

Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



“Efecto del pH y la disponibilidad de hierro sobre las modificaciones del lípido A de *Helicobacter pylori* y su impacto en la inmunogenicidad en células epiteliales AGS”

Proyecto de Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al Grado Académico de Magíster en Bioquímica, área de especialización en Bioquímica de Proteínas y Biotecnología.

Memoria para optar al título de Bioquímico.

Héctor Gabriel Garcias Papayani

Directores de Tesis:

Dr. Sergio Aníbal Álvarez Armijo

Dra. Denisse Margarita Bravo Rodríguez

Santiago - Chile

Octubre 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato:

HÉCTOR GABRIEL GARCÍAS PAPAYANI

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización en Proteínas Recombinantes y Biotecnología y al Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día

Directores de Tesis:

Dr. Sergio A. Álvarez

Dra. Denisse Bravo

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Davor Cotoras (Presidente)

Dra. Claudia Lefimil

Dr. Dante Miranda

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Microbiología “Rafael Virgilio A.” del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, y en el Laboratorio de Microbiología Oral del Departamento de Patología y Medicina Oral de la Facultad de Odontología, ambos pertenecientes a la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Sergio A. Álvarez y la Dra. Denisse Bravo.

Este trabajo contó con financiamiento de los proyectos Fondecyt 1130225 y 1171844; Proyecto de Investigación e Innovación (PII) 2018 de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Proyecto FIOUCH 17/020 de la Facultad de Odontología, CONICYT-FONDAP 15130011.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a todas las personas que de alguna u otra forma me acompañaron/soportaron durante el desarrollo de esta tesis.

A mis jefes, el Dr. Sergio Álvarez y a la Dr. Denisse Bravo por tenerme la confianza para realizar este trabajo, a pesar del desafío que implicó realizar esta investigación desde cero. Gracias por la paciencia y por el apoyo todos estos años, y gracias por compartirme espacios y permitirme conocer personas geniales que me ayudaron en lo que necesitaba, incluso si no lo pedía. Si no fuera por ustedes, los siguientes párrafos no serían lo mismo.

Gracias también a mi tercer jefe (no oficial), Dr. Carlos Santiviago, por su ayuda, por revisar las tonteras que escribí y por aportar al desarrollo de este trabajo.

Quiero agradecer a mi familia, son mis primeros profesores, a mis hermanos Lucía, Alfredo y Verónica, y toda su descendencia de monos (Vannia, Cony, Cristóbal, Florencia, Isidora, Almendra y Sebastián) por enseñarme paciencia a lo largo de todos estos años y por aguantar mi mal humor en este calbario. A mi abuela Aída y mi tía Domi que me cuidaron cuando pequeño, a mis primos y tíos.

Agradezco infinitamente a mis padres por darme la oportunidad de ver el mundo con otros ojos. A mi padre por enseñarme lo entretenido de desarmar las cosas (como mis juguetes o las bacterias) y a mi madre por cultivar mi amor a los seres vivos (y a la educación) con los libros, plantas y animales con los que me crió. No me atrevería a decir que fue una mezcla perfecta, pero funcionó. Creo.

Debo agradecer también a mis amistades más antiguas, mis Tejedoras, Marie, María, Yaritza, Ángela y Vanessa, por siempre ofrecerme espacios de recreación y desconexión, por enseñarme el lado humanista/artístico y hacerme (o tratar) un ser humano más íntegro. Especial mención para Paola, mi colega, la tejedora con la que puedo descargar penas científicas y que puede entender

de lo que me estoy quejando. Gracias chiquillas por más de 10 años de risas y apañe.

Agradezco también a las personas que conocí en pregrado, que terminaron por convertirse en amigos. A Cris, Gonzalo, Renata y Javiera (Kapi), no tengo palabras para expresar lo mucho que los quiero, a pesar de la distancia agradezco haberlos conocido. A Lía, por ser un ancla zen a toda mi ira. A Claudia, Mauricio, Gabriela y Leslie, gracias por cambiarme dulces por masajes, por las risotadas que se escuchaban en todo el pasillo y por las largas conversaciones en los tiempos muertos o no tan muertos de trabajo. A Checha por acompañarme en la facultad de Ciencias a la hora de almuerzo y por el tremendo apoyo que ella y Camila me dieron para terminar este trabajo en el laboratorio de la profesora Margarita Carú y Julieta Orlando, y por retarme para que acabe rápido.

Quiero agradecer a las personas que encontré en los tiempos un poco más oscuros de esta tesis, a las maravillosas personas que encontré en el bar, Natalia, Gordon, Belén, Xivo, Gustavo, Carlitos y Andrés, gracias por esos gratos momentos de trabajo, por tomar chela o tragos en una plaza a las 4 AM y por enseñarme otro mundo que no conocía. Agradecerle a mi jefecita Cony, por acompañar y permitir todo lo anterior, gracias por tanto y por los memes de gatos.

Gracias a Maca, a la profesora Rosalba y a Andrés por aceptarme en este nuevo lab, por darme la posibilidad de aprender un montón de cosas nuevas. Gracias también a los niños del lab, especialmente a Matías, Daniel, Marcelo y Sofía por la compañía, las risas, los helados y los dibujos de mí enojado y gruñendo. Y a Valentina, gracias por responder todas mis dudas y por ser una persona impresionantemente amable, a pesar de compartir mi odio.

Finalmente, no puedo dejar de mencionar a los laboratorios (y sus personas) que me acogieron y que le dieron pies a esta tesis (y varios otros órganos).

Al lab de microbiología oral, a Carmen, Vicky, Dani, Jime, Darnita, y Tofito. Gracias por la amabilidad y por la buena disposición, gracias por hacerme sentir

que hubiera trabajo allí por años (cuando estaba empezando la tesis). Gracias Vicky por todo el apañe estos años y por todo el cariño que me regalaste. Gracias Darnita por todo el apoyo que me diste, por siempre estar dispuesta a ayudarme y hacerme más fácil el trabajo. Gracias Tofito por ayudarme con experimentos, por sacrificar tu tiempo para que este pobre ser pudiera ser un profesional.

Al lab de micro, no tengo palabras para agradecerle todos estos años. A Lindo Precioso por su amabilidad. A Marce, Morgan, Ítalo, Bayron, Jimmy y Negro, gracias por las risas, las conversaciones, las anécdotas, las historias, por los almuerzos llenos de risa y por las salidas a chanclear. Gracias a los niños de unidad (el ejercito rojo, mención honrosa a Cony Marchant) que me sirvieron de práctica para enseñar. A Cami por ser un Golden Retriever, casi como una hermana menor y por continuar (o empezar a hacerlo) mi legado de odio. A Chinchí, por ser irritablemente amable, es una suerte tenerte en Ciencias de vez en cuando. A Andrea por ser adorable y tener siempre buena disposición con todos. A Bea por compartir todos los momentos de desolación y angustia que produjo este trabajo, al final igual se pudo y se acabó. A Pipe y a Fernando, por ser los maestros del LPS y por enseñarme los fundamentos de este trabajo, esta tesis es su culpa. El mejor lab del mundo.

Quiero agradecer especialmente a Kamo y a Pali, mis otras madres y jefas no oficiales, sin duda las personas de las que más he aprendido estos últimos años dentro y fuera del lab, ejemplos de personas a seguir. Infinitas gracias por todo el apoyo/ayuda/auxilio/arrimo. Muchísimas gracias, no tengo palabras para expresar lo mucho que las aprecio.

Para finalizar, me gustaría agradecer de forma simbólica a todas las personas que me han enseñado, profesores, amigos y conocidos. Gracias por compartir su visión del mundo conmigo.

Presentaciones y Congresos

Presentaciones en congresos:

- Paulina Fernández, Camila Espinoza, Andrea Avilés, **Héctor Garcias-Papayani**, Jaime Ortega, Carlos A. Santiviago, Sergio A. Álvarez. "La expresión de genes involucrados en la modificación del lípido A de *Salmonella* Enteritidis es regulada directamente por ArcA en respuesta a la disponibilidad de oxígeno". XLI Congreso Chileno de Microbiología, 5 al 8 de noviembre, 2019, Hotel Enjoy, Puerto Varas, Chile.

- Paulina Fernández, Felipe Velásquez, **Héctor Garcias-Papayani**, Camila Espinoza, Jaime Ortega, Fernando Amaya, Carlos A. Santiviago and Sergio A. Álvarez. "FNR regulates lipid A modification in *Salmonella* Enteritidis by controlling the expression of genes involved in this process in response to oxygen availability". XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM 2018), 13 al 16 de noviembre, 2018, Santiago, Chile.

- Fernando Amaya, Paulina Fernández, **Héctor Garcias-Papayani**, Felipe Velásquez, Chris Bowden, Jyotsana Gupta, Marissa Talamantes, Lydia Bogomolnaya, Helene Andrews-Polymenis, Carlos A. Santiviago and Sergio A. Álvarez. "Role of lipid A hydroxylation levels in *Salmonella* Enteritidis virulence in the murine host". XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM 2018), 13 al 16 de noviembre, 2018, Santiago, Chile.

- Paulina Fernández, Felipe Velásquez, Jaime Ortega, **Héctor Garcias-Papayani**, Fernando Amaya, Cecilia A. Silva-Valenzuela, Carlos A. Santiviago and Sergio A. Álvarez. "FNR and ArcA regulate lipid A hydroxylation in *Salmonella* Enteritidis by controlling *lpxO* expression in response to oxygen availability". XXXIX Congreso Chileno de Microbiología, 14 al 17 de noviembre, 2017, Hotel Club la Serena, La Serena, Chile.

- Fernando Amaya, Paulina Fernández, **Héctor Garcias-Papayani**, Felipe Velásquez, Chris Bowden, Jyotsana Gupta, Marissa Talamantes, Lydia Bogomolnaya, Helene Andrews-Polymenis, Carlos A. Santiviago and Sergio A. Álvarez. "The hydroxylation level of lipid A is critical for the interaction of *Salmonella* Enteritidis with murine macrophages and its ability to colonize the murine host". XXXIX Congreso Chileno de Microbiología, 14 al 17 de noviembre, 2017, Hotel Club la Serena, La Serena, Chile.

- **Héctor Garcias-Papayani**, Paulina Fernández, Fernando Amaya, Carlos A. Santiviago, Denisse Bravo and Sergio A. Álvarez. "Impact of iron availability and medium acidity on lipid A structure in *Helicobacter pylori*". XXXIX Congreso Chileno de Microbiología, 14 al 17 de noviembre, 2017, Hotel Club la Serena, La Serena, Chile.

- Paulina Fernández, Felipe Velásquez, Jaime Ortega, Cecilia A. Silva-

Valenzuela, **Héctor Garcias-Papayani**, Fernando Amaya, Carlos A. Santiviago and Sergio A. Álvarez. "Changes in Lipid A hydroxylation and *lpxO* expression are regulated by the global regulator FNR in *Salmonella* Enteritidis". 7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017), 9 al 13 de julio, 2017, Valencia, España.

- Paulina Fernández, Cecilia A. Silva, Felipe Velásquez, Fernando Amaya, **Héctor Garcias-Papayani**, Carlos A. Santiviago y Sergio A. Álvarez. "La expresión de los determinantes del largo de cadena del antígeno O es regulada por FNR y ArcA en *Salmonella* Enteritidis". XXXVIII Congreso Chileno de Microbiología, 22 al 25 de noviembre, 2016, Hotel Villa del Río, Valdivia, Chile.

- **Héctor Garcias-Papayani**, Paulina Fernández, Carlos A. Santiviago, Denisse Bravo y Sergio A Álvarez. "Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la estructura del lipopolisacárido de *Helicobacter pylori*". XXXVIII Congreso Chileno de Microbiología, 22 al 25 de noviembre, 2016, Hotel Villa del Río, Valdivia, Chile.

- Paulina Fernández, Felipe Velásquez, Cecilia A. Silva, **Héctor Garcias-Papayani**, Fernando Amaya, Carlos A. Santiviago y Sergio A. Álvarez. "El factor transcripcional ArcA participa en la regulación oxígeno-dependiente de las modificaciones covalentes del lípido A en *Salmonella* Enteritidis". XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM 2016), 26 al 30 de septiembre, 2016, Rosario, Argentina.

- Paulina Fernández, Cecilia A. Silva, Felipe Velásquez, Fernando Amaya, **Héctor Garcias-Papayani**, Carlos A. Santiviago and Sergio A. Álvarez. "Changes in expression of genes involved in O-antigen chain-length regulation and lipid A covalent modification are regulated by FNR in *Salmonella* Enteritidis". ASM Microbe 2016, 16 al 20 de junio, Boston, Massachusetts, USA.

- Paulina Fernández, Cecilia A. Silva, Felipe Velásquez, **Héctor Garcias-Papayani**, Carlos A. Santiviago y Sergio A. Álvarez. "Participación de FNR en la regulación de la expresión de genes involucrados en la modificación covalente del lípido A-core en *Salmonella* Enteritidis". XXXVII Congreso Chileno de Microbiología, 1 al 4 de diciembre, 2015, Hotel Club la Serena, La Serena, Chile.

- Cecilia A. Silva, **Héctor Garcias-Papayani**, Felipe Velásquez, Carlos A. Santiviago and Sergio A. Álvarez. "Transcriptional Factors ArcA and Fnr Regulate the Chain Length Distribution of the O-Antigen in *Salmonella* Enteritidis in Response to Oxygen Availability". 115th ASM General Meeting, 30 de mayo al 2 de junio, 2015, New Orleans, Louisiana, USA.

- Paula Bustamante, **Héctor Garcias-Papayani**, Oriana Salazar, Omar Orellana. "A riboswitch regulates the expression of a Tyrosyl-tRNA synthetase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*". XXXV Congreso Chileno de Microbiología, 26 al 30 de noviembre, 2013, Hotel Marbella, Valparaíso, Chile.

Artículos Publicados

- Paulina A. Fernández, Felipe Velásquez, **Héctor Garcias-Papayani**, Fernando A. Amaya, Jaime Ortega, Sebastián Gómez, Carlos A. Santiviago and Sergio A. Álvarez*. (2018). "Fnr and ArcA regulate lipid A hydroxylation in Salmonella Enteritidis by controlling lpxO expression in response to oxygen availability". Front. Microbiol. 9:1220.

- Cecilia A. Silva-Valenzuela, Felipe Velásquez, Johany Peñailillo, **Héctor Garcias-Papayani**, Paulina Fernández, Pía Tobar, Inés Contreras, Carlos A. Santiviago and Sergio A. Álvarez*. (2016). "O-antigen chain-length distribution in Salmonella enterica serovar Enteritidis is regulated by oxygen availability". Biochem. Biophys. Res. Commun. 477(4):563-567.

- Paula Bustamante*, Oriana Salazar, **Héctor Garcias-Papayani**, Pamela Álamos, and Omar Orellana. (2016). "A tyrosine- dependent riboswitch controls the expression of a tyrosyl-tRNA synthetase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*". Croat. Chem. Acta. 89(2): 189–195.

Índice General

| | |
|---|-------------|
| Índice General | X |
| Índice de Tablas y Figuras | XII |
| Abreviaturas | XIII |
| Resumen | XV |
| Summary | XVII |
| 1.- Introducción | 1 |
| 1.1.- Generalidades sobre <i>Helicobacter pylori</i> | 1 |
| 1.2.- Ciclo infectivo de <i>H. pylori</i> | 2 |
| 1.3.- Factores de Virulencia de <i>H. pylori</i> | 4 |
| 1.4.- El lipopolisacárido de <i>H. pylori</i> | 5 |
| 1.5.- Modificaciones del lípido A de <i>H. pylori</i> | 9 |
| 1.6.- Influencia del medio en la expresión de los factores de virulencia de <i>H. pylori</i> | 12 |
| 1.6.1.- Importancia del pH en la interacción de <i>H. pylori</i> con su hospedero | 12 |
| 1.6.2.- Importancia del hierro en la infección por <i>H. pylori</i> | 14 |
| 2.- Hipótesis | 17 |
| 3.- Objetivo General | 17 |
| 4.- Objetivos Específicos | 17 |
| 5.- Materiales y Métodos | 18 |
| 5.1.- Reactivos | 18 |
| 5.2.- Cepas bacterianas | 20 |
| 5.3.- Plasmidios | 20 |
| 5.4.- Oligonucleótidos | 20 |
| 5.5.- Medios y condiciones de cultivo bacteriano | 21 |
| 5.6.- Extracción de LPS y purificación de lípido A | 23 |
| 5.7.- Análisis de muestras de LPS mediante electroforesis | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 5.8.- Análisis de muestras de lípido A mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) | 27 |
| 5.9.- Determinación de la expresión de IL-8 en cultivos celulares estimulados con LPS..... | 28 |
| 5.9.1.- Línea celular..... | 28 |
| 5.9.2.- Cultivo de línea celular | 28 |
| 5.9.3.- Estimulación de células AGS con LPS | 29 |
| 5.9.4.- Extracción de RNA total | 30 |
| 5.9.5.- Obtención de cDNA | 31 |
| 5.9.6.- Generación de la curva estándar | 32 |
| 5.9.7.- Cuantificación de mRNA | 33 |
| 6.- Resultados | 35 |
| 6.1.- Análisis bioinformático..... | 35 |
| 6.1.1.- Análisis bioinformático del efecto de la delección de <i>arsS</i> sobre la expresión de genes codificadores de enzimas modificadoras del lípido A | 35 |
| 6.1.2.- Búsqueda de sitios de unión a Fur en promotores de genes productores de enzimas modificadoras de lípido A. | 38 |
| 6.2.- Efecto de la acidez y la disponibilidad de hierro sobre la abundancia relativa de especies de lípido A de <i>H. pylori</i> | 41 |
| 6.3.- Efecto del pH sobre el grado de polimerización del LPS de <i>H. pylori</i> ... | 45 |
| 6.4.- Efecto de LPS de <i>H. pylori</i> obtenido bajo distintas condiciones de cultivo sobre la expresión de mediadores de inflamación..... | 47 |
| 7.- Discusión | 51 |
| 8.- Conclusiones | 61 |
| 9.- Referencias | 62 |
| 10.- Anexo..... | 69 |

Índice de Tablas y Figuras

TABLAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabla 1. | Oligonucleótidos utilizados en este trabajo | 20 |
| Tabla 2. | Volúmenes utilizados para la elaboración de geles de poliacrilamida | 26 |
| Tabla 3. | Valores de la expresión de transcrito de genes relacionados con modificaciones del lípido A de <i>H. pylori</i> | 37 |
| Tabla 4. | Resultados de la predicción de sitios de unión para Fur en promotores de genes referencia. | 40 |
| Tabla 5. | Resultados de la predicción de sitios de unión para Fur en promotores de genes relacionados con modificaciones covalentes del lípido A de <i>H. pylori</i> | 42 |

FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 1. | Estructura del lipopolisacárido (LPS) de <i>Helicobacter pylori</i> | 6 |
| Figura 2. | Estructura del lípido A de <i>H. pylori</i> | 8 |
| Figura 3. | Diagrama de modificaciones del lípido A de <i>H. pylori</i> | 11 |
| Figura 4. | Esquema de purificación de lípido A de <i>H. pylori</i> | 24 |
| Figura 5. | Esquema de ensayo de estimulación con LPS de <i>H. pylori</i> | 30 |
| Figura 6. | <i>Heatmap</i> de la expresión genes relacionados con respuesta a acidez en <i>H. pylori</i> | 36 |
| Figura 7. | Secuencias consenso para sitios de unión a Fur | 39 |
| Figura 8. | Efecto de la disponibilidad de hierro sobre la abundancia de especies de lípido A de <i>H. pylori</i> | 43 |
| Figura 9. | Efectos de la acidez sobre la abundancia de especies de lípido A de <i>H. pylori</i> | 45 |
| Figura 10. | Perfil electroforético de LPS de <i>H. pylori</i> cultivado a pH 5 y pH 7 | 46 |
| Figura 11. | Efecto de distintos LPS y tiempos de estimulación en la transcripción de IL-8 en células AGS | 49 |

Abreviaturas

| | |
|-----------------------|---|
| °C | Grados Celsius |
| μL | Microlitro |
| μM | Micromolar |
| AgO | Antígeno O |
| Amp | Ampicilina |
| Amp ^R | Resistencia/resiste a Ampicilina |
| APS | Persulfato de amonio |
| ArsRS | Regulador y Sensor del Sistema de respuesta a la acidez |
| bp | Pares de bases |
| CH ₃ COONa | Acetato de sodio |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| DHB | Ácido 2,5-dihidroxibenzóico |
| DO ₆₀₀ | Densidad óptica a 600 nm |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| cDNA | DNA complementario |
| dNTPs | Desoxirribonucleótidos |
| EDTA | Ácido etilendiamintetraacético |
| EtOH | Etanol |
| Fur | Regulador de la entrada de hierro |
| g | Gramo |
| GIAcNAc | N-acetilglucosamina |
| h | Horas |
| IL-1β | Interleuquina 1β |
| IL-8 | Interleuquina 8 |
| IL-17 | Interleuquina 17 |
| kb | Kilobase |

| | |
|---------------|--|
| KDO | Ácido 3-deoxi-D-mano-octulosónico |
| L | Litro |
| LB | Caldo lisógeno |
| LPS | Lipopolisacárido |
| M | Concentración Molar |
| MALDI | Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz |
| MD-2 | Factor de diferenciación mieloide 2 |
| m/z | Relación masa-carga |
| min | Minutos |
| N | Concentración Normal |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| qRT-PCR | PCR cuantitativo en tiempo real |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida |
| TEMED | Tetrametiletilendiamina |
| TLR | Receptor tipo <i>Toll</i> |
| TOF | Tiempo de vuelo |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral α |
| TSA | Agar soya tripticasa |
| x g | Aceleración gravitacional |

Resumen

Helicobacter pylori es una bacteria Gram-negativo del grupo de las epsilonproteobacterias y uno de los pocos microorganismos capaces de colonizar el epitelio gástrico de los seres humanos, siendo el único patógeno asociado al desarrollo de úlceras pépticas y carcinomas gástricos. Se estima que su prevalencia en la población mundial es de alrededor del 50%, esto debido al desarrollo de múltiples estrategias y mecanismos que le permiten la evasión del sistema inmune del hospedero.

Uno de los principales factores de virulencia de *H. pylori* es su lipopolisacárido (LPS), el mayor constituyente de la cara externa de su membrana externa. La porción de ésta molécula que la ancla a la membrana se denomina lípido A, y se caracteriza por ser el componente tóxico del LPS. Este glicolípido puede presentar modificaciones covalentes que alteran su bioactividad. En el caso de esta bacteria, el lípido A se distingue por ser una estructura altamente modificada que le confiere una baja inmunoreactividad al compararla con la misma molécula de enterobacterias.

Hasta hace poco se consideraba que el lípido A de *H. pylori* presentaba una serie de modificaciones de carácter constitutivo, pero investigaciones recientes han logrado demostrar que existen algunas señales capaces de alterar la distribución de especies de lípido A. Entre las señales ambientales más importantes que el patógeno es capaz de detectar se encuentran: acidez, presencia de metales divalentes y algunos metabolitos del hospedero. Estas señales pueden ser vinculadas a la regulación de la virulencia y a la adaptación a las condiciones ambientales en las que se encuentra.

En esta tesis se analizó el efecto de la acidez y la disponibilidad de hierro como factores ambientales determinantes en la distribución de especies de lípido A de *H. pylori*, debido a que son señales altamente vinculadas con la regulación de otros factores de virulencia como toxinas y algunos genes involucrados en la ruta biosintética del LPS de esta bacteria.

Este trabajo incluyó un análisis en profundidad de *arrays* transcriptómicos que evidenció la relación entre el sensor de acidez (ArsS) y la expresión de genes que codifican enzimas modificadoras del lípido A. Además, se realizó una predicción de sitios de unión a Fur para apoyar la propuesta de que el hierro es un factor ambiental involucrado en la modificación del lípido A.

También se evaluó la influencia de estos factores ambientales sobre las modificaciones del LPS de manera experimental, utilizando espectrometría de masas de lípido A y análisis de perfiles electroforéticos de LPS. Los espectros de masa indicaron que la disponibilidad de hierro provoca cambios menores en la distribución de especies del lípido A. En cambio, los espectros de las muestras obtenidas desde bacterias cultivadas con distinto pH muestran cambios más drásticos en la proporción de especies, siendo el más notorio un cambio en la especie mayoritaria detectada a pH 5 y 7. Este fenómeno no ha sido descrito para *H. pylori* y podría indicar un posible cambio en la actividad proinflamatoria del LPS de bacterias crecidas a estos pH. Por su parte, el análisis del perfil electroforético de estas muestras indicó que el LPS obtenido de *H. pylori* cuando se cultiva a pH 7 presenta diferencias en la intensidad de las bandas de movilidad intermedia respecto al LPS obtenido de bacterias cultivadas a pH 5.

Finalmente, el efecto del LPS extraído desde *H. pylori* cultivado a distinto pH no muestra cambios significativos en la expresión de IL-8 en células AGS.

En conclusión, los resultados de esta tesis indican que existe una regulación ambiental de las modificaciones del lípido A de *H. pylori*, pero estas modificaciones producidas por la alteración del pH del medio de cultivo no afectarían las propiedades proinflamatorias de la molécula en células gástricas.

Summary

“Effect of pH and iron availability on *Helicobacter pylori* lipid A modifications and their impact on immunogenicity in AGS epithelial cells

Helicobacter pylori is a Gram-negative bacterium belonging to the epsilonproteobacteria class, and one of the few microorganisms able of colonizing the gastric human epithelium, being the only pathogen associated with the development of peptic ulcers and gastric carcinomas. It is estimated that its prevalence is about 50% worldwide, due in part to the development of multiple strategies and mechanisms that allow it to evade the host immune system.

One of the main *H. pylori* virulence factors is its lipopolysaccharide (LPS), the major component of the outer leaflet of its outer membrane. The portion of this molecule that anchors it to the membrane is called lipid A, and is characterized for being the toxic component of LPS. This glycolipid may exhibit covalent modifications that alter its bioactivity. In the case of *H. pylori*, the lipid A is distinguished for being a highly modified structure that confers it a low immunoreactivity when compared to the same molecule from enterobacteria.

Until recently, it was considered that the lipid A of *H. pylori* exhibited several modifications of constitutive character, however recent publications have demonstrated that there are some environmental cues able of modify the distribution of lipid A species. Among the most important environmental signals recognized by this pathogen are: the acidity, the presence of divalent metals and some host metabolites. These signals can be associated to the regulation of the virulence and the adaptation to environmental conditions.

In this thesis the effect of acidity and iron availability as determinant environmental cues in the distribution of lipid A species of *H. pylori* was analyzed, because they are signals highly relevant to the regulation of other virulence factors, such as toxins production and expression of several genes involved in the biosynthetic route of the LPS in this bacterium.

This work included an in-deep analysis of transcriptomic arrays that showed the relationship between the acidity sensor protein (ArsS) and the expression of genes encoding lipid A modifying enzymes. Furthermore, a prediction of Fur-binding sites was made to support the proposal that iron is an environmental cue involved in the modification of lipid A.

The influence of this environmental factors was also evaluated experimentally, using lipid A mass spectrometry and analysis of electrophoretic profiles of LPS. The mass spectra indicated that the iron availability causes minor changes in the distribution of lipid A distribution. In contrast, the spectra of the samples obtained from bacteria grown at different pH show more drastic changes in the proportion of the species, being the most significant a change in the majority species detected at pH 5 and 7. This phenomenon has not been described in *H. pylori* and could indicate a possible change in the proinflammatory activity of the LPS of bacteria grown under these pHs. On the other hand, the analysis of the electrophoretic profile of these samples indicated that the LPS obtained from *H. pylori* grown at pH 7 exhibits differences in the intensity of the intermedium mobility bands compared to the LPS obtained from bacteria grown at pH 5.

Finally, the effect of the LPS extracted from *H. pylori* grown at different pH does not show significant changes in the expression of IL-8 in AGS cells.

In conclusion, the results of this thesis indicate that there is an environmental regulation of the lipid A modifications of *H. pylori*, but these modifications produced by the alteration of the pH on the culture medium does not affect the proinflammatory properties of the molecule in gastric cells.

1.- Introducción

1.1.- Generalidades sobre *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori es una bacteria Gram-negativo, neutrófila y con forma de espiral, perteneciente a la familia de las ϵ -proteobacterias. *H. pylori* es un patógeno capaz de colonizar el estómago humano e interactuar con la microbiota gástrica normal, provocando cambios que influyen en el desarrollo del cáncer gástrico (Chouhan et al., 2019; Iizasa, Ishihara, Richardo, Kanehiro, & Yoshiyama, 2015; Nardone & Compare, 2015). Esta bacteria es la única que ha sido asociada a la aparición y desarrollo de úlceras pépticas recurrentes y carcinomas gástricos (Marshall & Warren, 1984; Parsonnet et al., 1991). Se estima que alrededor de un 50% de la población mundial se encuentra colonizada por esta bacteria, aunque las proporciones de personas infectadas varían de acuerdo a las condiciones sociales, económicas y culturales. Se estima que el porcentaje de infección de la población chilena varía entre un 60% a un 79% (Almeida Cunha et al., 2003; Coppelli et al., 2019; Gasbarrini et al., 1995; Goh, Peh, Wong, Parasakthi, & Puthuchear, 1990; Parra-Sepulveda, Merino, Saez-Carrillo, Gonzalez, & Garcia-Cancino, 2019; Pateraki et al., 1990).

Comúnmente, la primera colonización por *H. pylori* ocurre durante la niñez y puede proceder como una infección persistente por décadas al no ser tratada. Cuando esta infección se produce durante la adultez puede producir síntomas que abarcan gastritis con hipoclorhidria, náuseas y dolor epigástrico. El principal factor que influye en el desarrollo de enfermedades como gastritis crónica o adenocarcinoma se debe a la inflamación prolongada producto de la persistencia

del patógeno (Atherton, 2006; Graham, Alpert, Smith, & Yoshimura, 1988; Morris & Nicholson, 1987).

1.2.- Ciclo infeccioso de *H. pylori*.

El ciclo infeccioso de *H. pylori* aún no está completamente dilucidado, puesto que existe un estrecho rango de hospederos, lo que ha limitado el uso de modelos animales de experimentación fidedignos. De hecho, sólo se ha podido aislar este microorganismo desde humanos, algunos primates y, en casos excepcionales, desde algunos animales domésticos (Fox, 1995). Es por esto que se propone que la transmisión directa de un humano a otro es la vía más probable para la adquisición de la bacteria, ya sea por vía oral o fecal-oral, puesto que se ha detectado la presencia del patógeno en secreciones tales como saliva, vómito, reflujo gástrico y heces (Brown et al., 2001; Fox, 1995; Kabir, 2004; Parsonnet, Shmueli, & Haggerty, 1999). Otra posible fuente de transmisión es por medio de la ingesta de alimentos contaminados, tales como leche, pollo y lechuga, puesto que esta bacteria es capaz de sobrevivir, pero no replicarse, en condiciones de refrigeración (Poms & Tatini, 2001).

Una vez que la bacteria alcanza el estómago se enfrenta a un pH extremadamente ácido. Bajo esta nueva condición se altera la expresión de aproximadamente 300 genes, lo que contribuye a la adaptación del patógeno (Pflock, Finsterer, et al., 2006). Dentro de los elementos regulados se encuentran los genes que codifican las proteínas del complejo ureasa (*ureA*, *ureB* y *ureI*), las cuales catalizan la hidrólisis de urea para generar amoníaco. Esto genera un microambiente alrededor de la bacteria con un pH cercano a 7, manteniendo el

pH citoplasmático dentro de niveles normales (Weeks, Eskandari, Scott, & Sachs, 2000; Wen et al., 2003).

Habiendo sobrevivido la barrera ácida del estómago, *H. pylori* penetra la mucosa gástrica gracias a su morfología espiral y la presencia de su flagelo polar. Para esto, aprovecha el gradiente de pH y otras moléculas (como urea) como atrayente hacia el epitelio gástrico (Croxen, Sisson, Melano, & Hoffman, 2006; Eaton, Morgan, & Krakowka, 1992; Mizote, Yoshiyama, & Nakazawa, 1997).

Finalmente, cuando la bacteria se adhiere a la cara apical de las células secretoras del mucus, se gatilla la expresión de diversos genes, dentro de los que se encuentran factores de virulencia. Así, la producción de proteínas bacterianas gatilla una respuesta inflamatoria tanto local como sistémica, pero que es incapaz de eliminar al patógeno, lo que, eventualmente promueve la aparición de los síntomas característicos de las patologías producidas por *H. pylori* (Atherton, 2006; N. Kim et al., 2004).

La respuesta inflamatoria del hospedero frente a esta infección se caracteriza por la infiltración de neutrófilos y otros leucocitos a la mucosa, además de una aclorhidria transitoria. Esta respuesta está comandada por la acción de factores bacterianos reconocidos por distintos componentes del tejido, siendo los más destacados las células del epitelio, macrófagos y neutrófilos. La activación del epitelio y de los macrófagos se caracteriza por la alta producción de interleuquina-8 (IL-8), que a la vez funciona como sustancia quimioatrayente de neutrófilos. Esto, sumado a la acción de componentes bacterianos, genera la secreción de citoquinas inflamatorias como IL-1 β , TNF- α e IL-8 (Crabtree, 1996a,

1996b; Crabtree & Lindley, 1994). Más aún, la liberación de IL-8 por parte de las células del epitelio favorece la activación y la quimiotaxis de otras células del sistema inmune hacia el sitio de la infección, iniciando la respuesta del sistema adaptativo, en donde las células T comienzan a liberar una gran cantidad de citoquinas proinflamatorias como Interferon- γ e IL-17, aumentando la migración de células de la respuesta innata a la mucosa gástrica (Agnihotri et al., 1998; Algood, Gallo-Romero, Wilson, Peek, & Cover, 2007; Ishihara et al., 2004; Karttunen, Karttunen, Ekre, & MacDonald, 1995; Mizuno et al., 2005).

Como se mencionó, a pesar de toda la respuesta inflamatoria que se produce, el patógeno no es eliminado del organismo y puede persistir por décadas o de por vida si es que no se realiza un tratamiento médico (Algood & Cover, 2006; Atherton, 2006). Sin embargo, sólo el 15% de las personas infectadas desarrollan úlceras pépticas, y entre el 0,5% y 2% desencadenan en adenocarcinomas. Este desenlace depende de tres factores: (I) la virulencia de la cepa de *H. pylori* infectante y de su capacidad de estimular la producción de citoquinas o dañar directamente el epitelio; (II) el tipo y duración de la respuesta inmune producida por el hospedero; y (III) la presencia de algunos factores moduladores o ambientales, tales como la dieta y algunos hábitos, como fumar (Atherton, 2006).

1.3.- Factores de Virulencia de *H. pylori*.

Existen múltiples factores asociados a la virulencia de *H. pylori* y al desarrollo de la inflamación. La mayoría de ellos corresponden a proteínas con actividades tóxicas, como la toxina vacuolizante (VacA) o la proteína asociada a

citotoxina (CagA). Adicionalmente, posee proteínas que le ayudan a sobrevivir, como el complejo ureasa, o a colonizar, como la proteína activadora de neutrófilos (HP-NAP) (Crabtree, 1996a; Satin et al., 2000). No obstante, *H. pylori* ha evolucionado de tal forma que desarrolló estrategias que le permiten evadir y modular la respuesta inmune del hospedero, lo cual constituye el elemento principal de la persistencia de la infección producida por esta bacteria. Dentro de las más notables estrategias adquiridas, está la modificación de su lipopolisacárido (LPS), una de las estructuras más inmunoestimulantes descritas para bacterias Gram-negativo.

1.4.- El lipopolisacárido de *H. pylori*.

El LPS es un glicolípido que se encuentra en la cara externa de la membrana externa de bacterias Gram-negativo. Se trata de una molécula compleja en la que se puede distinguir tres dominios: el lípido A, la región *core* y el antígeno O (AgO) (Fig. 1). El lípido A representa el componente hidrofóbico que permite el anclaje del LPS a la membrana externa del microorganismo, y se ha descrito como la región tóxica o bioactiva de la molécula, capaz de desencadenar la respuesta inmune innata al ser reconocido por el complejo entre el receptores tipo Toll (TLR) y el Factor de Diferenciación Mieloide 2(MD-2) (Park & Lee, 2013), por lo que también se le denomina endotoxina. La región del *core* corresponde a un oligosacárido de heptosas (*core* interno) y hexosas (*core* externo), que sirve como sitio de unión para la cadena del AgO. Este último corresponde a un polímero de un oligosacárido, que en el caso de *H. pylori* está

constituido por tres azúcares (Fig. 1), y que se proyecta hacia el exterior de la bacteria (Reeves et al., 1996; Rietschel et al., 1994).

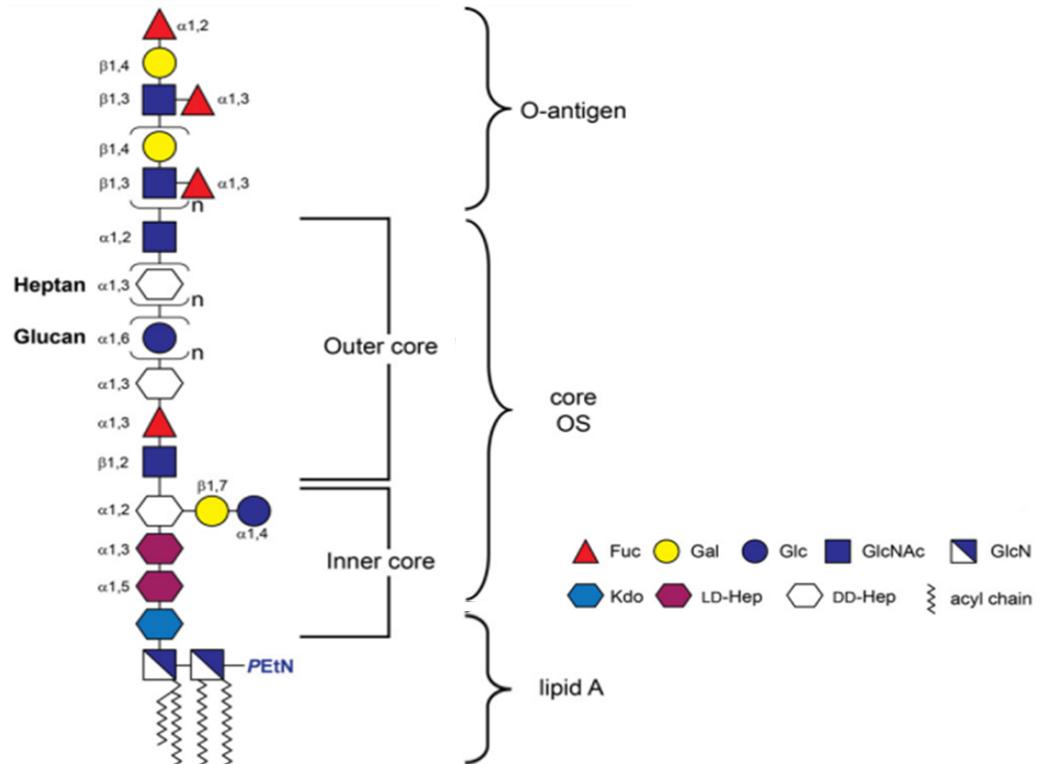


Figura 1. Estructura del lipopolisacárido (LPS) de *Helicobacter pylori*. Se muestran los distintos dominios: Antígeno O, región *core* (interno y externo) y lípido A. Además, se indica el tipo de enlace glicosídico. A la derecha se indican los distintos azúcares y lípidos que conforman el LPS de *H. pylori*. PEtN es la abreviación de fosfoetanolamina (Li et al., 2016).

Este glicolípido permite la mantención de la integridad estructural de la membrana externa y al interactuar con proteínas y cationes divalentes, previene la acción de algunos antibióticos y detergentes. Al mismo tiempo, el LPS funciona como la primera y principal interfase de interacción entre la bacteria y su entorno, relacionándose con elementos moleculares y celulares que se encuentran tanto en el ambiente como en un hospedero (Raetz et al., 1991; Raetz & Whitfield,

2002). En el caso de *H. pylori*, el LPS contribuye a uno de los principales mecanismos de mimetismo molecular, ya que el patógeno realiza modificaciones en la composición y distribución de los azúcares del AgO, asimilándolo a los antígenos de Lewis presentes en células eucariontes (Rubin & Trent, 2013).

Por su parte, el lípido A de *H. pylori* posee una estructura inusual, presentando dos formas estructuralmente distinguibles, una minoritaria y una mayoritaria (Fig. 2). Ambas presentan dos residuos de N-acetil-glucosamina (GlcNAc), unidos covalentemente por un enlace del tipo $\beta(1,6)$. En estos azúcares se pueden encontrar fosforilaciones tanto en el carbono 1 como en el 4' en el caso de la forma menos abundante, mientras que en la forma mayoritaria el carbono 4' se suele encontrar libre y el carbono 1' suele poseer una fosforilación o fosfoetanolaminación. Cabe destacar que este disacárido, tanto en la estructura mayoritaria como en la minoritaria, presenta un inusitado patrón de acilación respecto a la estructura canónica del lípido A (correspondiente al lípido A de *Escherichia coli* K-12 en la Fig. 2). En primer lugar, presentan cadenas de ácidos grasos inusualmente largos (entre 16 y 18 carbonos, a diferencia de las cadenas de 12 y 14 carbonos del lípido A de *E. coli*). Además, ambos tipos de lípido A se diferencian en la cantidad de cadenas presentes, ya que en la especie mayoritaria sólo se presentan 4 cadenas, mientras que la minoritaria posee 6 cadenas (Moran, Lindner, & Walsh, 1997; Muotiala, Helander, Pyhala, Kosunen, & Moran, 1992). Así, de acuerdo a ruta biosintética del lípido A de *H. pylori*, se ha demostrado que la especie minoritaria correspondería al lípido A sintetizado *de novo* por esta bacteria, sobre la cual actúan diversas enzimas

modificadoras que generan la especie mayoritaria (Moran et al., 1997). Estas modificaciones darían cuenta de la menor capacidad del lípido A de *H. pylori* para interactuar con elementos del sistema inmune y, consecuentemente, en la generación de la respuesta inflamatoria. De hecho, al comparar su capacidad de estimular la actividad mitogénica de células del bazo y su toxicidad en ratones sensibles a D-galactosamina, se observa que es mil veces menor y quinientas veces menor que la del lípido A hexaacilado de *Salmonella Typhimurium*, respectivamente (Muotiala et al., 1992). Por lo tanto, se ha hipotetizado que esta inusual y altamente modificada estructura del lípido A de *H. pylori* ha evolucionado de tal manera que contribuye a la persistencia del patógeno y favorece la mantención de la infección en la mucosa gástrica del hospedero (Li et al., 2016).

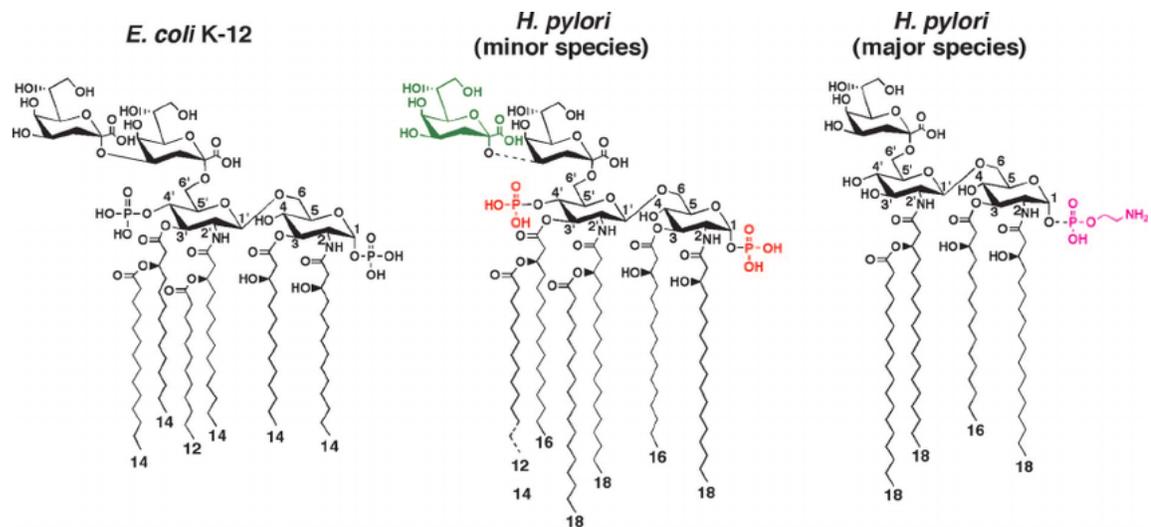


Figura 2. Estructura del lípido A de *H. pylori*. Comparación de las estructuras del lípido A de *Escherichia coli* (estructura canónica) y las formas minoritaria y mayoritaria del lípido A de *H. pylori*. Los números bajo las cadenas de acilos se refieren a la cantidad de carbonos de la cadena. En colores (verde, rojo y púrpura) se muestran los sustituyentes que modifican la estructura del lípido A (Kdo, grupos fosforilo y fosfoetanolamina, respectivamente) (C. M. Stead, Beasley, Cotter, & Trent, 2008).

1.5.- Modificaciones del lípido A de *H. pylori*

Como se mencionó, las modificaciones del lípido A otorgan ventajas adaptativas a las bacterias, como la disminución de la inmunogenicidad o del potencial inflamatorio de la molécula (Steimle, Autenrieth, & Frick, 2016). Entre las modificaciones más comunes se encuentran la adición de fosfoetanolamina o L-4-aminoarabinosa, las cuales reemplazan o neutralizan las cargas negativas provistas por los grupos fosforilos de este dominio, y modificaciones en el patrón de acilación (Raetz, Reynolds, Trent, & Bishop, 2007). Así, el LPS corresponde a una molécula con una estructura cuyo dinamismo contribuye a la adaptación de las bacterias Gram-negativo a su ambiente.

El dinamismo estructural del lípido A depende de la función de distintas enzimas. Estas modificaciones son específicas para cada organismo y en la mayoría de las ocasiones se producen por la inducción o represión de genes que codifican las enzimas modificadoras en respuesta a las condiciones ambientales, incluyendo el pH del medio, la presencia de cationes divalentes o incluso la presencia de agentes antimicrobianos, entre otros (Gibbons, Kalb, Cotter, & Raetz, 2005; Groisman, 2001; Raetz et al., 2007). La presencia de estas modificaciones confiere al LPS diferentes capacidades inmunogénicas al alterar la interacción de esta molécula con el complejo TLR-4/MD-2, llegando incluso al punto de funcionar como un antagonista de estos receptores (H. M. Kim et al., 2007; Kovach, Yee, Munford, Raetz, & Harlan, 1990; Scott, Oyler, Goodlett, & Ernst, 2017).

Las modificaciones del lípido A de *H. pylori* se producen mediante una acción enzimática de cinco pasos (Li et al., 2016; Tran, Stead, & Trent, 2005). Estos incluyen (Fig. 3):

- 1) Desfosforilación de la posición 1 del disacárido, producto de la acción de la enzima LpxE (Hp0021).
- 2) Fosfoetanolaminación de la posición 1 del disacárido, producto de la acción de la enzima EptA (Hp0022).
- 3) Remoción de un residuo de ácido 3-deoxi-D-mano-octulosónico (Kdo), producto de la acción del complejo Kdo hidrolasa KdoH1 y KdoH2 (Hp0579/Hp0580).
- 4) Desfosforilación del extremo 4' del disacárido, producto de la acción de la enzima LpxF (Hp1580).
- 5) Desacilación del residuo 3' del disacárido, producto de la acción enzimática de LpxR (Hp0694).

Se ha observado que bajo las condiciones de cultivo habitualmente usadas (que incluyen la adición de suero animal), la estructura del lípido A de *H. pylori* se encuentra siempre modificada, por lo que se propone que sus modificaciones son constitutivas y no dependen de factores ambientales que las regulen (C. M. Stead, Zhao, Raetz, & Trent, 2010). Sin embargo, existen evidencias que indican que *H. pylori* es capaz de regular estas modificaciones de acuerdo a algunas señales ambientales. Particularmente, se ha observado que el cultivo rutinario en Agar Campylobacter suplementado con suero de oveja genera bacterias resistentes a polimixina B, un antibiótico que produce la desestabilización de la

membrana, pero cuando se permite el crecimiento de este patógeno en medio Ham's F-12 sin suero fetal bovino, la bacteria se vuelve sensible (Testerman, Conn, Mobley, & McGee, 2006).

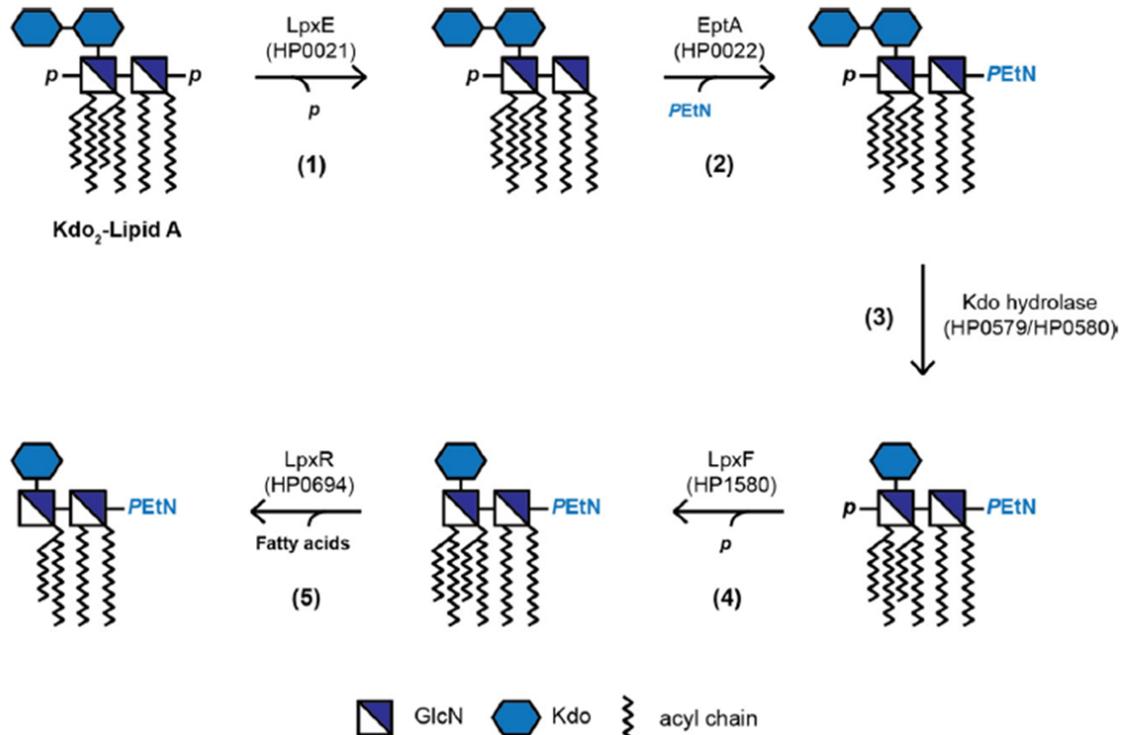


Figura 3. Diagrama de modificaciones del lípido A de *H. pylori*. Esquema de las modificaciones enzimáticas del lípido A de *H. pylori* realizadas a partir de la síntesis de novo del lípido A hexaacilado (Li et al., 2016).

Por otra parte, está demostrado que en presencia de calprotectina, un péptido antimicrobiano capaz de secuestrar hierro, manganeso y zinc, la distribución de las poblaciones del lípido A de *H. pylori* se modifica producto de un aumento de las especies de lípido A hexaaciladas y pentaaciladas, ambas conservando la posición 4' fosforilada. Esto es debido a que la presencia de este

quelante evita la acción de las enzimas LpxR (deacilasa), LpxF (fosfatasa) y LpxL (acil-transferasa) (Gaddy et al., 2015). En este mismo trabajo, se observó que al suplementar el medio con zinc o manganeso, ocurre una reversión de este fenotipo, obteniéndose el lípido A tetraacilado, y más importante aún, que la adición de zinc produce un aumento significativo en los niveles del transcrito de los genes *lpxL* y *lpxF* (Gaddy et al., 2015). Estos antecedentes indican que existen señales ambientales capaces de regular estas enzimas modificadoras, las cuales se creía tenían un carácter constitutivo en la fisiología de *H. pylori*.

1.6.- Influencia del medio en la expresión de los factores de virulencia de *H. pylori*

Con el fin de colonizar de manera más efectiva su nicho ecológico, *H. pylori*, al igual que todas las bacterias, es capaz de regular la expresión de sus genes en respuesta a señales ambientales. En el caso de este patógeno muchos de estos genes están relacionados con la generación y actividad de distintos factores de virulencia (Sharma et al., 2010).

Dentro de las señales ambientales más relevantes para este patógeno se encuentran la disponibilidad de nutrientes, como cationes divalentes, variación en el grado de acidez del medio, cambios en la osmolaridad, y la actividad del sistema inmune (de Bernard & Josenhans, 2014; Haley & Gaddy, 2015b).

1.6.1.- Importancia del pH en la interacción de *H. pylori* con su hospedero

H. pylori se caracteriza por su capacidad de colonizar el estómago humano. En este proceso es clave su habilidad para detectar cambios en la acidez del medio, lo que le permite soportar la acidez extrema de este órgano. En la mucosa

del estómago humano, que protege las células epiteliales, existe un gradiente de acidez, que varía desde pH 2 (en la región luminal) a 7 (en la región más cercana a las células epiteliales). A pH inferior a 4, la sobrevivencia de *H. pylori* está determinada por la actividad del complejo ureasa, el cual libera amoníaco a partir de urea, ayudando a neutralizar la acidez en la vecindad de la bacteria. A pH superior a 4, la bacteria cuenta con mecanismos independientes de ureasa para soportar la acidez (Clyne, Labigne, & Drumm, 1995; Eaton & Krakowka, 1994; Krishnamurthy et al., 1998; McGowan, Cover, & Blaser, 1994).

El sistema ArsRS es uno de los pocos sistemas de dos componentes descritos en *H. pylori* y es el encargado de realizar el monitoreo del pH del medio (Pflock, Kennard, Finsterer, & Beier, 2006). Otros factores transcripcionales como NikR (Factor transcripcional sensible a níquel) y Fur (Regulador transcripcional dependiente de hierro) también son capaces de responder frente a cambios en la acidez (Pflock, Kennard, et al., 2006).

El sistema ArsRS comprende la proteína ArsS, que es una histidina kinasa responsable de sensar directamente el pH del medio y la proteína reguladora de respuesta ArsR, que es un factor transcripcional perteneciente a la familia OmpR de reguladores de respuesta. El regulón de este sistema de dos componentes comprende dos grupos de genes objetivo: (I) genes controlados por la forma no fosforilada de ArsR y (II) genes no esenciales que son regulados por la forma fosforilada en respuesta a pH ácido (Beier & Frank, 2000; Pflock, Finsterer, et al., 2006; Pflock, Kennard, et al., 2006; Schar, Sickmann, & Beier, 2005).

Por otra parte, existe evidencia experimental que muestra que la acidez del ambiente afecta la estructura del LPS de *H. pylori*. En un estudio previo se mostró que algunas modificaciones del AgO (antígenos de Lewis) de *H. pylori* dependen de la acidez del medio (Moran et al., 2002). En el mismo estudio se describió que esta condición aparentemente no afecta estructura del Lípido A de la bacteria. Sin embargo, un análisis en profundidad de los datos disponibles de un estudio transcriptómico para la mutante $\Delta arsS$ a pH5 (N° Acceso GEO GSM98073) (Pflock, Finsterer, et al., 2006) nos reveló cambios en la expresión de los genes HP0021, HP0579 y HP0580, que codifican las proteínas LpxE y ambas subunidades del complejo Kdo Hidrolasa, respectivamente, encargadas de algunas de las modificaciones del Lípido A en *H. pylori*. Estas observaciones sugieren una regulación por parte del sistema ArsRS (y por consiguiente de la acidez del medio) sobre las modificaciones del lípido A, lo que a su vez sugiere una la participación de la acidez como señal regulatoria para las modificaciones del lípido A.

1.6.2.- Importancia del hierro en la infección por *H. pylori*

El hierro es necesario para una multiplicidad de vías metabólicas esenciales en todos los seres vivos: es requerido por enzimas y proteínas de la cadena transportadora de electrones, para la replicación del DNA, síntesis de aminoácidos y forma parte de los grupos Heme y grupos hierro-azufre. En el ser humano se encuentra asociado a lactoferrina, transferrina y grupos Heme, entre otros ligandos, haciéndolo prácticamente inaccesible a los patógenos. Al ser un patógeno gástrico, *H. pylori* tiene acceso al hierro que se obtiene de la dieta,

aunque también debe competir con el hospedero para poder incorporarlo. En condiciones de carencia, es capaz de obtenerlo a partir de fuentes alternativas como hemoglobina, transferrina y lactoferrina (Dhaenens, Szczebara, Van Nieuwenhuysse, & Husson, 1999). Por medio de ensayos de infección *in vivo* y la utilización de cepas mutantes incapaces de detectar hierro, se ha evidenciado la importancia que posee este elemento en la regulación transcripcional de *H. pylori*, especialmente en las etapas iniciales del proceso infectivo y, además, en el desarrollo de la inflamación estomacal, donde determina la capacidad del patógeno para colonizar el epitelio gástrico (Miles et al., 2010).

El principal regulador de genes en respuesta a la disponibilidad de hierro es la proteína Fur, la cual se presenta en dos formas: *apo-Fur* y *holo-Fur*, siendo la última la forma unida a hierro. En *H. pylori*, este regulador es capaz de actuar como un represor o como un activador de genes involucrados en la adaptación metabólica del microorganismo, tanto en su forma unida a hierro o independiente de él (Bereswill et al., 1999; Carpenter et al., 2013; Gancz, Censini, & Merrell, 2006). En condiciones de alta concentración de hierro, el regulador inhibe la expresión de genes relacionados con el transporte del metal y otros sistemas relacionados con la homeostasis del hierro. A su vez, la activación de Fur por hierro conlleva un aumento en la expresión de genes como *cagA*. Por otro lado, la forma *apo* reprime la expresión de genes relacionados con estrés oxidativo y almacenamiento de hierro, activando simultáneamente su propia expresión (Pich & Merrell, 2013). Por último, Algunos informes han descrito la probable participación del regulador Fur en la expresión de múltiples genes relacionados

con la biosíntesis y modificación del LPS de *H. pylori*, como HP0279 (*rfaC*), HP0619 (*lic2B*) y HP0679 (*wbpB*) (Danielli et al., 2006; Gancz et al., 2006).

A partir de lo expuesto anteriormente, se puede concluir que:

- 1) La adaptación de las bacterias a distintas condiciones ambientales requiere la coordinación y participación de diversos genes, lo cual, en el caso de los patógenos, provoca cambios en la expresión de factores de virulencia.
- 2) *H. pylori* es un patógeno que ha evolucionado para coexistir en los humanos, y por consiguiente ha desarrollado múltiples estrategias que le permiten modular los sistemas de defensa del hospedero.
- 3) El LPS de los patógenos Gram-negativo es un factor de virulencia altamente relevante, ya que constituye la primera interfase de interacción entre patógeno-hospedero. En *H. pylori*, las modificaciones de esta molécula juegan un rol importante en la persistencia del patógeno, ya que disminuyen la capacidad de ser reconocida por el hospedero.
- 4) Entre los principales factores ambientales que regulan la expresión de genes y factores de virulencia en *H. pylori* están la acidez y la disponibilidad de hierro del medio.

2.- Hipótesis

La acidez y la disponibilidad de hierro del medio inducen cambios en la estructura del lípido A del lipopolisacárido de *Helicobacter pylori*, los cuales afectan la producción de mediadores de inflamación (IL-8) en la línea celular AGS de epitelio gástrico.

3.- Objetivo General

Determinar si el pH y la disponibilidad de hierro induce cambios en la estructura del lípido A de *Helicobacter pylori*, y si estos cambios de estructura se relacionan con cambios en el nivel del transcrito de IL-8 en la línea celular AGS de cáncer gástrico.

4.- Objetivos Específicos

- 1.- Determinar el efecto del pH y de la disponibilidad de hierro sobre la distribución de especies de lípido A producido por *H. pylori*.
- 2.- Evaluar el efecto de las modificaciones del LPS, obtenido de bacterias crecidas bajo las diferentes condiciones de cultivo, sobre el nivel del mRNA de IL-8 en la línea celular de epitelio gástrico AGS.

5.- Materiales y Métodos

5.1.- Reactivos

A continuación, se señalan los proveedores y los insumos adquiridos desde éstos para el desarrollo de esta tesis.

De Becton Dickinson (NJ, EEUU) se obtuvo: Agar Soya Tripticasa (TSA), Triptona, Extracto de Levadura, Bacto Agar y Caldo Brucella.

De Biological Industries (Israel) se obtuvo: Solución C de Tripsina EDTA 0,5%, EDTA 0,2% (10X).

De BIOTIUM (CA, EEUU) se obtuvo: Gelred para tinción para ácidos nucleicos.

De BIO-RAD (CA, EEUU) se obtuvo: SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix.

De Corning (NY, EEUU) se obtuvo: Suero Equino, Suero Fetal Bovino, Tampón Fosfato Salino (PBS) y medio RPMI 1640 (1X) con 25 mM HEPES y L-Glutamina.

De Gibco (NY, EEUU) se obtuvo: Azul de tripán.

De IDT (IO, EEUU) se obtuvo: oligonucleótidos partidores.

De Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvo: *Taq* DNA polimerasa, acrilamida, N,N'-metilenbisacrilamida ultrapura, agarosa ultrapura y TRizol.

De Merck Química Chilena Soc. Ltda. (Chile) se obtuvo: cloruro de sodio (NaCl), ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \times H_2O$), acetato de sodio (CH_3COONa), cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl_2 \times 7 H_2O$), ácido clorhídrico fumante (HCl), isopropanol ($CH_3COH_2CH_3$), hidróxido de sodio (NaOH), amoníaco 25% (NH_3), nitrato de plata ($AgNO_3$), peryodato de sodio ($NaIO_4$), formaldehído (CH_2O), etanol absoluto (CH_3CH_2O), fosfato de sodio dihidrogenado (NaH_2PO_4), solución amortiguadora TAE (Tris HCl, Acetato y EDTA) 50 X pH 8,3.

De New England Biolabs (Ipswich, MA, EEUU) se obtuvo: estándares de peso molecular de 1 kb y de 100 bp.

De Oxoid (MA, EEUU) se obtuvo: Vitox y Suplemento Selectivo para *Helicobacter pylori* (Dent).

De Promega (WI, EEUU) se obtuvo: Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), vector pBAD-TOPO e Inhibidor Ribonucleasas RNasin.

De Qiagen (MD, EEUU) se obtuvo: QIAquick PCR Purification Kit y QIAprep Spin Miniprep Kit.

De Sigma Chemical Co. (MO, EEUU) se obtuvo: Azul de bromofenol y β -mercaptoetanol.

De Thermo Fisher Scientific (MA, EEUU) se obtuvo: Solución antibiótica/antimicótica 100X y Transcriptasa Reversa SuperScript™ II.

De US Biological (MA, EEUU) se obtuvo: Dodecil sulfato de sodio (SDS) y Trisaminometano (Tris base).

5.2.- Cepas Bacterianas

Para el desarrollo de esta tesis se utilizó la cepa bacteriana *Helicobacter pylori* 26695 [KE26695] y *Escherichia coli* One Shot™ Top10 Chemically competent (Thermo Fisher Scientific).

5.3.- Plasmidios

Para la realización de esta tesis fueron utilizados los vectores plasmidiales pBAD-TOPO (vector de clonamiento, Amp^R, Promega) y pTZ5R/T (vector de clonamiento, Amp^R, Thermo Fisher Scientific).

5.4.- Oligonucleótidos

Los partidores utilizados para este trabajo se muestran en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

| Nombre | Secuencia |
|----------|----------------------------|
| GAPDH_Fw | ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC |
| GAPDH_Rv | TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA |
| IL-8_Fw | GTC TGG ACC CCA AGG AAA AC |
| IL-8_Rv | AGG CAG ATA CCT AAT GAC GA |

5.5.- Medios y condiciones de cultivo bacteriano

Rutinariamente, *H. pylori* se cultivó en placas de agar TSA, el cual se suplementó con Suero Equino (5%), Vitox y Dent (ambos suplementos de acuerdo a las indicaciones entregadas por el proveedor), a 37°C, en una atmósfera de 5% CO₂ por dos días. Una vez obtenido el césped bacteriano sobre el agar, se procedió a recolectar las bacterias en una alícuota de PBS, la cual posteriormente se usó como inóculo para los experimentos. Se determinó la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de esta suspensión utilizando un espectrofotómetro Halo RB-10 (Dynamica Scientific). Además, a partir de esta suspensión se evaluó el estado morfológico de las bacterias con el fin de asegurar una presencia mínima de bacterias en estado cocoide (forma no replicativa de *H. pylori*) en los experimentos.

A partir de la suspensión anterior se sembraron los preinóculos (1:100) en Caldo Brucella (10 g/L Digestión Pancreática de Caseína, 10 g/L Digestión Péptica de Tejido Animal, 2 g/L Extracto de Levadura, 5 g/L Cloruro de Sodio, 0,1 g/L Bisulfito de Sodio, 1 g/L Dextrosa), medio utilizado comúnmente para el cultivo de microorganismos fastidiosos, el cual fue suplementado con Vitox, Dent y Suero Equino de igual manera que el agar TSA. Luego, estos preinóculos fueron incubados con agitación orbital (90 rpm) en una incubadora de CO₂ al 5% y 37°C por un día.

Para estudiar el efecto de la acidez, el pH del se ajustó utilizando ácido clorhídrico fumante o hidróxido de sodio hasta alcanzar un pH de 5 (condición de estrés ácido) o de 7 (condiciones normales de cultivo). Se adicionó NaH₂PO₄

(concentración final 50 mM) para amortiguar el pH del medio de cultivo. El caldo Brucella con las condiciones a ensayar fue inoculado a partir del preinóculo a una DO_{600} de 0,05, equivalente a aproximadamente 4×10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) por mL. Luego, se incubó con agitación orbital (90 rpm) a 37°C , en una incubadora de CO_2 al 5% y se esperó hasta obtener una DO_{600} de 0,6.

Para el estudio del efecto de la disponibilidad de hierro sobre las modificaciones del lípido A de *H. pylori*, a partir de bacterias crecidas en placa TSA se preparó 0,5 mL de una suspensión en PBS que se ajustó a DO_{600} de 0,5. Con este volumen se sembraron placas de TSA suplementadas con Suero, Vitox y Dent, con o sin una adición de $30 \mu\text{M}$ de FeSO_4 (de aquí en adelante denominada condición exceso de hierro).

En el caso de *E. coli*, la cepa fue utilizada de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Thermo Fisher Scientific) para la clonación y propagación de los plasmidios. Brevemente, se mezcló el producto de ligación con las bacterias, se incubaron en hielo por 30 minutos y luego se incubaron a 42°C por exactamente 30 segundos. Las bacterias se recuperaron con caldo Lisogénico (LB, 10 g/L triptona, 5 g/L extractura de levadura, 5 g/L NaCl) por una hora a 37°C y agitación orbital (120 rpm). Luego las bacterias fueron sembradas en agar LB (caldo LB con 15 g/L de Bacto-Agar) suplementado con ampicilina ($100 \mu\text{g/mL}$). Luego de un día, los clones transformantes se cultivaron en caldo LB suplementado con ampicilina para la propagación de los clones y la consiguiente extracción de los plasmidios.

5.6.- Extracción de LPS y purificación de lípido A

El LPS y el lípido A de *H. pylori* se obtuvo mediante la adaptación de un procedimiento de purificación de múltiples etapas basado metodologías descritas en la literatura para enterobacterias (Caroff & Novikov, 2011; Fernandez et al., 2018; Yi & Hackett, 2000) (esquemático en la Fig. 4). Para esto, las bacterias se cultivaron bajo las condiciones descritas (sección 5.5) hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6 o hasta observar un césped confluyente en las placas (2 días). La biomasa se sedimentó por centrifugación a $3420 \times g$ a $4^{\circ}C$ durante 10 min. El sedimento se lisó por solubilización en TRIzol (Invitrogen™) en 1/25 del volumen de cultivo utilizado. La mezcla se agitó vigorosamente por Vórtex luego de agregar 1/4 de volumen de cloroformo ($CHCl_3$), respecto del volumen del lisado, y se incubó a temperatura ambiente por 15–30 min. La emulsión resultante se centrifugó a $3420 \times g$ por 10 min a temperatura ambiente y se recolectó la fase acuosa (capa superior) que retiene los componentes celulares con mayor polaridad, entre ellos el LPS. La fase orgánica se sometió a una reextracción utilizando 1 mL de H_2O ultrapura para recuperar el LPS remanente. Las fases acuosas recolectadas se congelaron y almacenaron a $-80^{\circ}C$, luego se sublimaron por liofilización a $-40^{\circ}C$ y 0,121 mBar durante 24 horas. El producto liofilizado se resuspendió en una solución fría de $MgCl_2$ 0,375 M en EtOH 95% y se sedimentó por centrifugación a $3280 \times g$ a $4^{\circ}C$ por 10 minutos. El precipitado se lavó tres veces con EtOH 95% frío y una vez con EtOH 100% frío, centrifugando a $3280 \times g$ a $4^{\circ}C$ por 5 min cada vez. Luego del último lavado, el precipitado se secó invirtiendo el tubo durante 1 a 5 min. Una vez seco, el sedimento se sometió a la

extracción Folch, la cual elimina impurezas de la preparación, como fosfolípidos y SDS residuales, que podrían interferir con la posterior hidrólisis del lípido A. Para esto, el precipitado seco se resuspendió en 1 mL de una mezcla $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1 (reactivo de Folch) y se centrifugó a $11000 \times g$ a 4°C por 5 min, descartando cuidadosamente el sobrenadante. La etapa de extracción anterior se repitió una vez y el sedimento se secó a temperatura ambiente durante 24 h para permitir la volatilización de los residuos de solventes orgánicos.

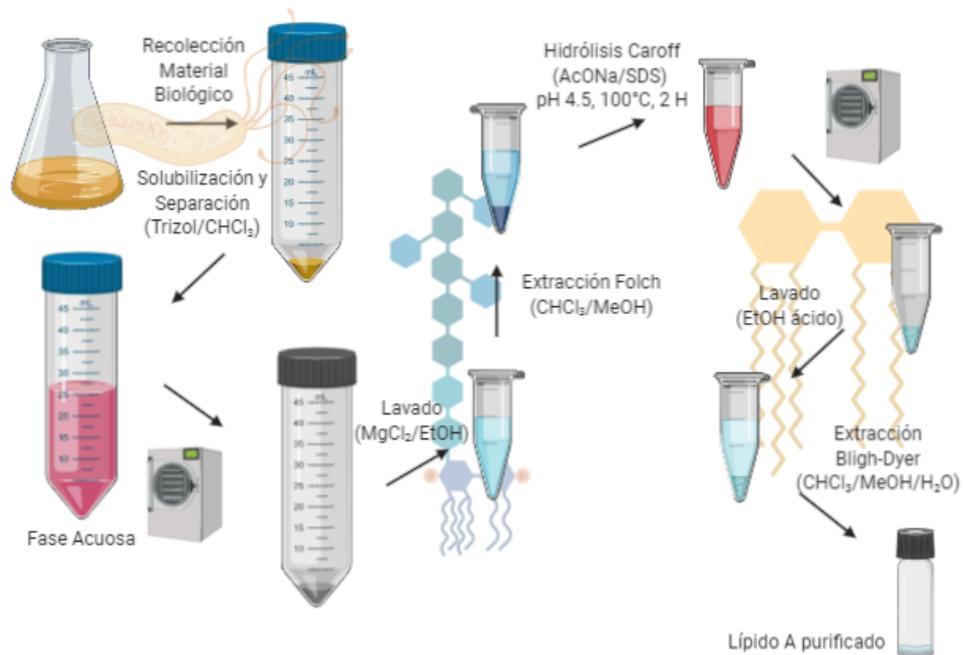


Figura 4. Esquema de purificación de lípido A de *H. pylori*. En la figura se presentan los distintos pasos realizados para la obtención de LPS y lípido A. Los detalles se explican en el texto.

El precipitado seco, correspondiente a LPS purificado, se separó en dos fracciones. La más pequeña se destinó a electroforesis por Tris-tricina SDS-PAGE (sección 5.7), con el objeto de verificar la integridad del LPS obtenido.

La fracción restante de LPS se sometió a una hidrólisis química en medio ácido para escindir el AgO polimérico y la región “core”, liberando el lípido A. Para esto el precipitado se resuspendió en una solución de 1% SDS y 10 mM acetato de sodio pH 4,5, seguido de una incubación a temperatura ambiente por 30 min y luego a 100°C por 120 min. La solución resultante fue desecada a 60°C utilizando un SpeedVac. El producto seco se resuspendió en EtOH acidificado (4 N HCl en 95% EtOH, 1:200) y se lavó tres veces con EtOH 95 %, centrifugando cada vez a 3280 x g por 5 min a 4°C. El sedimento se secó invirtiendo el tubo durante 1 a 5 min y se sometió a la extracción Bligh-Dyer para remover restos de LPS no hidrolizado, resuspendiendo en una solución de CHCl₃/MetOH/H₂O ultrapura (1:1:0.9) e incubando por 5 min a temperatura ambiente. La fase orgánica (capa inferior), en la que está contenido el lípido A, se recuperó luego de centrifugar a 2110 x g por 5 min. Los solventes orgánicos se eliminaron por evaporación a temperatura ambiente durante 24 h, originándose un precipitado de lípido A.

5.7.- Análisis de muestras de LPS mediante electroforesis

Las muestras de LPS fueron analizadas mediante SDS-PAGE usando geles de poliacrilamida al 12% (Marolda, Lahiry, Vines, Saldias, & Valvano, 2006). Para la elaboración del gel se utilizó la mezcla de la Tabla 2.

Tabla 2. Volúmenes utilizados para la elaboración de geles de poliacrilamida.

| Componente | Gel Resolutivo | Gel Concentrador |
|--|----------------|------------------|
| Acrilamida 49,5% Bisacrilamida 6% | 1250 μ L | - |
| Acrilamida 49,5% Bisacrilamida 3% | - | 250 μ L |
| Tampón de Gel (3 M Tris, 0,3% SDS, pH 8,45) | 1660 μ L | 775 μ L |
| Glicerol | 520 μ L | - |
| ddH ₂ O | 1560 μ L | 2100 μ L |
| 10% APS | 100 μ L | 75 μ L |
| TEMED | 6 μ L | 6 μ L |

En los carriles se cargaron 5 μ L de la muestra de LPS purificado. La electroforesis se realizó utilizando los amortiguadores correspondientes: Amortiguador de Cátodo (0,1 M Tricina, 0,1% SDS, 0,1 M Tris-HCl pH 8,25) y Amortiguador de Ánodo (0,2 M Tris-HCl pH 8,9), utilizando una corriente eléctrica de 50 V por 50 minutos mientras las muestras permanecían en el gel concentrador, y luego a 150 V por 90 minutos.

Luego de finalizada la electroforesis, los geles fueron teñidos utilizando el método de Tsai y Frasch (Tsai & Frasch, 1982) con algunas modificaciones. Una vez que el gel fue retirado de la cámara de electroforesis, éste fue fijado utilizando una solución 40% etanol y 5% ácido acético durante toda la noche. A continuación, se oxidó utilizando una solución 40% etanol, 5% ácido acético y 0,7% peryodato de sodio por 10 minutos en agitación constante. Se retiró el exceso lavando el gel tres veces con ddH₂O por 10 minutos. Luego se tiñó el gel con una solución 0,04 M AgNO₃, 0,33% NH₃ y 1,89 mM NaOH por 15 minutos en

agitación constante. Se retiró el exceso lavando el gel tres veces con ddH₂O por 10 minutos. Finalmente, el gel fue revelado utilizando una solución 0,02% formaldehído y 0,03 mM ácido cítrico, hasta que se observara la aparición de bandas. El revelado fue detenido lavando el gel abundantemente con ddH₂O (Fernandez et al., 2018).

5.8.- Análisis de muestras de lípido A mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF)

Las muestras de lípido A obtenidas utilizando la metodología anteriormente señalada fueron analizadas usando el espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF Microflex LRF (Bruker Daltonics Inc. MA, EEUU). El espectrómetro fue controlado utilizando el software flexControl 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). La adquisición de espectros fue realizada en modo ion negativo mediante detección por reflexión y los espectros finales son el resultado de la sumatoria de 50 barridos de 30 impactos de láser, aplicados en diferentes puntos, tomados al azar, de cada muestra depositada en una placa portamuestra *micro scout* (Bruker Daltonics Inc., Ma, EEUU).

Para montar las muestras de lípido A en la placa portamuestra, se resuspendió cada ejemplar en 90 µL de una mezcla cloroformo/metanol en una relación 1:1 v/v. A su vez, esta solución fue combinada en una relación 1:1 con una solución de matriz correspondiente a ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB, 10 mg/mL) en ácido cítrico (19,2 mg/mL). Esta mezcla de lípido A y matriz fue depositada en la placa portamuestra utilizando aproximadamente 5 µL. El análisis

de los espectros obtenidos fue realizado mediante el software mMass 5.5 (<http://www.mmass.org>) (Fernandez et al., 2018).

5.9.- Determinación de la expresión de IL-8 en cultivos celulares estimulados con LPS

5.9.1.- Línea Celular

Para el desarrollo de esta tesis fue utilizada la línea celular AGS (ATCC CRL-1739), correspondiente a un linaje celular inmortalizado de epitelio gástrico humano.

5.9.2.- Cultivo de línea celular

La línea celular AGS fue mantenida en cultivo utilizando medio RPMI, suplementado con suero fetal bovino al 10%, en una incubadora con atmósfera de CO₂ al 5% a una temperatura de 37°C.

Los cultivos fueron mantenidos hasta una confluencia celular del 80%, a partir de lo cual se realizaron subcultivos. Para esto se adicionó un volumen de tripsina equivalente a un décimo del volumen del cultivo, se incubó durante 5 min a 37°C y a continuación se diluyó en PBS hasta completar un volumen final de 5 mL. Luego, las células fueron desprendidas por arrastre mecánico utilizando un rastrillo de goma y la suspensión resultante fue centrifugada a 300 x *g*, por 10 min a 22°C. A continuación, el sobrenadante se descartó y las células fueron resuspendidas en 1 mL de medio de cultivo para ser transferidas una nueva botella de cultivo.

5.9.3.- Estimulación de células AGS con LPS.

La capacidad proinflamatoria del LPS de *H. pylori* fue estudiada mediante la cuantificación de los niveles de transcrito del gen que codifica IL-8 en células AGS. Para esto, se sembraron 5×10^4 células AGS en placas de 24 pocillos y se dejaron crecer hasta una confluencia del 80%. Luego, se procedió a cambiar el medio de cultivo y reemplazarlo con medio nuevo el cual contenía LPS purificado de *H. pylori* a una concentración de 10 ng/mL. El LPS se obtuvo desde bacterias cultivadas bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente. Como control positivo se utilizó LPS de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, obtenido desde bacterias cultivadas durante toda la noche en caldo LB y a 37°C.

Para analizar el efecto del LPS sobre las células se realizaron mediciones a tiempo 8 horas y 24 horas post estimulación. Una vez transcurrido el tiempo se recuperaron las células adheridas y se utilizaron para la extracción de RNA total. En la Figura 5 se ilustra el proceso general del ensayo.

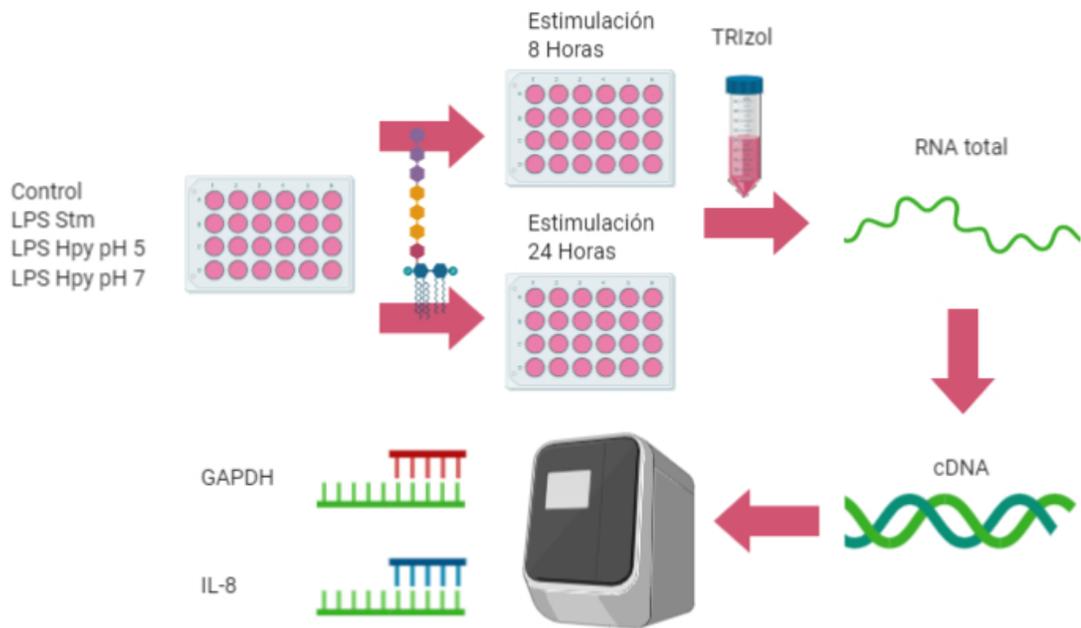


Figura 5. Esquema de ensayo de estimulación con LPS de *H. pylori*. En la figura se presenta la secuencia del ensayo para la determinación de IL-8 producida por la estimulación de LPS en células AGS.

5.9.4.- Extracción de RNA total

Se solubilizaron las células utilizando el reactivo TRIZOL (100 μ L por cm^2 del área de cultivo). La solución se transfirió a tubos de microcentrifuga y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después se adicionó 0,2 volúmenes de cloroformo y se agitó vigorosamente hasta obtener una mezcla homogénea, la que se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 35000 x g por 25 minutos a 4°C. Luego de la separación de las fases, se procedió a recolectar la fase acuosa (superior), tratando de no remover parte de la interfase ni de la fase orgánica. La fase acuosa fue combinada con medio volumen de alcohol isopropílico por volumen de TRIZOL utilizado. De manera adicional se agregó 1 μ L (20 μ g) de

glicógeno, y se dejó incubar a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó la mezcla a $35000 \times g$ por 25 minutos a 4°C y se descartó completamente el sobrenadante. El pellet de RNA fue lavado con 1 mL de etanol 75% por mL de TRIzol utilizado, agitado vigorosamente y centrifugado a $25000 \times g$ por 10 minutos a 4°C . El procedimiento de lavado se repitió una vez y se dejó secar por 30 minutos para eliminar el etanol remanente. Finalmente, se dejó hidratando en agua DEPC durante 1 hora antes de determinar su concentración y almacenarlo a -20°C .

5.9.5.- Obtención de cDNA

Para la obtención de cDNA a partir del RNA total extraído desde las células AGS estimuladas con LPS, se realizaron ensayos de transcripción reversa utilizando los protocolos entregados por el proveedor (*SuperScript II Reverse Transcriptase*, Thermo Fisher Scientific). Brevemente, se procedió a realizar una mezcla compuesta de *Random Primer* ($500 \mu\text{g}/\text{mL}$, $1 \mu\text{L}$), dNTPs (10 mM cada uno, $1 \mu\text{L}$), RNA ($55 \text{ ng}/\mu\text{L}$, aproximadamente $10 \mu\text{L}$) y agua tratada con DEPC hasta un volumen de $12 \mu\text{L}$. La mezcla se incubó a 65°C por 5 minutos y se enfrió en hielo por 3 minutos. A continuación, se agregó DTT ($0,1 \text{ M}$, $2 \mu\text{L}$), *First Strand Buffer* (5X , $4 \mu\text{L}$) y RNasin ($1 \mu\text{L}$) y se incubó 2 minutos a 25°C . Finalmente, se agregó la enzima *SuperScript II* (200 Unidades) y se realizó el ensayo dejando incubar la mezcla 10 minutos a 25°C , 60 minutos a 42°C y 15 minutos a 70°C . La presencia e integridad del cDNA obtenido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa.

5.9.6.-Generación de la curva estándar

Con el fin de determinar la eficiencia de los partidores a utilizar para la cuantificación de los niveles de transcrito, fue necesario generar una curva estándar. Para esto se utilizaron los cDNA obtenidos en el punto anterior como templado para realizar amplificación por PCR utilizando los partidores mencionados en la Tabla 1. Los amplicones generados se purificaron utilizando el kit comercial QIAquick PCR Purification Kit de Qiagen. Una vez que los productos de PCR fueron purificados fueron ligados de la siguiente forma: el producto de PCR correspondiente al transcrito del gen GAPDH fue insertado en el vector pBAD-TOPO (tamaño final 4,55 de kb), mientras que el producto de PCR correspondiente al transcrito del gen IL-8 fue insertado en el vector pTZ57R/T (tamaño final de 3,05 kb). Estos vectores recombinantes fueron utilizados para transformar *E. coli* Top10. Una vez obtenidas colonias, se corroboró la presencia del vector por medio de selección en medio selectivo (Agar LB Amp) y por PCR de colonias utilizando los partidores para los insertos.

Una vez seleccionadas las colonias con el vector deseado, se procedió a realizar una extracción de DNA plasmidial desde un cultivo utilizando el kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit de Qiagen. Estos plasmidios se utilizaron como DNA molde en distintas concentraciones (diluciones seriadas en base 10 a partir de una solución de concentración 10^{10} copias/ μ l) para determinar la eficiencia de los partidores GAPDH_Fw, GAPDH_Rv, IL-8_Fw e IL-8_Rv, utilizando las mismas condiciones para la determinación del transcrito en las muestras.

La recta de las curvas estándar para ambos genes se presentan en el Anexo 10.3, en conjunto con las curvas de melting en el Anexo 10.4.

5.9.7.-Cuantificación de mRNA

Para determinar los niveles de mRNA se utilizó el *kit* comercial SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix de Bio-Rad. Brevemente, la mezcla de reacción consiste en:

| | |
|-----------------------------|-------|
| qPCR Master Mix 2X | 10 µL |
| H ₂ O DEPC | 6 µL |
| Partidor 1 (10 µM) | 1 µL |
| Partidor 2 (10 µM) | 1 µL |
| DNA (cDNA o DNA plasmidial) | 2 µL |

Para la cuantificación de cDNA de IL-8 se utilizó la pareja de partidores IL-8_Fw e IL-8_Rv, mientras que para la determinación del RNA *Housekeeping* se utilizó la pareja de partidores GAPDH_Fw y GAPDH_Rv.

La mezcla de reacción se montó en un equipo CFX96™ Real-Time System C1000 Touch™ Thermal Cyler, y el programa de amplificación utilizado consistió en una etapa de desnaturalización inicial (95°C por 10 minutos), seguido de 40 ciclos que incluyeron un paso de desnaturalización (95°C por 10 segundos), alineamiento que incluye la lectura de la placa (60°C por 30 segundos), y extensión (72°C por 20 segundos). Luego de los 40 ciclos de amplificación se realizó una curva de *melting* entre 65°C y 95°C, con un incremento de 0,5°C cada 5 segundos. En la Figura 5 se esquematiza el proceso de determinación del transcrito.

Los resultados entregados por el equipo fueron visualizados mediante el programa Bio-Rad CFX Maestro y tratados de acuerdo al método de Livak o método del $\Delta\Delta Ct$. El análisis estadístico (ANOVA de dos vías) se realizó utilizando el software Prism en su versión 8.3.1.

6.- Resultados

6.1.- Análisis Bioinformático

Con el fin de predecir el efecto que la disponibilidad de hierro y la acidez podrían tener sobre la estructura del LPS de *H. pylori*, se decidió realizar un análisis bioinformático utilizando la base de datos Prodoric (www.prodoric.de/vfp/) para encontrar posibles sitios de unión al factor transcripcional Fur, que responde a la disponibilidad de hierro, en genes relacionados con modificaciones del LPS. Asimismo, se utilizó el portal Colombos (www.colombos.net), que reúne datos de diversos estudios transcriptómicos, para examinar el efecto que la acidez podría tener sobre la expresión de estos genes.

6.1.1.- Análisis bioinformático del efecto de la delección de *arsS* sobre la expresión de genes codificadores de enzimas modificadoras del lípido A en *H. pylori*

Por medio del portal Colombos, que permite la exploración y análisis de un compendio de *arrays* de expresión génica, se realizó un análisis específico del efecto de la acidez (cultivo en caldo BHI pH 5,0 por 60 minutos) sobre la expresión de los genes de interés, relacionados con la modificación del lípido A de *H. pylori*. Se incluyó *ureA* como control del análisis, debido a que ya se encuentra reportado el efecto del regulador Ars como inductor de la expresión de este gen (Marcus, Sachs, Wen, Feng, & Scott, 2012).

Al introducir los genes de interés en el *software* se obtuvo el *heatmap* de la Figura 6, evidenció que, bajo esta condición de estrés ácido, se produce un gran aumento (color verde en Fig. 6) en la expresión del gen *ureA*. A la vez, también se ve un aumento, aunque de menor intensidad, de los genes relacionados con enzimas modificadoras del lípido A (HP0579, HP0580 y HP0021), y por el contrario, se observa una disminución en la expresión (en una tonalidad de color rojo oscuro) de los genes HP1580 y HP0694.

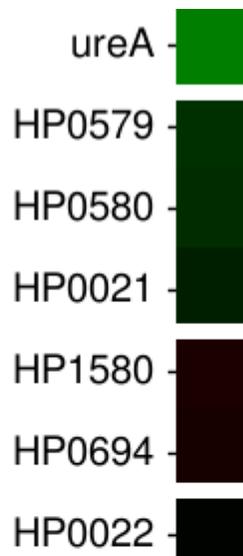


Figura 6. Heatmap de la expresión genes relacionados con respuesta a acidez en *H. pylori*. Los tonos de verde indican que existe una estimulación producto de la respuesta a la acidez de medio, mientras que los tonos rojos indican represión de la expresión al comparar la intensidad de las señales de la cepa WT en contra la cepa $\Delta arsS$ en condiciones de estrés ácido. El color negro indica que no hay cambios entre las condiciones.

Para obtener un dato cuantitativo, se utilizó la plataforma GEO (ncbi.nlm.nih.gov/geo/), la cual consiste en un repositorio de información genómica que permite acceder a los valores experimentales (Tabla 3), en vez de

la razón entre la intensidad de la señal WT respecto de la intensidad de la señal de la mutante ($\Delta arsS$) bajo la condición de estrés ácido como la intensidad del color en un *heatmap* como se presenta en Colombos. De acuerdo a esto, se analizaron las intensidades de las señales de todos los genes conocidos que codifican proteínas modificadoras del lípido A de *H. pylori*, además de utilizar *ureA* como referencia del análisis

Tabla 3. Valores de la expresión de transcrito de genes relacionados con modificaciones del lípido A de *H. pylori*.

| Locus | Gen/Producto génico | Intensidad Señal WT ^a | Intensidad Señal $\Delta arsS$ ^a | Razón $\Delta arsS$ /WT |
|--------|---------------------------------|----------------------------------|---|-------------------------|
| HP0073 | <i>ureA</i> | 41500 | 6283 | 0,15 |
| HP0021 | <i>lpxE</i> | 1952 | 1511 | 0,77 |
| HP0022 | <i>eptA</i> | 2631 | 2650 | 1,01 |
| HP0579 | Kdo hydrolase complex subunit 1 | 748 | 426 | 0,57 |
| HP0580 | Kdo hydrolase complex subunit 2 | 957 | 547 | 0,57 |
| HP0694 | <i>lpxR</i> | 1092 | 1498 | 1,37 |
| HP1580 | <i>lpxF</i> | 616 | 944 | 1,53 |

^a Valor correspondiente al promedio de todas las intensidades publicadas en la base de datos GSM98073.

De lo expuesto anteriormente se observa que la ausencia del sensor de respuesta al estrés ácido (ArsS) produce una alteración en la expresión de expresión de genes que codifican para proteínas modificadoras del lípido A, y por lo tanto se puede sugerir que existe una relación entre la acidez del ambiente y la modificación del lípido A de *H. pylori*. Así, los cambios mayores se observan en la expresión de los genes que codifican el complejo Kdo-Hidrolasa, la cual

disminuye en un 43% de acuerdo a los datos provistos, mientras que la expresión del gen que codifica para la fosfatasa LpxF aumenta en un 53%. Además, se observa que hay un menor efecto sobre los genes *lpxE* y *lpxR*, siendo el primer caso una disminución y el segundo un aumento, ambas de aproximadamente un 30%. Finalmente y como era de esperar, se observa que *ureA* sufre una disminución cercana al 90% de la expresión del gen, en concordancia a la literatura (Marcus, Sachs, & Scott, 2018).

6.1.2.- Búsqueda de sitios de unión a Fur en promotores de genes productores de enzimas modificadoras de lípido A

Utilizando el *software* Virtual Footprint 3.0, se realizó una búsqueda de posibles sitios de unión de Fur en los blancos de interés (genes relacionados con las modificaciones del lípido A de *H. pylori*). Esta herramienta cuenta con una base de datos de múltiples organismos y secuencias consenso para la búsqueda de cajas o sitios de unión de factores transcripcionales (Munch et al., 2005).

En el caso de *H. pylori*, el software cuenta con una matriz para determinar posibles sitios de unión de Fur. Inicialmente, para probar este sistema, se utilizó la herramienta con genes blanco experimentalmente comprobados (*sodB*, *pfr*, *hydA*). El análisis utilizando esta matriz no predijo ningún posible sitio de unión, por lo que se descartó su uso para seleccionar los posibles sitios de unión a Fur en los genes de interés de *H. pylori* (Tabla 4). Dado lo anterior, se realizó la misma aproximación, pero esta vez utilizando matrices para el reconocimiento de cajas utilizando la secuencia unión de Fur de *Escherichia coli* (basadas en un octámero y un octadecámero), debido a que existe cierta similitud entre estas secuencias

consenso y las secuencias experimentales de Fur de *H. pylori* (Fig. 7) (Carpenter et al., 2013; Pich, Carpenter, Gilbreath, & Merrell, 2012).

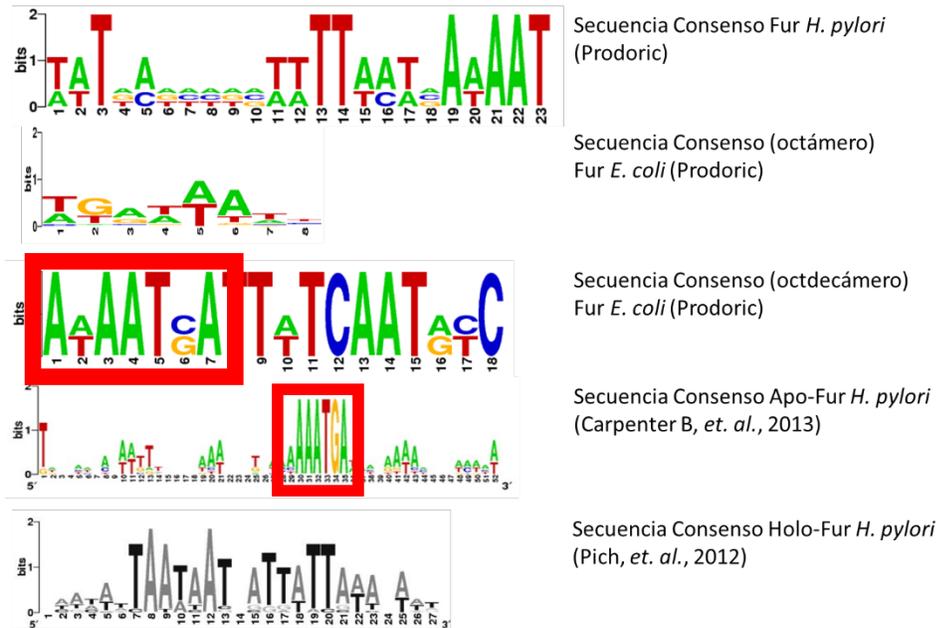


Figura 7. Secuencias consenso para sitios de unión a Fur. Comparación de las secuencias consenso utilizadas para la predicción de sitios de unión de Fur a las regiones promotoras de los genes que codifican para proteínas modificadoras del lípido A de *H. pylori*. Se incluyen las secuencias consenso de *E. coli* por la semejanza entre la secuencia octadecamérica (nucleótidos 1 a 7) y la secuencia Apo-Fur (nucleótidos 29 a 35) (Carpenter et al., 2013; Munch et al., 2005; Pich et al., 2012).

Para comprobar la validez de esta aproximación se decidió realizar el mismo tipo de análisis con las matrices de *E. coli*. El resultado muestra que sólo aquella basada en un octámero fue capaz de identificar sitios de unión de Fur en los genes experimentalmente comprobados como sitios blancos del regulador, en los mismos sitios descritos experimentalmente (Tabla 4), apoyando la validez de esta aproximación.

Tabla 4. Resultados de la predicción de sitios de unión para Fur en promotores de genes referencia.

| Secuencia Consenso | Gen objetivo | Caja Experimental | Caja Predicha | Ubicación | Score | Dirección de la hebra |
|---------------------------------|--------------|-------------------|------------------|-----------|---------|-----------------------|
| <i>E. coli</i> Fur (8mer) | <i>sodB</i> | TTAAAAAATGATTA | TTAAAAAATGATTAC | -34 | 2,13 | sentido |
| | <i>pfr</i> | CATAAATGATAA | TTCATTATCATTATG | -48 | 2,31 | antisentido |
| | | | TTCATTATCATTATG | -54 | 2,31 | antisentido |
| | <i>hydA</i> | AACAAATGAAA | GTACTTTTTTCATTTT | -160 | 2,37 | antisentido |
| AATGAAAATTCT | | | -12 | 2,4 | sentido | |
| <i>E. coli</i> Fur (18mer) | <i>sodB</i> | TTAAAAAATGATTA | No encuentra | | | |
| | <i>pfr</i> | CATAAATGATAATG | No encuentra | | | |
| | <i>hydA</i> | AACAAATGAAA | No encuentra | | | |
| <i>H. pylori</i> Fur (Prodoric) | <i>sodB</i> | TTAAAAAATGATTA | No encuentra | | | |
| | <i>pfr</i> | CATAAATGATAATG | No encuentra | | | |
| | <i>hydA</i> | AACAAATGAAA | No encuentra | | | |

En rojo se demarcan los nucleótidos que conforman la caja consenso obtenida experimentalmente, mientras que en azul se presenta la predicción.

Por lo tanto, se decidió utilizar la matriz de Fur de *E. coli* correspondiente al octámero para realizar un análisis de las regiones río arriba del sitio de inicio de traducción de los genes de interés de *H. pylori*. Así fue como se encontraron posibles sitios de unión para la forma Apo Fur en los promotores que controlarían la transcripción de los genes *lpxE*, HP0579 y *lpxR*, todos ellos relacionados con modificaciones covalente del lípido A (Tabla 5). Así, estos análisis sugieren que la disponibilidad de hierro podría ser una de las señales que determinaría la estructura del lípido A en esta bacteria.

6.2.- Efecto de la acidez y la disponibilidad de hierro sobre la abundancia relativa de especies de lípido A de *H. pylori*

Para determinar si las condiciones ambientales propuestas tienen algún efecto en sobre la abundancia de las especies del lípido A de *H. pylori*, se realizaron cultivos tanto en medio sólido (TSA), para los experimentos de disponibilidad de hierro, como en medio líquido (Caldo Brucella), para los experimentos de acidez), y se purificó el lípido A para su análisis mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF). Los espectros se muestran en las Figuras 8 y 9 (disponibilidad de hierro y pH, respectivamente)

Tabla 5. Resultados de la predicción de sitios de unión para Fur en promotores de genes relacionados con modificaciones covalentes del lípido A de *H. pylori*.

| Producto Génico | Gen | Secuencia encontrada | Ubicación | Score | Dirección de la hebra |
|--------------------------------|--------|----------------------|-----------|-------|-----------------------|
| LpxE | HP0021 | AATGAAAATGTC | -504 | 2,23 | sentido |
| EptA | HP0022 | GCGTTAATCACAA | -486 | 2,3 | antisentido |
| Kdo Hydrolase Small SubUnit | HP0579 | AGTGATTAACGAT | -1 | 2,31 | sentido |
| | | TTTGAAAACCTT | -282 | 2,24 | sentido |
| Kdo Hydrolase Large SubUnit | HP0580 | No encuentra | | | |
| LpxR | HP0694 | TAAAGGTTTTCTCTT | -76 | 2,64 | antisentido |
| LpxF | HP1580 | No encuentra | | | |

En rojo se demarcan los nucleótidos predichos como sitios de unión para Fur utilizando la matriz de *E. coli*.

En la Figura 8 se muestra la distribución de especies de lípido A cuando las bacterias se crecieron bajo condiciones normales de hierro (Fig. 8A) o con un exceso de este nutriente (Fig. 8B). Al analizar los espectros de masas se observa la predominancia de una señal a 1548 unidades de masa (m/z), la cual corresponde a la especie de lípido A completamente modificada (tetraacilada, desfosforilada en la posición 4', poseedora de un único residuo de Kdo y sustituida en la posición 1 por un grupo PEtN), ya reportada como la especie de lípido A mayoritaria en *H. pylori* (Moran et al., 1997; C. M. Stead et al., 2010). Además, se observa que en exceso de Fe^{2+} , la distribución de especies de lípido A cambia respecto a la condición control, desatacándose la aparición o enriquecimiento de dos especies de lípido A (m/z = 1576 y m/z = 1816) respecto a la señal de la estructura mayoritaria, cuyas estructuras moleculares no han sido descritas.

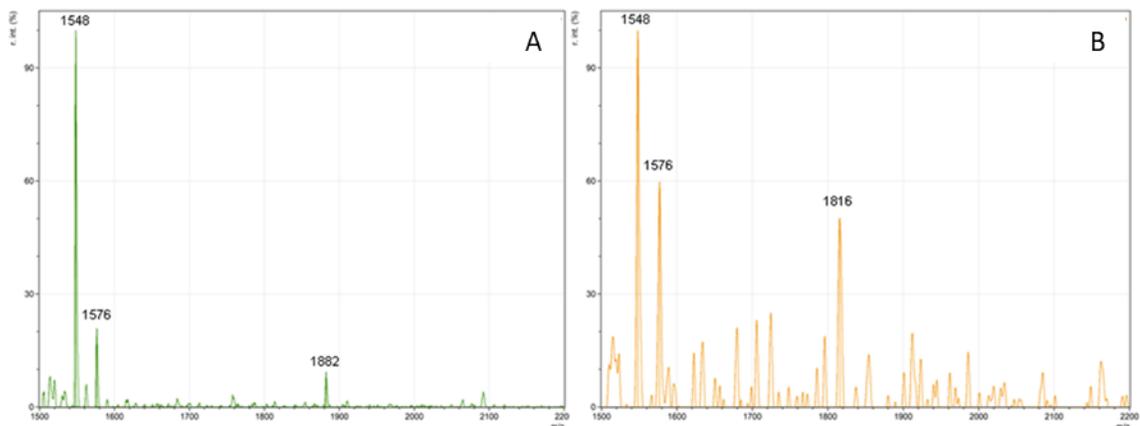


Figura 8. Efecto de la disponibilidad de hierro sobre la abundancia de especies de lípido A de *H. pylori*. Espectros de masas de especies de lípido A de *H. pylori* purificadas desde cultivos en placa TSA con bajas concentraciones de hierro (A) y exceso de hierro (B).

Los espectros de masa de la Figura 9 revelan, por su parte, que la acidez del medio de crecimiento altera la distribución de especies de lípido A en *H. pylori*. Se observa que a pH neutro (Fig. 9A) la señal con mayor intensidad se encuentra a 1548 m/z, en cambio, a pH 5 (Fig. 9B) la señal de mayor intensidad se encuentra a 1576 m/z. Cabe destacar que existe variación en las otras señales que componen el espectro, por ejemplo, a pH 5 no existen señales que superen una intensidad relativa del 30% (respecto de la señal de mayor intensidad), mientras que a pH 7 la señal a 1882 m/z es cercana al 60%. Además, a pH 7 es posible observar un grupo de señales sobre las 2000 unidades m/z cuya intensidad es relativamente considerable, cercana al 10%, contrastando el espectro a pH 5, que sólo presenta una señal intensa en ese rango (2093 m/z). Es necesario mencionar que muchas de las señales destacadas en las figuras no han sido descritas y por lo tanto se desconoce su identidad.

Al comparar todas las condiciones expuestas anteriormente (cultivo sin suplementar, con exceso de hierro y acidez ajustada), se decidió realizar los siguientes experimentos utilizando sólo la condición de acidez como variable, debido a que afecta considerablemente la distribución relativa de especies de lípido A, especialmente la estructura mayoritaria, lo que podría afectar la propiedad bioactiva del LPS.

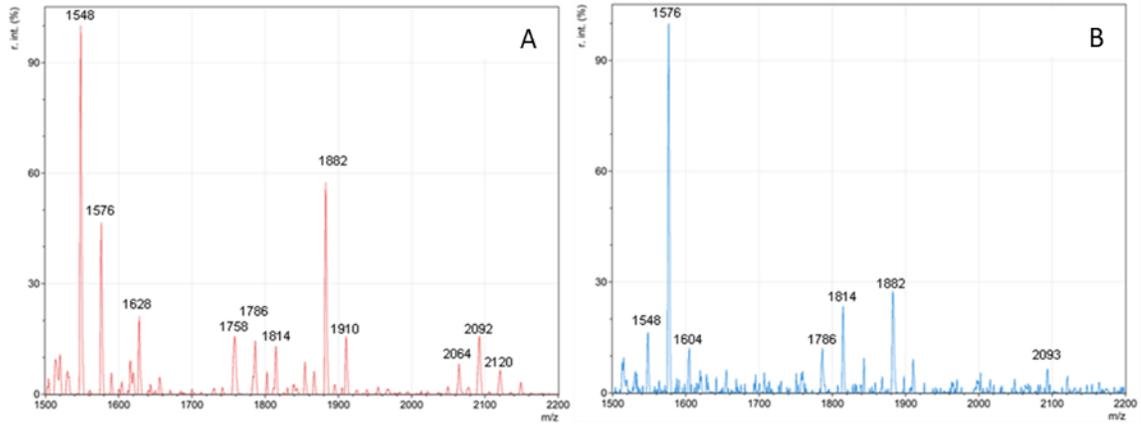


Figura 9. Efectos de la acidez sobre la abundancia de especies de lípido A de *H. pylori*. Se muestran los espectros de masas del lípido A purificado desde bacterias cultivadas en caldo Brucella ajustado a pH 7 (A) y pH 5 (B).

6.3.- Efecto del pH sobre el grado de polimerización del LPS de *H. pylori*

Además de analizar la estructura del lípido A de *H. pylori* cultivado bajo distintas condiciones, también se realizó un análisis del perfil electroforético del LPS en geles de poliacrilamida, debido a que esa es la forma de la endotoxina con la cual se realizarán los ensayos de estimulación de las células AGS de epitelio gástrico humano. Para esto, sólo utilizaron las bacterias cultivadas en caldo Brucella con el pH ajustado a 5 o 7, debido a que son las que presentan diferencias más notorias en la distribución de especies de lípido A. A partir de estas células, se obtuvo su LPS según la metodología descrita por Marolda (Marolda et al., 2006). Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% y se revelaron utilizando una técnica de tinción con plata. El perfil del LPS de *Salmonella* Enteritidis Wild-type (Sen WT) (Fig. 10) presenta todos los dominios de LPS mencionados anteriormente (lípido A-core y moléculas con AgO polimérico). En cambio, el perfil electroforético de la cepa de

Salmonella Typhimurium carente de la ligasa del antígeno O (SEN $\Delta waaL$), sólo se observa el lípido A unido a la región *core*. Estas muestras se utilizaron como referencia de la movilidad electroforética de los distintos dominios del LPS en el gel, observándose las distintas modas del LPS de acuerdo a grado de polimerización de su AgO, en donde cada adición del monómero del antígeno a la molécula de LPS es representada por una banda. En el caso de la mutante $\Delta waaL$, ésta permite identificar la banda de menor tamaño como lípido A-core.

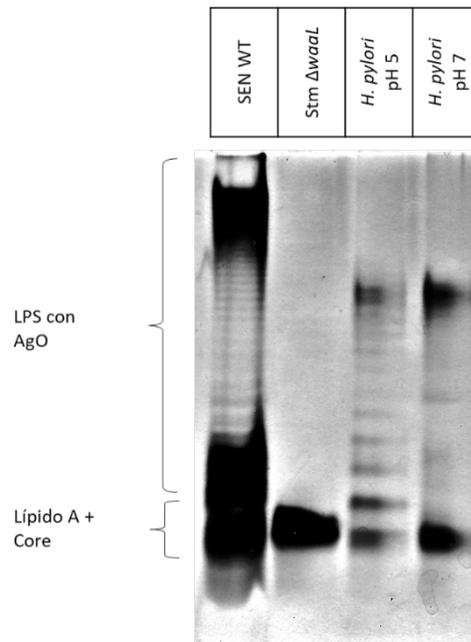


Figura 10. Perfil electroforético de LPS de *H. pylori* cultivado a pH 5 y pH 7. En la figura se muestran los perfiles de electroforesis de las especies de LPS de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SEN) *Wild-Type* y una mutante de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium que carece de la ligasa que une el antígeno O al lípido A-core (Stm $\Delta waaL$). Estas muestras se incluyen como control del perfil. Luego se presentan los perfiles de las muestras de *H. pylori* cultivadas a pH 5 y pH 7.

Los carriles “*H. pylori* pH 5” y “*H. pylori* pH 7” muestran los perfiles electroforéticos de LPS completo de la bacteria cultivada bajo esas condiciones de acidez. Se observa que ambas muestras poseen un perfil completo, es decir, presenta los tres dominios del LPS. Al compararla con el perfil de *Salmonella* WT se observa que el LPS de ambas muestras de *H. pylori* poseen un menor grado de polimerización. Al comparar entre condiciones, es posible notar la presencia de dos modalidades de distribución de las especies de LPS. En el primer caso (*H. pylori* pH 5), se observa que existe una distribución escalonada en los largos de cadena de AgO, mientras que en el caso de *H. pylori* cultivado a pH 7, se destacan 2 bandas principales, una de mayor y otra de menor movilidad.

Estos resultados indican que ambas muestras presentan LPS completo, lo cual es necesario para la realización del ensayo de estimulación de células AGS, debido al requerimiento del sistema TLR-MD-2 (Huber et al., 2006; Ishihara et al., 2004). Además, indican que la acidez no sólo es un factor ambiental que afecta las modificaciones del lípido A, sino que también induce cambios en la distribución modal del AgO.

6.4.- Efecto de LPS de *H. pylori* obtenido bajo distintas condiciones de cultivo sobre la expresión de mediadores de inflamación

Para evaluar de forma funcional si las modificaciones producidas por efecto de la acidez son relevantes para afectar la respuesta inmune, se realizaron ensayos de estimulación en células AGS, que corresponden a células epiteliales gástricas humanas. Estos ensayos consistieron en la adición de LPS purificado desde bacterias crecidas a pH 7 o 5 a un cultivo de células AGS, para luego

determinar la variación en los niveles de transcrito de IL-8 como marcador de inflamación, mediante qRT-PCR. Como control se utilizaron células no estimuladas.

Además del LPS purificado de la bacteria en estudio, se obtuvo mediante el mismo protocolo LPS purificado de un enteropatógeno (*Salmonella Typhimurium*) cuyo lípido A presenta una estructura canónica cuando es cultivado en condiciones estándar. Según ha sido reportado, este lípido A canónico es el ligando cognado del receptor TLR-4 (Park & Lee, 2013), por lo que funcionaría como control positivo de la estimulación. Se decidió además probar dos tiempos de estimulación, 8 y 24 horas, debido a que se ha reportado que el aumento en la expresión del gen es visible a partir de las 8 horas de estimulación (Ishihara et al., 2004).

El análisis de la variación en los niveles de transcrito se realizó normalizando respecto al nivel de mRNA de GAPDH (Korbakis, Fragoulis, & Scorilas, 2013). Los datos se presentan como las veces de cambio respecto de la condición no estimulada (Fig. 11).

Al analizar los niveles de expresión del mRNA de IL-8 se observa que bajo la presencia de LPS de *S. Typhimurium*, la expresión de la citoquina aumenta respecto a la condición no estimulada luego de 8 horas de incubación (valor promedio: 1,325), y luego de 24 horas de incubación con este LPS se produce un aumento aún más pronunciado (valor promedio: 5,795).

En el caso de la estimulación con LPS de *H. pylori* cultivado a pH 7, se observa que luego de 8 horas de estimulación no hay un efecto en los niveles de transcrito de IL-8 en comparación con células no estimuladas (valor promedio: 0,9153). Sin embargo, después de 24 horas, se observa que el promedio del nivel de expresión aumenta a casi 4 veces en comparación con la condición control sin estimulación (valor promedio: 3,912), aunque la dispersión de los datos no permite asegurar una variación estadísticamente significativa.

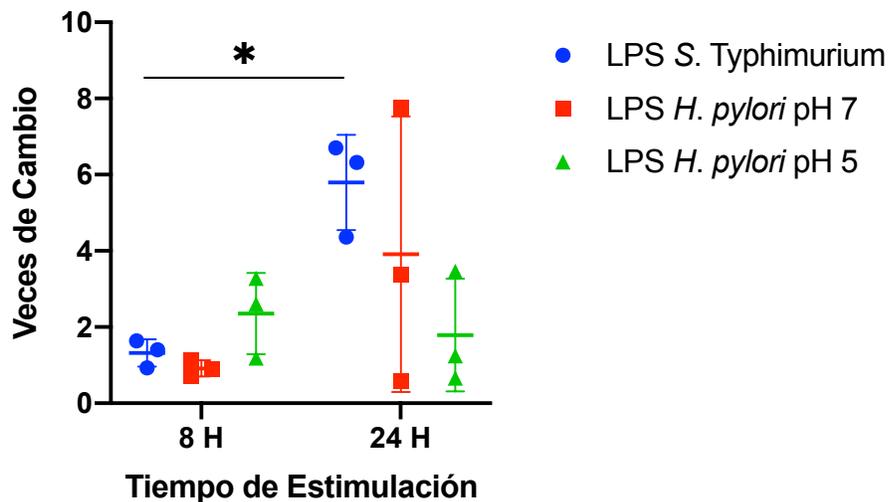


Figura 11. Efecto de distintos LPS y tiempos de estimulación en la transcripción de IL-8 en células AGS. En la figura se muestran las veces de cambio en la expresión del mRNA de IL-8 de las células AGS respecto del control no estimulado, expuestas a 10 ng/mL de LPS de *Salmonella Typhimurium* (azul) y LPS de *H. pylori* cultivado a pH 7 (rojo) y pH 5 (verde). Cada punto representa una réplica biológica obtenida a partir de tres réplicas técnicas de cada ensayo. El asterisco (*) indica significancia con un valor $P < 0,05$.

Finalmente, al estimular con el LPS de *H. pylori* crecido a pH 5, se observa un leve aumento del mRNA de IL-8 comparado a la condición control sin estimular (valor promedio: 2,358), el cual se mantiene relativamente hasta las 24 horas (valor promedio: 1,791). Sin embargo, el análisis estadístico indicó que no existe una variación significativa.

En conjunto, estos resultados demuestran que si bien el ambiente (la acidez del medio específicamente) es capaz de producir modificaciones en el lípido A de *H. pylori*, en nuestras condiciones de estudio estas no fueron capaces de inducir una expresión significativamente distinta del mensajero de IL-8 al comparada con la condición control (estimulación con LPS de *Salmonella Typhimurium*).

La diferencia más notoria de acuerdo a los datos presentados en la Figura 11 es entre los niveles producidos por la estimulación de 24 horas con LPS de *Salmonella* y LPS de *H. pylori* cultivado a pH 5, cuyo análisis arroja un valor P ajustado de 0,1208. Asimismo, la diferencia entre el mRNA producido cuando las células se estimularon con LPS de *Salmonella* entre las 8 y 24 horas de estimulación tiene un valor P de 0,078. Para el resto de los datos, los valores P son superiores a 0,3.

7.- Discusión

Helicobacter pylori es el patógeno más estudiado relacionado a infecciones gástricas. Se estima que es el agente infeccioso más común a nivel mundial y que sus orígenes se remontan incluso antes de las primeras migraciones humanas desde África (alrededor de 58000 años atrás). La íntima relación con el hospedero le ha permitido desarrollar una multitud de tácticas que le ofrece ventajas para sobrevivir y prosperar en este ambiente y evadir las defensas del hospedero, por lo que algunos autores postulan que su erradicación no debería ser necesaria para ciertas poblaciones (Linz et al., 2007; R. M. Peek, 2008; R. M. Peek, Jr. & Blaser, 2002).

En su ciclo infeccioso, este microorganismo debe atravesar distintos ambientes antes de alcanzar el punto de colonización, siendo el principal obstáculo el estómago y su secreción gástrica. En ésta, la disponibilidad de nutrientes, la acidez y presencia de otros metabolitos varía según un gradiente que va desde el lumen hasta las células epiteliales del estómago. Estas señales y gradientes permiten la coordinación de múltiples sistemas en *H. pylori* que le permiten la adaptación a este nicho (Bahari, Ross, & Turnberg, 1982; Haley & Gaddy, 2015a; Kiela & Ghishan, 2016; Pich & Merrell, 2013; Valenzuela, Cerda, & Toledo, 2003). De los factores ambientales que este patógeno es capaz de sensor, se destacan la acidez y la disponibilidad de hierro. Ambas señales han sido fuertemente vinculadas a la expresión de factores de virulencia que le permiten no sólo sobrevivir, sino que competir y obtener nutrientes del hospedero (Marcus et al., 2018; Pich & Merrell, 2013).

Como ya se mencionó durante este trabajo, una de las características que enfatizan las adaptaciones evolutivas de *H. pylori* es la adaptación de su LPS, que se ha transformado para reducir su capacidad de ser detectado por el hospedero y favorecer así la colonización del patógeno (Gonciarz et al., 2019; Moran et al., 2002; Perepelov, Senchenkova, & Knirel, 2020). A pesar de la singularidad de esta estructura, no se ha estudiado en profundidad si existen factores ambientales que la determinen y cómo éstos regularían las modificaciones, por lo que este fue el enfoque de este trabajo. Para esto, se realizó una revisión de la información existente en publicaciones y análisis transcriptómicos, en conjunto con el análisis bioquímico de la abundancia relativa de las especies de lípido A, en búsqueda de evidencia que soportara el planteamiento de que los reguladores que responden a determinados cambios ambientales están vinculados con genes que expresan modificadores del lípido A o LPS en general.

De esta forma se encontraron los datos de un experimento de transcriptómica que analiza la expresión de una cepa de *H. pylori* y una mutante carente de la proteína ArsS bajo condiciones de estrés ácido (Pflock, Finsterer, et al., 2006). Este análisis reveló que existe influencia de este factor transcripcional en la expresión de genes que codifican para enzimas modificadoras del lípido A, aunque son resultados que deben tomarse con cautela debido a las diferencias metodológicas con los experimentos realizados en esta tesis (como composición del medio, condiciones de cultivo y cepas utilizadas).

Para investigar el efecto del hierro en las modificaciones del lípido A, inicialmente se realizó una aproximación idéntica al caso anterior, pero dado que la bibliografía publicada no presenta información detallada, se decidió recurrir a la predicción de posibles sitios de unión del regulador Fur. Utilizando la herramienta Virtual Footprint (versión 3.0) se analizaron los sitios promotores o secuencias río arriba de los genes de interés y genes circundantes a los mismos, debido a que se desconoce la existencia de operones que incluyan los genes de interés. Esta herramienta cuenta con una matriz para la búsqueda de sitios de unión a Fur de *H. pylori*, la cual al ser utilizada no fue capaz de reconocer secuencias experimentalmente comprobadas que reclutan Fur. Cabe destacar que además este microorganismo presenta la peculiaridad de poseer secuencias independientes para la unión de las forma *apo* y *holo* de la proteína Fur (Carpenter et al., 2013; Pich et al., 2012). Debido a esto, se decidió realizar la misma aproximación utilizando otras matrices provistas por el servidor. A pesar de esta cantidad de variables, la utilización de una de las matrices para Fur de *E. coli* fue capaz de reconocer sitios comprobados experimentalmente para la forma *apo*-Fur de *H. pylori*. Por su parte, la complejidad de la secuencia consenso de la forma *holo* del regulador no permitió la predicción de sitios de unión.

Los espectros de masas del lípido A de bacterias crecidas con distinta disponibilidad de hierro resultaron ser similares. En ambas condiciones la señal de mayor intensidad corresponde a la denominada estructura mayoritaria del lípido A de *H. pylori* (1548 m/z) (Moran et al., 1997), mientras que la principal diferencia cuando la disponibilidad de hierro es mayor en el medio de cultivo, se

ve como un cambio en el aumento relativo de las especies 1576 m/z y 1816 m/z. Respecto de lo primero, la detección de la señal a 1548 m/z, independiente de la concentración de hierro, podría indicar que ambas condiciones de cultivo producen lípido A con características fisicoquímicas similares, por lo que se podría sugerir una actividad inmunoestimuladora comparable. En el caso de la señal a 1816 m/z, ésta no ha sido mencionada en la literatura, pero en base a estimaciones matemáticas, se puede predecir que correspondería a una estructura pentaacilada y con un residuo de Kdo. Además, poseería fosforilaciones en ambos extremos del disacárido de GlcNAc o con un solo residuo de fosfoetanolamina.

En cuanto a la distribución de especies dependiendo de la acidez del medio, se observa que el efecto de esta condición produce múltiples cambios en la distribución de especies de lípido A. Principalmente, se observan una multitud de señales que no han sido descritas en la literatura (en Anexo 10.1 y 10.2 se presentan las estructuras descritas en la literatura). En estos espectros también se presentan señales alrededor de 1786 m/z, cuya estructura tampoco ha sido descrita, pero que en base a cálculos matemáticos podría corresponder a un lípido A pentaacilado con un único residuo de Kdo y ambos extremos del disacárido de GlcNAc fosforilados. También es posible detectar una señal a 1628 m/z, tampoco descrita y cuya posible identidad, de acuerdo a cálculos matemáticos, correspondería a un lípido A tetraacilado, con un residuo de Kdo, y con los extremos del disacárido sustituidos con un residuo de fosfoetanolamina y uno de fosfato.

Finalmente, se observa que el cambio más importante corresponde a una inversión de las señales más intensas. A pH 7 predomina la señal a 1548 m/z, que corresponde a la denominada estructura mayoritaria, mientras que a pH 5 la señal con mayor intensidad se encuentra a 1576 m/z, cuya estructura no ha sido descrita a pesar de que suele observarse esta señal en espectros de masa de *H. pylori* publicados, en donde también se observa la señal a 1548 m/z (Gaddy et al., 2015; C. M. Stead et al., 2008; Tran et al., 2006). La diferencia de masa (28 m/z) entre dos especies de lípido A también se ha reportado en *Klebsiella pneumoniae*. Esta bacteria presenta dos alelos de *lpxL*, que codifican las enzimas encargadas de realizar la acilación secundaria de la cadena del carbono 2' del disacárido. Se ha descrito que un cambio en la temperatura de crecimiento determina la expresión diferencial de uno de estos alelos que codifica enzimas que se caracterizan por utilizar distintos sustratos para realizar la adición de la cadena secundaria (Mills, Dumigan, Kidd, Hopley, & Bengoechea, 2017). LpxL1 utiliza el grupo laureato (C₁₂) de una proteína portadora de acilos (acyl carrier protein, ACP), mientras que LpxL2 utiliza el grupo miristato (C₁₄). Esta diferencia de sustratos produce una alteración en la masa de los espectros de exactamente 28 unidades m/z. Al observar con atención los espectros de las Figura 9, correspondiente al estudio del efecto del pH en la distribución de especies de lípido A, se puede observar que muchas de las señales presentan esta diferencia de ± 28 m/z. Por ejemplo, en el caso de la señal 1548 m/z, 28 m/z más generarían una señal a 1576 m/z. Más aún, los resultados muestran grupos de señales en los que se observa una señal cercana a otras 28 m/z mayor y 28 m/z menor (Ej.: 1758 m/z, 1786 m/z y 1814 m/z, Fig. 9). Lo mismo se observa alrededor de

las señales a 1882 m/z y 2092 m/z. Es necesario destacar que estos “tripletes” no sólo han sido observados en este trabajo, sino que en diversas publicaciones que presentan espectros de masa de especies de lípido A de *H. pylori*, y que sin embargo no han sido aludidos (Gaddy et al., 2015; C. Stead et al., 2005; C. M. Stead et al., 2008; Tran et al., 2006).

Para entender las bases bioquímicas de este fenómeno, se realizó una búsqueda de posibles alelos en *H. pylori* que den cuenta del mismo fenotipo observado en *K. pneumoniae*, utilizando la misma metodología de ese trabajo, la cual corresponde la búsqueda por medio de alineamiento de secuencias mediante BLAST con una disminución en la estrictez del alineamiento (Mills et al., 2017). De esta forma se utilizaron las secuencias de *lpxL1* y *lpxL2* de *K. pneumoniae* y *lpxL* de *E. coli* contra el genoma de *H. pylori*. Sin embargo, con esta aproximación no fue posible encontrar ortólogos en el genoma de referencia de *H. pylori*. En respuesta a esto, una de las posibles explicaciones que podrían solucionar este dilema es que esta enzima LpxL (u otra acil transferasa) de *H. pylori* no posea un sustrato específico. Así, la eventual utilización de uno u otro ácido graso (con distintos largos de cadena) se altere con la condición ambiental. Otra posibilidad es que la condición ambiental (por ejemplo la acidez en el caso de *H. pylori*) afecte la disponibilidad de sustratos, alterando los mecanismos que determinan el largo de cadena en la síntesis de ácidos grasos, tal como se ha descrito en otras bacterias (Bainbridge et al., 2008; Rubin, O'Brien, Ivanov, Brodbelt, & Trent, 2014; Shen et al., 2018; Siliakus, van der Oost, & Kengen, 2017).

Finalmente, al comparar entre ambos experimentos (disponibilidad de hierro y efecto del pH), se puede observar que existen diferencias en cuanto a las especies presentes en los controles de cada uno (pH 7 y medio sin suplemento de hierro). Esto puede deberse principalmente al tipo de cultivo que se hace ya que, debido a las limitaciones técnicas, no es posible realizar las modificaciones necesarias en el medio TSA para estudiar el efecto de la acidez. Por lo tanto, estas diferencias refuerzan la idea que la constitución del medio ejerce un efecto en la fisiología de esta bacteria a nivel de LPS.

De acuerdo a estos hallazgos ya mencionados, se decidió seguir el estudio utilizando las muestras obtenidas por cambios en la acidez del medio, ya que la distribución de especies cambió de forma más compleja, lo cual podría conllevar un mayor efecto en la expresión de IL-8 al momento de estimular las células con LPS obtenido de estos cultivos. Primeramente, es necesario destacar que la metodología utilizada permitió la purificación LPS bioactivo, como lo demuestra la estimulación con el LPS de *S. Typhimurium*. Respecto de los resultados del ensayo, a las 8 horas de estimulación no se observa una variación significativa la expresión del transcrito de IL-8 para ninguno de las muestras de LPS de *H. pylori* respecto de la condición sin estimular, ya que todos los valores promedio son cercanos a 1 (a diferencia de la condición estimulada con LPS de *H. pylori* cultivado a pH 5, cuyo valor fue de aproximadamente 2). En el caso del LPS de *H. pylori*, se esperaba que esta respuesta fuera menor que la producida por el LPS de *S. Typhimurium*, debido a que ya se ha descrito que su capacidad

proinflamatoria era baja en comparación con el LPS de enterobacterias (Muotiala et al., 1992).

La habilidad para activar el TLR-4 de las células está determinada por las distintas formas en que el lípido A es reconocido por el receptor, en lo que es relevante el reconocimiento de sus cargas y la disposición de sus cadenas de acilos. Respecto de este último, la forma tridimensional que adopta la molécula varía de acuerdo a la cantidad de acilos y al largo de sus cadenas. Cuando el lípido A se encuentra en su forma canónica (hexaacilada) adquiere una forma cónica que se ajusta al surco del TLR-4, mientras que la forma tetraacilada (forma predominante en el lípido A de *H. pylori*) presenta una estructura similar a un cilindro, que no es capaz de interactuar con todos los sitios de unión del receptor y por consiguiente disminuye su capacidad proinflamatoria (Netea, van Deuren, Kullberg, Cavaillon, & Van der Meer, 2002).

Es relevante destacar que el tipo celular utilizado también presenta una menor respuesta pro-inflamatoria en comparación con otros tipos celulares. Cuando se compara la producción de citoquinas como IL-8, TNF- α o IL-1 β producidas por la estimulación con LPS, los niveles producidos por las células AGS suelen ser menores comparadas con otras líneas celulares como macrófagos o adenocarcinoma de colon (Ishihara et al., 2004; Mahmoodi et al., 2012).

Al observar el gráfico de la Figura 11 se puede observar que existen diferencias en la expresión del mRNA de IL-8. Se observó que los niveles del mensajero luego de 24 horas de estimulación con LPS de *S. Typhimurium*

aumentaron, tal como se esperaba. Para el caso de *H. pylori* cultivado a pH 5, se observa un leve aumento en los niveles del transcrito, pero estas diferencias no son estadísticamente significativas, de acuerdo al test ANOVA de dos vías (valor P ajustado: 0,12). Por otro lado, se puede observar que el LPS de *H. pylori* cultivado a pH 5 es de hecho 3 veces menor que el LPS de *S. Typhimurium*, lo cual concuerda con el hecho de que ambas estructuras son drásticamente diferentes (*S. Typhimurium* posee un lípido A hexaacilado y *H. pylori* posee uno tetraacilado, además de otras modificaciones relacionadas con la carga neta de la molécula) (Nielsen, Birkholz, Andersen, & Moran, 1994).

En el caso de las estimulaciones con LPS de *H. pylori* cultivado a diferentes pH, se obtuvo una alta dispersión de los datos (especialmente la condición pH 7 y 24 horas) por lo que no es posible asegurar que la diferencia en la distribución de especies de lípido A (el cambio de la señal mayoritaria de 1548 m/z en pH 7 a 1576 en pH 5) posea algún efecto significativo en la estimulación de células AGS. Por otra parte, según lo observado en *K. pneumoniae*, la utilización de acilos de cadena más larga disminuye la capacidad inmunogénica del LPS para inducir la expresión de IL-6 y TNF- α en macrófagos murinos inmortalizados, lo que se sugiere que la estimulación medida como expresión de IL-8 por efecto del LPS de *H. pylori* cultivado a pH 5 debería ser menor que su contraparte a pH 7 (Mills, Dumigan, Kidd, Hopley, & Bengoechea, 2017).

Finalmente, en este trabajo sólo se abordó la importancia de las modificaciones del lípido A en cuanto a la relación entre el hospedero y el microorganismo. En este sentido, es necesario recordar que muchas de las

modificaciones que se realizan a nivel de esta membrana también tienen roles fisiológicos relacionados con la mantención de la integridad del microorganismo frente a otros factores ambientales, como son la presencia de sustancias desestabilizadoras como detergentes o péptidos antimicrobianos, además de favorecer la integridad del microorganismo a la acidez al modificar la fluidez y el espesor de la membrana (Bengoechea et al., 2003; Nikaido, 2003). Consecuentemente, las modificaciones del lípido A comprenden múltiples aspectos de la interacción con el hospedero.

8.- Conclusiones

Primeramente, en este trabajo fue posible adaptar para *H. pylori* un protocolo de extracción y purificación de lípido A usado en enterobacterias, apto para analizar estudiar la mezcla de especies mediante espectrometría de masas.

Se determinó que la variación de condiciones ambientales como disponibilidad de hierro y cambios en el pH del medio son capaces de inducir cambios en la distribución de especies de lípido A de *H. pylori*. Los cambios más fueron más notorios al alterar la acidez del medio.

Se diseñó un protocolo para la estimulación con LPS de *H. pylori* de células epiteliales de adenocarcinoma gástrico (AGS) y la cuantificación del transcrito de IL-8 como marcador de inflamación.

La utilización de LPS de *H. pylori* purificado de distintas condiciones de cultivo como agente inmunoestimulador no aumenta significativamente la expresión de IL-8 en células AGS, a diferencia de la utilización con un LPS canónico como el que presenta *S. Typhimurium*.

9.- Referencias

- Agnihotri, N., Bhasin, D. K., Vohra, H., Ray, P., Singh, K., & Ganguly, N. K. (1998). Characterization of lymphocytic subsets and cytokine production in gastric biopsy samples from *Helicobacter pylori* patients. *Scand J Gastroenterol*, *33*(7), 704-709.
- Algood, H. M., & Cover, T. L. (2006). *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between H. pylori and host immune defenses. *Clin Microbiol Rev*, *19*(4), 597-613. doi: 10.1128/CMR.00006-06
- Algood, H. M., Gallo-Romero, J., Wilson, K. T., Peek, R. M., Jr., & Cover, T. L. (2007). Host response to *Helicobacter pylori* infection before initiation of the adaptive immune response. *FEMS Immunol Med Microbiol*, *51*(3), 577-586. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00338.x
- Almeida Cunha, R. P., Alves, F. P., Rocha, A. M., Rocha, G. A., Camargo, L. M., Nogueira, P. O., . . . Queiroz, D. M. (2003). Prevalence and risk factors associated with *Helicobacter pylori* infection in native populations from Brazilian Western Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, *97*(4), 382-386.
- Atherton, J. C. (2006). The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol*, *1*, 63-96. doi: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100125
- Bahari, H. M., Ross, I. N., & Turnberg, L. A. (1982). Demonstration of a pH gradient across the mucus layer on the surface of human gastric mucosa in vitro. *Gut*, *23*(6), 513-516. doi: 10.1136/gut.23.6.513
- Bainbridge, B. W., Karimi-Naser, L., Reife, R., Blethen, F., Ernst, R. K., & Darveau, R. P. (2008). Acyl chain specificity of the acyltransferases LpxA and LpxD and substrate availability contribute to lipid A fatty acid heterogeneity in *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*, *190*(13), 4549-4558. doi: 10.1128/JB.00234-08
- Beier, D., & Frank, R. (2000). Molecular characterization of two-component systems of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, *182*(8), 2068-2076. doi: 10.1128/jb.182.8.2068-2076.2000
- Bengoechea, J. A., Brandenburg, K., Arraiza, M. D., Seydel, U., Skurnik, M., & Moriyon, I. (2003). Pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains increase the outer membrane permeability in response to environmental stimuli by modulating lipopolysaccharide fluidity and lipid A structure. *Infect Immun*, *71*(4), 2014-2021. doi: 10.1128/iai.71.4.2014-2021.2003
- Bereswill, S., Lichte, F., Greiner, S., Waidner, B., Fassbinder, F., & Kist, M. (1999). The ferric uptake regulator (Fur) homologue of *Helicobacter pylori*: functional analysis of the coding gene and controlled production of the recombinant protein in *Escherichia coli*. *Med Microbiol Immunol*, *188*(1), 31-40. doi: 10.1007/s004300050102
- Brown, L. M., Thomas, T. L., Ma, J. L., Chang, Y. S., You, W. C., Liu, W. D., . . . Gail, M. H. (2001). *Helicobacter pylori* infection in rural China: exposure to domestic animals during childhood and adulthood. *Scand J Infect Dis*, *33*(9), 686-691.
- Caroff, M., & Novikov, A. (2011). Micromethods for lipid A isolation and structural characterization. *Methods Mol Biol*, *739*, 135-146. doi: 10.1007/978-1-61779-102-4_12
- Carpenter, B. M., Gilbreath, J. J., Pich, O. Q., McKelvey, A. M., Maynard, E. L., Li, Z. Z., & Merrell, D. S. (2013). Identification and characterization of novel *Helicobacter pylori* apo-fur-regulated target genes. *J Bacteriol*, *195*(24), 5526-5539. doi: 10.1128/JB.01026-13
- Clyne, M., Labigne, A., & Drumm, B. (1995). *Helicobacter pylori* requires an acidic environment to survive in the presence of urea. *Infect Immun*, *63*(5), 1669-1673.
- Coppelli, L., Diaz, L. A., Riquelme, A., Waeger, C., Rollan, A., Bellolio, E., . . . Coppelli, C. (2019). [Protocolized referral to endoscopy and *Helicobacter pylori* detected in stools aimed to

- decrease endoscopy waiting lists]. *Rev Med Chil*, 147(11), 1382-1389. doi: 10.4067/S0034-98872019001101382
- Crabtree, J. E. (1996a). Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther*, 10 Suppl 1, 29-37.
- Crabtree, J. E. (1996b). Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 215, 3-10.
- Crabtree, J. E., & Lindley, I. J. (1994). Mucosal interleukin-8 and *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 6 Suppl 1, S33-38.
- Croxen, M. A., Sisson, G., Melano, R., & Hoffman, P. S. (2006). The *Helicobacter pylori* chemotaxis receptor TlpB (HP0103) is required for pH taxis and for colonization of the gastric mucosa. *J Bacteriol*, 188(7), 2656-2665. doi: 10.1128/JB.188.7.2656-2665.2006
- Chouhan, D., Barani Devi, T., Chattopadhyay, S., Dharmaseelan, S., Nair, G. B., Devadas, K., & Radhakrishna Pillai, M. (2019). *Mycobacterium abscessus* infection in the stomach of patients with various gastric symptoms. *PLoS Negl Trop Dis*, 13(11), e0007799. doi: 10.1371/journal.pntd.0007799
- Danielli, A., Roncarati, D., Delany, I., Chiarini, V., Rappuoli, R., & Scarlato, V. (2006). In vivo dissection of the *Helicobacter pylori* Fur regulatory circuit by genome-wide location analysis. *J Bacteriol*, 188(13), 4654-4662. doi: 10.1128/JB.00120-06
- de Bernard, M., & Josenhans, C. (2014). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 19 Suppl 1, 11-18. doi: 10.1111/hel.12160
- Dhaenens, L., Szczebara, F., Van Nieuwenhuysse, S., & Husson, M. O. (1999). Comparison of iron uptake in different *Helicobacter* species. *Res Microbiol*, 150(7), 475-481. doi: 10.1016/s0923-2508(99)00109-6
- Eaton, K. A., & Krakowka, S. (1994). Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, 62(9), 3604-3607.
- Eaton, K. A., Morgan, D. R., & Krakowka, S. (1992). Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*, 37(2), 123-127. doi: 10.1099/00222615-37-2-123
- Fernandez, P. A., Velasquez, F., Garcias-Papayani, H., Amaya, F. A., Ortega, J., Gomez, S., . . . Alvarez, S. A. (2018). Fnr and ArcA Regulate Lipid A Hydroxylation in *Salmonella Enteritidis* by Controlling *lpxO* Expression in Response to Oxygen Availability. *Front Microbiol*, 9, 1220. doi: 10.3389/fmicb.2018.01220
- Fox, J. G. (1995). Non-human reservoirs of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther*, 9 Suppl 2, 93-103.
- Gaddy, J. A., Radin, J. N., Cullen, T. W., Chazin, W. J., Skaar, E. P., Trent, M. S., & Algood, H. M. (2015). *Helicobacter pylori* Resists the Antimicrobial Activity of Calprotectin via Lipid A Modification and Associated Biofilm Formation. *MBio*, 6(6), e01349-01315. doi: 10.1128/mBio.01349-15
- Gancz, H., Censini, S., & Merrell, D. S. (2006). Iron and pH homeostasis intersect at the level of Fur regulation in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, 74(1), 602-614. doi: 10.1128/IAI.74.1.602-614.2006
- Gasbarrini, G., Pretolani, S., Bonvicini, F., Gatto, M. R., Tonelli, E., Megraud, F., . . . Grassi, M. (1995). A population based study of *Helicobacter pylori* infection in a European country: the San Marino Study. Relations with gastrointestinal diseases. *Gut*, 36(6), 838-844.
- Gibbons, H. S., Kalb, S. R., Cotter, R. J., & Raetz, C. R. (2005). Role of Mg²⁺ and pH in the modification of *Salmonella* lipid A after endocytosis by macrophage tumour cells. *Mol Microbiol*, 55(2), 425-440. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04409.x

- Goh, K. L., Peh, S. C., Wong, N. W., Parasakthi, N., & Puthuchery, S. D. (1990). *Campylobacter pylori* infection: experience in a multiracial population. *J Gastroenterol Hepatol*, 5(3), 277-280.
- Gonciarz, W., Walencka, M., Moran, A. P., Hinc, K., Obuchowski, M., & Chmiela, M. (2019). Upregulation of MUC5AC production and deposition of LEWIS determinants by HELICOBACTER PYLORI facilitate gastric tissue colonization and the maintenance of infection. *J Biomed Sci*, 26(1), 23. doi: 10.1186/s12929-019-0515-z
- Graham, D. Y., Alpert, L. C., Smith, J. L., & Yoshimura, H. H. (1988). Iatrogenic *Campylobacter pylori* infection is a cause of epidemic achlorhydria. *Am J Gastroenterol*, 83(9), 974-980.
- Groisman, E. A. (2001). The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol*, 183(6), 1835-1842. doi: 10.1128/JB.183.6.1835-1842.2001
- Haley, K. P., & Gaddy, J. A. (2015a). *Helicobacter pylori*: Genomic Insight into the Host-Pathogen Interaction. *Int J Genomics*, 2015, 386905. doi: 10.1155/2015/386905
- Haley, K. P., & Gaddy, J. A. (2015b). Metalloregulation of *Helicobacter pylori* physiology and pathogenesis. *Front Microbiol*, 6, 911. doi: 10.3389/fmicb.2015.00911
- Huber, M., Kalis, C., Keck, S., Jiang, Z., Georgel, P., Du, X., . . . Freudenberg, M. A. (2006). R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells. *Eur J Immunol*, 36(3), 701-711. doi: 10.1002/eji.200535593
- Iizasa, H., Ishihara, S., Richardo, T., Kanehiro, Y., & Yoshiyama, H. (2015). Dysbiotic infection in the stomach. *World J Gastroenterol*, 21(40), 11450-11457. doi: 10.3748/wjg.v21.i40.11450
- Ishihara, S., Rumi, M. A., Kadowaki, Y., Ortega-Cava, C. F., Yuki, T., Yoshino, N., . . . Kinoshita, Y. (2004). Essential role of MD-2 in TLR4-dependent signaling during *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *J Immunol*, 173(2), 1406-1416. doi: 10.4049/jimmunol.173.2.1406
- Kabir, S. (2004). Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review. *Helicobacter*, 9(2), 115-123. doi: 10.1111/j.1083-4389.2004.00207.x
- Karttunen, R., Karttunen, T., Ekre, H. P., & MacDonald, T. T. (1995). Interferon gamma and interleukin 4 secreting cells in the gastric antrum in *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis. *Gut*, 36(3), 341-345.
- Kiela, P. R., & Ghishan, F. K. (2016). Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 30(2), 145-159. doi: 10.1016/j.bpg.2016.02.007
- Kim, H. M., Park, B. S., Kim, J. I., Kim, S. E., Lee, J., Oh, S. C., . . . Lee, J. O. (2007). Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell*, 130(5), 906-917. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.002
- Kim, N., Marcus, E. A., Wen, Y., Weeks, D. L., Scott, D. R., Jung, H. C., . . . Sachs, G. (2004). Genes of *Helicobacter pylori* regulated by attachment to AGS cells. *Infect Immun*, 72(4), 2358-2368.
- Korbakis, D., Fragoulis, E. G., & Scorilas, A. (2013). Quantification and study of the L-DOPA decarboxylase expression in gastric adenocarcinoma cells treated with chemotherapeutic substances. *Anticancer Drugs*, 24(3), 291-299. doi: 10.1097/CAD.0b013e32835db25a
- Kovach, N. L., Yee, E., Munford, R. S., Raetz, C. R., & Harlan, J. M. (1990). Lipid IVA inhibits synthesis and release of tumor necrosis factor induced by lipopolysaccharide in human whole blood ex vivo. *J Exp Med*, 172(1), 77-84.
- Krishnamurthy, P., Parlow, M., Zitzer, J. B., Vakil, N. B., Mobley, H. L., Levy, M., . . . Dunn, B. E. (1998). *Helicobacter pylori* containing only cytoplasmic urease is susceptible to acid. *Infect Immun*, 66(11), 5060-5066.

- Li, H., Liao, T., Debowski, A. W., Tang, H., Nilsson, H. O., Stubbs, K. A., . . . Benghezal, M. (2016). Lipopolysaccharide Structure and Biosynthesis in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, *21*(6), 445-461. doi: 10.1111/hel.12301
- Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac, P., . . . Achtman, M. (2007). An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*, *445*(7130), 915-918. doi: 10.1038/nature05562
- Mahmoodi, M., Alizadeh, A. M., Sohanaki, H., Rezaei, N., Amini-Najafi, F., Khosravi, A. R., . . . Khori, V. (2012). Impact of fumonisin B1 on the production of inflammatory cytokines by gastric and colon cell lines. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, *11*(2), 165-173. doi: 011.02/ijaai.165173
- Marcus, E. A., Sachs, G., & Scott, D. R. (2018). Acid-regulated gene expression of *Helicobacter pylori*: Insight into acid protection and gastric colonization. *Helicobacter*, *23*(3), e12490. doi: 10.1111/hel.12490
- Marcus, E. A., Sachs, G., Wen, Y., Feng, J., & Scott, D. R. (2012). Role of the *Helicobacter pylori* sensor kinase ArsS in protein trafficking and acid acclimation. *J Bacteriol*, *194*(20), 5545-5551. doi: 10.1128/JB.01263-12
- Marolda, C. L., Lahiry, P., Vines, E., Saldias, S., & Valvano, M. A. (2006). Micromethods for the characterization of lipid A-core and O-antigen lipopolysaccharide. *Methods Mol Biol*, *347*, 237-252. doi: 10.1385/1-59745-167-3:237
- Marshall, B. J., & Warren, J. R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, *1*(8390), 1311-1315.
- McGowan, C. C., Cover, T. L., & Blaser, M. J. (1994). The proton pump inhibitor omeprazole inhibits acid survival of *Helicobacter pylori* by a urease-independent mechanism. *Gastroenterology*, *107*(5), 1573-1578.
- Miles, S., Piazuelo, M. B., Semino-Mora, C., Washington, M. K., Dubois, A., Peek, R. M., Jr., . . . Merrell, D. S. (2010). Detailed in vivo analysis of the role of *Helicobacter pylori* Fur in colonization and disease. *Infect Immun*, *78*(7), 3073-3082. doi: 10.1128/IAI.00190-10
- Mills, G., Dumigan, A., Kidd, T., Hopley, L., & Bengoechea, J. A. (2017). Identification and Characterization of Two *Klebsiella pneumoniae* lpxL Lipid A Late Acyltransferases and Their Role in Virulence. *Infect Immun*, *85*(9). doi: 10.1128/IAI.00068-17
- Mizote, T., Yoshiyama, H., & Nakazawa, T. (1997). Urease-independent chemotactic responses of *Helicobacter pylori* to urea, urease inhibitors, and sodium bicarbonate. *Infect Immun*, *65*(4), 1519-1521.
- Mizuno, T., Ando, T., Nobata, K., Tsuzuki, T., Maeda, O., Watanabe, O., . . . Goto, H. (2005). Interleukin-17 levels in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa and pathologic sequelae of colonization. *World J Gastroenterol*, *11*(40), 6305-6311.
- Moran, A. P., Knirel, Y. A., Senchenkova, S. N., Widmalm, G., Hynes, S. O., & Jansson, P. E. (2002). Phenotypic variation in molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. Acid-induced phase variation in Lewis(x) and Lewis(y) expression by *H. Pylori* lipopolysaccharides. *J Biol Chem*, *277*(8), 5785-5795. doi: 10.1074/jbc.M108574200
- Moran, A. P., Lindner, B., & Walsh, E. J. (1997). Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides. *J Bacteriol*, *179*(20), 6453-6463. doi: 10.1128/jb.179.20.6453-6463.1997
- Morris, A., & Nicholson, G. (1987). Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am J Gastroenterol*, *82*(3), 192-199.

- Munch, R., Hiller, K., Grote, A., Scheer, M., Klein, J., Schobert, M., & Jahn, D. (2005). Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics*, *21*(22), 4187-4189. doi: 10.1093/bioinformatics/bti635
- Muotiala, A., Helander, I. M., Pyhala, L., Kosunen, T. U., & Moran, A. P. (1992). Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun*, *60*(4), 1714-1716.
- Nardone, G., & Compare, D. (2015). The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? *United European Gastroenterol J*, *3*(3), 255-260. doi: 10.1177/2050640614566846
- Netea, M. G., van Deuren, M., Kullberg, B. J., Cavaillon, J. M., & Van der Meer, J. W. (2002). Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol*, *23*(3), 135-139. doi: 10.1016/s1471-4906(01)02169-x
- Nielsen, H., Birkholz, S., Andersen, L. P., & Moran, A. P. (1994). Neutrophil activation by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. *J Infect Dis*, *170*(1), 135-139. doi: 10.1093/infdis/170.1.135
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*, *67*(4), 593-656. doi: 10.1128/mmbr.67.4.593-656.2003
- Park, B. S., & Lee, J. O. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*, *45*, e66. doi: 10.1038/emm.2013.97
- Parra-Sepulveda, C., Merino, J. S., Saez-Carrillo, K., Gonzalez, C., & Garcia-Cancino, A. (2019). Antibiotic Resistance Surveillance of *Helicobacter Pylori* at the Biobio Region (Chile) in a Decade. *Arq Gastroenterol*, *56*(4), 361-366. doi: 10.1590/S0004-2803.201900000-72
- Parsonnet, J., Friedman, G. D., Vandersteen, D. P., Chang, Y., Vogelman, J. H., Orentreich, N., & Sibley, R. K. (1991). *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med*, *325*(16), 1127-1131. doi: 10.1056/NEJM199110173251603
- Parsonnet, J., Shmueli, H., & Haggerty, T. (1999). Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA*, *282*(23), 2240-2245.
- Pateraki, E., Mentis, A., Spiliadis, C., Sophianos, D., Stergiatou, I., Skandalis, N., & Weir, D. M. (1990). Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in Greece. *FEMS Microbiol Immunol*, *2*(3), 129-136. doi: 10.1111/j.1574-6968.1990.tb03512.x
- Peek, R. M. (2008). *Helicobacter pylori* infection and disease: from humans to animal models. *Dis Model Mech*, *1*(1), 50-55. doi: 10.1242/dmm.000364
- Peek, R. M., Jr., & Blaser, M. J. (2002). *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*, *2*(1), 28-37. doi: 10.1038/nrc703
- Perepelov, A. V., Senchenkova, S. N., & Knirel, Y. A. (2020). Variations in the Expression of Terminal Oligosaccharide Units and Glycosylation of Poly(N-acetyllactosamine) Chain in the *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharide upon Colonization of Rhesus Macaques. *Biochemistry (Mosc)*, *85*(2), 234-240. doi: 10.1134/S0006297920020108
- Pflock, M., Finsterer, N., Joseph, B., Mollenkopf, H., Meyer, T. F., & Beier, D. (2006). Characterization of the ArsRS regulon of *Helicobacter pylori*, involved in acid adaptation. *J Bacteriol*, *188*(10), 3449-3462. doi: 10.1128/JB.188.10.3449-3462.2006
- Pflock, M., Kennard, S., Finsterer, N., & Beier, D. (2006). Acid-responsive gene regulation in the human pathogen *Helicobacter pylori*. *J Biotechnol*, *126*(1), 52-60. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.03.045
- Pich, O. Q., Carpenter, B. M., Gilbreath, J. J., & Merrell, D. S. (2012). Detailed analysis of *Helicobacter pylori* Fur-regulated promoters reveals a Fur box core sequence and novel Fur-regulated genes. *Mol Microbiol*, *84*(5), 921-941. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08066.x

- Pich, O. Q., & Merrell, D. S. (2013). The ferric uptake regulator of *Helicobacter pylori*: a critical player in the battle for iron and colonization of the stomach. *Future Microbiol*, 8(6), 725-738. doi: 10.2217/fmb.13.43
- Poms, R. E., & Tatini, S. R. (2001). Survival of *Helicobacter pylori* in ready-to-eat foods at 4 degrees C. *Int J Food Microbiol*, 63(3), 281-286.
- Raetz, C. R., Reynolds, C. M., Trent, M. S., & Bishop, R. E. (2007). Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem*, 76, 295-329. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803
- Raetz, C. R., Ulevitch, R. J., Wright, S. D., Sibley, C. H., Ding, A., & Nathan, C. F. (1991). Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J*, 5(12), 2652-2660.
- Raetz, C. R., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 71, 635-700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414
- Reeves, P. R., Hobbs, M., Valvano, M. A., Skurnik, M., Whitfield, C., Coplin, D., . . . Rick, P. D. (1996). Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol*, 4(12), 495-503.
- Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., . . . et al. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*, 8(2), 217-225.
- Rubin, E. J., O'Brien, J. P., Ivanov, P. L., Brodbelt, J. S., & Trent, M. S. (2014). Identification of a broad family of lipid A late acyltransferases with non-canonical substrate specificity. *Mol Microbiol*, 91(5), 887-899. doi: 10.1111/mmi.12501
- Rubin, E. J., & Trent, M. S. (2013). Colonize, evade, flourish: how glyco-conjugates promote virulence of *Helicobacter pylori*. *Gut Microbes*, 4(6), 439-453. doi: 10.4161/gmic.25721
- Satin, B., Del Giudice, G., Della Bianca, V., Dusi, S., Laudanna, C., Tonello, F., . . . Rossi, F. (2000). The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp Med*, 191(9), 1467-1476.
- Scott, A. J., Oyler, B. L., Goodlett, D. R., & Ernst, R. K. (2017). Lipid A structural modifications in extreme conditions and identification of unique modifying enzymes to define the Toll-like receptor 4 structure-activity relationship. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1862(11), 1439-1450. doi: 10.1016/j.bbalip.2017.01.004
- Schar, J., Sickmann, A., & Beier, D. (2005). Phosphorylation-independent activity of atypical response regulators of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, 187(9), 3100-3109. doi: 10.1128/JB.187.9.3100-3109.2005
- Sharma, C. M., Hoffmann, S., Darfeuille, F., Reignier, J., Findeiss, S., Sittka, A., . . . Vogel, J. (2010). The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 464(7286), 250-255. doi: 10.1038/nature08756
- Shen, J. J., Chen, F., Wang, X. X., Liu, X. F., Chen, X. A., Mao, X. M., & Li, Y. Q. (2018). Substrate Specificity of Acyltransferase Domains for Efficient Transfer of Acyl Groups. *Front Microbiol*, 9, 1840. doi: 10.3389/fmicb.2018.01840
- Siliakus, M. F., van der Oost, J., & Kengen, S. W. M. (2017). Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure. *Extremophiles*, 21(4), 651-670. doi: 10.1007/s00792-017-0939-x
- Stead, C., Tran, A., Ferguson, D., Jr., McGrath, S., Cotter, R., & Trent, S. (2005). A novel 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) hydrolase that removes the outer Kdo sugar of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *J Bacteriol*, 187(10), 3374-3383. doi: 10.1128/JB.187.10.3374-3383.2005

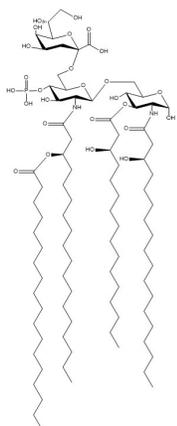
- Stead, C. M., Beasley, A., Cotter, R. J., & Trent, M. S. (2008). Deciphering the unusual acylation pattern of *Helicobacter pylori* lipid A. *J Bacteriol*, *190*(21), 7012-7021. doi: 10.1128/JB.00667-08
- Stead, C. M., Zhao, J., Raetz, C. R., & Trent, M. S. (2010). Removal of the outer Kdo from *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and its impact on the bacterial surface. *Mol Microbiol*, *78*(4), 837-852. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07304.x
- Steimle, A., Autenrieth, I. B., & Frick, J. S. (2016). Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *Int J Med Microbiol*, *306*(5), 290-301. doi: 10.1016/j.ijmm.2016.03.001
- Testerman, T. L., Conn, P. B., Mobley, H. L., & McGee, D. J. (2006). Nutritional requirements and antibiotic resistance patterns of *Helicobacter* species in chemically defined media. *J Clin Microbiol*, *44*(5), 1650-1658. doi: 10.1128/JCM.44.5.1650-1658.2006
- Tran, A. X., Karbarz, M. J., Wang, X., Raetz, C. R., McGrath, S. C., Cotter, R. J., & Trent, M. S. (2004). Periplasmic cleavage and modification of the 1-phosphate group of *Helicobacter pylori* lipid A. *J Biol Chem*, *279*(53), 55780-55791. doi: 10.1074/jbc.M406480200
- Tran, A. X., Stead, C. M., & Trent, M. S. (2005). Remodeling of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *J Endotoxin Res*, *11*(3), 161-166. doi: 10.1179/096805105X37349
- Tran, A. X., Whittimore, J. D., Wyrick, P. B., McGrath, S. C., Cotter, R. J., & Trent, M. S. (2006). The lipid A 1-phosphatase of *Helicobacter pylori* is required for resistance to the antimicrobial peptide polymyxin. *J Bacteriol*, *188*(12), 4531-4541. doi: 10.1128/JB.00146-06
- Tsai, C. M., & Frasch, C. E. (1982). A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, *119*(1), 115-119. doi: 10.1016/0003-2697(82)90673-x
- Valenzuela, M., Cerda, O., & Toledo, H. (2003). Overview on chemotaxis and acid resistance in *Helicobacter pylori*. *Biol Res*, *36*(3-4), 429-436. doi: 10.4067/s0716-97602003000300014
- Weeks, D. L., Eskandari, S., Scott, D. R., & Sachs, G. (2000). A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science*, *287*(5452), 482-485.
- Wen, Y., Marcus, E. A., Matrubutham, U., Gleeson, M. A., Scott, D. R., & Sachs, G. (2003). Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, *71*(10), 5921-5939.
- Yi, E. C., & Hackett, M. (2000). Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria. *Analyst*, *125*(4), 651-656. doi: 10.1039/b000368i

10.- Anexo

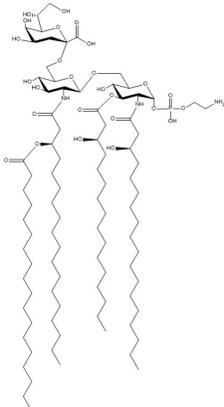
10.1.- Especies de lípido A descritas en la literatura:

| Señal (unidad m/z) | Descripción estructura | Referencia |
|-----------------------|---|----------------------------|
| 1506 | Tetraacilada, 4' desfosforilada, 1 Fosforilada, 1 Kdo | (Tran et al., 2006) |
| 1547 | Tetraacilada, 4' desfosforilada, 1 PEtN, 1 Kdo | (Moran et al., 1997) |
| 1718 | Hexaacilada, 4' Fosfato, 1 desfosforilada, 0 Kdo | (C. Stead et al., 2005) |
| 1747 | Pentaacilada, 4' Desfosforilada, 1 PEtN, 1 Kdo | (C. M. Stead et al., 2008) |
| 1825 | Pentaacilada, 4' Fosforilada, 1 PEtN, 1 Kdo | (Gaddy et al., 2015) |
| 1938 | Hexaacilado, 4' Fosforilado, 1 Kdo | (C. Stead et al., 2005) |
| 2014 | Hexaacilada, 4' desfosforilada, 1 PEtN, 1 Kdo | (C. M. Stead et al., 2008) |
| 2048 | Hexaacilada, 1 y 4' Fosforilada, 1 Kdo | (Tran et al., 2006) |
| 2092 | Hexaacilado, 4' Fosforilado, 1 PEtN, 1 Kdo | (Gaddy et al., 2015) |
| 2158 | Hexaacilado, 4' Fosforilado, 2 Kdo | (C. Stead et al., 2005) |
| 2238 | Hexaacilado, 1 y 4' Fosforilado, 2 Kdo | (Tran et al., 2004) |

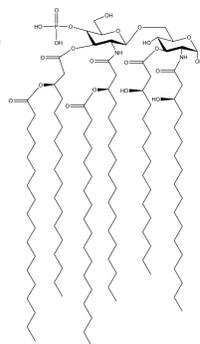
10.2.- Estructuras de lípido A descritas en literatura (ver tabla anterior)



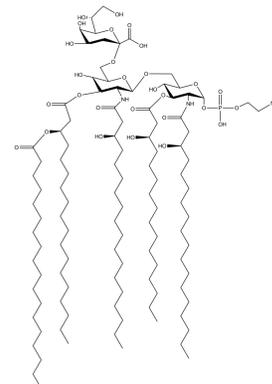
1509 m/z



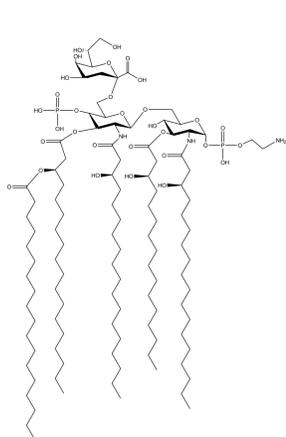
1548 m/z



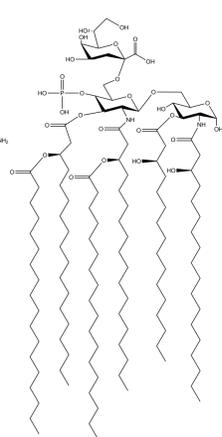
1718 m/z



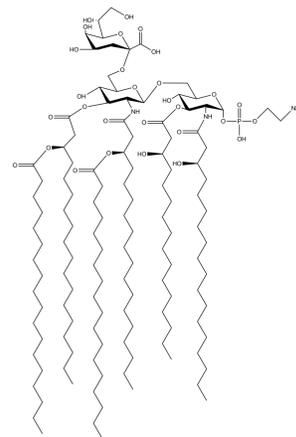
1747 m/z



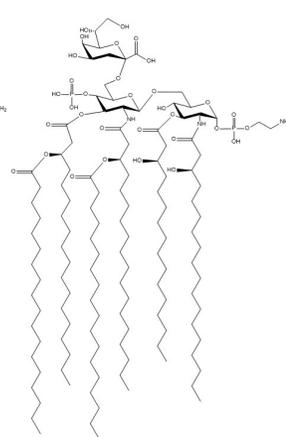
1825 m/z



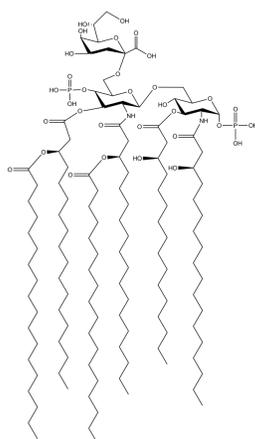
1938 m/z



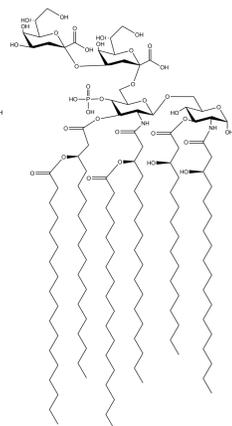
2014 m/z



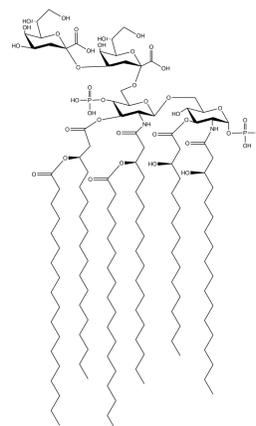
2092 m/z



2048 m/z

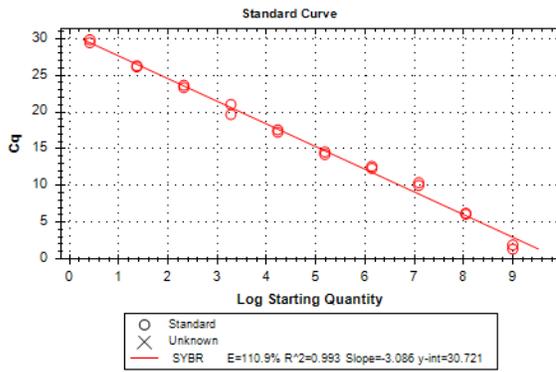


2158 m/z

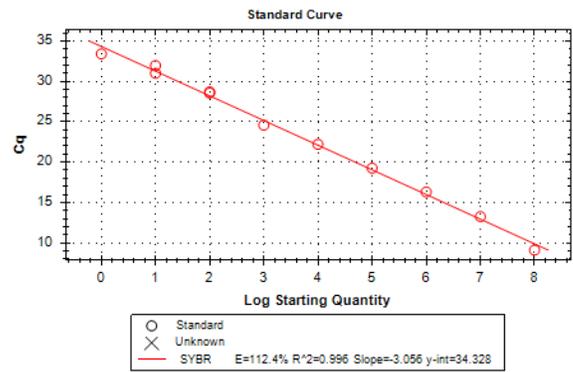


2238 m/z

10.3.- Curvas estándar qPCR.

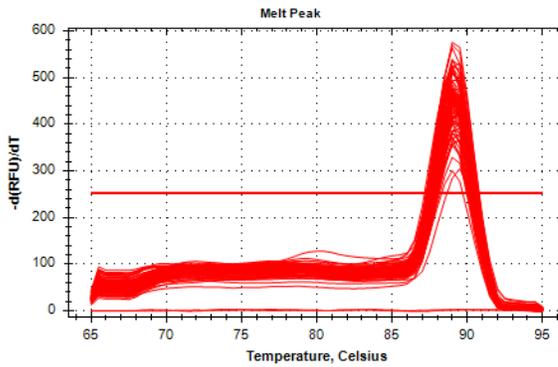


Curva Estándar GAPDH

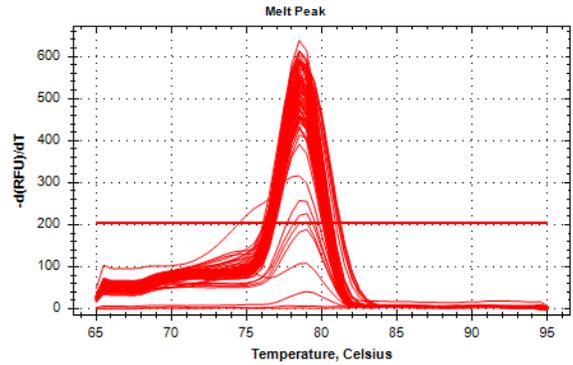


Curva Estándar IL-8

10.4.- Curvas de Melting.



Curva de Melting amplicones GAPDH



Curva de Melting amplicones IL-8