointestinales en México." Enfermedades infecciosas y microbiología **31**(4): 137.

Cervantes-García, E. (2016). "Helicobacter pylori: mecanismos de patogenicidad." Revista Latinoamericana de Patología Clínica y medicina de laboratorio **63**(2): 100-109.

Cruz, J. N. Z., et al. (2017). "Mortalidad de cáncer gástrico en México 2005-2015: perfil epidemiológico." Archivos de medicina **13**(4): 4.

Chen, J.-h., et al. (2008). "T-2 toxin-induced apoptosis involving Fas, p53, Bcl-xL, Bcl-2, Bax and caspase-3 signaling pathways in human chondrocytes." Journal of Zhejiang University Science B **9**(6): 455-463.

Chipuk, J. E., et al. (2010). "The BCL-2 family reunion." Molecular cell **37**(3): 299-310.

de Alba Aguayo, D. R. and A. Rueda (2013). "Problema bioquímico: Determinación del ciclo umbral y la eficiencia para la PCR cuantitativa en tiempo real." REB. Revista de educación bioquímica **32**: 36-39.

De Falco, M., et al. (2015). "Molecular mechanisms of Helicobacter pylori pathogenesis." Journal of cellular physiology **230**(8): 1702-1707.

Dickens, L. S., et al. (2012). "The 'complexities' of life and death: death receptor signalling platforms." Experimental cell research **318**(11): 1269-1277.

Dunn, B. E., et al. (1997). "Localization of Helicobacter pylori urease and heat shock protein in human gastric biopsies." Infection and immunity **65**(4): 1181-1188.

Elinos-Báez, C. M., et al. (2003). "Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis." Gaceta Médica de México **139**(5): 493-499.

Espinoza, M. G. C., et al. (2011). "Detection of the glmM gene in Helicobacter pylori isolates with a novel primer by PCR." Journal of clinical microbiology **49**(4): 1650-1652.

Galluzzi, L., et al. (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." Cell Death & Differentiation **19**(1): 107-120.

García, M. and E. Vecino (2003). "Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina." Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología **78**(7): 351-364.

González López, L. and B. L. Rodríguez González (2011). "Patogénesis de la infección por Helicobacter pylori." Revista Cubana de Medicina **50**: 441-452.

Green, D. R. and F. Llambi (2015). "Cell death signaling." Cold Spring Harbor perspectives in biology **7**(12): a006080.

Ha, N.-C., et al. (2001). "Supramolecular assembly and acid resistance of Helicobacter pylori urease." Nature Structural & Molecular Biology **8**(6): 505.

Harris, D., et al. (2001). "Dolor abdominal, dispepsia y gastritis en pediatría: Rol del Helicobacter pylori." Revista chilena de pediatría **72**(2): 81-91.

Hatakeyama, M. (2009). "Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis." Journal of gastroenterology **44**(4): 239-248.

Hatakeyama, M. and H. Higashi (2005). "Helicobacter pylori CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis." Cancer science **96**(12): 835-843.

Higashi, H., et al. (2004). "Helicobacter pylori CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation." Journal of Biological Chemistry **279**(17): 17205-17216.

Holczer, M., et al. (2015). "A comprehensive systems biological study of autophagy-apoptosis crosstalk during endoplasmic reticulum stress." BioMed research international **2015**.

Jiménez, F. T. and C. T. Bayona (2016). "Fisiopatología molecular en la infección por Helicobacter pylori." Salud Uninorte **32**(3): 500-512.

Jordán, J. (2003). "Apoptosis: muerte celular programada." Offarm **22**(6): 100-106.

Khan, S., et al. (2009). "Helicobacter urease: niche construction at the single molecule level." Journal of biosciences **34**(4): 503-511.

Latorre, G., et al. (2016). "Aumento de Detección de Lesiones Gástricas Premalignas mediante Protocolo de Sydney en comparación con biopsias no protocolizadas." Gastroenterol latinoam **27**(4): 207-214.

Lin, W., et al. (2014). "Helicobacter pylori sensitizes TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human gastric epithelial cells through regulation of FLIP." Cell death & disease **5**(3): e1109-e1109.

Liu, H.-F., et al. (2005). "Effect of Helicobacter pylori infection on Bax protein expression in patients with gastric precancerous lesions." World Journal of Gastroenterology: WJG **11**(37): 5899.

Llambi, F., et al. (2011). "A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria." Molecular cell **44**(4): 517-531.

Mahdavi, J., et al. (2002). "Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation." Science **297**(5581): 573-578.

Maroto Castillo, E. and M. Logroño Ruiz (2010). Importancia de la prueba de rotavirus como ayuda del diagnostico de gastroenteritis en los niños que acuden al centro de desarrollo infantil Maria Murgueyto de Guerrero de la Ciudada de Riobamba, en el periodo de octubre 2009 a Marzo 2010, Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo, 2010.

Martínez, M. Á., et al. (2008). "microbiológico de las infecciones gastrointestinales."

Munari, F., et al. (2014). "Cytokine BAFF released by Helicobacter pylori–infected macrophages triggers the Th17 response in human chronic gastritis." The Journal of Immunology **193**(11): 5584-5594.

Muñoz-Pinedo, C., et al. (2006). "Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(31): 11573-11578.

Newton, K. and V. M. Dixit (2012). "Signaling in innate immunity and inflammation." Cold Spring Harbor perspectives in biology **4**(3): a006049.

Nyström, J. and A.-M. Svennerholm (2007). "Oral immunization with HpaA affords therapeutic protective immunity against H. pylori that is reflected by specific mucosal immune responses." Vaccine **25**(14): 2591-2598.

Odenbreit, S., et al. (2000). "Translocation of Helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion." Science **287**(5457): 1497-1500.

Pachathundikandi, S. K., et al. (2011). "Induction of TLR-2 and TLR-5 expression by Helicobacter pylori switches cagPAI-dependent signalling leading to the secretion of IL-8 and TNF-α." PLoS One **6**(5): e19614.

Panayotopoulou, E. G., et al. (2007). "Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in Helicobacter pylori clinical isolates." Journal of clinical microbiology **45**(2): 488-495.

Peek, J. R., et al. (1998). "Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a Helicobacter pylori gene, iceA, that is associated with clinical outcome." Proceedings of the Association of American Physicians **110**(6): 531-544.

Perrone, M., et al. (2009). "Genotipos vacA de Helicobacter pylori en una población venezolana." Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología **29**(1): 39-43.

Rad, R., et al. (2002). "The Helicobacter pylori blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response." The Journal of Immunology **168**(6): 3033-3041.

Rhead, J. L., et al. (2007). "A new Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer." Gastroenterology **133**(3): 926-936.

Salido, F. P. and J. J. R. Fernández (2004). "Infecciones gastrointestinales: tipos, diagnóstico y tratamiento." Offarm: farmacia y sociedad **23**(5): 100-106.

Sánchez-Cuén, J. A., et al. (2015). "Concordancia entre procedimientos diagnósticos invasivos para la infección por Helicobacter pylori en adultos." salud pública de méxico **57**: 352-357.

Sepúlveda, E., et al. (2012). "Comparación de Helicobacter pylori en cavidad oral y mucosa gástrica de acuerdo a genotipo de virulencia (cagA y vacAm 1)." Revista chilena de infectología **29**: 278-283.

Shalini, S., et al. (2015). "Old, new and emerging functions of caspases." Cell Death & Differentiation **22**(4): 526-539.

Shiota, S., et al. (2010). "Systematic review and meta-analysis: the relationship between the Helicobacter pylori dupA gene and clinical outcomes." Gut pathogens **2**(1): 13.

Smoot, D. T., et al. (1990). "Helicobacter pylori urease activity is toxic to human gastric epithelial cells." Infection and immunity **58**(6): 1992-1994.

Sundrud, M. S., et al. (2004). "Inhibition of primary human T cell proliferation by Helicobacter pylori vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion." Proceedings of the National Academy of Sciences **101**(20): 7727-7732.

Sung, J. J., et al. (2020). "Gastric microbes associated with gastric inflammation, atrophy and intestinal metaplasia 1 year after Helicobacter pylori eradication." Gut.

Tait, S. W. and D. R. Green (2010). "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond." Nature reviews Molecular cell biology **11**(9): 621-632.

Torres Jiménez, F. and C. Torres Bayona (2016). "Molecular pathophysiology in infection by Helicobacter pylori." Revista Salud Uninorte **32**(3): 500-512.

Trujillo, E., et al. (2014). "Genotipificación de los factores de virulencia vacA y cagA de Helicobacter pylori en individuos de dos regiones de Colombia con riesgo opuesto de cáncer gástrico." Biomédica **34**(4): 567-573.

Truong, B. X., et al. (2009). "Diverse characteristics of the CagA gene of Helicobacter pylori strains collected from patients from southern vietnam with gastric cancer and peptic ulcer." Journal of clinical microbiology **47**(12): 4021-4028.

Tsai, H.-F. and P.-N. Hsu (2017). "Modulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis by Helicobacter pylori in immune pathogenesis of gastric mucosal damage." Journal of Microbiology, Immunology and Infection **50**(1): 4-9.

Valadez, F. T., et al. (2010). Helicobacter pylori, Intersistemas.

Valenzuela-González, F., et al. (2015). "El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas." Ciencias marinas **41**(4): 297-313.

Vinaccia, S., et al. (2004). "Conducta anormal de enfermedad en pacientes con enfermedades gastrointestinales." Psicología y Salud **14**(1): 31-41.

Wang, G., et al. (2006). "The diverse antioxidant systems of Helicobacter pylori." Molecular microbiology **61**(4): 847-860.

Wilson, K. T. and J. E. Crabtree (2007). "Immunology of Helicobacter pylori: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies." Gastroenterology **133**(1): 288-308.

Xu, J., et al. (2013). "Overexpression of β-actin is closely associated with metastasis of gastric cancer." Hepato-gastroenterology **60**(123): 620-623.

Yamaoka, Y., et al. (2002). "Importance of Helicobacter pylori oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production." Gastroenterology **123**(2): 414-424.

Yamaoka, Y., et al. (2000). "A Mr 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of Helicobacter pylori." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(13): 7533-7538.

Yang, J. J., et al. (2011). "Oncogenic CagA promotes gastric cancer risk via activating ERK signaling pathways: a nested case-control study." PLoS One **6**(6): e21155.

Yang, Y., et al. (2003). "Effect of Helicobacter pylori on apoptosis and apoptosis related genes in gastric cancer cells." Molecular Pathology **56**(1): 19.

Yuan, S., et al. (2010). "Structure of an apoptosome-procaspase-9 CARD complex." Structure **18**(5): 571-583.