



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Programa de Doctorado en Bioquímica

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

“Vesículas extracelulares liberadas de la línea celular gástrica GES-1 infectada con *Helicobacter pylori* promueven características asociadas al desarrollo y la progresión del Cáncer Gástrico”

Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado de Doctora en Bioquímica por:

María Fernanda González Castro

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Andrew FG Quest
Dr. Alejandro Corvalan
Santiago – Chile 2021

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

MARIA FERNANDA GONZÁLEZ CASTRO

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendida el día _____ de _____ de 2021.

Directores de Tesis:

Dr. Andrew Quest: _____

Dr. Alejandro Corvalan: _____

Comisión Informante de Tesis:

Dra. Lee Meisel (Presidenta): _____

Dr. Vicente Torres: _____

Dra. Roxana Pincheira: _____

Dr. Jorge Martínez: _____

**Quiero dedicar este trabajo a mis padres, hermanos y compañero de
vida.**

“Siempre acabamos llegando donde nos esperan”
—Libro de los itinerarios
-José Saramago, *El viaje del elefante*

AGRADECIMIENTOS:

Primeramente, quiero agradecer a mis padres, por su apoyo y amor incondicional hoy y siempre. Sin ustedes nada de esto hubiese sido posible.

Quiero agradecer a mis hermanos, que también han sido un pilar fundamental a lo largo de toda mi vida.

También quiero agradecer a mi compañero de vida Juan Sebastián, por su constante ayuda y apoyo durante esta etapa.

Gracias a todos mis compañeros del Laboratorio de Comunicaciones Celulares y a la Dra. Lisette Leyton. Siempre estuvieron para mí, y cada discusión con ustedes sirvió para mejorar sustancialmente este trabajo.

Finalmente quiero agradecer a mis tutores, el Dr. Alejandro Corvalán, por su buena disposición siempre y al Dr. Andrew Quest por su guía, apoyo y paciencia durante la realización de este trabajo.

FINANCIAMIENTOS:

El trabajo experimental de esta tesis de doctorado se realizó gracias al apoyo del Dr. Andrew Quest en el laboratorio de Comunicaciones Celulares, ubicado en la Facultad de Medicina de la Universidad Chile.

Finalmente, se pudo realizar esta tesis gracias a los siguientes financiamientos:

Financiamiento otorgado al Dr. Andrew Quest.

- Proyecto FONDECYT 1170925, 1210644.

Financiamiento otorgado al Dr. Andrew Quest y Dr. Alejandro Corvalan

- Proyecto FONDAP 15130011.

Financiamiento otorgado a María Fernanda González Castro.

- Beca Doctorado Nacional, ANID 21170292 (2017-2021).
- Beca de Gastos Operacionales para la realización de Tesis Doctoral, ANID 21170292 (2019-2020)
- Beca de Extensión de Tesis, ANID 21170292.

PUBLICACIONES OBTENIDAS DURANTE EL DESARROLLO DE
ESTA TESIS

Burgos-Ravanal, Renato, América Campos, Magda C. Díaz-Vesga, **María Fernanda González**, Daniela León, Lorena Lobos-González, Lisette Leyton, Marcelo J. Kogan, and Andrew FG Quest. "Extracellular Vesicles as Mediators of Cancer Disease and as Nanosystems in Theranostic Applications." *Cancers* 13, no. 13 (2021): 3324.

González, María Fernanda, Paula Díaz, Alejandra Sandoval-Bórquez, Daniela Herrera, and Andrew FG Quest. "Helicobacter pylori Outer Membrane Vesicles and Extracellular Vesicles from Helicobacter pylori-Infected Cells in Gastric Disease Development." *International Journal of Molecular Sciences* 22, no. 9 (2021): 4823.

Orellana-Serradell, Octavio, Magda C. Díaz, **María Fernanda González**, Myriam Gutiérrez, Daniela Herrera, Daniela Jara, Diego Maureira, Jenny L. Ruiz-Fuentes, Sofia Sanhueza, and Lisette Leyton. "Does Peer Reviewing for COVID-19-Related Papers Still Work?." *Frontiers in research metrics and analytics* 5 (2020).

Valenzuela-Valderrama, Manuel, Paulina Cerda-Opazo, Steffen Backert, **María Fernanda González**, Nicolás Carrasco-Véliz, Carla Jorquera-Cordero, Sergio Wehinger, Jimena Canales, Denisse Bravo, and Andrew FG Quest. "The helicobacter pylori urease virulence factor is required for the induction of hypoxia-induced factor-1 α in gastric cells." *Cancers* 11, no. 6 (2019): 799.

Campos, America, Renato Burgos-Ravanal, **María Fernanda González**, Ricardo Huilcaman, Lorena Lobos González, and Andrew Frederick Geoffery Quest. "Cell intrinsic and extrinsic mechanisms of caveolin-1-enhanced metastasis." *Biomolecules* 9, no. 8 (2019): 314.

TRABAJOS EN PREPARACIÓN

María Fernanda González, Renato Burgos, Manuel Valenzuela, Alejandro H. Corvalan and Andrew F.G. Quest. EVs from gastric epithelial GES-1 cells infected with *H. pylori* promote changes in recipient cells associated with malignancy

PRESENTACION A CONGRESO NACIONAL

I Congreso de Estudiantes de Posgrado Campus Dra. Eloísa Díaz Universidad de Chile, 10 y 11 de Diciembre de 2020.

En el cual obtuvo el 2do lugar en formato de presentación oral: “La comunicación a través de Vesículas Extracelulares de células gástricas cambia luego de infección por *Helicobacter pylori*”

XXXIII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Biología Celular. Noviembre 25-29 del 2019. Puerto Varas, Chile

POSTER: “Release of extracellular vesicles from gastric cells is enhanced by infection with *Helicobacter pylori*”. **María Fernanda González C.** and Andrew Quest.

Índice General

| | |
|--|-------------|
| <i>Índice general</i> | <i>viii</i> |
| <i>Índice de Figuras</i> | <i>xii</i> |
| <i>Índice de Tablas</i> | <i>xiv</i> |
| <i>Índice de Figuras Suplementarias</i> | <i>xv</i> |
| <i>Índice de Tablas Suplementarias</i> | <i>xvi</i> |
| <i>Resumen</i> | <i>xvii</i> |
| <i>Abstract</i> | <i>xxi</i> |
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Estadísticas de Cáncer gástrico en el mundo y en Chile..... | 1 |
| 1.2. Cáncer gástrico | 1 |
| 1.2.1. <i>Helicobacter pylori</i> es el principal factor de riesgo para el desarrollo de Cáncer Gástrico..... | 2 |
| 1.2.1.1. La infección <i>H. pylori</i> induce la generación de citoquinas pro-inflamatorias | 5 |
| 1.2.1.2. <i>H. pylori</i> es capaz de silenciar genes supresores de tumores | 6 |
| 1.2.1.3 La infección por <i>H. pylori</i> induce cambios a nivel celular | 10 |
| 1.3. Rol de las Vesículas Extracelulares en Comunicación Celular | 12 |
| 1.3.1. Rol de las Vesículas Extracelulares en Cáncer Gástrico | 14 |
| 1.3.2. Vesículas Extracelulares en infección con <i>H. pylori</i> | 15 |
| Resumen de antecedentes | 19 |
| Objetivo general | 21 |
| Objetivos específicos | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 2. Metodología | 22 |
| 2.1. Reactivos | 22 |
| 2.2. Cultivo de líneas celulares..... | 24 |
| 2.3. Cultivo Bacteriano | 24 |
| 2.4. Infección de células gástricas GES-1 por <i>H. pylori</i> cepa 26695 WT | 25 |
| 2.5. Obtención del FBS libre de EVs (SFB EV-Free)..... | 26 |
| 2.6. Aislamiento de Vesículas Extracelulares a partir de medio condicionado mediante Exospin TM | 27 |
| 2.7. Aislamiento de Vesículas Extracelulares a partir de medio condicionado mediante protocolo de Ultracentrifugación | 28 |
| 2.8. Determinación del tamaño y la concentración de las EVs mediante Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) | 29 |
| 2.9. Análisis de las proteínas celulares y de EVs por <i>Western Blot</i> | 29 |
| 2.10. Pre-tratamiento de células con EVs..... | 31 |
| 2.11. Determinación de la expresión génica relativa por RT-qPCR | 32 |
| 2.12. Viabilidad celular..... | 33 |
| 2.13. Ensayos de migración celular..... | 34 |
| 2.14. Ensayos de invasión celular | 35 |
| 2.15. Ensayos de migración transendotelial..... | 36 |
| 2.16. Ensayo de formación de redes vasculares <i>in vitro</i> | 37 |
| 2.17. Análisis proteómico de las EVs mediante Espectrometría de Masas (LC-ESI-MS/MS) | 38 |
| 2.18. Procesamiento de datos y análisis estadístico | 40 |
| | |
| 3. Resultados..... | 41 |
| 3.1. Efectos de la infección con <i>H. pylori</i> de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 | 41 |
| 3.1.1. Efecto de la infección de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 con <i>H. pylori</i> sobre los niveles de las proteínas E-cadherina y Caveolina-1 | 42 |

| | |
|---|----|
| 3.1.2. Efecto de la infección de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 con <i>H. pylori</i> sobre viabilidad celular | 44 |
| 3.1.3. Efecto de la infección de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 con <i>H. pylori</i> sobre la expresión génica relativa de citoquinas | 45 |
| 3.1.4. Efecto de la infección de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 con <i>H. pylori</i> sobre la migración celular..... | 49 |
| 3.2. Purificación y caracterización de EVs liberadas de células epiteliales gástricas GES-1 infectadas o no con <i>H. pylori</i> | 50 |
| 3.2.1. Caracterización de EVs liberadas de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 infectadas o no con <i>H. pylori</i> purificadas mediante Ultracentrifugación..... | 51 |
| 3.3. Efectos de las EVs liberadas de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 infectadas o no con <i>H. pylori</i> en células receptoras | 54 |
| 3.3.1. Determinación la viabilidad celular de células de las líneas celulares gástricas GES-1 y AGS estimuladas con EVs liberadas de células GES-1 infectadas o no con <i>H. pylori</i> | 56 |
| 3.3.2. Determinación de los niveles relativos de expresión de citoquinas en células de las líneas celulares gástricas GES-1 y AGS estimuladas con EVs liberadas de células GES-1 infectadas o no con <i>H. pylori</i> | 57 |
| 3.3.3. Determinación de la migración celular de células de las líneas celulares gástricas GES-1 y AGS estimuladas con EVs liberadas de células GES-1 infectadas o no con <i>H. pylori</i> | 61 |
| 3.3.4. Determinación de la invasión celular <i>in vitro</i> de células de las líneas celulares gástricas GES-1 y AGS estimuladas con EVs liberadas de células GES-1 infectadas o no con <i>H. pylori</i> | 64 |
| 3.3.5. Determinación de la migración transendotelial de células de las líneas celulares gástricas GES-1 y AGS estimuladas con EVs aisladas de células GES-1 infectadas o no con <i>H. pylori</i> | 67 |

| | |
|--|------------|
| 3.3.6. Determinación de la formación de redes vasculares de células de la línea endotelial EA.hy926 luego de estímulo con EVs aisladas de células GES-1 infectadas o no con <i>H. pylori</i> | 70 |
| 3.3.7. Análisis de proteómica por espectrometría de masas de EVHp- y EVHp+ | 73 |
| 4. Discusión | 76 |
| 4.1. Efectos de la infección con <i>H. pylori</i> de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 | 76 |
| 4.2. Purificación y caracterización de EVs liberadas de células epiteliales gástricas GES-1 infectadas o no con <i>H. pylori</i> | 86 |
| 4.3. Efectos de las EVs liberadas de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 infectadas o no con <i>H. pylori</i> en células receptoras | 89 |
| 4.4. Caracterización del contenido proteico de las EVs liberadas de células GES-1 infectadas o no con <i>H. pylori</i> | 97 |
| Resumen de resultados | 102 |
| Referencias | 103 |
| Anexos | 113 |

Índice de Figuras

| | |
|--|-----------|
| 1. Introducción | 1 |
| Figura 1.1. La inflamación asociada a <i>H. pylori</i> promueve la metilación de genes asociados con la supresión tumoral..... | 7 |
| Figura 1.2. Las vesículas extracelulares son una población heterogénea de vesículas de membrana derivadas de células | 13 |
| Figura 1.3. Modelo propuesto | 20 |
| 3. Resultados..... | 41 |
| Figura 3.1. Efecto de la infección con <i>H. pylori</i> de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 sobre la expresión de E-cadherina y Caveolina-1..... | 43 |
| Figura 3.2. Viabilidad celular en células epiteliales gástricas GES-1 luego de infección con <i>H. pylori</i> | 45 |
| Figura 3.3. Expresión génica relativa de citoquinas en células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 luego de infección con <i>H. pylori</i> | 48 |
| Figura 3.4. Efecto de la infección con <i>H. pylori</i> en la migración de las células GES-1 | 49 |
| Figura 3.5. Efectos de la infección con <i>H. pylori</i> de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 sobre la liberación de EVs..... | 53 |
| Figura 3.6. Viabilidad celular de células de las líneas celulares gástricas GES-1 y AGS luego de incubación con EVHp- o EVHp+ | 57 |
| Figura 3.7. Expresión genética relativa de citoquinas en células GES-1 estimuladas con EVHp- o EVHp+ durante 24 h..... | 59 |
| Figura 3.8. Expresión génica relativa de citoquinas en células AGS estimuladas con EVHp- y EVHp+ durante 24 h..... | 60 |
| Figura 3.9. Efectos de EVs liberadas de células gástricas GES-1 infectadas o no con <i>H. pylori</i> sobre la migración celular de células GES-1 | 62 |
| Figura 3.10. Efectos de EVs liberadas de células gástricas GES-1 infectadas o no con <i>H. pylori</i> sobre la migración celular de células AGS | 63 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 3.11. Efecto de EVs liberadas de células gástricas GES-1 infectadas o no con <i>H. pylori</i> sobre la invasión celular <i>in vitro</i> de células GES-1..... | 65 |
| Figura 3.12. Efectos de EVs liberadas de células gástricas GES-1 infectadas o no con <i>H. pylori</i> sobre la invasión celular <i>in vitro</i> de células AGS | 66 |
| Figura 3.13. Efectos de EVs liberadas de células gástricas GES-1 infectadas o no con <i>H. pylori</i> sobre la migración transendotelial <i>in vitro</i> de células GES-1 | 68 |
| Figura 3.14. Efectos de EVs liberadas de células gástricas GES-1 infectadas o no con <i>H. pylori</i> sobre la migración transendotelial <i>in vitro</i> de células AGS..... | 69 |
| Figura 3.15. Efectos de EVs liberadas de células gástricas GES-1 infectadas o no con <i>H. pylori</i> sobre la formación de redes vasculares <i>in vitro</i> en células endoteliales EA.hy926..... | 71 |
| Figura 3.16. Análisis de proteómica por espectrometría de masas de EVHp- y EVHp+ | 74 |
| 4. Discusión | 76 |
| Figura 4.1. Modelo esquemático del daño celular ocasionado por las EVs liberadas de células GES-1 infectadas con <i>H. pylori</i> | 101 |

Índice de Tablas

| | |
|--|-----------|
| 2. Metodología | 22 |
| Tabla 2.1. Secuencias de los <i>primers</i> y las temperaturas de hibridación | 33 |
| 3. Resultados | 41 |
| Tabla 3.1. Caracterización de EVs liberadas de células epiteliales gástricas GES-1 infectadas con <i>H. pylori</i> purificadas mediante Ultracentrifugación..... | 54 |
| Tabla 3.2. Proteínas que se encuentran exclusivamente en EVHp+ | 75 |

Índice de Figuras Suplementarias

| | |
|---|-----|
| Figura Suplementaria 1. Caracterización de EVs liberadas de células GES-1 infectadas (EVHp+) o sin infectar con <i>H. pylori</i> (EVHp-) purificadas mediante Exo-spin™. | 114 |
| Figura Suplementaria 2. Efecto de la concentración de EVs sobre la migración celular de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1..... | 116 |
| Figura Suplementaria 3. Migración celular de células EA.hy926 estimuladas con EVHp- o EVHp+ durante 24 h..... | 117 |
| Figura Suplementaria 4. Permeabilidad de monocapa de células endoteliales EA.hy926 luego de estímulo durante 24 h con EVHp- o EVHp+..... | 118 |

Índice de Tablas suplementarias

| | |
|---|-----|
| Tabla suplementaria 1. Caracterización de EVs liberadas de células epiteliales gástricas GES-1 infectadas con <i>H. pylori</i> , purificadas mediante Exo-spin™..... | 115 |
| Tabla suplementaria 2. Proteínas que se encuentran exclusivamente en EVHp-..... | 119 |
| Tabla suplementaria 3. Proteínas enriquecidas en EVHp+ en comparación con EVHp- | 119 |
| Tabla suplementaria 4. Proteínas enriquecidas en EVHp- en comparación con EVHp+ | 123 |

RESUMEN

El cáncer gástrico (CG) es la cuarta causa principal de mortalidad relacionada con el cáncer y el quinto cáncer más común en todo el mundo. En Chile, la situación es aún más alarmante, ya que el país ocupa el primer y quinto lugar, en cuanto a mortalidad e incidencia, respectivamente, en Latinoamérica. El CG se puede clasificar principalmente en dos tipos: el CG difuso, asociado a factores hereditarios y el CG intestinal, más asociado a factores ambientales. Entre los factores de riesgo asociados al desarrollo de CG intestinal se encuentran la infección por la bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). *H. pylori* es una bacteria gram-negativa que coloniza el epitelio gástrico, y se estima que al menos el 50% de la población adulta en todo el mundo posee esta bacteria. Los efectos oncogénicos de *H. pylori* en las células epiteliales se atribuyen directamente a la acción tóxica de los factores de virulencia expresados por la bacteria como CagA, VacA, GGT, Ureasa, entre otros, o indirectamente a los procesos inflamatorios producidos por la infección. En específico, la carcinogénesis gástrica inducida por *H. pylori* está asociada con inflamación crónica, caracterizada por el aumento de citoquinas pro-inflamatorias. Por otro lado, la infección con *H. pylori* ocasiona el silenciamiento de genes que funcionan como supresores de tumores y cambios a nivel celular en células gástricas y endoteliales, incluidos cambios en viabilidad y supervivencia celular, migración celular, entre otros. Estos hallazgos provienen de experimentos realizados *in vitro*, en células de cáncer gástrico o de estudios clínicos, realizados en pacientes infectados con *H. pylori*. Por último, recientes evidencias indican que la infección con *H. pylori* también ocasiona cambios en la comunicación celular mediada por Vesículas Extracelulares (EVs). La comunicación celular a través de EVs es importante en procesos fisiológicos y fisiopatológicos como las infecciones por patógenos, enfermedades autoinmunes y el cáncer. Sin embargo, aún se sabe muy poco acerca de los cambios que ocurren en la comunicación celular mediada por EVs en el contexto de infección con *H. pylori*. Estos antecedentes nos llevaron a plantear la siguiente hipótesis: **“EVs liberadas de línea celular gástrica GES-1 infectada con *H. pylori* promueven inflamación, angiogénesis y características asociadas a la progresión del cáncer”**. Por consiguiente, el objetivo

principal de esta tesis fue: demostrar que las EVs liberadas de la línea celular gástrica GES-1 infectada con *H. pylori*, promueven en células receptoras aumento de citoquinas pro-inflamatorias, y afectan procesos celulares como la proliferación, migración celular, invasión celular, migración transendotelial y formación de redes endoteliales vinculadas. Con los siguientes objetivos específicos: 1) Determinar en células GES-1 infectada con *H. pylori* cambios en: niveles de las proteínas E-cadherina y Caveolina-1; expresión de citoquinas pro-inflamatorias; y procesos celulares como proliferación y migración celular. 2) Evaluar cambios en la liberación de EVs de células GES-1 infectadas con *H. pylori*. Y por último 3) Determinar el rol de las EVs purificadas de células GES-1 infectadas con *H. pylori* en el aumento de citoquinas pro-inflamatorias, cambios en proliferación, migración celular, invasión celular, migración transendotelial y formación de redes endoteliales vinculadas, en células receptoras. Los resultados mostraron que la infección con *H. pylori* en las células gástricas no transformadas GES-1, indujo disminución de los niveles proteicos relativos de E-cadherina, una proteína que funciona como supresor de tumores. A su vez, indujo aumento de los niveles proteicos de Caveolina-1, una proteína que tienen un rol dual antagónico en cáncer, el cual depende del tipo de cáncer y estadio de la enfermedad. Adicionalmente, la infección con *H. pylori* en células GES-1 redujo en un ~20% la viabilidad celular; indujo el aumento de la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α IL-8 e IL-6; y disminuyó la migración celular en un ~50%. Adicionalmente, la infección con *H. pylori* en células GES-1 ocasionó un aumento de 2 veces en la liberación de EVs. Las EVs liberadas de células GES-1 infectadas con *H. pylori* (EVHp+) tuvieron un tamaño promedio ligeramente menor pero significativo comparado con las EVs aisladas de células no infectadas con *H. pylori* (EVHp-) (206 nm vs 227 nm, respectivamente). Por otro lado, en ambos tipos de EVs aisladas (EVHp- y EVHp+) se detectaron marcadores de EVs mediante *Western blot*. Se evaluó el efecto biológico de las EVs liberadas de células GES-1 infectadas o no con *H. pylori*, en células receptoras, incluyendo las células gástricas GES-1, células de cáncer gástrico AGS y las células endoteliales EA.hy926, realizando varios ensayos. El estímulo con EVHp+ redujo ~20% la viabilidad celular de células GES-1, pero no indujo cambios en la viabilidad de

las células de cáncer gástrico AGS. El estímulo de células GES-1 con *EVHp-* indujo aumento de las citoquinas IL-1 β e IL-23, más aún el estímulo de células GES-1 con *EVHp+* indujo aumento de la expresión de IL-6 y mayores aumentos de las citoquinas IL-1 β e IL-23. Por el contrario, el estímulo de células AGS con *EVHp-* o *EVHp+* no indujo cambios en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. El estímulo de células GES-1 con *EVHp-* aumentó la migración celular, sin embargo, se observó un aumento aun mayor de la migración celular cuando el estímulo fue realizado con *EVHp+*. Por otro lado, en las células AGS solo el estímulo con *EVHp+* aumentó la migración celular. Además, solamente el estímulo con *EVHp+* en células GES-1 y AGS aumentó la invasión celular en Matrigel y la migración a través de una monocapa de células endoteliales EA.hy926 (migración transendotelial). Finalmente, el estímulo de células endoteliales EA.hy926 con *EVHp+* aumentó la formación de redes vasculares. Si bien la infección con *H. pylori* ocasionó un aumento en la liberación de EVs de las células GES-1, los estímulos se realizaron considerando la misma cantidad de proteínas totales para ambos tipos de EVs. Esto indica que las diferencias obtenidas en los ensayos biológicos al realizar los estímulos con *EVHp-* o *EVHp+*, implican diferencias en composición de éstas EVs. Debido a que las proteínas forman parte importante de las moléculas contenidas en las EVs, se realizó un análisis de proteómica de las *EVHp-* y *EVHp+* mediante espectrometría de masas. Mediante los resultados del análisis por espectrometría de masas de las EVs, se identificaron proteínas únicamente presentes en *EVHp+* importantes en procesos de migración e invasión celular como por ejemplo la ADAM Metalopeptidasa con motivo de trombospondina tipo 13, la molécula de adhesión de células leucocitarias activadas (ALCAM), Follistatin Like 1 (FSTL1) y vitronectina (VTN), y otras enriquecidas en *EVHp+*, importantes para la biogénesis de exosomas (Anexina A2, Anexina A5, CD63, CD81, HSPA1, HSP90, Rab-7a y Rap-1b) y para la adhesión y migración celular (Syndecan-4 y Syndecan Binding Protein). Estas proteínas encontradas exclusivamente o enriquecidas en *EVHp+* en comparación con *EVHp-*, podrían estar relacionadas con la adquisición o aumento de los rasgos malignos evaluados en este trabajo, y que son importantes para la progresión de los cambios preneoplásicos gástricos asociados con la

infección por *H. pylori*. Vale la pena recalcar que, los resultados mostraron que las células GES-1 liberan mayor cantidad de EVs luego de infección con *H. pylori*, con lo cual podemos inferir que los efectos observados acá por el estímulo con las EVHp+ en células receptoras, se podrían ver aun más aumentados en un contexto de infección con *H. pylori*, tanto en células gástricas no transformadas como células de cáncer gástrico. En conclusión, los efectos perjudiciales ocasionados por la infección con *H. pylori* asociados con la malignidad gástrica podrían propagarse a través de las EVs en etapas tempranas y tardías de la carcinogénesis gástrica.

ABSTRACT

Gastric cancer (GC) is the fourth leading cause of cancer-related mortality and the fifth most common cancer worldwide. In Chile, the situation is even more alarming, since the country ranks first and fifth, in terms of mortality and incidence, respectively, in Latin America. GC can be classified mainly into two types: diffuse GC, associated with hereditary factors, and intestinal GC, more associated with environmental factors. Among the risk factors associated with the development of intestinal GC are infection by the bacterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). *H. pylori* is a gram-negative bacterium that colonizes the gastric epithelium, and it is estimated that at least 50% of the adult population worldwide has this bacterium. The oncogenic effects of *H. pylori* on epithelial cells are directly attributed to the toxic action of virulence factors expressed by the bacteria such as CagA, VacA, GGT, Urease, among others, or indirectly to the inflammatory processes produced by the infection. Specifically, *H. pylori*-induced gastric carcinogenesis is associated with chronic inflammation, characterized by increased pro-inflammatory cytokines. On the other hand, infection with *H. pylori* causes the silencing of genes that function as a tumor suppressor and changes at the cellular level in gastric and endothelial cells, including changes in cell viability and survival, cell migration, among others. These findings come from *in vitro* experiments on gastric cancer cells or from clinical studies in patients infected with *H. pylori*. Finally, recent evidence indicates that *H. pylori* infection also causes changes in cell communication mediated by Extracellular Vesicles (EVs). Cellular communication through EVs is important in physiological and pathophysiological processes such as infections by pathogens, autoimmune diseases, and cancer. However, about the changes that occur in EV-mediated cellular communication in the context of *H. pylori* infection, very little is known. These antecedents led us to propose the following hypothesis: "EVs released from gastric cell line GES-1 infected with *H. pylori* promote inflammation, angiogenesis and characteristics associated with cancer progression" Therefore, the main objective of this thesis was: To demonstrate that the EVs released from the gastric cell line GES-1 infected with *H. pylori*, promote an increase in pro-inflammatory cytokines in recipient cells, and affect cellular processes such as proliferation, migration cell, cell invasion, transendothelial migration and formation of linked endothelial networks. With the following specific objectives: 1) To determine in GES-1 cells infected with *H. pylori*

changes in: levels of the proteins E-cadherin and Caveolin-1; expression of pro-inflammatory cytokines; and cellular processes such as cell proliferation and migration. 2) Evaluate changes in the release of EVs from GES-1 cells infected with *H. pylori*. And finally, 3) To determine the role of purified EVs from GES-1 cells infected with *H. pylori* in the increase of pro-inflammatory cytokines, changes in proliferation, cell migration, cell invasion, transendothelial migration and formation of linked endothelial networks, in recipient cells. The results showed that *H. pylori* infection in non-transformed GES-1 gastric cells induced a decrease in the relative protein levels of E-cadherin, a protein that functions as a tumor suppressor. In turn, it induced an increase in the protein levels of Caveolin-1, a protein that has a dual antagonistic role in cancer, which depends on the type of cancer and the stage of the disease. Additionally, *H. pylori* infection in GES-1 cells reduced cell viability by ~20%; induced increased expression of pro-inflammatory cytokines TNF- α IL-8 and IL-6; and decreased cell migration by ~50%. Additionally, *H. pylori* infection in GES-1 cells caused a 2-fold increase in EV release. The EVs released from GES-1 cells infected with *H. pylori* (EVHp+) had a slightly smaller but significant average size compared to EVs isolated from cells not infected with *H. pylori* (EVHp-) (206 nm vs 227 nm, respectively). On the other hand, in both types of EVs isolated (EVHp- and EVHp+), markers of exosomes were detected by *Western blot*. The biological effect of EVs released from GES-1 cells infected or not with *H. pylori* was evaluated in recipient cells, including gastric GES-1 cells, gastric cancer AGS cells and endothelial EA.hy926 cells, by performing several tests. Stimulation with EVHp+ reduced ~20% cell viability of GES-1 cells, but did not induce changes in viability of gastric cancer AGS cells. The stimulation of GES-1 cells with EVHp- induced an increase in the cytokines IL-1 β and IL-23, furthermore, the stimulation of GES-1 cells with EVHp+ induced an increase in the expression of IL-6 and greater increases in cytokines. IL-1 β and IL-23. On the contrary, the stimulation of AGS cells with EVHp- or EVHp+ did not induce changes in the expression of pro-inflammatory cytokines. The stimulation of GES-1 cells with EVHp- increased cell migration, however an even greater increase in cell migration was observed when the stimulation was performed with EVHp+. On the other hand, only stimulation with EVHp+ in AGS cells increased cell migration. Furthermore, only stimulation with EVHp+ in GES-1 and AGS cells increased cell invasion in Matrigel and migration through an EA.hy926

endothelial cell monolayer (transendothelial migration). Finally, the stimulation of EA.hy926 endothelial cells with EVHp⁺ increased the formation of linked vascular networks. Although infection with *H. pylori* caused an increase in the release of EVs from GES-1 cells, the stimuli were performed considering the same number of total proteins for both types of EVs. This indicates that the differences obtained in the biological tests when carrying out the stimuli with EVHp⁻ or EVHp⁺, imply differences in the composition of these EVs. Since proteins are an important part of the molecules contained in EVs, a proteomic analysis of EVHp⁻ and EVHp⁺ was performed by mass spectrometry. Through the results of the mass spectrometric analysis of the EVs, proteins only present in EVHp⁺ important in cell migration and invasion processes such as ADAM Metallopeptidase with type 13 thrombospondin motif, activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM), Follistatin Like 1 (FSTL1) and vitronectin (VTN), and others enriched in EVHp⁺, important for exosome biogenesis (Annexin A2, Annexin A5, CD63, CD81, HSPA1, HSP90, Rab-7a and Rap-1b) and for cell adhesion and migration (Syndecan-4 and Syndecan Binding Protein). These proteins found exclusively or enriched in EVHp⁺ compared to EVHp⁻, could be related to the acquisition or increase of the malignant traits evaluated in this work, and which are important for the progression of gastric preneoplastic changes associated with *H. pylori*. It is worth emphasizing that the results showed that the GES-1 cells release a greater amount of EVs after infection with *H. pylori*, with which we can infer that the effects observed here by the stimulation with the EVHp⁺ in recipient cells could be seen even more increases in the context of *H. pylori* infection, both in non-transformed gastric cells and gastric cancer cells. In conclusion, the detrimental effects caused by *H. pylori* infection associated with gastric malignancy could spread through the Extracellular Vesicles in early and late stages of gastric carcinogenesis.

1. Introducción

1.1 *Estadísticas de Cáncer gástrico en el mundo y en Chile*

El cáncer gástrico (GC), también llamado cáncer de estómago, es la cuarta causa principal de mortalidad relacionada con el cáncer y el quinto cáncer más común en todo el mundo (Sung H. *et al.* 2021). Según las estadísticas mundiales, la población chilena posee una de las tasas de mortalidad más altas en Latinoamérica para esta patología, ocupando el primer y quinto lugar, en hombres y mujeres, respectivamente (Owen G. *et al.* 2018; GLOBOCAN 2018). En el 2015, el CG ocasionó el mayor número de muertes por cáncer en Chile, registrando una tasa de mortalidad de 18,7 por 100.000 habitantes (MINSAL, 2018). La mayoría de los cánceres gástrico (alrededor del 90% al 95%) son adenocarcinomas, es decir, que aparecen en las células glandulares (<https://www.cancer.org>).

1.2 *Cáncer Gástrico*

El CG se puede clasificar principalmente en dos tipos de acuerdo a sus características histológicas: el CG difuso, con la variante hereditaria, HDGC (Hereditary diffuse gastric cancer) y el CG intestinal, asociado a factores

ambientales (Polakovicova, I. *et al.* 2018). El CG difuso está compuesto por células no cohesivas y se observa con mayor frecuencia en pacientes más jóvenes, con una forma hereditaria evidente, mientras que el CG intestinal está asociado a factores ambientales, tales como infección por la bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), dieta alta en sal, tabaquismo y obesidad (Figueiredo, C. *et al.* 2002; Peleteiro, B. *et al.* 2014). El CG de tipo intestinal, se caracteriza por una cascada histopatológica preneoplásica bien definida de progresión, conocida como cascada de Correa, que inicia como gastritis no atrófica seguida de gastritis atrófica, metaplasia intestinal (IM), displasia (DYS) y finalmente el desarrollo de CG de tipo intestinal (Correa, P. y Houghton, J. 2007).

1.2.1 Helicobacter pylori es el principal factor de riesgo para el desarrollo de Cáncer Gástrico

H. pylori es una bacteria gramnegativa que coloniza el epitelio gástrico, y se estima que al menos el 50% de la población adulta en todo el mundo posee esta bacteria. Se ha determinado que la infección con *H. pylori* puede comenzar en la niñez y ser persistente por décadas si no es tratado farmacológicamente (Eusebi, L. *et al.* 2014; Kalach, N. *et al.* 2017). La

infección con la bacteria *H. pylori* es considerada como el principal factor de riesgo para el desarrollo de CG y esta bacteria ha sido clasificada como un carcinógeno tipo 1 por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, 1994), debido a que se tiene suficiente evidencia de que su infección esta relacionada con el desarrollo de CG. Se ha demostrado que la infección con *H. pylori* puede persistir a lo largo de la cascada preneoplásica hasta CG (Pandey A. *et al.* 2014), por lo que la erradicación de *H. pylori* ha demostrado ser efectiva para detener la progresión de la cascada y se ha recomendado para prevenir GC. La contribución de la erradicación de *H. pylori* se ha visto reflejada en distintas circunstancias. Un ejemplo de esto es la disminución en la incidencia tanto del CG como de úlceras duodenales en países occidentales, ocasionado por la rápida disminución de la prevalencia de *H. pylori*, a inicios del siglo 20 (Hanada, K., y Graham, D. Y. 2014). A su vez, las mejoras en el saneamiento y el nivel de vida dieron como resultado una marcada reducción en la incidencia de muertes por enfermedades infecciosas, especialmente después de 1850 (Graham, D. Y. 2014). Sin embargo, un meta-análisis realizado por Chen, H. y colaboradores (2016) sugiere que la erradicación de *H. pylori* puede reducir la incidencia de CG, en particular, para los pacientes con un diagnóstico inicial de IM, en donde la erradicación

de *H. pylori* puede detener la progresión y reducir el riesgo del desarrollo de CG. Lamentablemente, cuando el diagnóstico es IM o DYS, no se observó ningún efecto preventivo en el riesgo de desarrollar CG ni en la progresión hacia una lesión precancerosa, después de la erradicación de la bacteria.

La infección de *H. pylori* se asocia con una respuesta inflamatoria aguda, la cual, como suele durar décadas, genera una inflamación crónica que da como resultado un daño progresivo de la mucosa gástrica. Este proceso conlleva a que la mucosa gástrica encargada de producir las enzimas digestivas y la secreción ácida, que normalmente se encuentra altamente regulada, se transforme en diferentes tipos de epitelios metaplásicos y displásicos, para finalmente transformarse en CG intestinal. Además, los polimorfismos en los genes del huésped determinan la intensidad de la respuesta inflamatoria (El-Omar, E. M. *et al.* 2000; Sugimoto, M. *et al.* 2007; Taguchi, A. *et al.* 2005).

La cepa bacteriana y los factores de virulencia bacterianos presentes en la misma, son a menudo factores clave que determinan el resultado de la infección. Los principales y más estudiados factores de virulencia de *H. pylori* son la proteína del Gen A asociado a citotoxina (*Cytotoxin-associated gene A*; CagA), la citotoxina vacuolizante A (*Vacuolating cytotoxin A*, VacA), la enzima ureasa, las adhesinas BabA y BabB, las flagelinas FlaA y

FlaB, que son críticos para que la bacteria colonice el estómago y genere una infección persistente, lo que conlleva al desarrollo de CG (Kao, C. Y. *et al.* 2016).

1.2.1.1 *La infección H. pylori induce la generación de citoquinas proinflamatorias.*

La carcinogénesis gástrica inducida por *H. pylori* se ha asociado con inflamación crónica, caracterizada por la infiltración de neutrófilos y macrófagos en el epitelio gástrico, lo que favorece la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) y citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Valenzuela, M. *et al.* 2015). Estos intermediarios inflamatorios son capaces de inducir diferentes cambios epigenéticos, que incluyen la metilación del ADN y modificaciones en las histonas, lo que contribuye a varios pasos importantes en la tumorigénesis y progresión de cáncer que implican el reclutamiento de leucocitos, la neoangiogénesis, la proliferación, la supervivencia, la invasión y finalmente la metástasis de las células tumorales (Fernandes, J. V. *et al.* 2015).

H. pylori es capaz de secretar factores de virulencia hasta el citosol de las células epiteliales gástricas debido a que posee el sistema de secreción tipo

IV. La presencia de estos factores en la célula inicia cascadas de señalización que convergen en la activación del factor de transcripción NFκB. A su vez, este factor de transcripción regula la expresión de citoquinas proinflamatorias en células gástricas epiteliales humanas, incluidas IL-8, IL-6, TNF-α e IL-1β, y en última instancia, la respuesta inflamatoria del hospedador (Figura 1.1) (Ying, L. y Ferrero, R. L. 2019).

1.2.1.2 *H. pylori es capaz de silenciar genes supresores de tumores*

La inflamación crónica asociada con *H. pylori* y la carcinogénesis gástrica también está relacionada con el silenciamiento de genes supresores de tumores, a través de la modificación epigenética, por la metilación de las islas CpG en las regiones promotoras de estos genes (Valenzuela, M. *et al.* 2015). Este es el caso de pacientes dispépticos infectados con *H. pylori*, en donde se encontró metilación del promotor del gen CDH1, el cual codifica la proteína E-cadherina, aunado a la disminución de los niveles de la E-cadherina (Chan, A. *et al.* 2003).

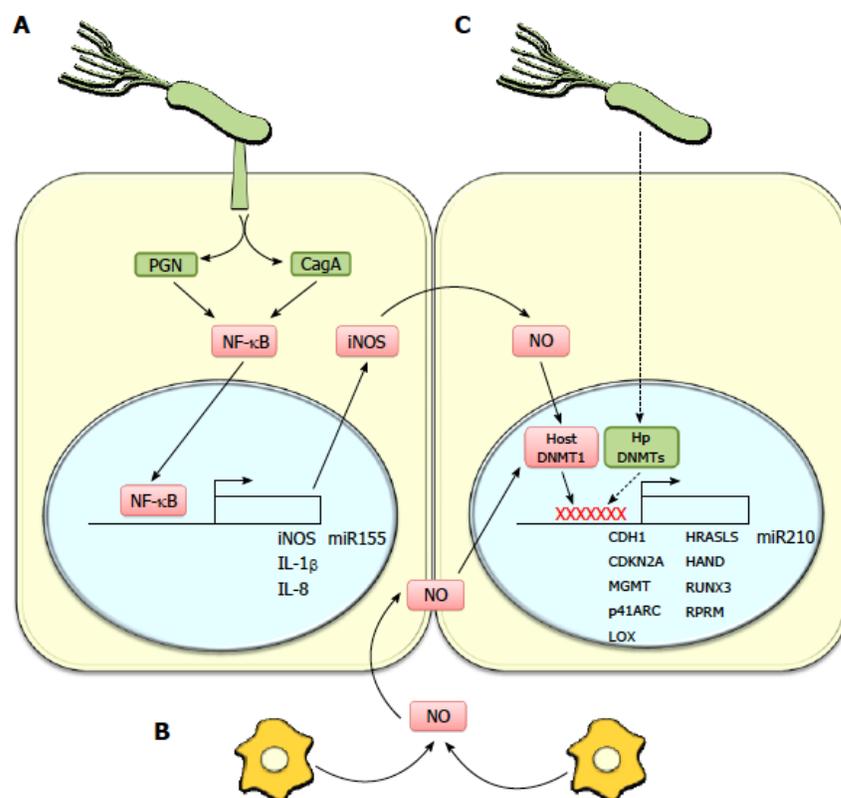


Figura 1.1. La inflamación asociada a *H. pylori* promueve la metilación de genes asociados con la supresión tumoral. A: *H. pylori* induce, mediante la inyección de los factores de virulencia CagA y peptidoglicano (PGN), la activación de NF-κB, promoviendo una respuesta proinflamatoria que aumenta la expresión de citocinas (IL-1β, IL-8) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Este último genera óxido nítrico (NO), una molécula importante en la regulación epigenética. B: además de los efectos directos de *H. pylori* en las células epiteliales gástricas, la infección activa a los macrófagos, que aumentan la producción de NO y los niveles de NO en las células epiteliales gástricas. NO puede activar la ADN metiltransferasa-1 (DNMT1 del huésped) para promover la metilación del ADN en varias regiones promotoras de genes; C: también las metiltransferasas de ADN de *H. pylori* (DNMT de *H. pylori*) pueden promover directamente la metilación del ADN del huésped en las regiones promotoras de varios genes que se cree que funcionan como supresores de tumores en el cáncer gástrico (Editado de, Valenzuela, M. *et al.* 2015).

Perri y col. (2007) confirmaron esta observación, demostrando que el promotor CDH1 también está hipermetilado en pacientes con gastritis infectados con *H. pylori*, lo que se revirtió después de la erradicación de la bacteria. Un estudio *in vitro* mostró que la infección por *H. pylori* aumentó la metilación del promotor E-cadherina mediante la activación del receptor de IL-1 β , la inducción de iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) y, posteriormente, una mayor actividad de DNMT (ADN metil transferasa) como consecuencia de la producción de óxido nítrico en las líneas celulares de cáncer gástrico MKN7, MKN74 y TMK-1 (Huang, F. *et al.* 2012).

La Caveolina-1 (CAV1) es una proteína que se ha descrito con un rol dual antagónico en cáncer, funcionando como supresora de tumores o como promotora de tumores. Su rol depende del tipo de cáncer y estadio de esta enfermedad. CAV1 es una proteína integral de membrana con una masa molecular de aproximadamente de 21 kDa y es una de las principales proteínas que componen estructuras en la membrana plasmática denominadas caveolas. Una importante característica de CAV1 es que es capaz de interactuar con diversas moléculas a través de su dominio de andamio (*Caveolin Scaffolding Domain*, CSD), regulando diferentes vías de señalización. Estas interacciones llevan, en general, a la inhibición de estas

vías de señalización e inducen cambios funcionales en las células. Esta función inhibitoria de CAV1, ha sido asociada con un rol de supresor de tumores (Quest, A. *et al.* 2013; Nunez-Wehinger, S. *et al.* 2014), particularmente en las etapas iniciales del desarrollo de cáncer, donde la expresión de la proteína se ve reducida durante el proceso de transformación celular. Sin embargo, en las etapas mas tardías de la enfermedad, la expresión de la proteína puede aumentar de nuevo, pudiendo favorecer el desarrollo de rasgos celulares asociados a mayor malignidad, incluida la resistencia a múltiples fármacos y la metástasis (Quest, A. *et al.* 2004; 2008, 2013). El rol de CAV1 asociada a la malignidad se remonta al descubrimiento de la proteína, cuando se identificó a CAV1 como una proteína altamente fosforilada en tirosina, en fibroblastos transformados por el virus del sarcoma de Rous (Glenney, J. *et al.* 1992). Esta fosforilación se ubica en la tirosina-14 y ocurre por acción de las tirosinas quinasas Src, Fyn, Yes y c-Abl, en respuesta a diversos estímulos (Li, S. *et al.* 1996; Núñez-Wehinger, S. *et al.* 2014). La fosforilación en tirosina-14 de CAV1 se ha asociado en particular con eventos importantes en la migración celular (Núñez-Wehinger, S. *et al.* 2014). En cuanto al rol de CAV1 en CG, se han hecho estudios clínicos, de muestras de pacientes con CG en donde se evalúa expresión de CAV1, pero

los resultados no son concluyentes (Ye, Y. *et al.* 2014). En líneas celulares de GC humano se evaluó la expresión de CAV1, encontrándose bajos niveles de CAV1 en células derivadas de tumor primario (AGS y SNU-1), e incrementándose los niveles de esta proteína en líneas celulares que se originan de metástasis a distancia (MKN-7, MKN-45, NCIN87, KATO-III, y SNU-5) (Burgermeister, E. *et al.* 2007).

1.2.1.3 La infección por H. pylori induce cambios a nivel celular

La infección con *H. pylori* ocasiona una serie de daños a las células epiteliales gástricas, como por ejemplo: cambios en la distribución de las uniones epiteliales, daño del ADN, apoptosis, proliferación, estimulación de la producción de citoquinas y transformación celular. Estos procesos se inician por varias vías de señalización celular, que se activan por la interacción de los distintos factores de virulencia de *H. pylori*, tanto en la superficie celular como con receptores intracelulares (Alzahrani, S. *et al.* 2014). *H. pylori* puede ocasionar la muerte de células gástricas, por un mecanismo de apoptosis, lo que resulta en lesiones tisulares primarias asociadas con la respuesta inflamatoria. La población de células gástricas sobrevivientes muestra una respuesta adaptativa, que incluye mayor supervivencia y

proliferación celular (Díaz, P. *et al.* 2018). Entre estas características adaptativas, también se incluye la capacidad de mayor migración celular (Wessler, S. *et al.* 2008; Wroblewski, L. E. *et al.* 2003; Moese, S. *et al.* 2004). Adicionalmente, también se ha reportado que la infección por *H. pylori* afecta a las células endoteliales y al sistema vascular (Pousa y Gisbert, 2006). Se ha encontrado que en las condiciones asociadas a la infección por *H. pylori*, como en la gastritis, la úlcera péptica y el carcinoma gástrico, hay una mayor concentración de factores angiogénicos y como consecuencia formación de nuevos vasos sanguíneos. La relación causal entre la infección por *H. pylori* y la angiogénesis aún no está del todo clara, aunque la inflamación parece ser relevante en este contexto. Chang, Y. y col. (2005) informaron que la expresión de COX-2 inducida por *H. pylori* aumenta la angiogénesis a través de TLR2 y TLR9 (Chang, Y. *et al.* 2005). Además, Liu, N. *et al.* (2016) proponen que *H. pylori* induce la expresión de VEGF mediada por COX-2 a través de la activación de la vía Wnt/ β -catenina (Liu, N. *et al.* 2016). Finalmente, la comunicación célula-célula es otro proceso celular que también se ha visto afectado durante la infección con *H. pylori*, en particular, la comunicación celular mediada por las Vesículas Extracelulares, lo cual será abordado en detalle más adelante. Finalmente, todos estos cambios

inducidos por la infección con *H. pylori*, que conllevan a la adquisición de estas características malignas, pueden permitir la formación de lesiones gástricas precancerosas y el desarrollo de CG.

1.3 Rol de las Vesículas Extracelulares en Comunicación Celular

El término Vesículas Extracelulares (*Extracellular Vesicles*; EVs) se refiere a una población heterogénea de vesículas de origen celular. Estas EVs se pueden clasificar en tres grupos de acuerdo a su origen y características biofísicas. Los exosomas, que derivan del compartimento endosómico y tienen un tamaño pequeño, aproximadamente desde 50 a 150 nm. Las microvesículas, que se originan de la escisión directa de la membrana plasmática, y tienen mayor tamaño, aproximadamente desde 50 a 500 nm. Finalmente, los cuerpos apoptóticos, que son producidos durante el proceso de apoptosis y varían ampliamente en tamaño, desde 50 a 2000 nm de diámetro (Figura 1.2). Las EVs transportan una variedad de moléculas, incluidas ARN, proteínas, lípidos y ADN. La liberación de EVs es un proceso altamente conservado a lo largo de la evolución, y estas también han sido detectadas en bacterias, protozoos, hongos y plantas. Las EVs pueden interactuar con otras células, tanto en la cercanía directa de la célula de origen

como en sitios distantes del cuerpo viajando a través de biofluidos, y pueden provocar una variedad de respuestas celulares. La creciente evidencia implica a las EVs como actores clave en la comunicación intercelular, ya que, envían mensajes complejos a través del perfil de moléculas que poseen (Coleman B. y Hill A. 2015).

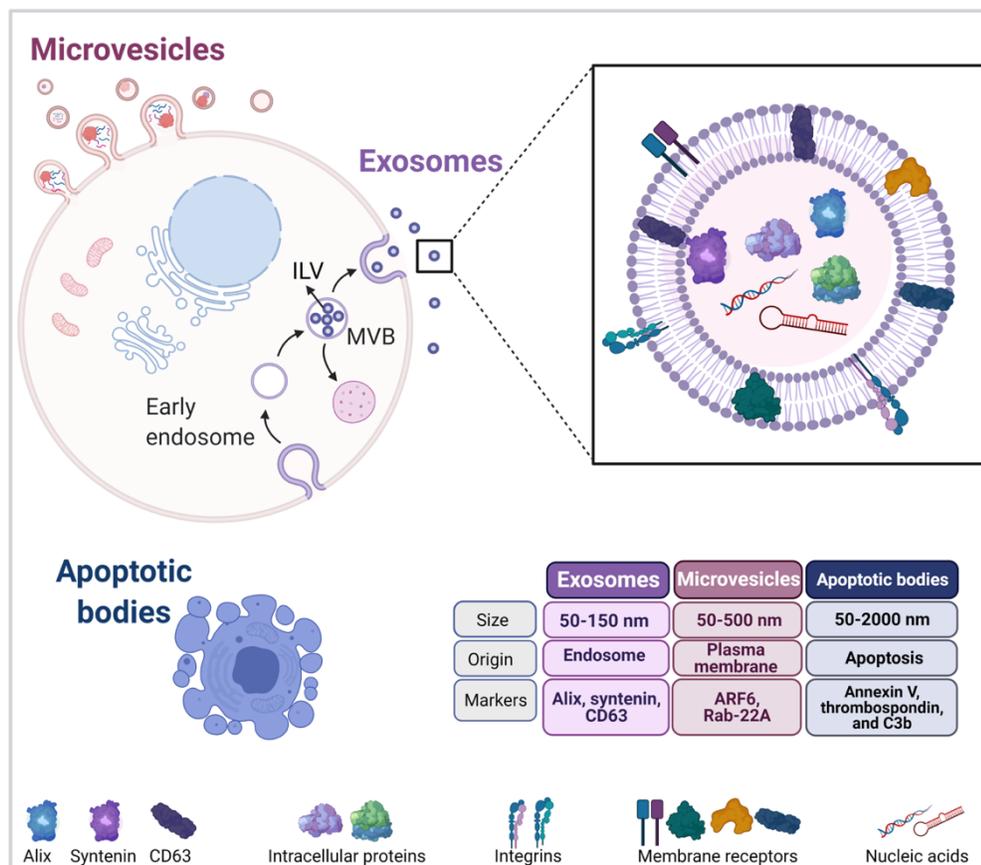


Figura 1.2. Las vesículas extracelulares son una población heterogénea de vesículas de membrana derivadas de células. Las EVs se han dividido clásicamente en tres tipos según su biogénesis y propiedades biofísicas: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Las EVs son transportadoras de una gran variedad de moléculas, que incluyen proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. El inserto con una vista de cerca de los exosomas muestra algunas moléculas comúnmente transportadas por ellos, como Alix, Syntenin, CD63, integrinas, receptores de membrana, diversas proteínas intracelulares y ácidos nucleicos (Editado de Burgos-Ravanel y cols 2021).

La comunicación de las EVs con la célula receptora puede ocurrir mediante distintas vías: a través de la unión de EVs a la superficie celular, la fusión de las membranas de las EVs y la célula y la captación por endocitosis (Maas, S. *et al.* 2017). Las EVs constituyen un mecanismo importante de comunicación celular y desempeñan un papel fundamental en enfermedades inflamatorias, en parte porque las citoquinas contenidas en ellas contribuyen a la fase de propagación de la inflamación (Buzas, E. *et al.* 2014). Además, se ha demostrado que las EVs derivadas de macrófagos y células dendríticas transfieren leucotrienos sintetas y hacen que las células receptoras produzcan leucotrienos B4 proinflamatorios y leucotrienos C4. Otro ejemplo encontrado es la proteína CXCL8 (también conocida como IL-8) y su ARNm, que han sido detectadas en EVs derivadas de tumores (Buzas, E. *et al.* 2014).

1.3.1 *Rol de las Vesículas Extracelulares en Cáncer Gástrico*

La evidencia acumulada demuestra que los exosomas juegan un papel crucial en el CG. Baran y colaboradores (2010) caracterizaron las EVs aisladas de muestras de plasma de 37 pacientes con GC y las compararon con las EVs de 10 individuos sanos como control. Entre sus hallazgos, demostraron que los pacientes con GC, tienen un número significativamente mayor de EVs

circulantes totales y una expresión diferente de ciertas proteínas en comparación con los controles. Lo que demuestra que en CG cambia tanto el número como la composición de las EVs liberadas en el torrente sanguíneo. Un aspecto importante para entender el cáncer es el estudio del microambiente tumoral. El microambiente tumoral está compuesto de distintos tipos de células además de las células de cáncer, entre ellas se encuentran las células epiteliales normales, células inmunes infiltrantes, células estromales y células endoteliales (Hanahan. D. y Weinberg, R, 2011). Estas células se comunican entre sí promoviendo el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la metástasis. Por lo que, la comunicación celular en el microambiente tumoral juega un papel fundamental en el desarrollo del cáncer. Por lo tanto, las EVs representan un mediador ideal con el que las células de cáncer se comunican con las células circundantes promoviendo el cáncer y la metástasis (Burgos-Ravanal, R. *et al.* 2021).

1.3.2 *Vesículas Extracelulares en infección con H. pylori*

Las células infectadas por patógenos pueden utilizar las EVs como una herramienta para manipular su microambiente, influyendo en las características de las células vecinas mediante la transferencia de diferentes

moléculas de señalización (Polakovicova, I. *et al.* 2018; Meckes, D. *et al.* 2010). Por el momento, se sabe poco sobre las EVs liberadas por las células infectadas con *H. pylori*, sin embargo, recientemente se describió que las EVs pueden ser importantes en este proceso (González, M. F. *et al.* 2021). Shimoda y cols (2016) reportaron la presencia de CagA en exosomas purificados de suero de pacientes infectados con *H. pylori* CagA-positivo. Por otra parte, Li, N. y cols (2019) determinaron que los exosomas aislados de pacientes infectados con *H. pylori* y de células GES-1 infectadas con *H. pylori* (*in vitro*), mostraron una mayor expresión de miR-25 (EVs⁺miR-25), el cual está relacionada con el desarrollo de aterosclerosis. Los EVs con una mayor carga de este miRNA (EVs⁺miR-25) fueron utilizados para estimular células endoteliales lo que indujo un aumento de molécula de adhesión celular vascular1 (VCAM-1), junto a un aumento de molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), interleuquina 6 (IL-6) y proteína quimio atrayente de monocitos 1 (MCP-1) (Li, N. *et al.* 2019). Por otro lado, se caracterizó la comunicación celular mediada por exosomas entre células de cáncer gástrico AGS infectadas con *H. pylori* y macrófagos. Los exosomas liberados de células AGS infectadas con *H. pylori* transfirieron el factor de transición epitelial mesenquimatoso activado (p-MET) a macrófagos y de esta manera

modularon la comunicación entre las células tumorales y el microambiente circundante (Che ,Y. *et al.* 2018). Xia, X. y cols (2020) mostraron que la infección por *H. pylori* afecta significativamente ciertas funciones de células endoteliales como proliferación, migración celular y formación de tubos a través de mecanismos mediados por exosomas. Finalmente, Chen, Y. y cols (2018), estudiaron EVs aisladas del suero de pacientes infectados con *H. pylori*, y al usarlas para estimular células de la línea celular GES-1, los niveles de sIL-6R e IL-1 α se encontraron aumentados.

Hasta el momento, se ha demostrado que las EVs liberadas por células gástricas infectadas por *H. pylori* o EVs aisladas de suero de pacientes positivos para *H. pylori* alteran funciones de células del sistema inmune y células endoteliales, además de promover aumento de ciertas citoquinas en células gástricas. Sin embargo, aún se sabe muy poco sobre los cambios que pueden ocurrir en cuanto a cantidad y contenido de las EVs liberadas por células gástricas no tumorigénicas infectadas con *H. pylori*. Más aún, se desconoce el rol que tienen estas EVs liberadas de células gástricas infectadas con *H. pylori* sobre características, que pueden adquirir las células receptoras, tanto en las etapas tempranas como tardías de la carcinogénesis gástrica, como lo son la migración e invasión celular, que conllevan a mayor

malignidad. Conocer estos aspectos de la comunicación celular mediada por EVs en el contexto de infección con *H. pylori*, es importante para determinar el rol de estas EVs provenientes de células gástricas infectadas con *H. pylori*, en la propagación de cambios celulares iniciados por *H. pylori* a otras células, en el sitio de infección o incluso en zonas adyacentes.

Resumen de los Antecedentes:

1. Infección con la bacteria *Helicobacter pylori* es un factor de riesgo importante para el desarrollo de cáncer gástrico, y es clasificada por la IARC como carcinógeno tipo 1.
2. *Helicobacter pylori* induce distintos cambios a nivel celular, entre ellos el aumento de citoquinas proinflamatorias, el silenciamiento de genes supresores de tumores y la migración celular.
3. La comunicación celular mediada por EVs juega un papel fundamental en cáncer, ya que promueve características malignas como la migración e invasión celular y angiogénesis.
4. Las EVs son importantes durante la infección con patógenos, ya que son capaces de transportar moléculas propias del patógeno, o del huésped en el contexto de la infección, lo cual propaga la infección.
5. Lo antes expuesto nos lleva a preguntar, ¿serán las EVs liberadas de células epiteliales gástricas infectadas con *Helicobacter pylori* capaces de inducir un cambio fenotípico en células receptoras que promueva la carcinogénesis gástrica?

En base a estos antecedentes, se plantea la siguiente *hipótesis*:

“EVs liberadas de línea celular gástrica GES-1 infectada con *H. pylori* promueven inflamación, angiogénesis y características asociadas a la progresión del cáncer”

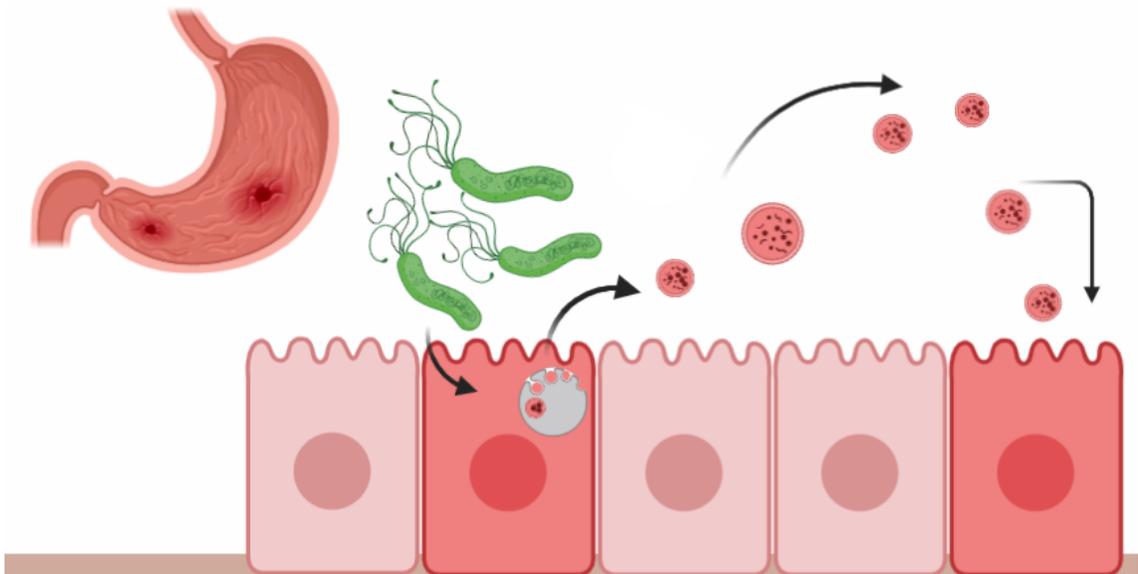


Figura 1. 3. Modelo propuesto. *Helicobacter pylori* infecta a las células del epitelio gástrico, induciendo cambios a nivel celular. Estos cambios incluyen alteraciones en la liberación de EVs. Estas EVs modificadas sirven como vehículo para moléculas asociadas a la infección con *H. pylori*, las cuales, al llegar a células receptoras, pueden inducir cambios que promuevan la iniciación o promoción de CG.

Con los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Demostrar que las EVs liberadas de la línea celular gástrica GES-1 infectada con *H. pylori*, promueven en células receptoras aumento de citoquinas pro-inflamatorias, y afectan procesos celulares como la proliferación, migración celular, invasión celular, migración transendotelial y formación de redes endoteliales vinculadas.

Objetivos Específicos:

1. Determinar en células GES-1 infectada con *H. pylori* cambios en: niveles de las proteínas E-cadherina y Caveolina-1; expresión de citoquinas proinflamatorias; y procesos celulares como proliferación y migración celular
2. Evaluar cambios en la liberación de EVs de células GES-1 infectadas con *H. pylori*
3. Determinar el rol de las EVs purificadas de células GES-1 infectadas con *H. pylori* en el aumento de citoquinas pro-inflamatorias, cambios en proliferación, migración celular, invasión celular, migración transendotelial y formación de redes endoteliales vinculadas, en células receptoras.

2. Metodología

2.1 Reactivos

Medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI), Gibco Life Technologies (Cat # 23400-021). Medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), Gibco Life Technologies (Cat # 12200069). Suero fetal bovino (SFB), Biological Industries (Cat # 040011). Suero de caballo, Biological Industries (Cat # 04-004-1A). Penicilina/Estreptomicina, Gibco Life Technologies (Cat # 15640-055). Tampón fosfato salino (PBS 1X), Gibco Life Technologies (Cat # 70013). Tripsina-EDTA, Gibco Life Technologies (Cat # 25200072). Agar de soja tríptico, (TSA), BD, (Cat # BA-256665.02). Suplemento nutritivo Vitox (Oxoid, Thermo Fisher Scientific) y el suplemento selectivo para cultivar *H. pylori* Dent (Oxoid, Thermo Fisher Scientific), (Cat # SR0090A y SR0147E). Gentamicina, US Biological, Life Sciences (Cat # G2030). Ácido bicinconínico (BCA), Reactivo cromogénico, ThermoFisher Scientific (Cat #23223 y 23224). EZ-ECL, Solución de peróxido de hidrógeno, luminol y un compuesto fenólico, Biological Industries (Cat # 20-500-1000). SuperSignal™ West Femto, Thermo Scientific, (Cat # 34094). Tampón A, Componente de kit Exospin™, Cell Guidance Systems (Cat # EX01-25). Dodecilsulfato sódico (SDS), US

Biological (Cat # 151-21-3). Benzamidina/Antipapaína/Leupeptina (BAL), Mezcla de inhibidores de proteasas. Sigma, Calbiochem y US biological (Cat #B6506, 178220 y L-2050). Fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF, Inhibidor de proteasas de serina (Cat # Sigma P7626). Fibronectina humana (FN), Glicoproteína de matriz extracelular, Gibco (Cat # 33016-015). Cristal violeta, Colorante de triarilmetano (Sigma) (Cat # C-6158). Metanol, Merck, (Cat # 106009). Mowiol, Mucoadhesivo hidrocoloide soluble en agua a base de poli alcohol vinílico, Calbiochem (Cat # 475904). TRIzol Reagent (Trizol), Thermo Fisher Scientific, (Cat # 15596026). DNasa RQ1 libre de ARNasa (DNasa), Promega (Cat # M6101). Transcriptasa inversa M-MLV, Promega (Cat # M1701). Mezcla maestra Brilliant II SYBR® Green QPCR, Agilent (Cat #600828). Ensayo de proliferación celular no radiactiva CellTiter 96® AQueous (MTS), Promega (Cat # G4000). Solución de azul tripán, 0,4%, Gibco (Cat # 15250061). Azul de toluidina, Sigma (Cat #92-31-9). Azul dextrano, Sigma (Cat # 87915-38-6). Tinte verde CMFDA (CellTracker), Invitrogen, ThermoFisher Scientific, (Cat # C2925). Matriz de membrana (Matrigel), BD (Cat # 356237).

2.2 Cultivo de líneas celulares

La línea celular epitelial gástrica GES-1 (Ke, Y. *et al.* 1994) y la línea celular de adenocarcinoma gástrico AGS se cultivaron en medio RPMI-1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific). La línea celular endotelial EA.hy926 se cultivó en medio IMDM (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Todos los medios fueron suplementados con suero fetal bovino al 10% (FBS, European Grade, Heat Inactivated, Biological Industries) y antibióticos (10,000 U/mL de penicilina y 10 µg/mL de estreptomina), a menos de que se indique lo contrario. Las células se cultivaron en una atmósfera controlada (5% de CO₂, 70% de humedad) a 37 °C.

2.3 Cultivo bacteriano

La cepa 26695 de *H. pylori* (700392) se obtuvo de la ATCC (American Type Culture Collection). Las bacterias se sembraron en placas de agar tripticasa de soja (Trypticase Soy Agar; TSA), suplementadas con suero de caballo al 5% (Donor Horse Serum, Biological Industries), el suplemento nutritivo Vitox (Oxoid, Thermo Fisher Scientific) y el suplemento selectivo Dent (Oxoid, Thermo Fisher Scientific). Las bacterias se incubaron durante 24 h en condiciones de poco oxígeno (5% CO₂, 70% de humedad) a 37 °C.

2.4 Infección de células gástricas GES-1 por H. pylori cepa 26695 WT:

Las células GES-1 se sembraron en placas de cultivo celular de 100 mm (Falcon, Corning) o en botellas Multi-Flasks de 5 capas de 875 cm² (Falcon, Corning) y se cultivaron durante 24 h, utilizando medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 10 % sin antibióticos. Antes de la infección, las bacterias (sembradas como se describe en la sección 2.2) se recolectaron en PBS, y se centrifugaron a 4000 x g, finalmente el pellet se resuspendió en 1 mL de PBS. Se determinó el número de bacterias mediante Abs_{560nm} asumiendo un valor de 0,4 unidades a un equivalente a 3 x 10⁸ bacterias. Las células GES-1 se infectaron con una multiplicidad de infección (Multiplicity Of Infection; MOI) de 100 por 24 h (Valenzuela-Valderrama M., y cols., 2019). Luego de la infección, las bacterias se eliminaron lavando las células GES-1 con PBS cinco veces y se incubaron con gentamicina (US Biological, Life Sciences; concentración final 100 µg/µL) en medio RMPI-1640 durante 1 h. Finalmente, las células se lavaron nuevamente con PBS cinco veces y el medio se reemplazó con RMPI-1640 suplementado con 5 % suero fetal bovino libre de vesículas extracelulares (SFB EV-Free) (para minimizar la co-purificación de EV a partir de FBS), conteniendo gentamicina (concentración final 25 µg/µL), en donde las células se cultivaron durante 48

h para obtener el medio condicionado. Posterior a las 48 h de cultivo celular, el medio condicionado de células que habían sido infectadas y células sin infectar se colectó para la purificación de EVs de células GES-1 infectadas con *H. pylori* (EVHp+) o control (no infectadas con *H. pylori*, EVHp-). Para obtener el medio condicionado de las células sin infectar se siguió el mismo protocolo, excepto que se omitió el paso de añadir la bacteria a las células. Al momento de colectar el medio condicionado para aislar las EVs, las células se contaron mediante coloración con azul de tripán y se guardaron a -20 °C para evaluarlas por *Western blot*.

2.5 Obtención del FBS libre de EVs (SFB EV-Free)

El suero fetal bovino se centrifugó a 100.000 x g durante 18 h a 4 °C utilizando una ultracentrífuga de rotor T-1250 (Sorvall WX +, Thermo Scientific) (Théry y cols, 2006) y el sobrenadante se filtró usando filtros de 0.2 µm (GE Healthcare). El sobrenadante fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

2.6 Aislamiento de Vesículas Extracelulares a partir de medio condicionado mediante ExospinTM

Un volumen aproximado de 60 mL de medio condicionado recolectado en ambas condiciones (EVHp+ y EVHp-) siguiendo el protocolo 2.4, se centrifugó a 2.000 x g por 10 m a 4°C (Centrífuga Universal 320R, Hettich, Sigma-Aldrich) para eliminar restos celulares y vesículas de mayor tamaño. Este sobrenadante se centrifugó nuevamente a 3.000 x g por 5 a 15 m a 4°C utilizando Unidades de Filtro Amicon Ultra-15 (Merck Millipore) para concentrarlo. El sobrenadante concentrado obtenido se utilizó para aislar las EVs utilizando el Kit ExospinTM (Cell Guidance Systems) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, este concentrado se incubó con Tampón A durante toda la noche a 4 °C en rotación. Luego se centrifugó a 16.000 x g durante 1 h a 4 °C, donde se descartó la fracción soluble y el sedimento se resuspendió en 100 µL de PBS 1X. Paralelamente, se removió el tapón de la columna contenida en el Kit ExospinTM y se centrifugó a 100 x g durante 1 m a 4 °C para eliminar el tampón presente en la parte superior de la columna. Luego se añadieron 200 µL de PBS 1X y se centrifugó a 100 x g durante 1 m a 4 °C para equilibrar la columna. Se agregó el sedimento resuspendido en la parte superior de la columna, se centrifugó a 100 x g

durante 1 m a 4 °C y se descartó el eluido. La columna se colocó en un tubo de 1.5 mL nuevo y estéril, se añadieron 200 µL de PBS 1X en la parte superior de la columna y se centrifugó a 100 x g durante 1 m a 4 °C. El eluido contenía las EVs purificados, las cuales se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

2.7 Aislamiento de Vesículas Extracelulares a partir de medio condicionado mediante protocolo de Ultracentrifugación.

Un volumen aproximado de 200 mL de medio condicionado obtenido en ambas condiciones (EVHp+ y EVHp-) siguiendo el protocolo 2.4, se centrifugó a 2000 x g durante 30 m (Centrífuga Universal 320R, Hettich, Sigma-Aldrich) y el sobrenadante se filtró a través de filtros de 0,22 µm. El medio filtrado se ultracentrifugó a 100.000 x g durante 80 m usando un rotor T-1250 de ángulo fijo. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 20 mL de PBS filtrado con filtros de 0,1µm (se usaron 2 mL de PBS por tubo). El pellet resuspendido se volvió a centrifugar a 100.000 x g durante 80 m utilizando el rotor basculante TH-641. Finalmente, las EVs se obtuvieron por resuspensión del pellet en 200 µL de PBS filtrado con filtros de 0,1µm. Esta suspensión se almacenó a -80 °C hasta su análisis (Protocolo modificado de Salomon y cols., 2013).

2.8 Determinación del tamaño y la concentración de las EVs mediante Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)

El tamaño y la concentración de partículas de las EVs purificadas se determinaron mediante NTA (Bender, F. *et al.*, 2011). Este análisis utiliza grabaciones de video del movimiento browniano para determinar el tamaño de las EVs. 20 μ L de cada muestra se diluyeron en una razón 1:50 (volumen final de 1 mL) con PBS filtrado a través de filtros de 0,1 μ m para obtener 10–100 EVs por marco. Esta suspensión se inyectó en el NanoSight NS300 (Malvern Panalytical). Para cada muestra se grabaron tres videos de 30 s de duración. Luego, los videos se analizaron utilizando el software Nanosight NTA 3.2 incluido con el equipo para obtener el tamaño y la concentración de las EVs.

2.9 Análisis de las proteínas celulares y de EVs por Western Blot

La presencia de proteínas en lisados celulares y de marcadores exosomales en las EVs y en lisados celulares se evaluó mediante *Western Blot* (WB). Las células GES-1 y las EVs aisladas se lisaron mediante sonicación en buffer de lisis (PBS; 0,1% SDS e inhibidores de proteasa: leupeptina 12,5 μ g/mL; antipaina 10 μ g/mL; benzamidina 100 μ g/mL; fluoruro de fenilmetilsulfonilo

1 mM, 1 mM ortovanadato de sodio). La concentración de proteína total en las muestras se determinó utilizando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (ThermoFisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando una curva de calibración con la proteína seroalbúmina bovina (BSA). La medición de la absorbancia a 562 nm se hizo en placas de 96 pocillos con un lector de microplacas (Infinite® 200 PRO NanoQuant, TECAN). Se cargaron 20 µg de cada muestra por carril en gels de poliacrilamida (Gel concentrador 3%, Gel resolutivo 10%) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, como se describió anteriormente (Valenzuela-Valderrama, M. *et al.* 2019). Las membranas se bloquearon con PBS que contenía Tween al 0,1% y leche desnatada al 5% durante 1 hora en un agitador. La membrana bloqueada se incubó durante la noche con anticuerpos primarios diluidos en el tampón de bloqueo a 4 °C. Las diluciones de anticuerpos primarios fueron: anti-E-cadherina (610182, BD Biosciences) 1:3000; anti-Caveolin (610060, BD Biosciences) 1:3000; β-actin (A5316, Sigma-Aldrich) 1:5000; anti-Alix (SC-53540, Santa Cruz) 1:1000; Anti-tsg101 (sc-7964, Santa Cruz Biotechnology) 1:250; anti CD81 (sc-166029, Santa Cruz Biotechnology) 1:1000 y anti calregulina (sc-373863, Santa Cruz Biotechnology) 1:500. Luego, la membrana se lavó e incubó con anti-ratón (IgG de ratón (H&L)

anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, Rockland # 610-4302) 1:5000, o anti-conejo (conejo IgG (H&L) anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa , Rockland # 611-1302) 1:5000. Las transferencias se detectaron con el sistema EZ-ECL (Biological Industries, CT, EE. UU.) o con SuperSignal TM West Femto (Thermo Scientific). Finalmente, se realizó la adquisición de imágenes mediante cámara digital Hamamatsu (Discovery Gene Xpress).

2.10 Pre-tratamiento de células con EVs

Se sembraron $1,5 \times 10^5$ células GES-1 en placas de 6 pocillos. Al día siguiente, el medio de cultivo de cada una de las placas se reemplazó por medio RPMI con 5% SFB EV-free, después de dos lavados con PBS 1X. A cada placa se le añadieron 12 μg de proteína total de EVs (EVHp+ o EVHp-). Las células fueron incubadas con las EVs durante 24 h, mantenidas en condiciones de cultivo celular (37 °C y en una atmósfera con 5% de CO₂ en incubadora).

2.11 Determinación de la expresión génica relativa por RT-qPCR

Para los experimentos de infección de células GES-1 con *H. pylori*, las células GES-1 se infectaron con un MOI 100, siguiendo el protocolo en 2.3. Alternativamente, para la estimulación de células GES-1 con EVs, se siguió el protocolo 2.10. El ARN total de las células después de los tratamientos se aisló usando TRIzol (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El pellet de ARN resultante se disolvió en 25 μ L de agua sin nucleasas y se trató con DNasa (Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante para obtener ARN sin ADN. El ADNc se obtuvo mediante transcripción inversa (RT) utilizando 1 μ g de ARN sin ADN y la enzima transcriptasa inversa M-MLV (Promega) con 2 μ M de cebadores (*primers*) aleatorios. Se utilizaron 2 μ l de solución de ADNc para cuantificar la expresión génica relativa. Las qPCR se realizaron utilizando una mezcla maestra de qPCR verde SYBR de Brilliant II (Agilent) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se analizaron volúmenes de reacción de 20 μ L en el sistema Mx3000P QPCR (Agilent) en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 10 m a 95 °C, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 20 s, temperatura de hibridación de los *primers* durante 20 s y a 72 °C durante 20 s. En la Tabla 2.2 se muestra un resumen de las secuencias de

los *primers* y las temperaturas de hibridación utilizadas para las reacciones de qPCR. Los niveles de expresión génica relativos se calcularon mediante el método $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ (Livak K., y Schmittgen T., 2001) utilizando como control interno rRNA 18S.

Tabla 2.1 Secuencias de los *primers* y las temperaturas de hibridación

| Gen Blanco | Secuencia | Temperatura de alineamiento |
|---------------|---------------------------------|-----------------------------|
| RNA 18S | 5'-GTGGAGCGATTTGTCTGGTT-3' | 55 °C |
| | 5'-CGCTGAGCCAGTCAGTGTAG-3' | |
| TNF- α | 5'-TCCGTGAAAACGGAGCTGAA-3' | 58 °C |
| | 5'-AGGCTCAGCAATGAGTGACA-3' | |
| IL-8 | 5'-TCTGGACCCCAAGGAAAAC-3' | 58 °C |
| | 5'-TTGCATCTGGCAACCCTACA-3' | |
| IL-6 | 5'-TGACCCAACCACAAATGCCA-3' | 60 °C |
| | 5'-AATCTGAGGTGCCCATGCTA-3' | |
| IL-33 | 5'AACACTCTGTGGAGCTCCAT-3' | 60 °C |
| | 5'AACACTCCAGGATCAGTCTTGC-3' | |
| IL-10 | 5'-TGGGTTGCCAAGCCTTGTCT-3' | 60 °C |
| | 5'-TCCACGGCCTTGCTCTTGTT-3' | |
| IL-1 β | 5'-ACGGCTATAGCCTGGACTTT -3' | 53 °C |
| | 5'-TTTCTGTGTCAGGCGGGCTTTA-3' | |
| IL-23 | 5'-TGCTAGGATCGGATATTTTCACAGG-3' | 53 °C |
| | 5'-GAGGCTTGGAATCTGCTGAGTC-3' | |

2.12 Viabilidad celular

La viabilidad celular se midió usando los ensayos MTS (ensayo de proliferación celular acuosa, no radiactiva CellTiter 96, Promega) y ensayos de exclusión de colorante azul tripán. Para los experimentos de infección de células GES-1 con *H. pylori* se sembraron 2×10^3 células/pocillo en placas

de 96 pocillos y se infectaron con *H. pylori* siguiendo el protocolo de la sección 2.3. Después de 24, 48 y 72 h, se añadió el reactivo MTS a cada pocillo y se incubó a 37 °C durante 2 h. La absorbancia se determinó a 492 nm usando un lector de microplacas (Infinite® 200 PRO NanoQuant, TECAN). Para los ensayos de viabilidad de las células GES-1 y AGS luego de incubación con EVHp⁻ o EVHp⁺, se estimularon las células siguiendo el protocolo 2.10 y se determinó la viabilidad celular mediante ensayos de exclusión del colorante azul tripán.

2.13 Ensayos de migración celular

Los ensayos de migración celular se evaluaron usando Boyden Chambers (Transwell Costar, 6,5 mm de diámetro, tamaño de poro de 8 µm). Para medir los efectos sobre la migración de células GES-1 luego de infección con *H. pylori*, se realizó la infección siguiendo el protocolo 2.4. Para medir los efectos sobre la migración de células GES-1, AGS y EA.hy926 después de incubación con las EVs, se realizó el tratamiento siguiendo el protocolo 2.10. Después de los tratamientos, las células se contaron, resuspendieron en medio sin suero y se agregaron a la parte superior de cada inserto. Los lados inferiores de los insertos se recubrieron con 2 µg/ml de fibronectina

previamente. Adicionalmente, se añadió medio suplementado con 10% de FBS a la cámara inferior. Después de 2 h para GES-1 y 5 h para células AGS y EA.hy926, se retiraron los insertos y las células se tiñeron con cristal violeta al 0,1% en etanol al 2%. Las células que migraron al lado inferior de los insertos se contaron en un microscopio invertido.

2.14 Ensayos de invasión celular

Los efectos sobre la invasión de células GES-1 y AGS después del tratamiento con las EVs se evaluaron en Corning® BioCoat™ Matrigel® Invasion Chambers (tamaño de poro de 8 µm), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células fueron tratadas siguiendo el protocolo 2.10, posteriormente, se contaron, resuspendieron en medio sin suero y se agregaron a la parte superior de cada inserto. Adicionalmente, se añadió medio suplementado con 10% de FBS a la cámara inferior. Después de 18 h se retiraron los insertos y se fijaron y tiñeron dejándolos 15 m en la solución Trevors (4% paraformaldehído en 100 mM de buffer PIPES, pH 6.8, conteniendo 0.04 M KOH, 2 mM EGTA, y 2 mM MgCl₂), luego por 5 m en tampón universal (NaCl 150 M, Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 y NaN₃ 0,01%) y al menos dos h en azul de toluidina 0,1%. Las células que invadieron al lado

inferior de los insertos se contaron en un microscopio invertido (Oxion Inverso con contraste de fase, Euromex).

2.15 Ensayos de migración transendotelial

Para este ensayo se sembraron 200.000 células endoteliales EA.hy926 en Boyden Chambers (Transwell Costar, 6,5 mm de diámetro, tamaño de poro de 8 μm) y se cultivaron durante 72 h para permitir la formación de una monocapa impermeable de células. La impermeabilidad de esta capa se evaluó mediante una prueba de permeabilidad, en donde se midió el traspaso del colorante azul dextrano 10 mM (Sigma-Aldrich) desde la cámara superior a la cámara inferior del *transwell*, a través de la determinación de la absorbancia a 620 nm del medio de la cámara inferior. Una absorbancia inferior a 0,2 indica que la monocapa es impermeable. Una vez comprobada la formación de la monocapa impermeable de células endoteliales, las células GES-1 o AGS que fueron estimuladas con EVs (siguiendo el protocolo 2.10), se tiñeron con CellTracker Green (Thermo Fisher Scientific) y se agregaron las células GES-1 o AGS a la monocapa impermeable de células endoteliales. Transcurridas 18 h de incubación, se detuvo el ensayo fijando las células en tampón Trevors durante 15 min, y 2 veces durante 5 m en tampón universal.

Los insertos se cortaron y montaron en portaobjetos. Las células fluorescentes que transmigraron se observaron y fotografiaron usando el microscopio Spinning Disk.

2.16 Ensayo de formación de redes vasculares in vitro

La formación de redes vasculares de células EA.hy926 después del tratamiento con las EVs se evaluó de la siguiente forma: Primero, las células EA.hy926 se privaron de suero durante al menos 4 h antes de iniciar el experimento. Se añadieron 50 μ l de matrigel (BD, Biosciences Discovery Labware) por pocillo a placas de 96 pocillos revestidas con polilisina y se incubaron a 37 °C durante al menos 1 h. A continuación, se sembraron células EA.hy926 sobre los pocillos y se añadieron 0.1, 1 y 10 μ g de EVHp⁻ o EVHp⁺. Como control positivo de la formación de redes se utilizó VEGF (50 ng/mL) en uno de los pocillos. Después de 16 h, se tomaron fotografías y se analizó la formación de redes enlazadas utilizando la herramienta Analizador de Angiogenesis (Angiogenesis Analyzer) del software ImageJ. El parámetro utilizado como resultado de este experimento fue el número de segmento maestros (number of master segments) en el área analizada. Los datos se normalizaron con el valor de la condición control.

2.17 Análisis proteómico de las EVs mediante Espectrometría de Masas (LC-ESI-MS/MS)

Las proteínas se extrajeron de EVs obtenidos a partir de células GES-1 infectadas o no con *H. pylori* (EVHp⁻ y EVHp⁺, respectivamente). Éstas se prepararon para proteómica de escopeta o “shotgun proteomics” usando una serie de etapas de reducción, alquilación, digestión de proteínas y desalinización siguiendo el protocolo descrito en Shao, B. *et al.* (2015) 26011469. Para ello, las proteínas se redujeron con ditioneitol (8.3 mM) y la alquilación se realizó con yodoacetamida (14.3 mM). Las muestras fueron digeridas con tripsina (0.05 µg/µL) una primera vez durante 4 h y una segunda vez durante toda la noche. La digestión se detuvo acidificando la mezcla de reacción (pH 2 a 3) con ácido trifluoroacético. Los digeridos proteolíticos se desalaron con extracción en fase sólida utilizando un cartucho Oasis HLB (1 cc, 30 µm; Waters) antes del análisis de MS. Después de la desalación, se inyectaron las digestiones trípticas (2 µg de proteína) directamente en el instrumento Lumos. Los análisis LC-ESI-MS/MS se realizaron en el modo de iones positivos con un espectrómetro de masas Orbitrap Fusion Lumos Tribrid de masa de ultra alta resolución y precisión (Thermo Fisher Scientific, San José, CA) acoplado a un nanoACQUITY

UPLC (Waters, Milford, MA). Se utilizó un gradiente lineal de ácido fórmico al 0,1% en agua (disolvente A) y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo (disolvente B) para la separación. Los espectros de MS/MS se buscaron en la base de datos de humano UniProtKB utilizando el motor de búsqueda Comet MS/MS (versión 2018.01 rev.2) con alquilación de Cys fija y oxidaciones de Met variable. Se permitieron dos sitios de escisión faltantes en péptidos para búsquedas restringidas con tripsina. Los resultados de Comet se validaron utilizando PeptideProphet y ProteinProphet, utilizando una probabilidad ajustada de $> 0,90$ para los péptidos y $> 0,95$ para las proteínas. Para la identificación de una proteína, debían detectarse al menos dos péptidos exclusivos de la proteína de interés. Requerir al menos dos péptidos únicos con una alta puntuación de confianza disminuye marcadamente la tasa de falsos positivos de identificación de proteínas. Cada estado de carga de un péptido se consideró una identificación única. Se utilizaron recuentos de péptidos totales para comparar la abundancia de una proteína. Esta metodología se realizó en el laboratorio del Dr. Jay Heinicke, en la Universidad de Washington, Estados Unidos.

2.18 Procesamiento de datos y análisis estadístico

Para los datos que se expresan en porcentajes se asumieron los valores obtenidos de la condición control (sin tratamiento) como el 100% y en base a estos se calcularon los porcentajes de las condiciones experimentales. Todos los datos se expresan como media \pm error estándar de la media de los resultados de al menos tres experimentos independientes. Los datos se analizaron utilizando el T-test para datos no apareados. La significancia (valor p) se estableció de la siguiente forma: ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Todos los datos se procesaron utilizando GraphPad Software (<http://www.graphpad.com>).

3. Resultados

*3.1 Efectos de la infección con *H. pylori* de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1*

Con la finalidad de medir diversos efectos que tiene la infección con la bacteria *H. pylori* sobre células de la línea epitelial gástrica GES-1, se escogió la cepa 26695 de esta bacteria, la cual tiene el genoma totalmente secuenciado y posee los factores de virulencia más conocidos como CagA, VacA y la enzima ureasa. Por su parte, la línea celular GES-1 fue elegida, debido a que a diferencia de la mayoría de los modelos celulares epiteliales gástricos que provienen de un tumor, las células GES-1 son células epiteliales gástricas humanas que han sido inmortalizadas pero no son células transformadas, es decir, son incapaces de formar tumores (Ke, Y. *et al.* 1994), lo cual las hace más adecuadas para el estudio de los efectos de la infección con *H. pylori*, el cual es un evento importante especialmente al inicio de la cascada preneoplásica gástrica.

*3.1.1 Efecto de la infección de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 con *H. pylori* sobre los niveles de las proteínas E-cadherina y Caveolina-1*

Luego de infección de células de la línea celular GES-1 con *H. pylori* hasta un máximo de 72 h, usando un MOI igual a 100, las células se lavaron y se lisaron. Luego las proteínas totales se cuantificaron por el método BCA y se separaron mediante electroforesis. Finalmente, se detectaron las proteínas E-cadherina, Caveolina-1 y β -actina usando anticuerpos específicos, siguiendo el protocolo en la sección 2.9. Como se observa en la Figura 3.1, los niveles de E-cadherina disminuyeron luego de la infección con *H. pylori*, siendo significativo a las 4 h y 72 h luego de infección con la bacteria. Los niveles de Caveolina-1, como se observa en la Figura 3.1, aumentaron, siendo significativo a las 24 y 48 h, luego de la infección.

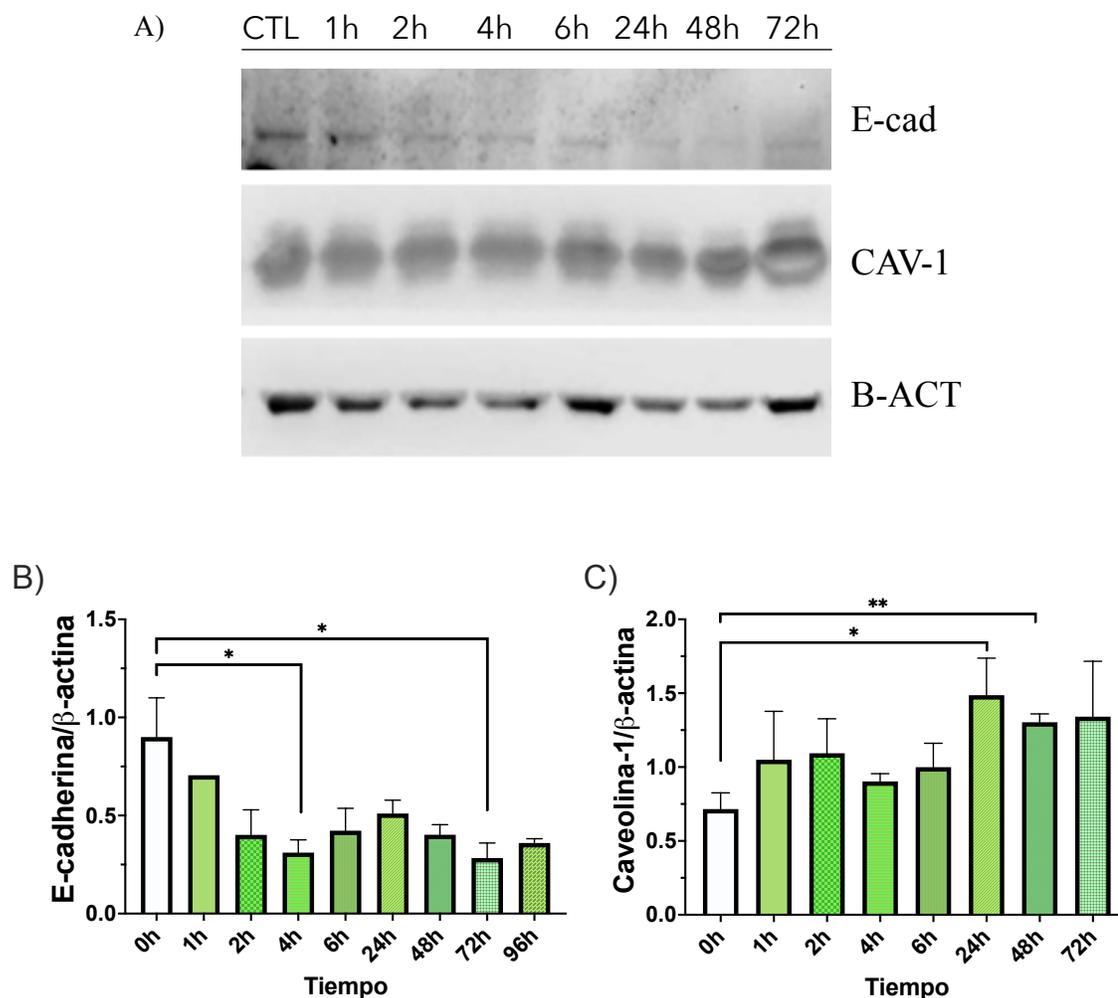


Figura 3.1. Efecto de la infección con *H. pylori* de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 sobre la expresión de E-cadherina y Caveolina-1. A) Imagen representativa de *Western blot* para las proteínas E-cadherina, Caveolina-1 y β -Actina, B) cuantificación de los niveles de E-cadherina normalizado por los niveles de β -Actina y C) cuantificación de los niveles de Caveolina-1 normalizado por los niveles de β -Actina. Los resultados se analizaron estadísticamente con el T test (n=3). * indica $p < 0.05$ y ** indica $p < 0.01$.

*3.1.2 Efecto de la infección de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 con *H. pylori* sobre viabilidad celular*

Luego de infección de células de la línea celular GES-1 con *H. pylori*, usando un MOI 100, se midió la viabilidad celular mediante un ensayo MTS, siguiendo la metodología descrita en la sección 2.12. La medición se realizó a las 24 h después de la infección con *H. pylori*, y a las 24 h y 48 h después del tratamiento con gentamicina, un antibiótico al cual *H. pylori* es sensible. Como se observa en la Figura 3.2, a las 24 h después de la infección con *H. pylori* la viabilidad celular disminuyó significativamente hasta ~ 80% con respecto a la viabilidad de las células sin infectar. Luego de 24 h del tratamiento con gentamicina, la viabilidad alcanzó 86% con respecto a las células sin infectar. Finalmente, a las 48 h del tratamiento la viabilidad celular de las células infectadas se recuperó, y aumentó hasta 104% con respecto a la viabilidad de células sin infectar, sin embargo, este aumento no fue significativo.

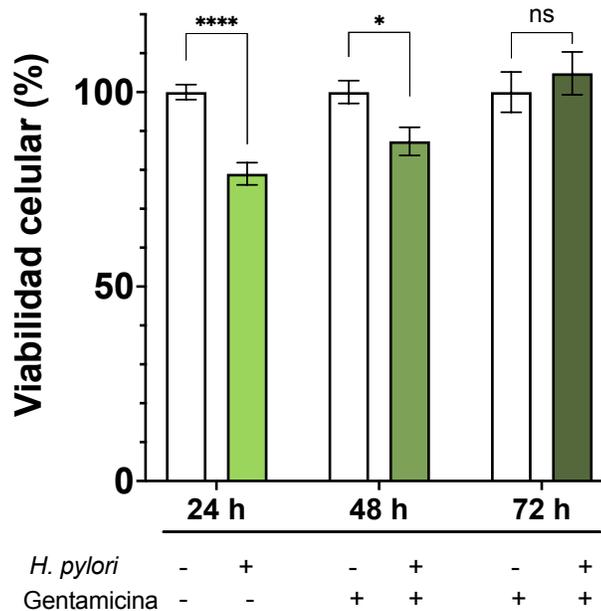


Figura 3.2. Viabilidad celular en células epiteliales gástricas GES-1 luego de infección con *H. pylori*. La viabilidad celular se midió mediante el ensayo MTS en células sin infectar y luego de infección con la bacteria, en las condiciones señaladas. 100% corresponde a ~0,4 a 490 nm. Los resultados se analizaron estadísticamente con el T test (n=3). ns indica $p > 0.05$, * indica $p < 0.05$ y **** indica $p < 0.0001$.

3.1.3 Efecto de la infección de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 con *H. pylori* sobre la expresión génica relativa de citoquinas

Debido a que en modelos celulares de cáncer gástrico y en pacientes la infección con *H. pylori* aumenta la liberación de citoquinas proinflamatorias, se quiso medir si la infección con *H. pylori* también aumenta las citoquinas

proinflamatorias en la línea celular GES-1. Luego de infección de las células GES-1 con *H. pylori*, usando un MOI 100, se midieron los niveles relativos de expresión de las citoquinas IL-8, IL-6, TNF- α , IL-33 y IL-10. La medición se realizó a las 24 h después de la infección con *H. pylori*, y a las 24 y 48 h después del tratamiento con gentamicina, siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.11. Como se observa en la Figura 3.2, a las 24 h posteriores a la infección, aumentó la expresión de las citoquinas IL-8 e IL-6; sin embargo, el cambio solo fue estadísticamente significativo para IL-8. TNF- α e IL-33 permanecieron sin cambios. La IL-10 disminuyó, aunque este cambio no fue estadísticamente significativo. Estos resultados son consistentes con los reportados en la literatura, donde se ha demostrado que la infección por *H. pylori* aumenta los niveles de algunas citoquinas proinflamatorias (Yang, T. *et al.* 2020; Zhang, Y. *et al.* 2021). Después de 24 h de tratamiento con gentamicina, se observó una disminución de la expresión relativa de TNF- α , IL-8 e IL-6 a niveles casi basales, mientras que este no fue el caso de IL-33 y IL-10. Sorprendentemente, a las 48 h del tratamiento con gentamicina, la expresión relativa de las citoquinas proinflamatorias volvió a aumentar, siendo estadísticamente significativo para las citoquinas TNF- α , IL-8 e IL-6. Por lo tanto, los niveles de estas citoquinas proinflamatorias producidas por

las células GES-1 después de la infección por *H. pylori* aumentaron después del tratamiento durante 48 h con gentamicina. Esto puede indicar que las células liberan factores al medio que favorecen la producción de citoquinas incluso después de que *H. pylori* se haya erradicado.

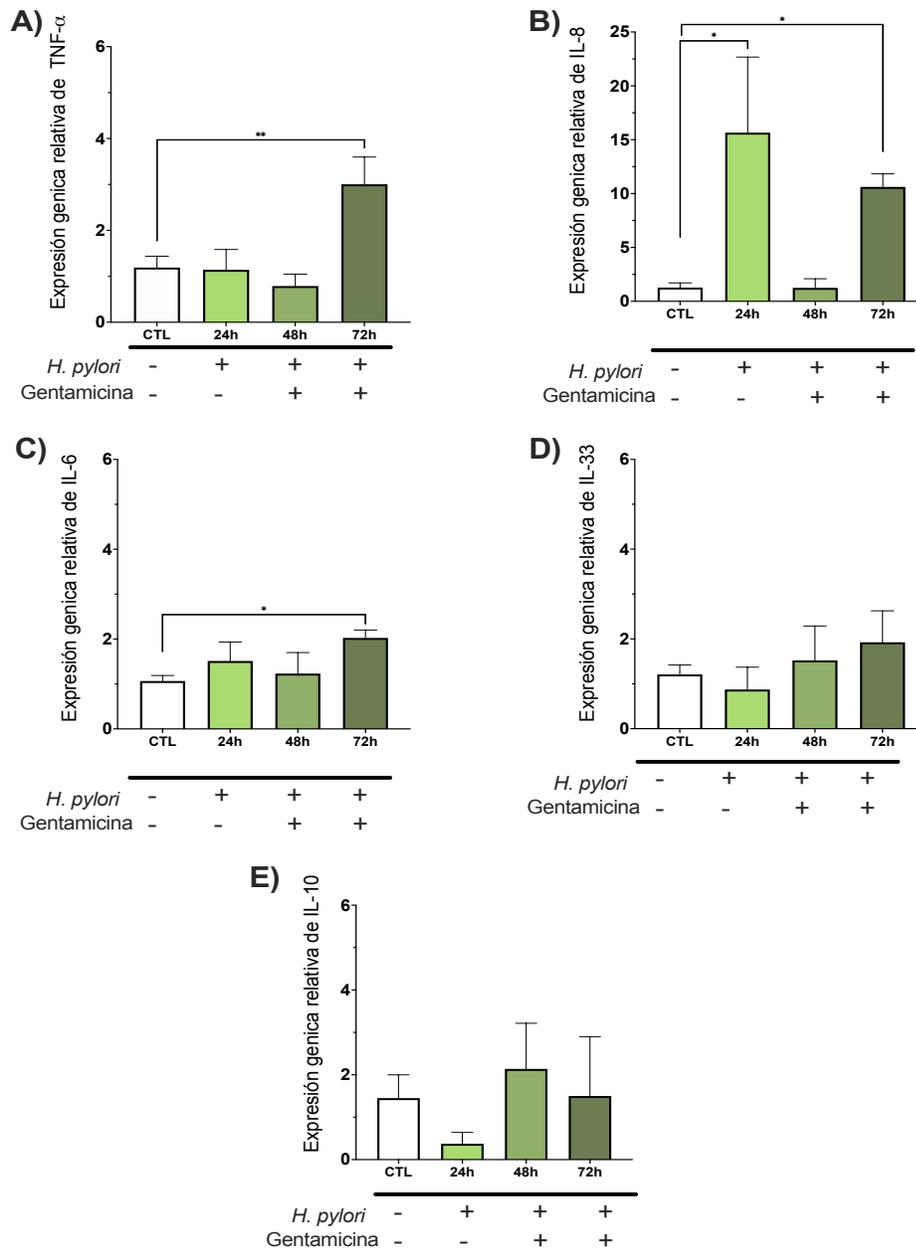


Figura 3.3. Expresión génica relativa de citoquinas en células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 luego de infección con *H. pylori*. En las figuras se graficó el $2^{-\Delta\Delta CT}$ determinado para las citoquinas proinflamatorias A) TNF- α , B) IL-8, C) IL-6, D) IL-33 y anti-inflamatoria E) IL-10, usando como gen normalizador el ARNr 18S. Los resultados se analizaron estadísticamente con el T test (n=3). * indica $p < 0.05$ y ** indica $p < 0.01$.

3.1.4 Efecto de la infección de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 con *H. pylori* sobre la migración celular.

Luego de 24 h de infección de las células GES-1 con *H. pylori*, usando un MOI 100, se midió la migración celular en *transwells*, siguiendo la metodología descrita en la sección 2.13. Como se observa en la Figura 3.4, las células que se infectaron con la bacteria disminuyeron significativamente su migración celular a un 40%, con respecto a las células que no se infectaron.

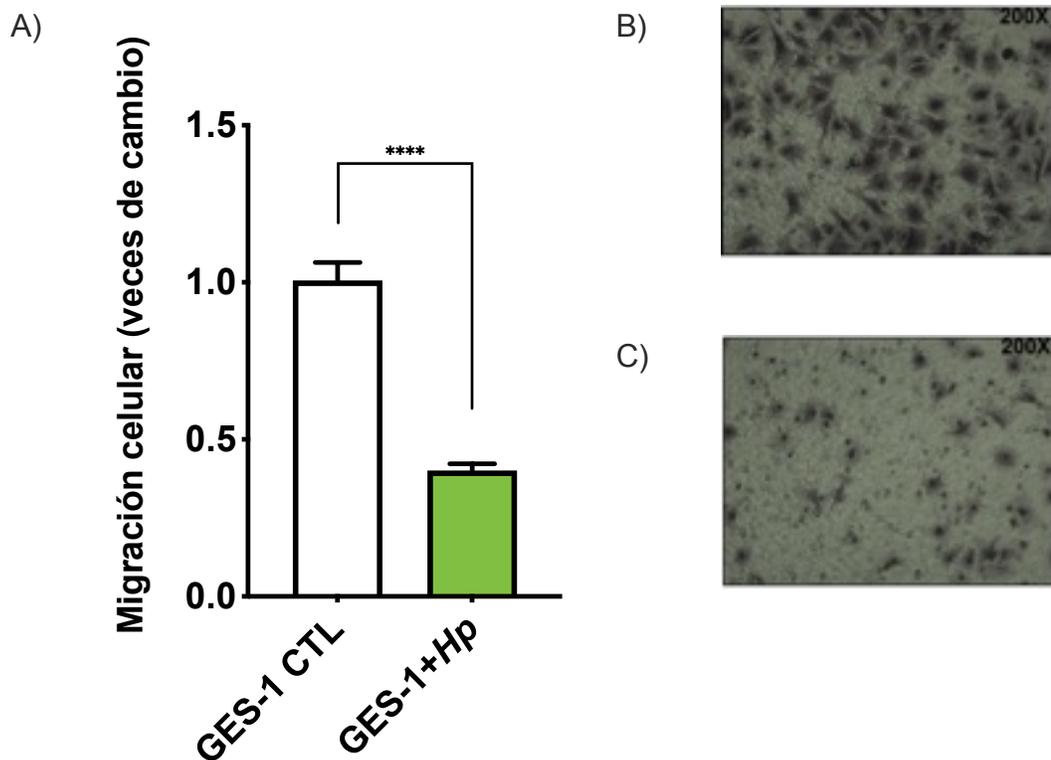


Figura 3.4. Efecto de la infección con *H. pylori* en la migración de las células GES-1. A) Migración celular de células GES-1 sin tratamiento o con infección con *H. pylori* durante 24 h. B) imagen representativa de células sin infectar que migraron y C) imagen representativa de células infectadas con

H. pylori que migraron. El valor 1 corresponde a ~100 células. Los resultados se analizaron estadísticamente con el T test (n=3). **** indica $p < 0.0001$.

3.2 Purificación y caracterización de EVs liberadas de células epiteliales gástricas GES-1 infectadas o no con H. pylori

Para la obtención del medio condicionado a partir del cual se purificaron las EVs provenientes de células GES-1 infectadas con *H. pylori* se siguió el protocolo descrito en la sección 2.4. Este protocolo consistía brevemente en infectar las células durante 24 h y luego tratarlas con gentamicina para eliminar la bacteria, posteriormente se repuso medio fresco suplementado con 5% de *SFB EV-Free*. Las células se mantuvieron en cultivo durante 48 h y se colectó el medio condicionado para aislar las EVs provenientes de células infectadas con *H. pylori* llamadas *EVHp+*. Paralelamente, células de GES-1 se sometieron al mismo protocolo, con la excepción que el paso en donde se agrega la bacteria se omitió para obtener las EVs de células sin infectar, llamadas *EVHp-*. Se realizó la purificación de las EVs mediante el uso del kit Exo-spin™ (sección 2.6) y mediante Ultracentrifugación (sección 2.7). Mediante la caracterización de las EVs aisladas por ambos métodos, se pudo determinar que la metodología de Ultracentrifugación ofrece mayor pureza en las EVs aisladas, por lo tanto, se escogió esta metodología para

hacer el resto de los experimentos. A continuación, se muestran los resultados de la caracterización de las EVs aisladas mediante Ultracentrifugación. Los resultados obtenidos de la caracterización de las EVs purificadas mediante el kit Exo-spin™ se muestra en la sección de ANEXO.

3.2.1 Caracterización de EVs liberadas de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 infectadas o no con H. pylori purificadas mediante Ultracentrifugación

Luego de purificar las EVs mediante Ultracentrifugación (sección 2.7) a partir del medio condicionado obtenido siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.4, las EVs se caracterizaron mediante NTA para conocer su concentración y tamaño y por *Western blot*, para la identificación de marcadores clásicos de exosomas. Adicionalmente, al momento de coleccionar el medio condicionado, se determinó el número total de células en cada condición. Como se muestra en la Figura 3.5.A, las células GES-1 infectadas con *H. pylori* liberan 50% más EVs comparado con las células sin infectar. Además, las EVHp⁺ tienen mayor concentración de proteínas totales normalizadas por cada 10⁶ células comparadas con las EVHp⁻ (Figura 3.5.B). Adicionalmente, se evidenció que las EVs liberadas de células infectadas con

H. pylori redujeron su tamaño promedio, con respecto a EV_{Hp-} (Figura 3.5.C y Tabla 3.1). Para determinar si la infección por *H. pylori* estaba aumentando el contenido de proteína por EV o más bien el número total de EV liberados, se calculó el contenido de proteína por partícula de EV. No se observaron diferencias significativas (Figura 3.5.D), lo que indica que la infección con *H. pylori* aumenta el número de EVs liberados por las células, pero no aumenta la concentración de carga proteica por EV. Finalmente, mediante *Western blot* se determinó la presencia de los marcadores de exosomas Alix, TSG101 y CD81 en ambas muestras de EVs (Figura 3.5.E). Estas proteínas son usadas como marcadores de exosomas porque participan en la biogénesis de exosomas. La detección de Calregulin, se utiliza como un control negativo, ya que, al ser una proteína de retículo endoplasmático, se espera que se encuentre ausente en las muestras de EVs y presente en las muestras de lisado celular, como fue lo observado. La presencia de los marcadores de exosomas y ausencia de Calregulin medido por *Western blot* indica una buena calidad de las EVs purificadas.

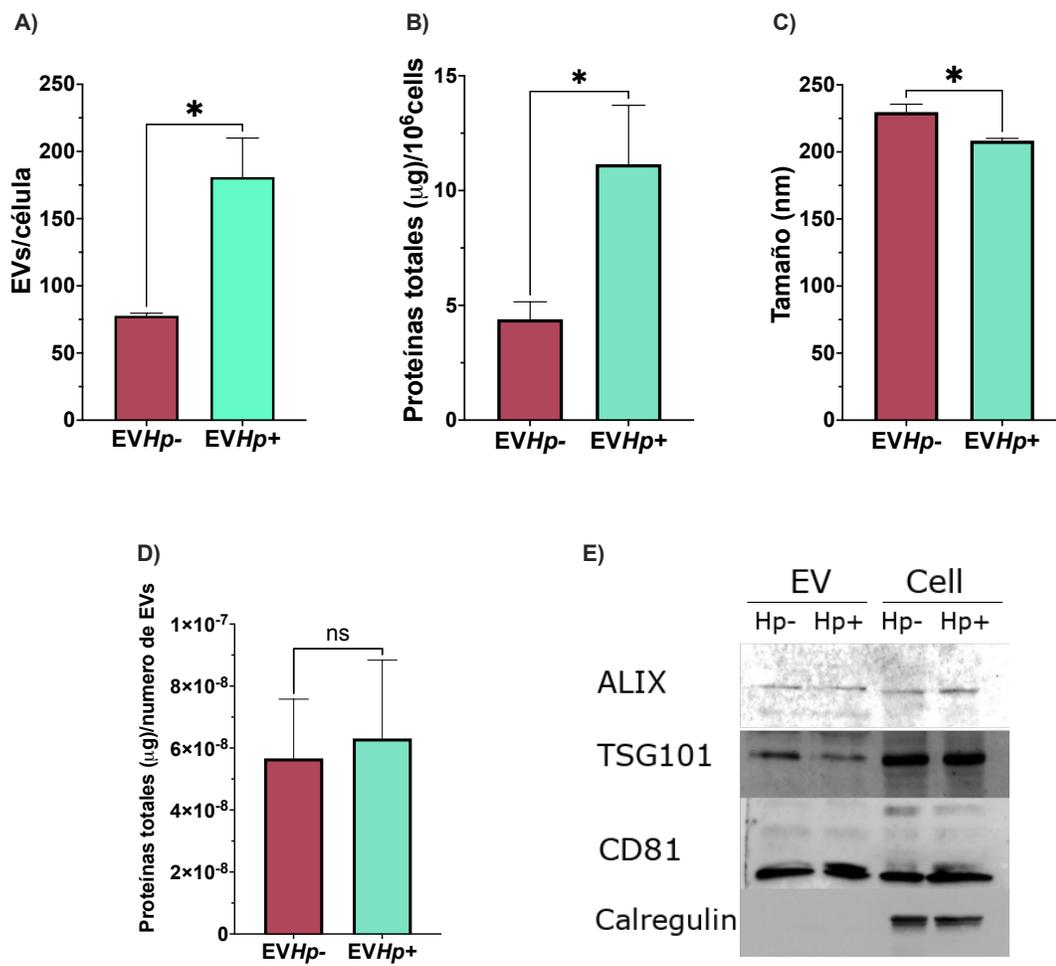


Figura 3.5. Efectos de la infección con *H. pylori* de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 sobre la liberación de EVs. A) número de EVs liberadas por cada célula; B) Proteínas totales en EVs liberadas por cada 10⁶ células; C) Tamaño promedio de las EVs; D) Proteínas totales (μg) por número de EVs; E) determinación mediante *Western blot* de la presencia de marcadores de exosomas como Alix, TSG101 y CD81. A su vez, se verificó la ausencia de Calregulina, un marcador de retículo endoplasmático. Los resultados se analizaron estadísticamente con el T test (n=4). ns indica p>0.05 y * indica p<0.05.

Tabla 3.1. Caracterización de EVs liberadas de células epiteliales gástricas GES-1 infectadas con *H. pylori* purificadas mediante Ultracentrifugación.

| Características | EVHp- | EVHp+ |
|--|--|--|
| Concentración de proteínas totales ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) | $1,078 \pm 0,38$ | $1,215 \pm 0,47$ |
| Concentración de partículas (partículas/mL) | $2,14 \times 10^{12} \pm 9,8 \times 10^{11}$ | $2,29 \times 10^{12} \pm 7,2 \times 10^{11}$ |
| Tamaño promedio (nm) | $227,7 \pm 5,3$ | $207,85 \pm 2,9$ |

3.3. Efectos de las EVs liberadas de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 infectadas o no con *H. pylori* en células receptoras

Como ya se mencionó, el método de purificación de EVs por Ultracentrifugación se consideró mejor que el kit Exo-spin™, debido a la mayor detección de los marcadores de exosomas usando esta técnica. Por lo tanto, todos los ensayos a continuación se realizaron con EVs purificadas mediante Ultracentrifugación. Las células fueron estimuladas con EVHp- o EVHp+ durante 24 h, para medir distintos efectos celulares, entre ellos los niveles de expresión relativos de las citoquinas IL-8, IL-6, TNF- α , IL-33 e IL-10 mediante RT-qPCR; la viabilidad celular; la migración celular en *transwell*; la invasión celular en Matrigel; la migración transendotelial y la formación de redes vasculares de células endoteliales EA.hy926. Para tener un panorama amplio de los efectos de las EVs liberadas de células gástricas GES-1 infectadas con *H. pylori*, se realizaron los ensayos biológicos

estimulando células de la línea celular gástrica GES-1 y la línea celular de cáncer gástrico AGS. Al usar la línea celular AGS en estos experimentos, se aporta información del rol de las EVs liberadas de células GES-1 infectadas con *H. pylori*, que pueden ser liberadas en zonas del estómago que estén infectadas con *H. pylori*, sobre células de un tumor primario adyacente. Adicionalmente, se realizaron ensayos biológicos usando la línea celular EA.hy926, la cual es un modelo de células endoteliales, por lo que podemos conocer los efectos de estas EVs sobre funciones de células endoteliales, ya que hay evidencia que indica que la infección por *H. pylori* también afecta a las células endoteliales y el sistema vascular (Pousa y Gisbert, 2006).

Para determinar la cantidad de EVs a usar como estímulo en los ensayos funcionales, se realizó un experimento de migración celular de células GES-1 en *transwell*, en donde se probaron distintas concentraciones de EVs considerando el número de EVs o la cantidad de proteínas totales de EVs (Ver sección ANEXO). Debido a que las condiciones evaluadas mostraron un efecto similar, se escogió utilizar como estímulo 12 µg de EVs en 1.5×10^5 células para los ensayos funcionales.

3.3.1 Determinación la viabilidad celular de células de las líneas celulares gástricas GES-1 y AGS estimuladas con EVs liberadas de células GES-1 infectadas o no con H. pylori

Células de las líneas celulares gástricas GES-1 y AGS se estimularon durante 24 h con EVs provenientes de células GES-1 sin infectar (EVHp-) o células infectadas con *H. pylori* (EVHp+). Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular. La viabilidad celular de GES-1 no se encontró afectada por la estimulación con EVHp-, sin embargo, cuando las células se estimularon con EVHp+, la viabilidad celular disminuyó en aproximadamente un 20% (Figura 3.6.A). Alternativamente, la incubación de células AGS con EVHp- o EVHp+ no afectó la viabilidad celular (Figura 3.6.B).

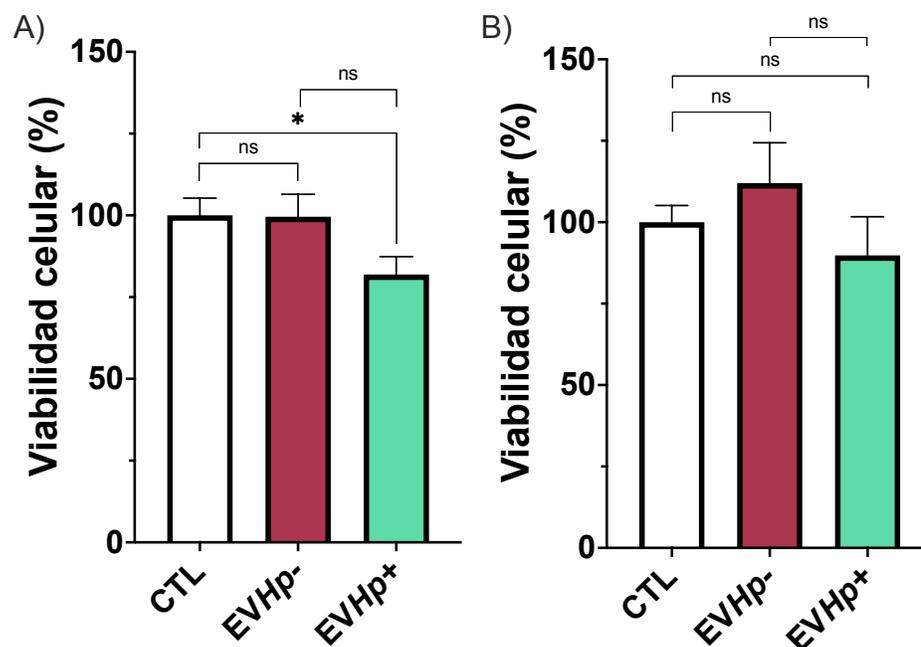


Figura 3.6. Viabilidad celular de células de las líneas celulares gástricas GES-1 y AGS luego de incubación con EVHp- o EVHp+. A) viabilidad celular de GES-1 y B) viabilidad celular de AGS. 100% corresponde a ~500.00 células. Los resultados se analizaron estadísticamente con el T test (n=4). ns indica $p > 0.05$ y * indica $p < 0.05$.

3.3.2 Determinación de los niveles relativos de expresión de citoquinas en células de las líneas celulares gástricas GES-1 y AGS estimuladas con EVs liberadas de células GES-1 infectadas o no con *H. pylori*

Luego de estimular células de las líneas celulares gástricas GES-1 y AGS durante 24 h con EVHp- o EVHp+, se colectaron las células en Trizol frío y se obtuvo el ARN total para determinar por RT-qPCR los niveles relativos de expresión de las citoquinas, siguiendo el protocolo descrito en la sección

2.11. El tratamiento de células GES-1 con *EVHp-* o *EVHp+* no indujo cambios en los niveles relativos de expresión de IL-8 y TNF- α (Figura 3.7.A y B). Los niveles relativos de expresión de IL-6 aumentaron solo con estimulación de *EVHp+* (Figura 3.7.C). Los niveles relativos de expresión de IL-1 β aumentaron con la estimulación de *EVHp-* y *EVHp+* (Figura 3.7.D). Los niveles relativos de expresión de IL-23 aumentaron con la estimulación de *EVHp-*, pero este aumento fue mayor cuando las células se estimularon con *EVHp+* (Figura 3.7.E). Interesantemente, en las células AGS, la estimulación con *EVHp-* o *EVHp+* no indujo aumentos significativos en los niveles relativos de expresión de ninguna de las citoquinas proinflamatorias medidas (Figura 3.8).

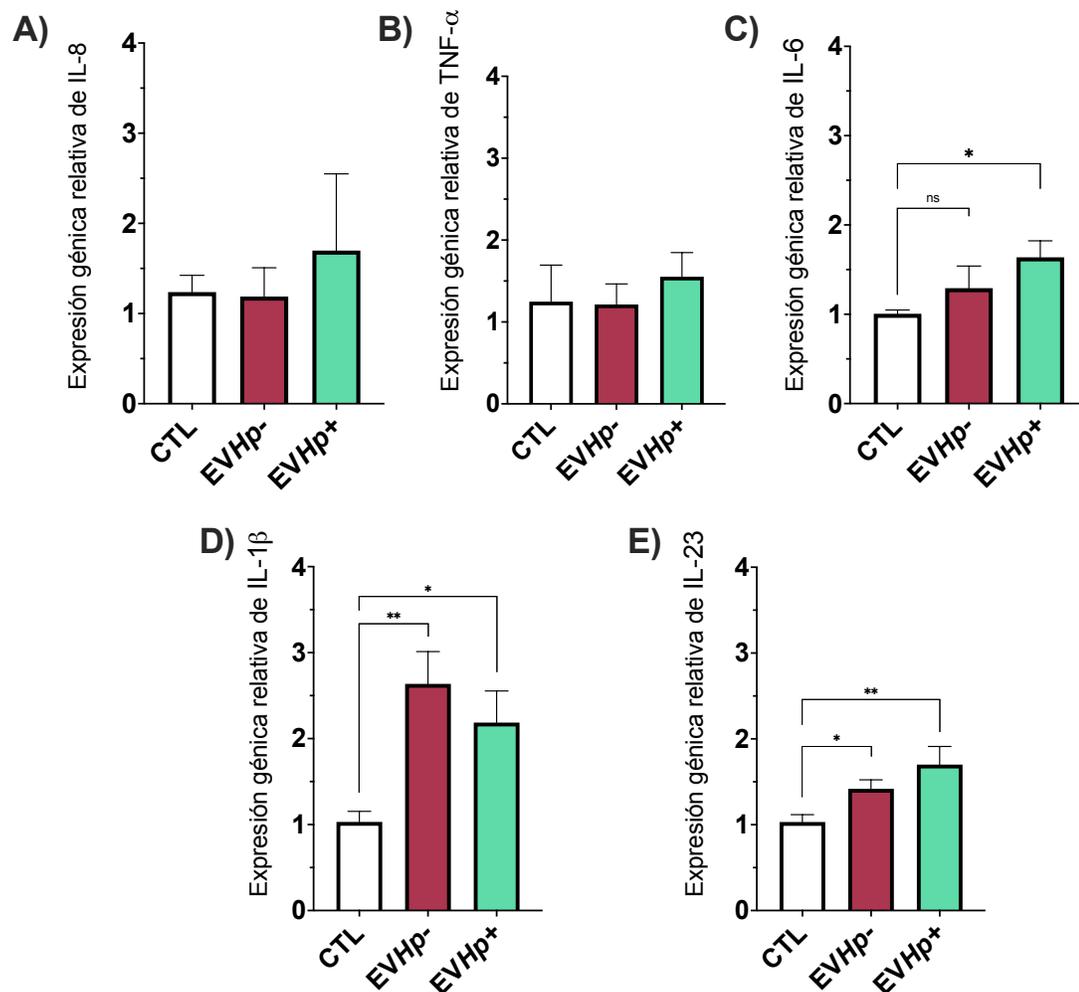


Figura 3.7. Expresión génica relativa de citoquinas en células GES-1 estimuladas con EVHp- o EVHp+ durante 24 h. En las figuras se graficó el $2^{-\Delta\Delta CT}$ determinado para las citoquinas proinflamatorias: A) IL-8, (B) TNF- α , C) IL-6; D) IL-1 β y E) IL-23 medida por RT-qPCR y normalizados utilizando el gen ARNr 18S. Los resultados se analizaron estadísticamente con el T test (n=4). ns indica $p > 0.05$, * indica $p < 0.05$ y ** indica $p < 0.01$.

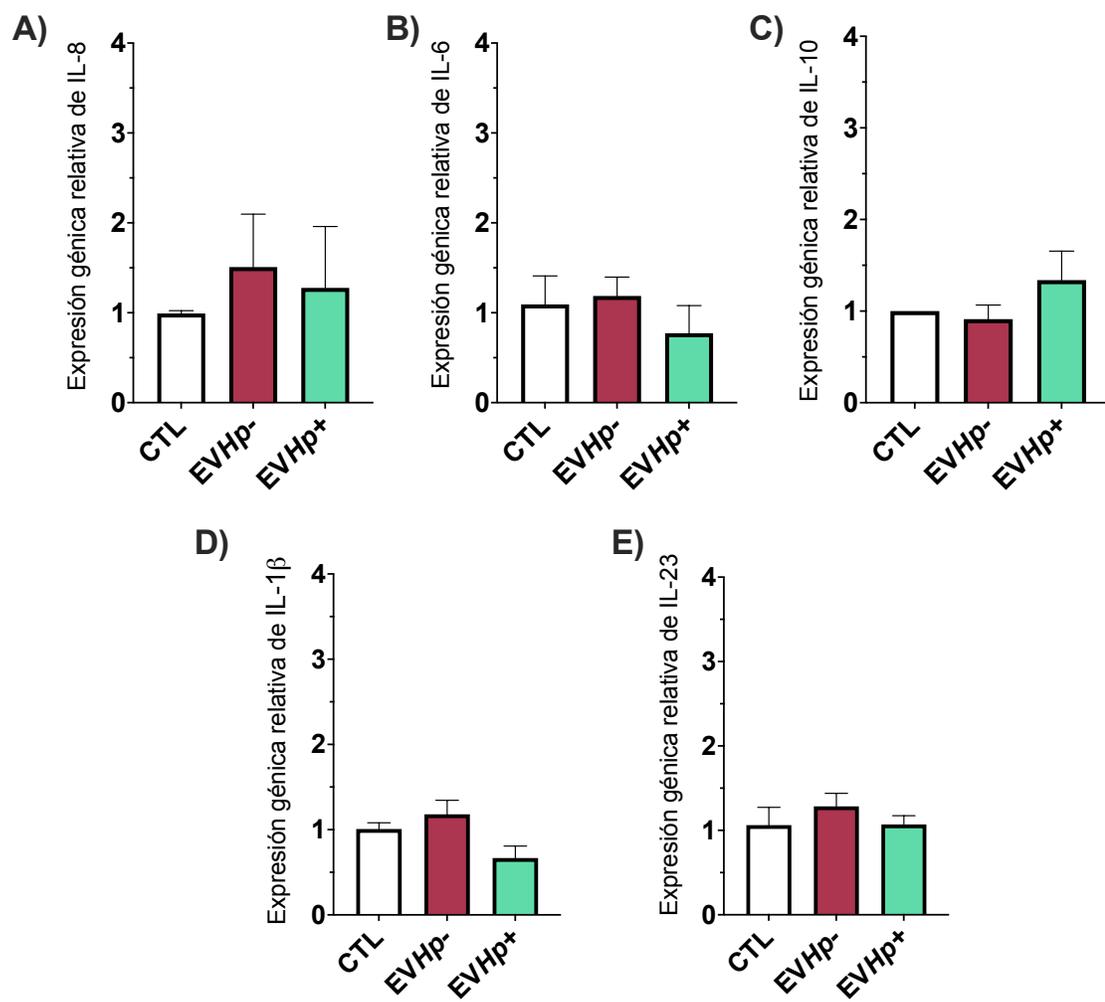


Figura 3.8. Expresión génica relativa de citoquinas en células AGS estimuladas con EVHp⁻ y EVHp⁺ durante 24 h. En las figuras se graficó el $2^{-\Delta\Delta CT}$ determinado para las citoquinas proinflamatorias: A) IL-8, B) IL-6, C) IL-10, D) IL-1 β y E) IL-23 medida por RT-qPCR y normalizados utilizando el gen ARNr 18S, en cuatro experimentos independientes. Los resultados se analizaron estadísticamente con el T test (n=4).

3.3.3 *Determinación de la migración celular de células de las líneas celulares gástricas GES-1 y AGS estimuladas con EVs liberadas de células GES-1 infectadas o no con H. pylori*

Células de las líneas celulares gástricas GES-1 y AGS se estimularon durante 24 h con EVHp⁻ o EVHp⁺, y posteriormente se midió la migración celular en *transwell*, siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.13. Como se observa en la figura 3.9, el estímulo de las células GES-1 con EVHp⁻ indujo un aumento moderado en la migración celular, el cual fue aun mayor cuando las células fueron estimuladas con EVHp⁺.

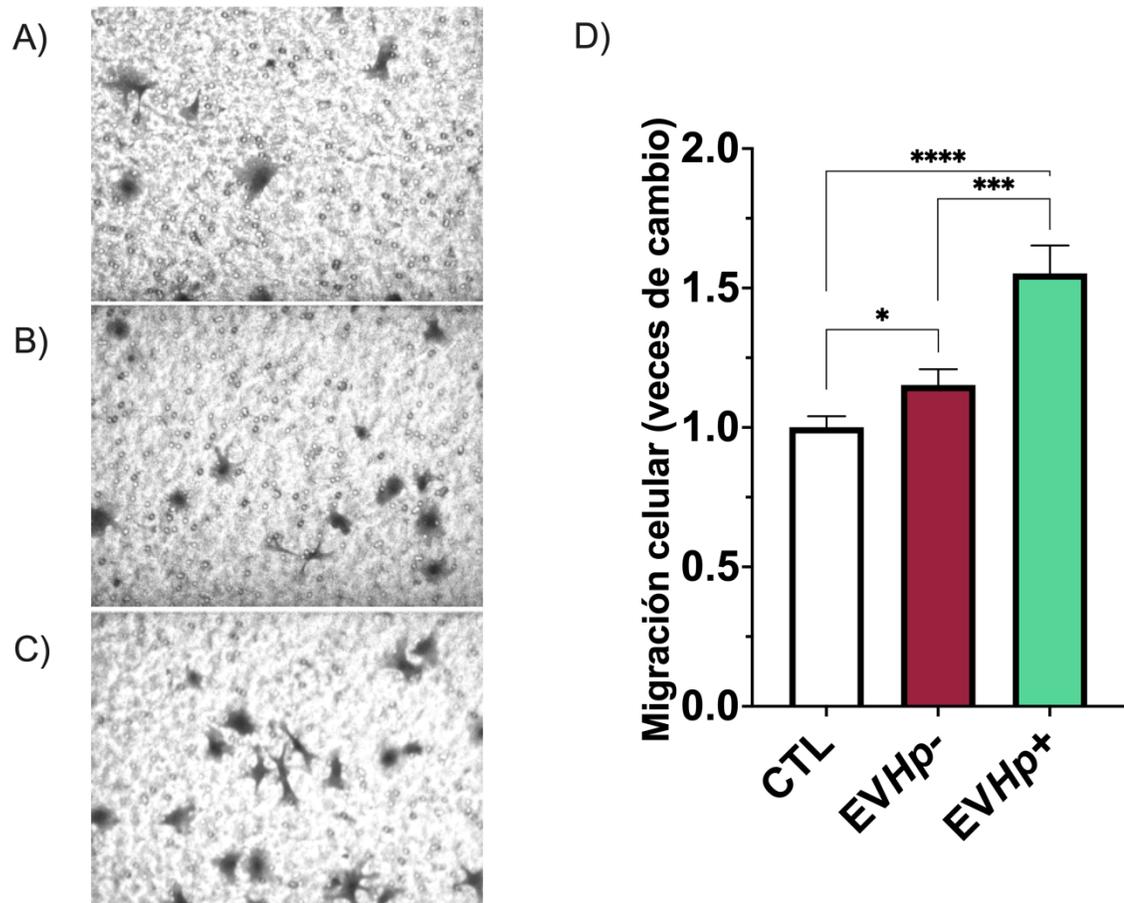


Figura 3.9. Efectos de EVs liberadas de células gástricas GES-1 infectadas o no con *H. pylori* sobre la migración celular de células GES-1. Se determinó la migración celular en *transwell* de: A) células GES-1 sin estímulo (CTL), B) células GES-1 estimuladas durante 24 h con EVHp- y C) células GES-1 estimuladas durante 24 h con EVHp+. En D) se muestran la cuantificación de cuatro experimentos independientes. El valor 1 corresponde a ~8 células por campo. Los resultados se analizaron estadísticamente con el T test (n=4). * indica $p < 0.05$, *** indica $p < 0.001$ y **** indica $p < 0.0001$.

La migración celular de las células AGS tuvo una tendencia a la disminución cuando las células fueron estimuladas con las EVHp-; sin embargo, este

cambio no fue significativo con respecto a las células sin tratamiento (CTL). Cuando estas células fueron estimuladas con las EVHp+, la migración celular aumentó significativamente (Figura 3.10).

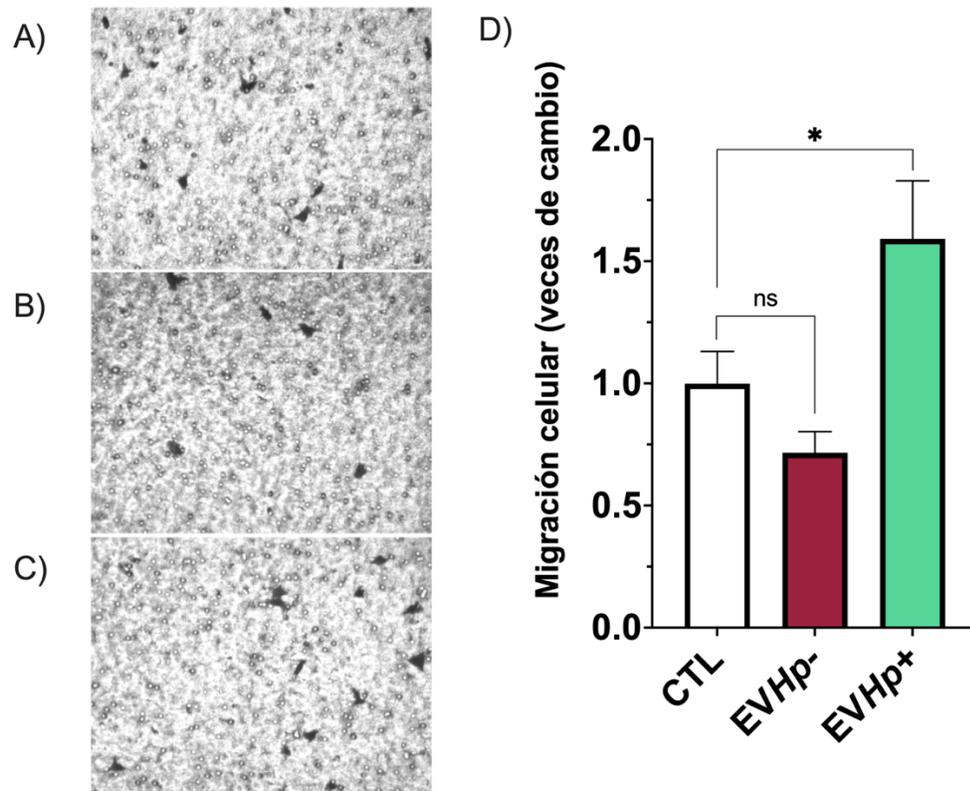


Figura 3.10. Efectos de EVs liberadas de células gástricas GES-1 infectadas o no con *H. pylori* sobre la migración celular de células AGS. Se determinó la migración celular en *transwell* de: A) Células AGS sin estímulo (CTL); B) Células AGS estimuladas durante 24 h con EVHp- y C) Células AGS estimuladas durante 24 h EVHp+. En D) se muestran la cuantificación de tres experimentos independientes. El valor 1 corresponde a ~7 células por campo. Los resultados se analizaron estadísticamente con el T test (n=3). ns indica $p>0.05$ y * indica $p<0.05$.

3.3.4 *Determinación de la invasión celular in vitro de células de las líneas celulares gástricas GES-1 y AGS estimuladas con EVs liberadas de células GES-1 infectadas o no con H. pylori*

Para continuar evaluando los efectos biológicos de las EVs liberadas de células GES-1 infectadas o no con *H. pylori*, se hicieron ensayos de invasión celular *in vitro* usando Matrigel, con células GES-1 y AGS estimuladas por 24 h con las EVs. Como se observa en la Figura 3.11, el estímulo de las células GES-1 con *EVHp-* no ocasionó un aumento en la invasión celular, sin embargo, cuando se estimuló con *EVHp+*, se observó un aumento significativo de la invasión. En cuanto a la invasión celular *in vitro* de las células AGS, solo aumentó significativamente cuando el estímulo fue *EVHp+* (Figura 3.12).

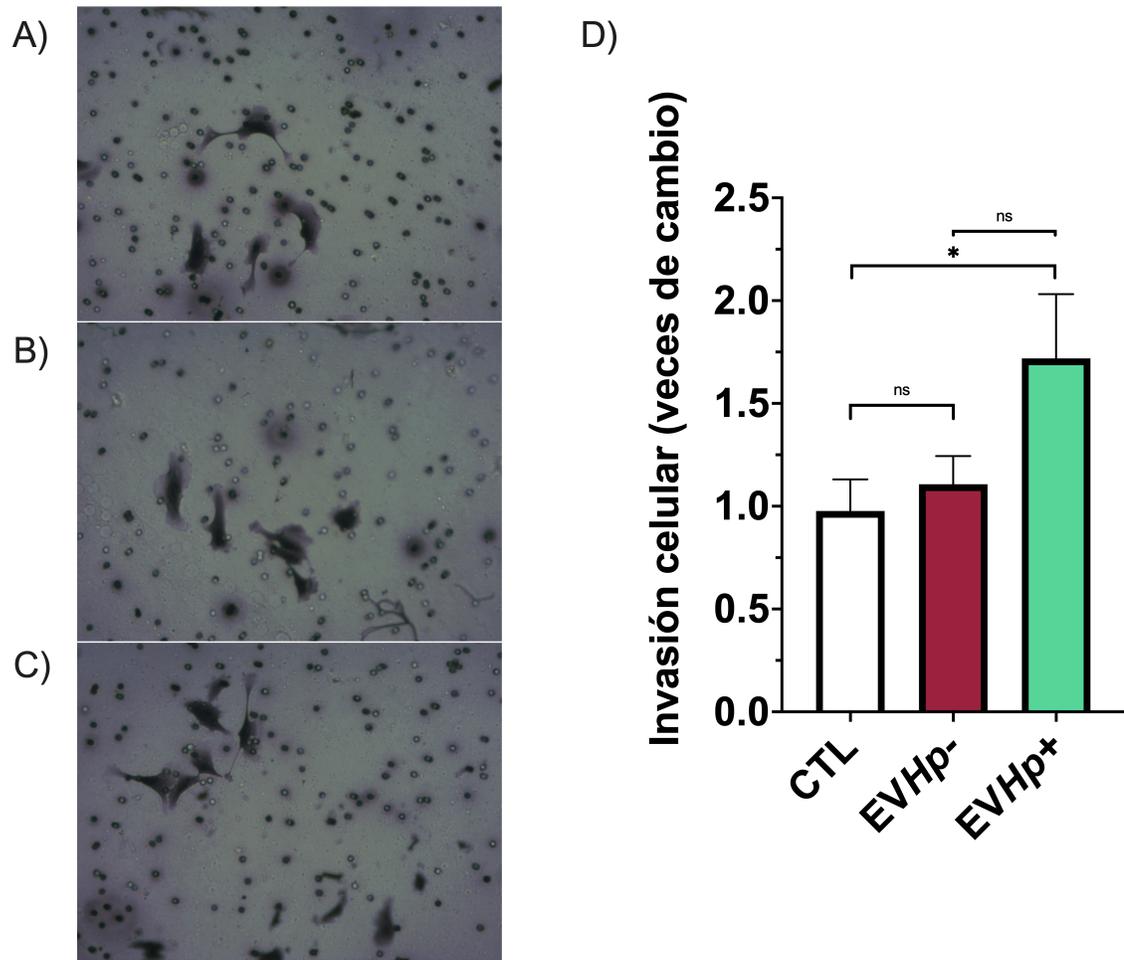


Figura 3.11. Efecto de EVs liberadas de células gástricas GES-1 infectadas o no con *H. pylori* sobre la invasión celular *in vitro* de células GES-1. Se determinó la invasión celular en Matrigel de: A) Células GES-1 sin estímulo (CTL); B) Células GES-1 estimuladas durante 24 h con EVHp- y C) Células GES-1 estimuladas durante 24 h con EVHp+. D) Cuantificación de cuatro experimentos independientes. El valor 1 corresponde a ~9 células por campo. Los resultados se analizaron estadísticamente con el T test (n=4). ns indica $p > 0.05$ y * indica $p < 0.05$.

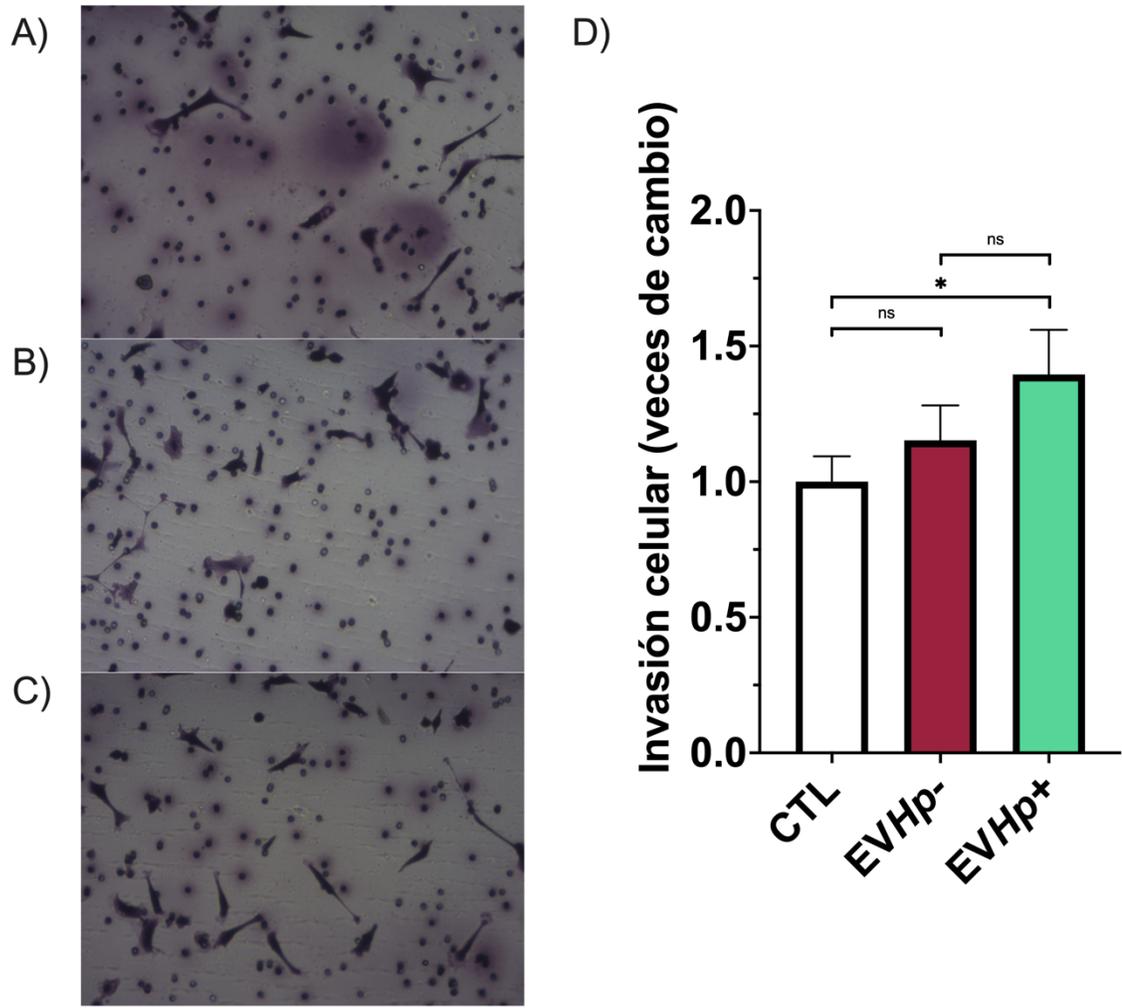


Figura 3.12. Efectos de EVs liberadas de células gástricas GES-1 infectadas o no con *H. pylori* sobre la invasión celular *in vitro* de células AGS. Se determinó la invasión celular en Matrigel de: A) Células AGS sin estímulo (CTL); B) Células AGS estimuladas durante 24 h con EVHp- y C) Células AGS estimuladas durante 24 h con EVHp+. D) Cuantificación de tres experimentos independientes. El valor 1 corresponde a ~20 células por campo. Los resultados se analizaron estadísticamente con el T test (n=3). ns indica $p > 0.05$ y * indica $p < 0.05$.

3.3.5 Determinación de la migración transendotelial de células de las líneas celulares gástricas GES-1 y AGS estimuladas con EVs aisladas de células GES-1 infectadas o no con *H. pylori*

Para obtener información acerca de si las EVs liberadas de células epiteliales gástricas GES-1 infectadas con *H. pylori* pueden ser importantes en procesos como la intravasación y/o la extravasación, ambos procesos relacionados a la cascada de eventos que antecede a la metástasis, se hicieron ensayos de migración transendotelial *in vitro*. Para ello, se sembraron las células estimuladas durante 24 h con EVHp⁻ o EVHp⁺ encima de una monocapa impermeable de células endoteliales EA.hy926 sembrada previamente en *transwells* (sección 2.16). Las células a evaluar se tiñeron con CellTracker™, por lo que, aquellas que lograron atravesar la monocapa de células endoteliales y los poros del *transwell*, pudieron ser observadas al otro lado del *transwell* por su fluorescencia detectada en el Microscopio Spinning Disk. Como se observa en las Figuras 3.13 y 3.14, la migración transendotelial de las células GES-1 y AGS, respectivamente, aumentó de manera significativa solo cuando fueron estimuladas con las EVHp⁺.

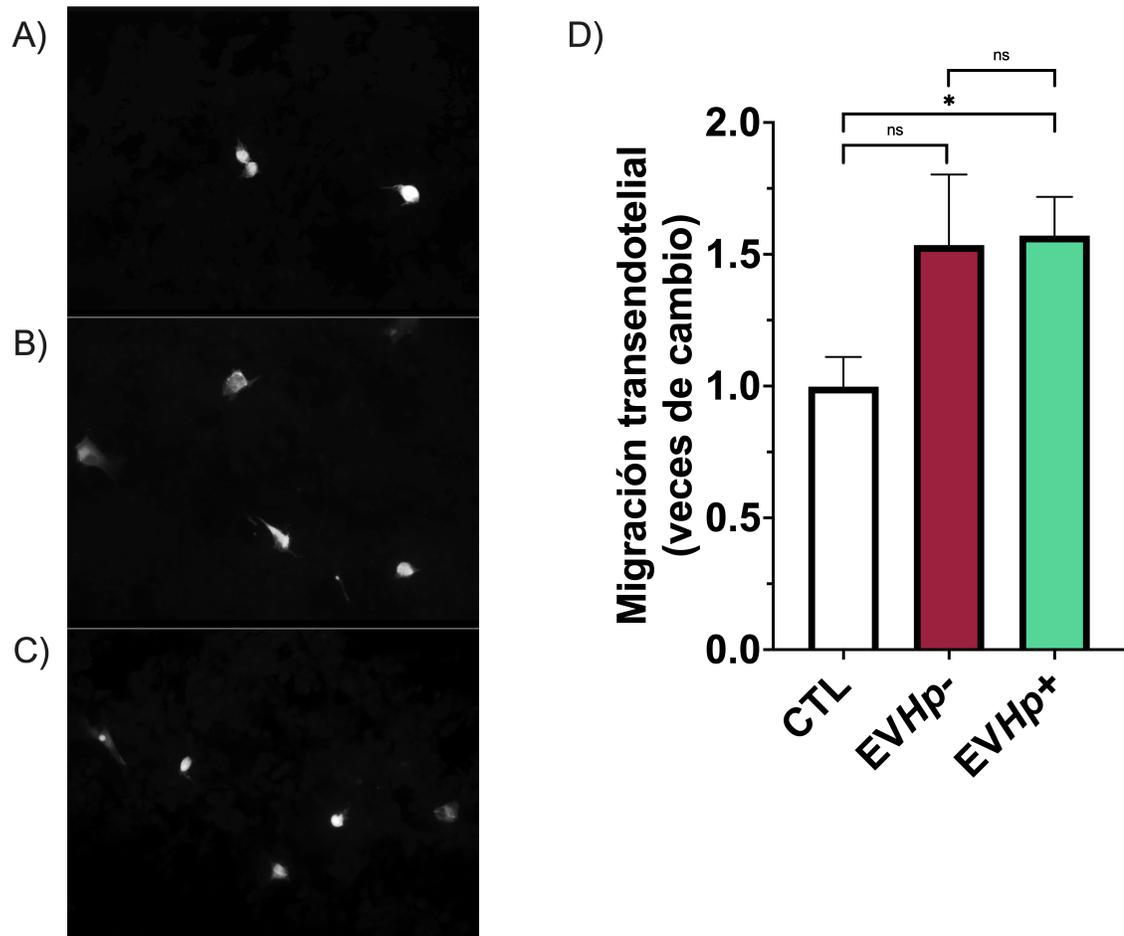


Figura 3.13. Efectos de EVs liberadas de células gástricas GES-1 infectadas o no con *H. pylori* sobre la migración transendotelial *in vitro* de células GES-1. Se determinó la migración transendotelial de: A) Células GES-1 sin estímulo (CTL); B) Células GES-1 estimuladas durante 24 h con EVHp- y C) Células GES-1 estimuladas durante 24 h con EVHp+. D) Cuantificación de tres experimentos independientes. El valor 1 corresponde a ~2 células por campo. Los resultados se analizaron estadísticamente con el T test (n=3). ns indica $p > 0.05$ y * indica $p < 0.05$.

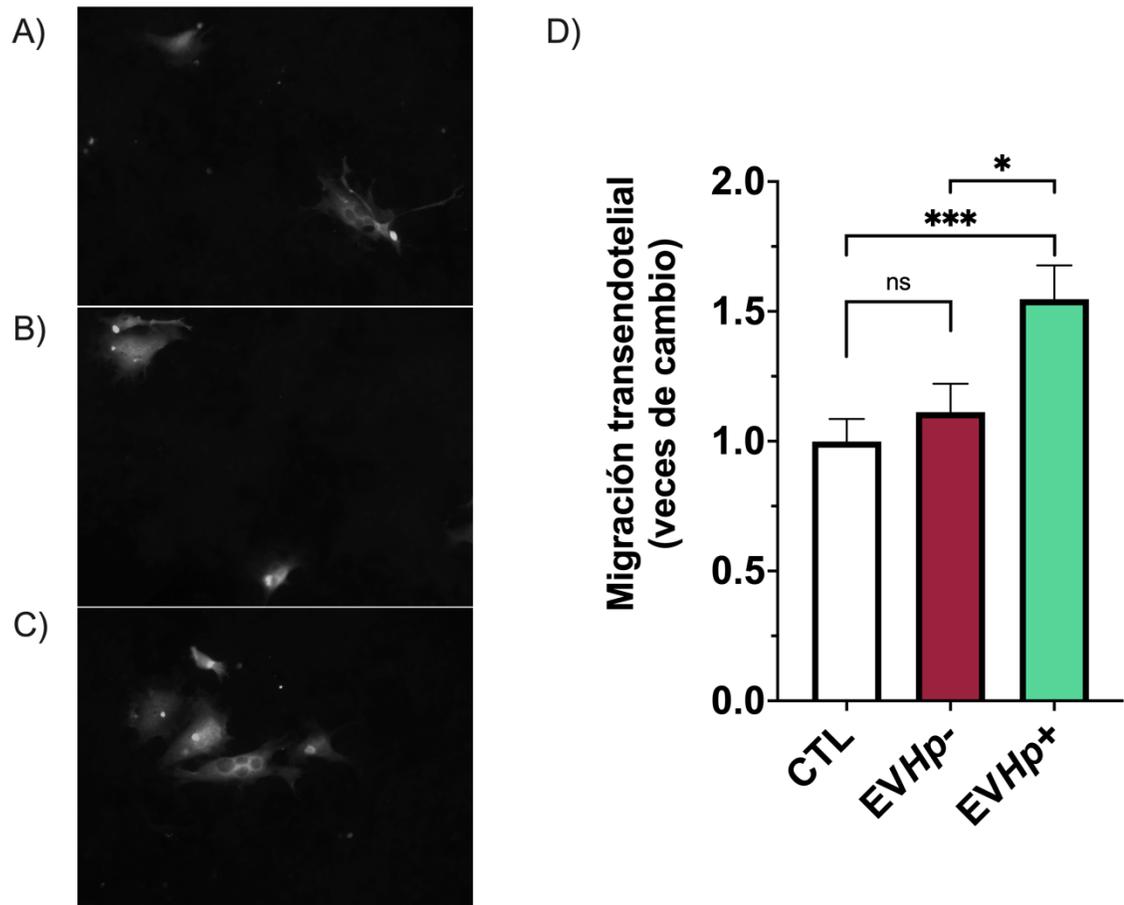


Figura 3.14. Efectos de EVs liberadas de células gástricas GES-1 infectadas o no con *H. pylori* sobre la migración transendotelial *in vitro* de células AGS. Se determinó la migración transendotelial de: A) Células AGS sin estímulo (CTL); B) Células AGS estimuladas durante 24 h con EVHp- y C) Células AGS estimuladas durante 24 h con EVHp+. D) Cuantificación de tres experimentos independientes. El valor 1 corresponde a ~4 células por campo. Los resultados se analizaron estadísticamente con el T test (n=3). ns indica $p > 0.05$, * indica $p < 0.05$ y *** indica $p < 0.001$.

3.3.6 *Determinación de la formación de redes vasculares de células de la línea endotelial EA.hy926 luego de estímulo con EVs aisladas de células GES-1 infectadas o no con H. pylori*

Se ha descrito anteriormente que la infección por *H. pylori* afecta las células endoteliales y el sistema vascular (Pousa y Gisbert, 2006). Por lo tanto, para determinar si las EVs liberadas de células GES-1 infectadas con *H. pylori* podrían modular procesos como la vasculogénesis, se evaluó la formación de redes vasculares por células EA.hy926 *in vitro*. El estímulo con EVHp- en ninguna de las concentraciones evaluadas ocasionó cambios significativos en el porcentaje de redes vinculadas, mientras que la exposición a EVHp+ aumentó más de 2 veces el número de redes vinculadas formadas por células EA.hy926 (Figura 3.15).

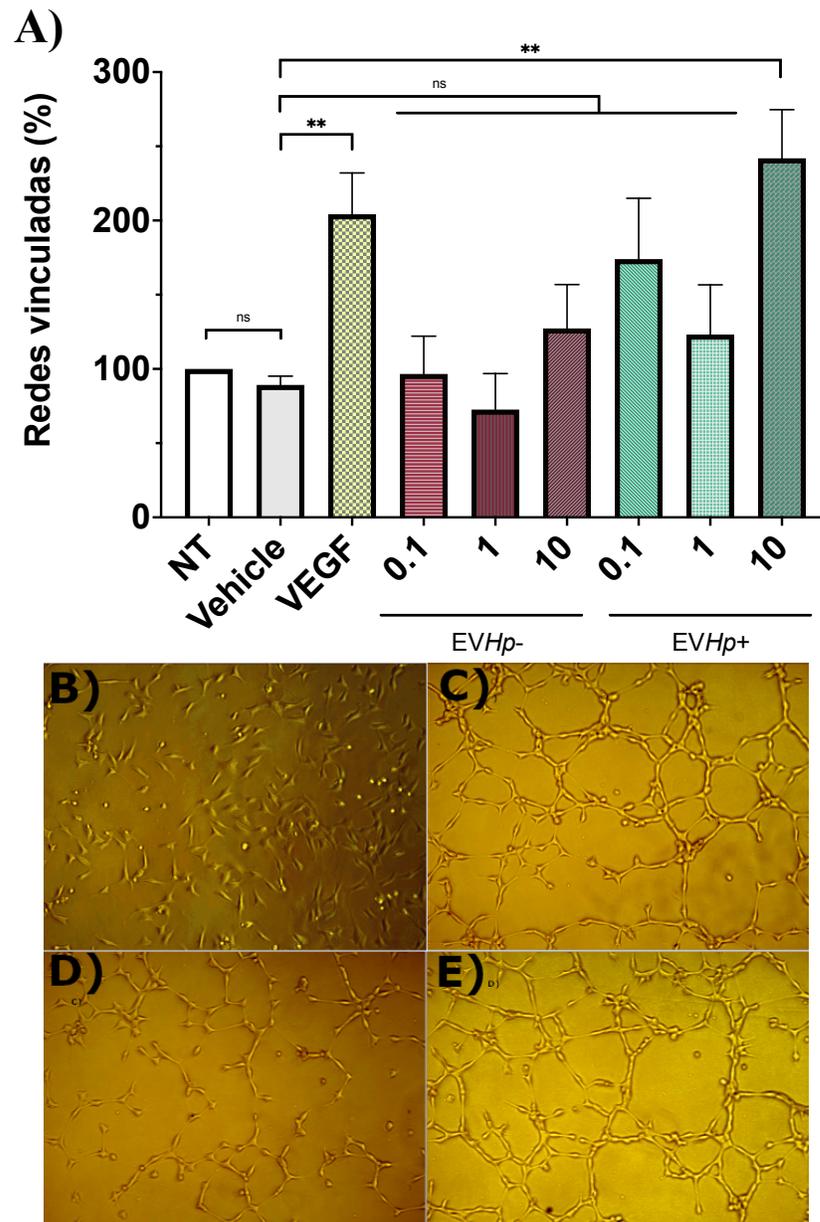


Figura 3.15. Efectos de EVs liberadas de células gástricas GES-1 infectadas o no con *H. pylori* sobre la formación de redes vasculares *in vitro* en células endoteliales EA.hy926. La formación de redes vinculadas por células EA.hy926 se determinó en las siguientes condiciones: NT, Vehículo, VEGF como control positivo, 0,1; 1; 10 μ g de EVHp- y 0,1; 1; 10 μ g de EVHp+. Imágenes representativas de los resultados obtenidos en las condiciones: B) NT; C) 50 ng/mL de VEGF; D) 10 μ g de EVHp- y E) 10 μ g de EVHp+. Los resultados se analizaron estadísticamente con el T test (n=4). ns indica $p > 0.05$ y ** indica $p < 0.01$.

Para que ocurra la formación de estas redes vinculadas, debe existir una migración dirigida, a diferencia de una migración al azar o aleatoria. Es por esto que evaluamos la migración celular *in vitro* de células EA.hy926 incubadas por 24 h con EVHp- o EVHp+. Los resultados obtenidos (Ver Anexos, Figura suplementaria 3) muestran que la incubación con ambos tipos de EVs aumentaron la migración celular de las células EA.hy926, y que no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos. Por lo tanto, otras características que promuevan a la formación de redes vinculadas en células endoteliales EA.hy926, diferentes de la migración celular, son particularmente promovidas por las EVHp+. Finalmente, se evaluó si las EVs liberadas de células gástricas GES-1 infectadas con *H. pylori* eran capaces de alterar la monocapa impermeable de células endoteliales EA.hy926. Esto se determinó midiendo la permeabilidad a azul dextrano (10 mM) de la monocapa de células endoteliales luego del estímulo con EVHp- o EVHp+ durante 24 h. El resultado de este ensayo demostró que ningún estímulo alteró la permeabilidad a azul dextrano de la monocapa, es decir, no hubo alteraciones de la monocapa de células endoteliales (Ver ANEXO, Figura suplementaria 4).

3.3.7 Análisis de proteómica por espectrometría de masas de EVHp⁻ y EVHp⁺

La infección de las células GES-1 por *H. pylori* provoca aumento de la liberación de EVs (Figura 3.5, A y B). Por otro lado, al incubar células epiteliales gástricas y endoteliales con concentraciones iguales de EVHp⁻ y EVHp⁺ para evaluar distintos ensayos biológicos, en general, el efecto es mayor cuando el estímulo se hace con EVHp⁺. Esto indica que los efectos diferenciales observados se deben a diferencias en el contenido de las EVs, que cambia cuando las células son infectadas con *H. pylori*. Debido a que las proteínas son moléculas importantes en el contenido de las EVs, se identificaron mediante análisis de espectrometría de masas las proteínas presentes en EVHp⁻ y EVHp⁺. Los resultados revelaron que 244 proteínas estaban presentes en ambas muestras, 21 proteínas estaban presentes únicamente en EVHp⁻ (Tabla suplementaria 2) y 27 proteínas estaban presentes exclusivamente en EVHp⁺ (Figura 3.16 y Tabla 3.2). Estas proteínas fueron buscadas en la base de datos GeneCards, encontrándose que, entre las proteínas presentes exclusivamente en las EVHp⁺, algunas están involucradas con los procesos celulares que hemos evaluado, como por

ejemplo la ADAM Metalopeptidasa con motivo de trombospondina tipo 13 (*ADAMTS13*); Molécula de adhesión de células leucocitarias activadas (*ALCAM*), una proteína involucrada en adhesión y migración celular; Follistatin Like 1 (*FSTLI*), una glicoproteína que participa en diversos procesos fisiológicos, como la angiogénesis, la regulación de la respuesta inmune, la proliferación y diferenciación celular; y vitronectina (*VTN*), una glicoproteína adhesiva, la cual puede promover adhesión o migración celular, al unirse a la matriz extracelular a través de una variedad de ligandos como integrinas, inhibidor 1 del activador del plasminógeno, entre otros (GeneCards).

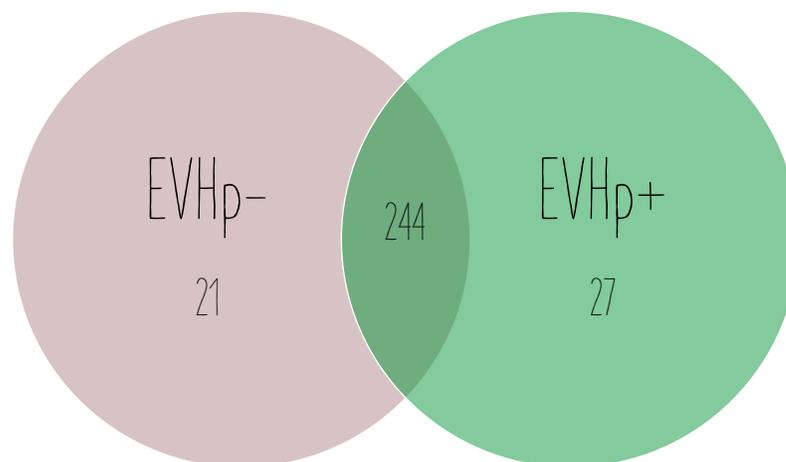


Figura 3.16. Análisis de proteómica por espectrometría de masas de EVHp- y EVHp+. 244 proteínas fueron encontradas en EVHp- y EVHp+, mientras que 21 proteínas fueron encontradas de forma exclusiva en EVHp- y 27 proteínas de forma exclusiva en EVHp+.

Tabla 3.2 Proteínas que se encuentran exclusivamente en *EVHp*⁺

| |
|--|
| 26S proteasome regulatory subunit 10B;PSMC6 |
| 26S proteasome regulatory subunit 7;PSMC2 |
| 26S proteasome regulatory subunit 8;PSMC5 |
| A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13;ADAMTS13 |
| CD166 antigen;ALCAM |
| Filamin-B;FLNB |
| Follistatin-related protein 1;FSTL1 |
| Hemoglobin subunit alpha;HBA2 |
| Hemoglobin subunit gamma-2;HBG2 |
| HLA class I histocompatibility antigen, B alpha chain;HLA-B |
| Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2;ITIH2 |
| Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4;ITIH4 |
| Keratin-associated protein 5-1;KRTAP5-1 |
| Myosin light polypeptide 6;MYL6 |
| Pantetheinase;VNN1 |
| Plasma protease C1 inhibitor;SERPING1 |
| Protein Z-dependent protease inhibitor;SERPINA10 |
| Receptor of activated protein C kinase 1;RACK1 |
| Serglycin;SRGN |
| Serine incorporator 1;SERINC1 |
| Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit;PPP1CB |
| Sex hormone-binding globulin;SHBG |
| T-complex protein 1 subunit zeta;CCT6A |
| Tetranectin;CLEC3B |
| Transketolase;TKT |
| Vimentin;VIM |
| Vitronectin;VTN |

4. Discusión

4.1 Efectos de la infección con H. pylori de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1.

H. pylori es una bacteria gramnegativa que coloniza el epitelio del estómago humano (Hooi, J. *et al.* 2017). La infección producida por *H. pylori* es una de las enfermedades infecciosas más comunes y afecta aproximadamente al 50% de la población mundial (Crowe, S., 2019). Numerosos estudios han identificado a *H. pylori* como el principal agente etiológico asociado con el desarrollo de gastritis crónica, enfermedad ulcerosa péptica, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas y cáncer gástrico (Nagy, P. *et al.* 2016). La infección por *H. pylori* del estómago humano y su función como carcinógeno bacteriano es un proceso complejo que implica la interacción entre las células huésped, el microorganismo y el entorno del huésped. Los efectos oncogénicos de *H. pylori* en las células epiteliales se atribuyen directamente a la acción tóxica de los factores de virulencia expresados por la bacteria como CagA, VacA, GGT, Ureasa, entre otros, o indirectamente a los procesos inflamatorios producidos por la infección. Entre los daños que la infección por *H. pylori* ocasiona en el epitelio gástrico, se encuentran la alteración de la polaridad de las células epiteliales y desregulación de los

complejos de unión apical (Amieva, M. y Peek, R., 2016; Wroblewski, L. *et al.* 2003), mediante la activación de distintas vías de señalización, que aumentan la producción de citoquinas proinflamatorias, atracción de neutrófilos y macrófagos que aumenta aún más la liberación de citoquinas proinflamatorias, ROS y factores de crecimiento (Gorrell, R. *et al.* 2013; Waskito, L. *et al.* 2018); formación de vacuolas ocasionada por acción del factor de virulencia VacA (Kao, C. *et al.* 2016; Chambers, M. *et al.* 2013), lo que genera cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática y altera la integridad de las células del epitelio gástrico (Kao, C. *et al.* 2016). Mas recientemente, se tiene evidencia de que la comunicación célula-célula es uno más de los procesos que también es alterado en la infección con *H. pylori*, particularmente la llevada a cabo a través de las EVs (González. M. F. *et al.*, 2021).

En específico, se ha evidenciado que la infección con *H. pylori* puede modificar los niveles de ciertas proteínas, por ejemplo, a través del silenciamiento de genes (Chan, A. *et al.* 2003). Usando como modelo las células gástricas no tumorigénicas GES-1, se evidenció que la infección con *H. pylori* causó la disminución de los niveles proteicos de E-cadherina y aumentó los niveles de Caveolina-1 (Figura 3.1). E-cadherina, siendo una

proteína de adhesión celular, funciona manteniendo las adhesiones entre célula-célula, conservando la integridad de los tejidos (Liu, X. y Chu, K., 2014). En el tejido gástrico, resulta ser una proteína muy importante para mantener la arquitectura del estómago y su pérdida se ha asociado a desarrollo de cáncer gástrico (Liu, X. y Chu, K., 2014). La disminución de E-cadherina en células GES-1 luego infección por *H. pylori* medido por *Western blot*, coincide con lo que se ha reportado en estudios clínicos, en donde se evidenció que en muestras de biopsia gástrica de pacientes infectados con la bacteria hay aumento de la metilación del gen que codifica la E-cadherina, con la concomitante disminución de los niveles de ARN mensajero y proteicos de E-cadherina. Adicionalmente, se ha encontrado que la infección con *H. pylori* genera metilación aberrante del gen que codifica la E-cadherina, aunado a expresión disminuida de la proteína E-cadherina en las líneas celulares de cáncer gástrico MKN7, MKN74, y TMK-1 (Chan, A. *et al.* 2003; Perri, F. *et al.* 2007; Huang, F. *et al.* 2012).

Por su parte, la proteína Caveolina-1 se ha descrito que tiene un rol dual en cáncer, como supresor de tumores o como promotor de tumores. El rol de Caveolina-1 depende del tipo de cáncer y el estadio de la enfermedad que se este estudiando (Nunez-Wehinger S. *et al.*, 2014). Hasta el momento el rol

de Caveolina-1 en CG es controvertido. En este trabajo se observó un aumento en los niveles de Caveolina-1 en células GES-1 luego de infección con *H. pylori*. La función de Caveolina-1 asociada a progresión del cáncer está relacionada a la fosforilación en la tirosina 14, la cual promueve un aumento de la migración celular (Urrea, H. *et al.* 2012). En este trabajo no se midió la fosforilación en tirosina 14 de Caveolina-1 en células GES-1 después de infección con *H. pylori*, con lo cual no podemos inferir si el aumento proteico observado en Caveolina-1 pudiese tener una función más relacionada con la promoción de tumores que con la de supresor de tumores. Sin embargo, debido a que la función oncogénica de caveolina-1 asociada a fosforilación de tirosina 14 se relaciona con la migración celular, y esta se observó reducida después de infección con *H. pylori*, es probable que no haya un aumento de esta fosforilación.

La infección con *H. pylori* por 24 h disminuyó la viabilidad celular de GES-1 significativamente hasta el 79% con respecto a células sin infectar (CTL) (Figura 3.2). Esto concuerda con lo encontrado por Wang, J. y cols. (2019), quienes reportaron inducción del proceso de apoptosis en las células GES-1 luego de 24 h de infección con *H. pylori*. Luego de este tratamiento con gentamicina, la viabilidad alcanzó 86% y a las 48 h se recuperó, aumentando

hasta 104% con respecto a la viabilidad de células sin infectar. Esto coincide con lo encontrado en la literatura, donde se reporta que la infección con *H. pylori* induce apoptosis en las células epiteliales de cáncer gástrico, que vuelve a la normalidad después de la erradicación de la infección (Xia, H., y Talley, N. 2001). Específicamente, numerosas moléculas producidas por *H. pylori*, incluidas la CagA, lipopolisacáridos, la monocloramina y el óxido nítrico, pueden inducir directamente la apoptosis (Piotrowski, J. *et al.* 1997; Peek, R. *et al.* 1999; Watanabe, S. *et al.* 2000). Además de que ciertas moléculas de la respuesta inflamatoria inducida por la infección con *H. pylori* también pueden inducir apoptosis, como TNF- α e INF- γ (Slomiany, B. *et al.* 1999; Fan X. *et al.* 1998). Por otro lado, la proliferación de células gástricas es significativamente mayor en pacientes con infección por *H. pylori* que en individuos sanos (Xia, H. y Talley, N. 2001). La apoptosis y la proliferación celular también aumentan en lesiones precancerosas como atrofia gástrica, metaplasia intestinal y displasia en presencia de infección por *H. pylori* (Xia, H. y Talley, N. 2001). La proliferación y la apoptosis son procesos opuestos pero complementarios para el funcionamiento celular normal y la alteración en el balance de estos dos procesos resulta en la perturbación de la homeostasis del tejido, lo cual está relacionado con varios tipos de cáncer

(Hetts, S., 1998). Con los resultados presentados en esta tesis, se demuestra que *H. pylori* ocasiona disminución de la viabilidad celular en la línea celular GES-1, lo cual pudiese estar mediado en su mayoría mediante el proceso de apoptosis, sin embargo, esto último no fue abordado en este trabajo. No obstante, trabajos anteriores en nuestro laboratorio han demostrado que la infección con *H. pylori* de células de cáncer gástrico induce apoptosis mediado en parte por la pérdida de una proteína llamada Survivina (Valenzuela, M. *et al.* 2010; Valenzuela, M. *et al.* 2013).

Adicionalmente, las células que lograron sobrevivir a la muerte celular inicial ocasionada por la infección muestran aumentada la viabilidad celular con respecto al control a las 48 h de tratamiento con gentamicina, con lo cual se puede inferir que el ~80% de células que sobrevivieron inicialmente a la infección con la bacteria aumentaron su proliferación. El aumento en la proliferación celular puede deberse a un mecanismo compensatorio al daño en el epitelio y a la apoptosis causada por la infección con *H. pylori* (Xia, H., y Talley, N. 2001). Estos hallazgos son relevantes, porque lo encontrado en la literatura, que en el epitelio gástrico de pacientes y en modelos *in vitro* de células de cáncer gástrico, la infección con *H. pylori* causa disminución de la viabilidad celular, que luego puede conllevar a mayor proliferación celular,

se corrobora en las células gástricas GES-1. La relevancia de usar las células GES-1, las cuales son un modelo de células gástricas no tumorigénicas, a diferencia de los demás modelos gástricos que son células de cáncer gástrico, es que se confirma que *H. pylori* puede tener un papel fundamental en el inicio de la carcinogénesis gástrica.

Usando también el modelo celular GES-1, se midieron los niveles de expresión relativos de citoquinas proinflamatorias luego de infección con *H. pylori*. Como se observa en la Figura 3.3.A-C las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-8 e IL-6 muestran el mismo patrón de expresión: aumentaron los niveles relativos de expresión con respecto al control a las 24 h luego de la infección con *H. pylori*, como era de esperar disminuyeron los niveles relativos de expresión a las 24 h después del tratamiento con gentamicina y sorprendentemente, luego de 48 h del tratamiento con gentamicina, los niveles de expresión relativa volvieron a aumentar nuevamente. Esto es relevante, ya que, los altos niveles continuos de citoquinas proinflamatorias, conocido como inflamación crónica, se ha identificado como una de las causas de carcinogénesis gástrica asociada con la infección por *H. pylori* (Valenzuela, M. *et al.* 2015). Nuestros hallazgos concuerdan con lo reportado por Wang, J. y cols. (2019), quienes demostraron un aumento en la secreción

de IL-8 en células GES-1 infectadas durante 24 h con *H. pylori*. Por otro lado, se ha descrito que la IL-8 puede regular la actividad del factor de transcripción NF- κ B (Waugh, D and Wilson, C. 2008). Adicionalmente, las citoquinas IL-6 y TNF- α son reguladas a nivel transcripcional por NF- κ B (Xiao, W., et al 2004; Wang, W., et al. 2007). Por lo que, el aumento de expresion de IL-8 a 24 h pudiese estar relacionado con el aumento de IL-6 y TNF- α observado a las 72 h.

En cuanto a la citoquina antiinflamatoria IL-10, el patrón de expresión es opuesto a lo descrito anteriormente, como era de esperarse, ya que funciona como un mecanismo regulador de la respuesta inflamatoria, inhibiendo la síntesis de otras citoquinas (Moore, W. *et al.* 1993). En la literatura encontramos que *H. pylori* es capaz de ocasionar una respuesta inflamatoria, en donde aumenta la liberación de citoquinas proinflamatorias (Robinson, K. *et al.* 2017) y esta inflamación persistente a su vez, es la que se relaciona con el inicio y progresión de la cascada preneoplásica, que conlleva a cáncer gástrico (Correa, P. y Piazuelo, M. 2012). De nuevo la mayoría de estos estudios encontrados en la literatura fueron realizados en muestras de biopsia gástrica de pacientes infectados con *H. pylori*, modelos animales en ratones o modelos *in vitro* usando células de cáncer gástrico (Blosse, A. *et al.* 2018;

Lee, K. *et al.* 2013; Rossi, A. *et al.* 2016). En este trabajo corroboramos que en la línea celular GES-1, la infección con *H. pylori* también produce un aumento de citoquinas proinflamatorias.

Finalmente, se determinó que las células GES-1 que fueron infectadas con *H. pylori* migraron mucho menos que las células que no fueron infectadas (Figura 3.4). En el laboratorio se ha hecho el mismo ensayo, usando la línea celular gástrica AGS (Datos no publicados de Jimena Canales y Paula Díaz), encontrándose que la migración celular de las células de cáncer gástrico AGS disminuye después de que las células son infectadas con *H. pylori*. En la literatura los hallazgos relacionados a migración celular luego de infección con *H. pylori* son controversiales. Hay trabajos en donde se reporta un aumento en la migración celular *in vitro*, en células de cáncer gástrico MKN28 luego de infección con *H. pylori* (Lee, Y. S. y colaboradores, 2014). Posselt, G. y colaboradores (2019) observaron el mismo efecto usando la línea celular AGS a un tiempo de infección de 24 h. Por el contrario, hay estudios que indican que la infección con *H. pylori* aumenta en tejidos de cáncer gástrico la expresión de MicroRNA-143-3p, el cual suprime el crecimiento tumoral, la migración y la invasión (Wang, F. *et al.* 2017). Contrario a lo hallado en nuestro trabajo, Wang, J., y cols. (2019) reportaron

un aumento en la migración celular de las células GES-1 después de ser infectadas con *H. pylori*, evaluado mediante un ensayo de cierre de herida. Sin embargo, hay algunas diferencias entre ambos experimentos: los tipos de ensayos para medir migración celular son distintos y la metodología de infección de las células GES-1 con *H. pylori* también. En específico, en el trabajo de Wang, J. y cols. las células durante el tiempo de infección están en medio sin suero fetal bovino, y la infección con *H. pylori* se realiza con MOI 100, asumiendo que una Abs_{600nm} de 0,6 equivale a 3×10^6 Unidades formadores de colonia/mL. En nuestro laboratorio, se ha determinado que una Abs_{560nm} de 0,4 equivale a 3×10^8 Unidades formadores de colonia/mL, por lo que, en nuestros experimentos comparados con los de Wang, J., y cols. se añade mayor cantidad de bacteria por célula, lo cual muy probablemente afecta el resultado de los experimentos y puede explicar las diferencias encontradas. Por otro lado, He, Y. y cols. (2020) encontraron que la exposición constante al lisado de *H. pylori* inhibe la migración y la invasión de las células GES-1, lo que concuerda con nuestros resultados. Los experimentos aquí reportados, muestran una disminución importante de la migración a las 24 h, tiempo en el cual hubo una disminución de la viabilidad celular al 79%. De nuestros resultados inferimos que el daño que ocurre a

nivel celular luego de infección con *H. pylori* por 24 h usando un MOI 100 parece interferir con la capacidad migratoria que tienen las células a nivel basal.

4.2 Purificación y caracterización de EVs liberadas de células epiteliales gástricas GES-1 infectadas o no con H. pylori

Hay evidencia que indica que la comunicación celular mediada por EVs puede verse afectada bajo la infección de diversos patógenos (Schorey, S. *et al.* 2015) y en enfermedades como el cáncer (Baran, J. *et al.* 2010). En este trabajo se evaluó el efecto de la infección por *H. pylori* sobre la liberación de EVs de las células gástricas GES-1. Las EVs liberadas de células GES-1 infectadas con *H. pylori* (EVHp+) y no infectadas (EVHp-), fueron purificadas mediante el kit Exospin y Ultracentrifugación. Usando ambas metodologías se evidenció que luego de la infección con la bacteria las células liberaban más EVs que en condiciones basales (Figura 3.5 y Figura Suplementaria 1). Sin embargo, al evaluar la presencia de marcadores de exosomas por *Western blot*, se evidenció que estos se apreciaban mejor cuando las EVs fueron purificadas mediante Ultracentrifugación, con lo cual, esta fue la técnica elegida purificar las EVs en el resto de la tesis. Al analizar

mas detalladamente las EVs purificadas mediante Ultracentrifugación, se evidencia que después de la infección con *H. pylori*, las células GES-1 liberaron 50% más de EVs al medio extracelular con un tamaño promedio ligeramente más pequeño (Figura 3.5.A y C). Las proteínas totales en las EVs liberadas de células infectadas con *H. pylori* (EVHp+) y no infectadas (EVHp-) fueron cuantificadas, resultando que las EVHp+ tienen mayor concentración de proteínas comparadas con las EVHp-. Sin embargo, cuando estos datos se normalizaron por el número de EVs liberadas (Figura 3.5.D), no hay diferencias entre ambas muestras, es decir, el aumento de proteínas totales en EVHp+ con respecto a EVHp- es un reflejo del aumento del total de EVs liberadas luego de infección con *H. pylori*. Interesantemente, esto coincide con reportes de que la inyección con LPS en ratones aumentó el número de exosomas en el suero de estos animales (Gao, K. *et al.* 2019). El LPS es un componente de la membrana externa de las bacterias gramnegativas, incluyendo *H. pylori*, y es un estimulante fuerte del sistema inmune. Experimentos *in vitro* también muestran que la liberación de exosomas aumenta cuando células son expuestas a LPS (Ti, D. *et al.* 2015). Por otro lado, en diversas enfermedades inflamatorias, como el síndrome de Sjögren, el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide, los niveles de

EVs circulantes en sangre de pacientes fueron significativamente más altos que en individuos sanos (Buzas, E. *et al.* 2014; Knijff-Dutmer, E. *et al.* 2002; Sellam, J. *et al.* 2009). Adicionalmente, se ha encontrado que los pacientes con GC tienen un número significativamente mayor de EVs totales que circulan en la sangre (Baran, J. *et al.*, 2010). La disminución en el tamaño promedio de las EVHp⁺ con respecto a las EVHp⁻, a pesar de que es discreto (disminución del ~10%), puede reflejar una mayor proporción de exosomas dentro del conjunto de EVs aisladas, pudiendo ser relevante, ya que los exosomas son el tipo de EVs que más se ha asociado a roles dentro del desarrollo y progresión del cáncer (Burgos-Ravanal, R. *et al.* 2021), entre otras enfermedades. Por su parte, se lograron observar los marcadores de exosomas Alix, CD81 y Tsg101, con lo cual, se confirma que en las EVs aisladas hay presencia de exosomas. La ausencia de Calregulina, una proteína de retículo endoplasmático, comprueba ausencia de contaminación con el retículo endoplasmático y es reflejo del grado de pureza de las preparaciones (Figura 3.5.E). De la literatura se conoce que el número y la composición de EVs liberadas varía en los distintos tipos de células, y a su vez, puede variar en el mismo tipo celular bajo distintas condiciones o estímulos (Wang, J. *et al.* 2018; Campos, A. *et al.* 2018). Esto último coincide con lo mostrado en

las células GES-1, que luego de infección con *H. pylori* liberan mayor cantidad de EVs, con un tamaño promedio más pequeño, con respecto a la misma línea celular en condiciones basales. Un incremento en la liberación de EVs por parte de las células infectadas con *H. pylori* aumenta la capacidad de las EVs de funcionar como vehículos para la diseminación de moléculas del patógeno o moléculas del huésped asociadas al proceso de infección, lo cual podría tener mayores efectos deletéreos en el contexto de infección con *H. pylori*.

4.3 Efectos de las EVs liberadas de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1 infectadas o no con H. pylori en células receptoras

Las EVs son un mecanismo importante de comunicación de célula a célula, que desempeña un papel importante en la inflamación, las enfermedades relacionadas con patógenos y el cáncer (Kanada, M. *et al.* 2016; Meehan, K. y Vella, L. 2016). En el contexto de infección por patógenos, las EVs pueden participar en la propagación de la infección, como en las provocadas por *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella*, *Chlamydia pneumoniae*, entre otras. Este efecto de las EVs se atribuye a su capacidad para contribuir a la distribución de moléculas que se originan a partir del patógeno que son

dañinas para el huésped o moléculas del huésped asociadas con la inflamación durante la infección (Buzas, E. *et al.* 2014; González, M. F. *et al.* 2021). Por otro lado, las EVs promueven varias características asociadas al cáncer, como la inflamación, la proliferación celular, la angiogénesis y la migración celular (Burgos-Ravanal, R. *et al.* 2021; Kanada, M. *et al.* 2016; Meehan K. y Vella, L. 2016).

Se evaluó la viabilidad celular de las células GES-1 luego de incubación por 24 h con *EVHp-* o *EVHp+*, observándose una disminución cuando las células fueron incubadas con *EVHp+* (Figura 3.6.A); sin embargo, cuando las células fueron estimuladas con *EVHp-* no hubo cambios en la viabilidad celular. Esto coincide con el resultado obtenido en la viabilidad celular de GES-1 luego de infección con *H. pylori*, en donde se observó que luego de 24 h de infección hubo una disminución de 20% en la viabilidad celular (Figura 3.2). Posiblemente, esta disminución de la viabilidad celular ocasionada por las *EVHp+* se deba a un aumento de la apoptosis, ya que se ha demostrado que la inflamación producida por la infección por *H. pylori* promueve la apoptosis del epitelio gástrico, debido al aumento de la liberación de radicales libres y daño del ADN de las células epiteliales (Hua-Xiang, X. y Talley, N. 2001; Moss, S. 2017; Alzahrani, S. *et al.* 2014). Estudios *in vivo* han demostrado

que la inoculación de *H. pylori* en ratones induce la activación de la caspasa 3, seguida de la fragmentación del ADN (Suzuki, H. 1999). Además, *in vitro*, la infección con *H. pylori* de las células gástricas induce la activación de las caspasas 3 y 8 (Hua-Xiang Xia y Talley, 2001). Por lo tanto, bajo infección con *H. pylori* las proteínas proapoptóticas que se ven aumentadas en su expresión o que se activan pudiesen incluirse en las EVHp⁺ y provocar apoptosis en células receptoras. La incubación con EVHp⁻ o EVHp⁺ no indujo cambios en la viabilidad celular de las células de cáncer gástrico AGS. Las células AGS al ser células de cáncer tienen distintos mecanismos de supervivencia y resistencia a señales de apoptosis, con lo cual, es esperable que no muestren susceptibilidad a las señales de apoptosis que pudieran contener las EVHp⁺, y que las células GES-1, al ser células no tumorigénicas, si son susceptibles.

Al evaluar los niveles de citoquinas proinflamatorias en células GES-1 después de la estimulación con EVHp⁻ o EVHp⁺, encontramos que la incubación con EVHp⁻ aumentó los niveles de expresión relativa de IL-1 β e IL-23 (Figura 3.7). Además, la estimulación con EVHp⁺ aumentó los niveles de expresión relativa de IL-6, IL-1 β e IL-23 (Figura 3.7). Aunque inesperado, el aumento de citoquinas proinflamatorias con la incubación con EVHp⁻ a la

concentración utilizada puede estar relacionado con el papel fisiológico de las EVs en la comunicación autocrina/paracrina entre las células epiteliales en condiciones normales. En particular, el mayor aumento observado de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y IL-23 con la incubación con EVHp+ probablemente se pueda atribuir a la carga de diferente composición en las EVs liberadas después de la infección por *H. pylori*. Sin embargo, el aumento en las citoquinas proinflamatorias parece ser más importante cuando las células se infectan directamente con *H. pylori* comparado con el efecto observado en las células GES-1 incubadas con las EVs provenientes de células infectadas con *H. pylori*, con lo cual las EVs en este proceso no parecen jugar un rol esencial.

La migración celular de las células gástricas GES-1 aumentó ligeramente con la incubación con EVHp- y en mayor medida con EVHp+. En la literatura se ha reportado que EVs liberadas de células de fibrosarcoma aumentan la migración celular *in vitro* de las células parentales, es decir, aumentan migración celular de una forma autocrina (Sung, B. *et al.* 2015). Esto coincide con lo reportado acá, donde se mostró que la incubación de células GES-1 con EVs aisladas de células GES-1 en condiciones basales (EVHp-) promovieron en un 15% la migración celular *in vitro*. Sin embargo, se

observó un mayor aumento, del ~55% comparado con la migración celular basal, con la incubación con *EVHp+*. Debido a que las incubaciones se realizaron con la misma concentración de EVs, los resultados indican que el contenido en las *EVHp+* es responsable del mayor aumento en migración celular observado. Además, encontramos que solo la incubación con *EVHp+* aumentó la migración celular en las células epiteliales gástricas AGS. Las células con una mayor capacidad de migración, como se muestra en las células GES-1 y AGS después de la incubación con *EVHp+*, pudiesen ser relevantes en el contexto de infección con *H. pylori*, y relacionarse con el desarrollo de cáncer gástrico y/o metástasis.

La invasión celular y la migración transendotelial, ambas evaluadas *in vitro*, tanto de las células gástricas no tumorigénicas GES-1, como de las células de cáncer gástrico AGS, aumentaron luego de la incubación por 24 h con las *EVHp+* (Figuras 3.11-14). Aunque pueda parecer inesperado que las células de la línea celular GES-1, a pesar de no ser células de cáncer, tengan la capacidad de migrar e invadir, está descrito que la migración celular ocurre y es un proceso importante en las células epiteliales gástricas, ya que ayuda a la regeneración del epitelio gástrico después de un daño (Jones, M. K. et al. 1999). En cuanto a la capacidad de invasión de estas células, se desconoce si

es un proceso propio de células epiteliales gástricas importante para su función. Sin embargo, está reportado que las células de la línea GES-1 son capaces de invadir en ensayos *in vitro* usando matrigel (Zhong, J. *et al.* 2013; Chen, L. *et al.* 2018; He, Y. *et al.* 2020).

Vale la pena mencionar que, si bien los estímulos para los ensayos funcionales se hicieron con la misma cantidad de EVHp⁻ o EVHp⁺, los resultados muestran que las células GES-1 liberan mayor cantidad de EVs luego de infección con *H. pylori*. Esto nos hace inferir que los efectos observados por el estímulo con las EVHp⁺ en células receptoras, se podrían ver aún más aumentados en un contexto de infección con *H. pylori*. La invasión y la migración transendotelial son capacidades que deben adquirir las células para alcanzar las distintas etapas que conllevan a la metástasis, y en la bibliografía podemos encontrar evidencia que indica que las EVs provenientes de células cancerígenas promueven los distintos *hallmarks* del cáncer, entre ellas la migración y la invasión (Burgos-Ravanal, R. *et al.* 2021). Encontrar que EVs liberadas de células infectadas con *H. pylori* promueven características como la invasión y la migración transendotelial, en el modelo de células gástricas no tumorigénicas GES-1 y las células de cáncer gástrico AGS, indica que estas EVs pueden cumplir un papel

importante, tanto en el inicio de la enfermedad, donde solo hay infección con *H. pylori*, como en estadios mas avanzados, donde ya se ha desarrollado el cáncer gástrico, y además hay infección con *H. pylori* en zonas adyacentes al tumor. En ambas situaciones, el aumento de invasión y migración transendotelial de células gástricas por incubación con EVHp+, se puede relacionar con mayor progresión de esta patología. En particular, para que la migración transendotelial de células GES-1 y AGS ocurra, estas células deben atravesar la monocapa impermeable de células endoteliales EA.hy926. Para descartar que las EVs tengan un efecto directo sobre la integridad de la monocapa endotelial, se incubó la monocapa de células endoteliales EA.hy926, por 24 h con EVHp- o EVHp+, encontrándose que en ninguno de los tratamientos hubo perdida de la capacidad de impermeabilidad de esta monocapa (Ver anexo, Figura suplementaria 3).

Por otro lado, se ha demostrado que la comunicación celular mediada a través de EVs provenientes de células de distintos tipos de cáncer aumenta la angiogénesis (Kanada, M. *et al.* 2016). Además, también se ha reportado que la infección por *H. pylori* afecta a las células endoteliales y al sistema vascular (Pousa y Gisbert, 2006). En los resultados acá reportados, demostramos que la incubación de células endoteliales EA.hy926 por 24 h

con EVHp+ aumentó la formación de redes vinculadas en más de un 100% con respecto a células endoteliales EA.hy926 sin tratamiento (Figura 3.15). La relación causal entre la infección por *H. pylori* y la angiogénesis aún no está del todo clara, aunque la inflamación parece ser relevante en este contexto. Moléculas como COX-1, VEGF parecen mediar estos efectos sobre celular endoteliales durante la infección con *H. pylori* (Chang, Y. *et al.* 2005; Liu, X. *et al.* 2016). Sin embargo, no encontramos estas moléculas en nuestros análisis de espectrometría de masas, con lo cual, otras son las moléculas que pueden estar implicadas en este proceso mediado por las EVs. Por otro lado, Xia, X. y cols. (2020), reportaron que la incubación de células endoteliales HUVEC con exosomas provenientes de células GES-1 infectadas con *H. pylori* indujo una disminución en la proliferación, migración y formación de tubos (redes vinculadas) en estas células. Si bien los resultados en cuanto a la migración celular y formación de redes vinculadas en las células endoteliales son opuestos a los encontrados en esta tesis, el protocolo para evaluar los efectos de las EVs de células infectadas con *H. pylori* en células endoteliales reportado por Xia. X y cols. tiene condiciones distintas: la línea celular usada es la HUVEC y en este trabajo es la EA.hy926, lo cual puede ocasionar diferencias; la infección la realizan

durante 2 h, por el contrario en este trabajo se realiza durante 24 h; las células no son tratadas con ningún antibiótico para eliminar la bacteria, como ocurre en este trabajo. Esto último es un paso crucial para eliminar la posible copurificación de EVs provenientes de células GES-1 con las OMVs provenientes de *H. pylori*. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el trabajo mencionado no se pueden descartar que estén mediados por la participación de las OMVs de *H. pylori*. De cualquier manera, la evidencia sugiere que las EVs en un contexto de infección con *H. pylori* son relevantes en procesos como la angiogénesis/vasculogénesis.

4.4 Caracterización del contenido proteico de las EVs liberadas de células GES-1 infectadas o no con H. pylori

Para revelar si las diferencias observadas en los resultados obtenidos luego de estímulos con EVHp⁻ y EVHp⁺, se debe a diferencias en el contenido proteico de las EVs, las mismas se analizaron mediante espectrometría de masas. Los resultados permitieron la identificación de proteínas que están presentes de forma exclusiva (Tabla 3.2) o enriquecidas en EVHp⁺ en comparación con EVHp⁻ (Tabla suplementaria 3), importantes para la biogénesis y liberación de exosomas (Anexina A2, Anexina A5, CD63,

CD81, HSPA1, HSP90, Rab-7a y Rap-1b) y la adhesión y migración celular (Syndecan-4 y Syndecan Binding Protein). La presencia y/o el enriquecimiento de estas proteínas en EVHp⁺ en comparación con EVHp⁻, indica un contenido proteico diferencial en las EVs ocasionado por la infección por *H. pylori*. Mas aún, estos cambios en el contenido proteico en las EVHp⁺ explica un mecanismo mediante el cual las EVs provenientes de células infectadas con *H. pylori* pueden propagar las características asociadas con la malignidad a células receptoras. Adicionalmente, ha sido descrito que la infección de células gástricas con *H. pylori* incrementa los niveles del factor 1-alfa inducible por hipoxia, también conocido como HIF1- α (Valenzuela-Valderrama, M. et al. 2019). Este factor de transcripción regula la expresión de distintas proteínas relacionadas con angiogénesis, metabolismo de la glucosa y proliferación celular/sobrevivencia (Ke, Q. y Costa, M. 2006; Semenza, G. L. 2003; Kim, J. G. et al. 2018). Entre las proteínas cuya expresión se encuentra regulada por HIF1- α , encontramos algunas presentes exclusivamente en las EVHp⁺ como la Vimentina, y otras en las proteínas enriquecidas en EVHp⁺ como la Alfa-enolasa (ENO1), Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), *Insulin-like growth factor II* (IGF2); *Keratin, type I cytoskeletal 14* (KRT14), *Keratin, type I*

cytoskeletal 19 (KRT19), Cadena A de la L-lactato deshidrogenasa (LDHA), Piruvato quinasa PKM (PKM) y proteína transformadora RhoA (RHOA). Algunas de estas proteínas, en específico la Vimentina, la LDHA y la RhoA, son proteínas muy importantes en el desarrollo y progresión de cáncer (Semenza, G. L. 2003). El probable aumento en la expresión de estas proteínas mediado por HIF1- α , en la condición de infección con *H. pylori*, pudiese favorecer la inclusión de estas proteínas en las EVHp+, pudiendo ser un posible mecanismo mediante el cual las EVHp+ promueven en células receptoras características asociadas al desarrollo del cáncer gástrico. Por lo tanto, usando un inhibidor de HIF1- α durante la infección con *H. pylori* pudiésemos aislar EVHp+ que no promuevan migración/invasión celular en células receptoras.

En conclusión, en este trabajo se hace evidente que la comunicación celular de células gástricas mediada por EVs cambia luego de infección con *H. pylori* (ver Figura 4.1). Estos cambios involucran un aumento en la liberación de EVs, una disminución discreta en su tamaño promedio y cambios en la composición proteica. Adicionalmente, EVs liberadas de células gástricas GES-1 infectadas con *H. pylori* aumentan migración celular, invasión celular y migración transendotelial de células gástricas GES-1 y células de cáncer

gástrico AGS. Aunado a un aumento de la formación de redes vinculadas de células endoteliales EA.hy926. Por lo tanto, EVs liberadas de células gástricas GES-1 infectadas con *H. pylori* podrían promover características malignas en células gástricas y vascularización, lo que podría favorecer el desarrollo y la progresión de cáncer gástrico

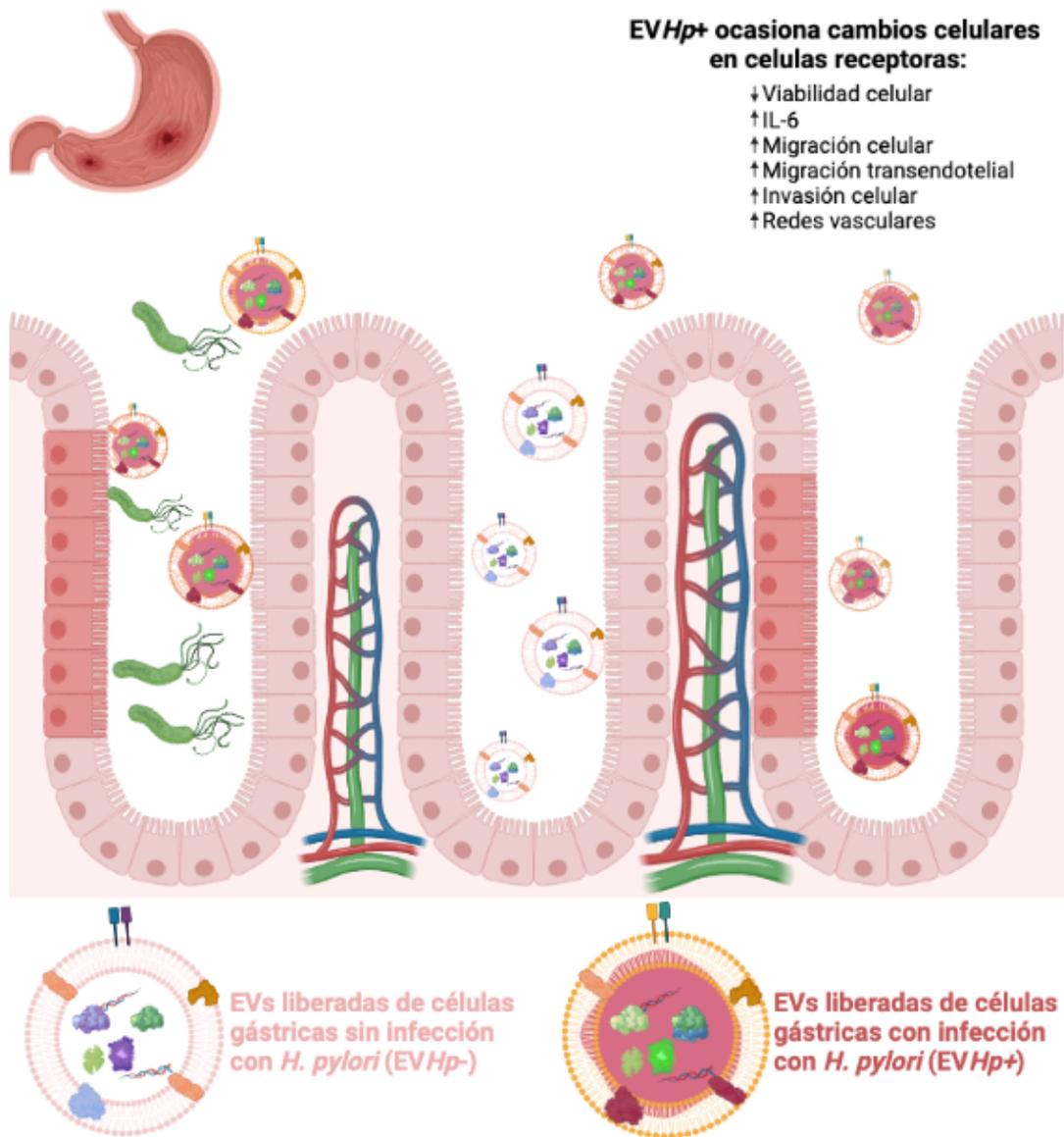


Figura 4.1. Modelo esquemático del daño celular ocasionado por las EVs liberadas de células GES-1 infectadas con *H. pylori*. EVs liberadas de células GES-1 infectadas con *H. pylori* tienen características distintas a las EVs liberadas de células GES-1 en condiciones basales, lo que ocasiona que induzcan efectos asociados a malignidad en células receptoras, como aumento de migración/invasión, además de inducir cambios en la vasculatura (vasculogénesis).

5. Resumen de resultados

1. La infección de células gástricas no tumorigénicas GES-1 con *H. pylori* disminuye los niveles proteicos de E-cadherina y aumenta los niveles proteicos de Caveolina-1; disminuye la viabilidad celular ; aumenta la expresión génica relativa de TNF- α , IL-8 e IL-6 y disminuye la migración celular *in vitro*.
2. La infección con células gástricas no tumorigénicas GES-1 con *H. pylori* ocasiona un aumento en la liberación de EVs, con un tamaño promedio ligeramente mas pequeño.
3. La incubación de células GES-1 con EVs liberadas de células GES-1 infectadas con *H. pylori*: disminuye la viabilidad celular; aumenta la expresión génica relativa de IL-6, IL1- β e IL-23; aumenta la migración celular, la invasión celular y la migración transendotelial.
4. La incubación de células de cáncer gástrico AGS con EVs liberadas de células GES-1 infectadas con *H. pylori*: aumenta la migración celular, la invasión celular y la migración transendotelial.
5. La incubación de células endoteliales EA.hy926 con EVs liberadas de células GES-1 infectadas con *H. pylori* aumenta la formación de redes vinculadas.

6. Referencias

Referencias de sitios web:

1. <https://www.genecards.org/>

2. <https://gco.iarc.fr/today/>

Alzahrani S, Lina TT, Gonzalez J, Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol*. 2014 Sep 28;20(36):12767-80. doi: 10.3748/wjg.v20.i36.12767. PMID: 25278677; PMCID: PMC4177462.

Amieva M, Peek RM Jr. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer. *Gastroenterology*. 2016 Jan;150(1):64-78. doi: 10.1053/j.gastro.2015.09.004. Epub 2015 Sep 16. PMID: 26385073; PMCID: PMC4691563.

Baran J, Baj-Krzyworzeka M, Weglarczyk K, Szatanek R, Zembala M, Barbasz J, Czupryna A, Szczepanik A, Zembala M. Circulating tumour-derived microvesicles in plasma of gastric cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 Jun;59(6):841-50. doi: 10.1007/s00262-009-0808-2. Epub 2009 Dec 31. PMID: 20043223.

Bender FC, Reymond MA, Bron C, Quest AF. Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity. *Cancer Res*. 2000 Oct 15;60(20):5870-8. PMID: 11059785.

Blosse A, Lehours P, Wilson KT, Gobert AP. *Helicobacter*: Inflammation, immunology, and vaccines. *Helicobacter*. 2018 Sep;23 Suppl 1(Suppl 1):e12517. doi: 10.1111/hel.12517. PMID: 30277626; PMCID: PMC6310010.

Burgermeister E, Xing X, Röcken C, Juhasz M, Chen J, Hiber M, Mair K, Shatz M, Liscovitch M, Schmid RM, Ebert MP. Differential expression and function of caveolin-1 in human gastric cancer progression. *Cancer Res*. 2007 Sep 15;67(18):8519-26. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1125. PMID: 17875691.

Burgos-Ravanel R, Campos A, Díaz-Vesga MC, González MF, León D, Lobos-González L, Leyton L, Kogan MJ, Quest AFG. Extracellular Vesicles as Mediators of Cancer Disease and as Nanosystems in Theranostic Applications. *Cancers (Basel)*. 2021 Jul 2;13(13):3324. doi: 10.3390/cancers13133324. PMID: 34283059; PMCID: PMC8268753.

Buzas EI, György B, Nagy G, Falus A, Gay S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2014 Jun;10(6):356-64. doi: 10.1038/nrrheum.2014.19. Epub 2014 Feb 18. PMID: 24535546.

Campos A, Salomon C, Bustos R, Díaz J, Martínez S, Silva V, Reyes C, Díaz-Valdivia N, Varas-Godoy M, Lobos-González L, Quest AF. Caveolin-1-containing extracellular vesicles transport adhesion proteins and promote malignancy in breast cancer cell lines. *Nanomedicine (Lond)*. 2018 Oct;13(20):2597-2609. doi: 10.2217/nmm-2018-0094. Epub 2018 Oct 19. PMID: 30338706.

- Chambers MG, Pyburn TM, González-Rivera C, Collier SE, Eli I, Yip CK, Takizawa Y, Lacy DB, Cover TL, Ohi MD. Structural analysis of the oligomeric states of *Helicobacter pylori* VacA toxin. *J Mol Biol.* 2013 Feb 8;425(3):524-35. doi: 10.1016/j.jmb.2012.11.020. Epub 2012 Nov 20. PMID: 23178866; PMCID: PMC3612943.
- Chan AO, Lam SK, Wong BC, Wong WM, Yuen MF, Yeung YH, Hui WM, Rashid A, Kwong YL. Promoter methylation of E-cadherin gene in gastric mucosa associated with *Helicobacter pylori* infection and in gastric cancer. *Gut.* 2003 Apr;52(4):502-6. doi: 10.1136/gut.52.4.502. PMID: 12631658; PMCID: PMC1773595.
- Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Chen CC. *Helicobacter pylori*-Induced invasion and angiogenesis of gastric cells is mediated by cyclooxygenase-2 induction through TLR2/TLR9 and promoter regulation. *J Immunol.* 2005 Dec 15;175(12):8242-52. doi: 10.4049/jimmunol.175.12.8242. PMID: 16339564.
- Che Y, Geng B, Xu Y, Miao X, Chen L, Mu X, Pan J, Zhang C, Zhao T, Wang C, Li X, Wen H, Liu Z, You Q. *Helicobacter pylori*-induced exosomal MET educates tumour-associated macrophages to promote gastric cancer progression. *J Cell Mol Med.* 2018 Nov;22(11):5708-5719. doi: 10.1111/jcmm.13847. Epub 2018 Aug 30. PMID: 30160350; PMCID: PMC6201349.
- Chen HN, Wang Z, Li X, Zhou ZG. *Helicobacter pylori* eradication cannot reduce the risk of gastric cancer in patients with intestinal metaplasia and dysplasia: evidence from a meta-analysis. *Gastric Cancer.* 2016 Jan;19(1):166-75. doi: 10.1007/s10120-015-0462-7. Epub 2015 Jan 22. PMID: 25609452.
- Chen L, Gao Y, Zhu L, Song H, Zhao L, Liu A, Zhang G, Shi G. Establishment and characterization of a GES-1 human gastric epithelial cell line stably expressing miR-23a. *Oncol Lett.* 2018 Jul;16(1):977-983. doi: 10.3892/ol.2018.8765. Epub 2018 May 22. PMID: 29963172; PMCID: PMC6019959.
- Chen Y, Wang X, Yu Y, Xiao Y, Huang J, Yao Z, Chen X, Zhou T, Li P, Xu C. Serum exosomes of chronic gastritis patients infected with *Helicobacter pylori* mediate IL-1 α expression via IL-6 trans-signalling in gastric epithelial cells. *Clin Exp Immunol.* 2018 Dec;194(3):339-349. doi: 10.1111/cei.13200. Epub 2018 Oct 1. PMID: 30105789; PMCID: PMC6231010.
- Coleman BM, Hill AF. Extracellular vesicles--Their role in the packaging and spread of misfolded proteins associated with neurodegenerative diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2015 Apr;40:89-96. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.02.007. Epub 2015 Feb 20. PMID: 25704308.
- Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 2007 Aug;133(2):659-72. doi: 10.1053/j.gastro.2007.06.026. PMID: 17681184.
- Correa P, Piazzuelo MB. The gastric precancerous cascade. *J Dig Dis.* 2012 Jan;13(1):2-9. doi: 10.1111/j.1751-2980.2011.00550.x. PMID: 22188910; PMCID: PMC3404600.
- Crowe SE. *Helicobacter pylori* Infection. *N Engl J Med.* 2019 Mar 21;380(12):1158-1165. doi: 10.1056/NEJMcp1710945. PMID: 30893536.
- Díaz P, Valenzuela Valderrama M, Bravo J, Quest AFG. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Adaptive Cellular Mechanisms Involved in Disease Progression. *Front*

- Microbiol. 2018 Jan 22;9:5. doi: 10.3389/fmicb.2018.00005. PMID: 29403459; PMCID: PMC5786524.
- El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*. 2000 Mar 23;404(6776):398-402. doi: 10.1038/35006081. Erratum in: *Nature* 2001 Jul 5;412(6842):99. PMID: 10746728.
- Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2014 Sep;19 Suppl 1:1-5. doi: 10.1111/hel.12165. PMID: 25167938.
- Fan X, Crowe SE, Behar S, Gunasena H, Ye G, Haeberle H, Van Houten N, Gourley WK, Ernst PB, Reyes VE. The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of *Helicobacter pylori* and induction of apoptosis in gastric epithelial cells: a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage. *J Exp Med*. 1998 May 18;187(10):1659-69. doi: 10.1084/jem.187.10.1659. PMID: 9584144; PMCID: PMC2212295.
- Fernandes JV, Cobucci RN, Jatobá CA, Fernandes TA, de Azevedo JW, de Araújo JM. The role of the mediators of inflammation in cancer development. *Pathol Oncol Res*. 2015 Jul;21(3):527-34. doi: 10.1007/s12253-015-9913-z. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25740073.
- Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R, Capelinha AF, Quint W, Caldas C, van Doorn LJ, Carneiro F, Sobrinho-Simões M. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Nov 20;94(22):1680-7. doi: 10.1093/jnci/94.22.1680. PMID: 12441323.
- Gao K, Jin J, Huang C, Li J, Luo H, Li L, Huang Y, Jiang Y. Exosomes Derived From Septic Mouse Serum Modulate Immune Responses via Exosome-Associated Cytokines. *Front Immunol*. 2019 Jul 12;10:1560. doi: 10.3389/fimmu.2019.01560. PMID: 31354717; PMCID: PMC6640201.
- Glenney JR Jr, Soppet D. Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Nov 1;89(21):10517-21. doi: 10.1073/pnas.89.21.10517. PMID: 1279683; PMCID: PMC50370.
- González MF, Díaz P, Sandoval-Bórquez A, Herrera D, Quest AFG. *Helicobacter pylori* Outer Membrane Vesicles and Extracellular Vesicles from *Helicobacter pylori*-Infected Cells in Gastric Disease Development. *Int J Mol Sci*. 2021 May 1;22(9):4823. doi: 10.3390/ijms22094823. PMID: 34062919; PMCID: PMC8124820.
- Gorrell RJ, Guan J, Xin Y, Tafreshi MA, Hutton ML, McGuckin MA, Ferrero RL, Kwok T. A novel NOD1- and CagA-independent pathway of interleukin-8 induction mediated by the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Cell Microbiol*. 2013 Apr;15(4):554-70. doi: 10.1111/cmi.12055. Epub 2012 Nov 21. PMID: 23107019.
- Graham DY. History of *Helicobacter pylori*, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 May 14;20(18):5191-204. doi: 10.3748/wjg.v20.i18.5191. PMID: 24833849; PMCID: PMC4017034.

- Hanada K, Graham DY. Helicobacter pylori and the molecular pathogenesis of intestinal-type gastric carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2014 Aug;14(8):947-54. doi: 10.1586/14737140.2014.911092. Epub 2014 May 7. PMID: 24802804.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.
- He Y, Wang C, Zhang X, Lu X, Xing J, Lv J, Guo M, Huo X, Liu X, Lu J, Du X, Li C, Chen Z. Sustained Exposure to Helicobacter pylori Lysate Inhibits Apoptosis and Autophagy of Gastric Epithelial Cells. *Front Oncol.* 2020 Oct 29;10:581364. doi: 10.3389/fonc.2020.581364. PMID: 33194715; PMCID: PMC7658535.
- Hetts SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA.* 1998 Jan 28;279(4):300-7. doi: 10.1001/jama.279.4.300. PMID: 9450715.
- Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, Malfertheiner P, Graham DY, Wong VWS, Wu JCY, Chan FKL, Sung JJY, Kaplan GG, Ng SC. Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology.* 2017 Aug;153(2):420-429. doi: 10.1053/j.gastro.2017.04.022. Epub 2017 Apr 27. PMID: 28456631.
- Huang FY, Chan AO, Rashid A, Wong DK, Cho CH, Yuen MF. Helicobacter pylori induces promoter methylation of E-cadherin via interleukin-1 β activation of nitric oxide production in gastric cancer cells. *Cancer.* 2012 Oct 15;118(20):4969-80. doi: 10.1002/cncr.27519. Epub 2012 Mar 13. PMID: 22415887.
- Jones MK, Tomikawa M, Mohajer B, Tarnawski AS. Gastrointestinal mucosal regeneration: role of growth factors. *Front Biosci.* 1999 Mar 15;4:D303-9. doi: 10.2741/a428. PMID: 10077540.
- Kalach N, Bontems P, Raymond J. Helicobacter pylori infection in children. *Helicobacter.* 2017 Sep;22 Suppl 1. doi: 10.1111/hel.12414. PMID: 28891139.
- Kanada M, Bachmann MH, Contag CH. Signaling by Extracellular Vesicles Advances Cancer Hallmarks. *Trends Cancer.* 2016 Feb;2(2):84-94. doi: 10.1016/j.trecan.2015.12.005. Epub 2016 Jan 22. PMID: 28741553.
- Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. Helicobacter pylori infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed J.* 2016 Feb;39(1):14-23. doi: 10.1016/j.bj.2015.06.002. Epub 2016 Apr 1. PMID: 27105595; PMCID: PMC6138426.
- Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol.* 2006 Nov;70(5):1469-80. doi: 10.1124/mol.106.027029. Epub 2006 Aug 3. PMID: 16887934.
- Ke Y, Ning T, Wang B. [Establishment and characterization of a SV40 transformed human fetal gastric epithelial cell line-GES-1]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 1994 Jan;16(1):7-10. Chinese. PMID: 8033753.
- Knijff-Dutmer EA, Koerts J, Nieuwland R, Kalsbeek-Batenburg EM, van de Laar MA. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002 Jun;46(6):1498-503. doi: 10.1002/art.10312. PMID: 12115179.
- Lee KE, Khoi PN, Xia Y, Park JS, Joo YE, Kim KK, Choi SY, Jung YD. Helicobacter pylori and interleukin-8 in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2013 Dec

- 7;19(45):8192-202. doi: 10.3748/wjg.v19.i45.8192. PMID: 24363509; PMCID: PMC3857441.
- Lee YS, Lee DY, Yu DY, Kim S, Lee YC. Helicobacter pylori induces cell migration and invasion through casein kinase 2 in gastric epithelial cells. *Helicobacter*. 2014 Dec;19(6):465-75. doi: 10.1111/hel.12144. Epub 2014 Jul 23. PMID: 25052887.
- Li N, Liu SF, Dong K, Zhang GC, Huang J, Wang ZH, Wang TJ. Exosome-Transmitted miR-25 Induced by *H. pylori* Promotes Vascular Endothelial Cell Injury by Targeting KLF2. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Oct 29;9:366. doi: 10.3389/fcimb.2019.00366. PMID: 31750260; PMCID: PMC6842922.
- Li S, Seitz R, Lisanti MP. Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J Biol Chem*. 1996 Feb 16;271(7):3863-8. PMID: 8632005.
- Liu N, Zhou N, Chai N, Liu X, Jiang H, Wu Q, Li Q. Helicobacter pylori promotes angiogenesis depending on Wnt/beta-catenin-mediated vascular endothelial growth factor via the cyclooxygenase-2 pathway in gastric cancer. *BMC Cancer*. 2016 May 19;16:321. doi: 10.1186/s12885-016-2351-9. PMID: 27198692; PMCID: PMC4873996.
- Liu X, Chu KM. E-cadherin and gastric cancer: cause, consequence, and applications. *Biomed Res Int*. 2014;2014:637308. doi: 10.1155/2014/637308. Epub 2014 Aug 12. PMID: 25184143; PMCID: PMC4145387.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.
- Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol*. 2017 Mar;27(3):172-188. doi: 10.1016/j.tcb.2016.11.003. Epub 2016 Dec 13. PMID: 27979573; PMCID: PMC5318253.
- Meckes DG Jr, Shair KH, Marquitz AR, Kung CP, Edwards RH, Raab-Traub N. Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Nov 23;107(47):20370-5. doi: 10.1073/pnas.1014194107. Epub 2010 Nov 8. PMID: 21059916; PMCID: PMC2996715.
- Meehan K, Vella LJ. The contribution of tumour-derived exosomes to the hallmarks of cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2016;53(2):121-31. doi: 10.3109/10408363.2015.1092496. Epub 2015 Oct 19. PMID: 26479834.
- MINSAL. Puesta al día de la situación epidemiológica del cáncer en Chile. Informe para el Departamento de Manejo Integral de Cáncer y otros. Tumores/DEPRECE/MINSAL Junio 2018.
- Moese S, Selbach M, Kwok T, Brinkmann V, König W, Meyer TF, Backert S. Helicobacter pylori induces AGS cell motility and elongation via independent signaling pathways. *Infect Immun*. 2004 Jun;72(6):3646-9. doi: 10.1128/IAI.72.6.3646-3649.2004. PMID: 15155677; PMCID: PMC415712.
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:165-90. doi: 10.1146/annurev.iy.11.040193.001121. PMID: 8386517.

- Moss SF. The Clinical Evidence Linking *Helicobacter pylori* to Gastric Cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2016 Dec 27;3(2):183-191. doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.12.001. PMID: 28275685; PMCID: PMC5331857.
- Nagy P, Johansson S, Molloy-Bland M. Systematic review of time trends in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in China and the USA. *Gut Pathog*. 2016 Mar 15;8:8. doi: 10.1186/s13099-016-0091-7. PMID: 26981156; PMCID: PMC4791971.
- Núñez-Wehinger S, Ortiz RJ, Díaz N, Díaz J, Lobos-González L, Quest AF. Caveolin-1 in cell migration and metastasis. *Curr Mol Med*. 2014 Feb;14(2):255-74. doi: 10.2174/1566524014666140128112827. PMID: 24467203.
- Owen GI, Pinto MP, Retamal IN, Fernández MF, Cisternas B, Mondaca S, Sanchez C, Galindo H, Nervi B, Ibañez C, Acevedo F, Madrid J, Peña J, Bravo ML, Maturana MJ, Cordova-Delgado M, Romero D, de la Jara N, Torres J, Rodriguez-Fernandez M, Espinoza M, Balmaceda C, Freire M, Gárate-Calderón V, Crovari F, Jimenez-Fonseca P, Carmona-Bayonas A, Zwenger A, Armisen R, Corvalan AH, Garrido M. Chilean Gastric Cancer Task Force: A study protocol to obtain a clinical and molecular classification of a cohort of gastric cancer patients. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Apr;97(16):e0419. doi: 10.1097/MD.00000000000010419. PMID: 29668600; PMCID: PMC5916646.
- Pandey A, Tripathi SC, Mahata S, Vishnoi K, Shukla S, Misra SP, Misra V, Hedau S, Mehrotra R, Dwivedi M, Bharti AC. Carcinogenic *Helicobacter pylori* in gastric pre-cancer and cancer lesions: association with tobacco-chewing. *World J Gastroenterol*. 2014 Jun 14;20(22):6860-8. doi: 10.3748/wjg.v20.i22.6860. PMID: 24944476; PMCID: PMC4051925.
- Peek RM Jr, Blaser MJ, Mays DJ, Forsyth MH, Cover TL, Song SY, Krishna U, Pietenpol JA. *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res*. 1999 Dec 15;59(24):6124-31. PMID: 10626802.
- Peleteiro B, Bastos A, Ferro A, Lunet N. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage. *Dig Dis Sci*. 2014 Aug;59(8):1698-709. doi: 10.1007/s10620-014-3063-0. Epub 2014 Feb 22. Erratum in: *Dig Dis Sci*. 2015 Sep;60(9):2849. PMID: 24563236.
- Perri F, Cotugno R, Piepoli A, Merla A, Quitadamo M, Gentile A, Pilotto A, Annese V, Andriulli A. Aberrant DNA methylation in non-neoplastic gastric mucosa of *H. Pylori* infected patients and effect of eradication. *Am J Gastroenterol*. 2007 Jul;102(7):1361-71. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01284.x. Epub 2007 May 17. PMID: 17509026.
- Piotrowski J, Piotrowski E, Skrodzka D, Slomiany A, Slomiany BL. Induction of acute gastritis and epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Scand J Gastroenterol*. 1997 Mar;32(3):203-11. doi: 10.3109/00365529709000195. PMID: 9085455.
- Polakovicova I, Jerez S, Wichmann IA, Sandoval-Bórquez A, Carrasco-Véliz N, Corvalán AH. Role of microRNAs and Exosomes in *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr Virus Associated Gastric Cancers. *Front Microbiol*. 2018 Apr 5;9:636. doi: 10.3389/fmicb.2018.00636. PMID: 29675003; PMCID: PMC5895734.
- Posselt G, Wiesauer M, Chichirau BE, Engler D, Krisch LM, Gadermaier G, Briza P, Schneider S, Boccellato F, Meyer TF, Hauser-Kronberger C, Neureiter D, Müller A,

- Wessler S. Helicobacter pylori-controlled c-Abl localization promotes cell migration and limits apoptosis. *Cell Commun Signal*. 2019 Jan 31;17(1):10. doi: 10.1186/s12964-019-0323-9. PMID: 30704478; PMCID: PMC6357398.
- Pousa ID, Gisbert JP. Gastric angiogenesis and Helicobacter pylori infection. *Rev Esp Enferm Dig*. 2006 Jul;98(7):527-41. English, Spanish. doi: 10.4321/s1130-01082006000700006. PMID: 17022702.
- Quest AF, Gutierrez-Pajares JL, Torres VA. Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer. *J Cell Mol Med*. 2008 Aug;12(4):1130-50. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00331.x. Epub 2008 Apr 8. PMID: 18400052; PMCID: PMC3865655.
- Quest AF, Leyton L, Párraga M. Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. *Biochem Cell Biol*. 2004 Feb;82(1):129-44. doi: 10.1139/o03-071. PMID: 15052333.
- Quest AF, Lobos-González L, Nuñez S, Sanhueza C, Fernández JG, Aguirre A, Rodríguez D, Leyton L, Torres V. The caveolin-1 connection to cell death and survival. *Curr Mol Med*. 2013 Feb;13(2):266-81. doi: 10.2174/156652413804810745. PMID: 23228128.
- Robinson K, Kaneko K, Andersen LP. Helicobacter: Inflammation, immunology and vaccines. *Helicobacter*. 2017 Sep;22 Suppl 1. doi: 10.1111/hel.12406. PMID: 28891128.
- Rossi AF, Cadamuro AC, Biselli-Périco JM, Leite KR, Severino FE, Reis PP, Cordeiro JA, Silva AE. Interaction between inflammatory mediators and miRNAs in Helicobacter pylori infection. *Cell Microbiol*. 2016 Oct;18(10):1444-58. doi: 10.1111/cmi.12587. Epub 2016 Apr 14. PMID: 26945693; PMCID: PMC5074252.
- Salomon C, Ryan J, Sobrevia L, Kobayashi M, Ashman K, Mitchell M, Rice GE. Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis. *PLoS One*. 2013 Jul 8;8(7):e68451. doi: 10.1371/journal.pone.0068451. PMID: 23861904; PMCID: PMC3704530.
- Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep*. 2015 Jan;16(1):24-43. doi: 10.15252/embr.201439363. Epub 2014 Dec 8. PMID: 25488940; PMCID: PMC4304727.
- Sellam J, Proulle V, Jünger A, Ittah M, Miceli Richard C, Gottenberg JE, Toti F, Benessiano J, Gay S, Freyssinet JM, Mariette X. Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):R156. doi: 10.1186/ar2833. Epub 2009 Oct 15. PMID: 19832990; PMCID: PMC2787287.
- Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003 Oct;3(10):721-32. doi: 10.1038/nrc1187. PMID: 13130303.
- Shao B, de Boer I, Tang C, Mayer PS, Zelnick L, Afkarian M, Heinecke JW, Himmelfarb J. A Cluster of Proteins Implicated in Kidney Disease Is Increased in High-Density Lipoprotein Isolated from Hemodialysis Subjects. *J Proteome Res*. 2015 Jul 2;14(7):2792-806. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00060. Epub 2015 Jun 15. PMID: 26011469; PMCID: PMC4636116.

- Shimoda A, Ueda K, Nishiumi S, Murata-Kamiya N, Mukai SA, Sawada S, Azuma T, Hatakeyama M, Akiyoshi K. Exosomes as nanocarriers for systemic delivery of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA. *Sci Rep*. 2016 Jan 7;6:18346. doi: 10.1038/srep18346. PMID: 26739388; PMCID: PMC4703974.
- Slomiany BL, Piotrowski J, Slomiany A. Involvement of endothelin-1 in up-regulation of gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Apr 29;258(1):17-20. doi: 10.1006/bbrc.1999.0578. PMID: 10222227.
- Sugimoto M, Furuta T, Shirai N, Nakamura A, Xiao F, Kajimura M, Sugimura H, Hishida A. Different effects of polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta on development of peptic ulcer and gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007 Jan;22(1):51-9. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04442.x. PMID: 17201881.
- Sung BH, Ketova T, Hoshino D, Zijlstra A, Weaver AM. Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion. *Nat Commun*. 2015 May 13;6:7164. doi: 10.1038/ncomms8164. PMID: 25968605; PMCID: PMC4435734.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.
- Suzuki H, Miyazawa M, Nagahashi S, Mori M, Seto K, Kai A, Suzuki M, Miura S, Ishii H. Attenuated apoptosis in *H. pylori*-colonized gastric mucosa of Mongolian gerbils in comparison with mice. *Dig Dis Sci*. 2002 Jan;47(1):90-9. doi: 10.1023/a:1013219621422. PMID: 11837740.
- Taguchi A, Ohmiya N, Shirai K, Mabuchi N, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, Goto H. Interleukin-8 promoter polymorphism increases the risk of atrophic gastritis and gastric cancer in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Nov;14(11 Pt 1):2487-93. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0326. PMID: 16284368.
- Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006 Apr;Chapter 3:Unit 3.22. doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30. PMID: 18228490.
- Ti D, Hao H, Tong C, Liu J, Dong L, Zheng J, Zhao Y, Liu H, Fu X, Han W. LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b. *J Transl Med*. 2015 Sep 19;13:308. doi: 10.1186/s12967-015-0642-6. PMID: 26386558; PMCID: PMC4575470.
- Urta H, Torres VA, Ortiz RJ, Lobos L, Díaz MI, Díaz N, Härtel S, Leyton L, Quest AF. Caveolin-1-enhanced motility and focal adhesion turnover require tyrosine-14 but not accumulation to the rear in metastatic cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(4):e33085. doi: 10.1371/journal.pone.0033085. Epub 2012 Apr 10. PMID: 22505999; PMCID: PMC3323582.
- Valenzuela MA, Pérez-Pérez G, Corvalán AH, Carrasco G, Urta H, Bravo D, Toledo H, Quest AF. *Helicobacter pylori*-induced loss of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin is linked to gastritis and death of human gastric cells. *J Infect Dis*. 2010 Oct 1;202(7):1021-30. doi: 10.1086/656143. PMID: 20735270.

- Valenzuela MA, Bravo D, Canales J, Sanhueza C, Díaz N, Almarza O, Toledo H, Quest AF. *Helicobacter pylori*-induced loss of survivin and gastric cell viability is attributable to secreted bacterial gamma-glutamyl transpeptidase activity. *J Infect Dis*. 2013 Oct 1;208(7):1131-41. doi: 10.1093/infdis/jit286. Epub 2013 Jul 11. PMID: 23847060.
- Valenzuela MA, Canales J, Corvalán AH, Quest AF. *Helicobacter pylori*-induced inflammation and epigenetic changes during gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2015 Dec 7;21(45):12742-56. doi: 10.3748/wjg.v21.i45.12742. PMID: 26668499; PMCID: PMC4671030.
- Valenzuela-Valderrama M, Cerda-Opazo P, Backert S, González MF, Carrasco-Véliz N, Jorquera-Cordero C, Wehinger S, Canales J, Bravo D, Quest AFG. The *Helicobacter pylori* Urease Virulence Factor Is Required for the Induction of Hypoxia-Induced Factor-1 α in Gastric Cells. *Cancers (Basel)*. 2019 Jun 10;11(6):799. doi: 10.3390/cancers11060799. PMID: 31185594; PMCID: PMC6627347.
- Valenzuela-Valderrama M, Cerda-Opazo P, Backert S, González MF, Carrasco-Véliz N, Jorquera-Cordero C, Wehinger S, Canales J, Bravo D, Quest AFG. The *Helicobacter pylori* Urease Virulence Factor Is Required for the Induction of Hypoxia-Induced Factor-1 α in Gastric Cells. *Cancers (Basel)*. 2019 Jun 10;11(6):799. doi: 10.3390/cancers11060799. PMID: 31185594; PMCID: PMC6627347.
- Wang F, Liu J, Zou Y, Jiao Y, Huang Y, Fan L, Li X, Yu H, He C, Wei W, Wang H, Sun G. MicroRNA-143-3p, up-regulated in *H. pylori*-positive gastric cancer, suppresses tumor growth, migration and invasion by directly targeting AKT2. *Oncotarget*. 2017 Apr 25;8(17):28711-28724. doi: 10.18632/oncotarget.15646. PMID: 28404925; PMCID: PMC5438685.
- Wang J, Deng Z, Wang Z, Wu J, Gu T, Jiang Y, Li G. MicroRNA-155 in exosomes secreted from *helicobacter pylori* infection macrophages immunomodulates inflammatory response. *Am J Transl Res*. 2016 Sep 15;8(9):3700-3709. PMID: 27725852; PMCID: PMC5040670.
- Wang J, Yao Y, Zhang Q, Li S, Tang L. Inflammatory responses induced by *Helicobacter pylori* on the carcinogenesis of gastric epithelial GES 1 cells. *Int J Oncol*. 2019 Jun;54(6):2200-2210. doi: 10.3892/ijo.2019.4775. Epub 2019 Apr 9. PMID: 31081048.
- Wang W, Ye L, Ye L, Li B, Gao B, Zeng Y, Kong L, Fang X, Zheng H, Wu Z, She Y. Up-regulation of IL-6 and TNF-alpha induced by SARS-coronavirus spike protein in murine macrophages via NF-kappaB pathway. *Virus Res*. 2007 Sep;128(1-2):1-8. doi: 10.1016/j.virusres.2007.02.007. Epub 2007 May 25. PMID: 17532082; PMCID: PMC7114322.
- Waskito LA, Salama NR, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2018 Sep;23 Suppl 1:e12516. doi: 10.1111/hel.12516. PMID: 30203582.
- Watanabe S, Takagi A, Koga Y, Kamiya S, Miwa T. *Helicobacter pylori* induces apoptosis in gastric epithelial cells through inducible nitric oxide. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000 Feb;15(2):168-74. doi: 10.1046/j.1440-1746.2000.02062.x. PMID: 10735541.
- Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 Nov 1;14(21):6735-41. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4843. PMID: 18980965.

- Wessler S, Backert S. Molecular mechanisms of epithelial-barrier disruption by *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol.* 2008 Aug;16(8):397-405. doi: 10.1016/j.tim.2008.05.005. Epub 2008 Jul 9. PMID: 18619844.
- Wroblewski LE, Noble PJ, Pagliocca A, Pritchard DM, Hart CA, Campbell F, Dodson AR, Dockray GJ, Varro A. Stimulation of MMP-7 (matrilysin) by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells: role in epithelial cell migration. *J Cell Sci.* 2003 Jul 15;116(Pt 14):3017-26. doi: 10.1242/jcs.00518. PMID: 12808021.
- Xia HH, Talley NJ. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol.* 2001 Jan;96(1):16-26. doi: 10.1111/j.1572-0241.2001.03447.x. PMID: 11197247.
- Xia X, Zhang L, Chi J, Li H, Liu X, Hu T, Li R, Guo Y, Zhang X, Wang H, Cai J, Li Y, Liu D, Cui Y, Zheng X, Flaker GC, Liao D, Hao H, Liu Z, Xu C. *Helicobacter pylori* Infection Impairs Endothelial Function Through an Exosome-Mediated Mechanism. *J Am Heart Assoc.* 2020 Mar 17;9(6):e014120. doi: 10.1161/JAHA.119.014120. Epub 2020 Mar 15. PMID: 32174233; PMCID: PMC7335532.
- Xiao W, Hodge DR, Wang L, Yang X, Zhang X, Farrar WL. Co-operative functions between nuclear factors NFkappaB and CCAT/enhancer-binding protein-beta (C/EBP-beta) regulate the IL-6 promoter in autocrine human prostate cancer cells. *Prostate.* 2004 Dec 1;61(4):354-70. doi: 10.1002/pros.20113. PMID: 15389813.
- Yang T, Wang R, Zhang J, Bao C, Zhang J, Li R, Chen X, Wu S, Wen J, Wei S, Li H, Cai H, Yang X, Zhao Y. Mechanism of berberine in treating *Helicobacter pylori* induced chronic atrophic gastritis through IRF8-IFN- γ signaling axis suppressing. *Life Sci.* 2020 May 1;248:117456. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117456. Epub 2020 Feb 22. PMID: 32097666.
- Ye Y, Miao SH, Lu RZ, Zhou JW. Prognostic value of caveolin-1 expression in gastric cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(19):8367-70. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.19.8367. PMID: 25339030.
- Ying L, Ferrero RL. Role of NOD1 and ALPK1/TIFA Signalling in Innate Immunity Against *Helicobacter pylori* Infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2019;421:159-177. doi: 10.1007/978-3-030-15138-6_7. PMID: 31123889.
- Zhang Y, Sun J, Dong Y, Shen X, Zhang Z. Vicenin-2 inhibits the *Helicobacterium pylori* infection associated gastric carcinogenic events through modulation of PI3K/AKT and Nrf2 signaling in GES-1 cells. *J Biochem Mol Toxicol.* 2021 Mar;35(3):e22680. doi: 10.1002/jbt.22680. Epub 2020 Dec 16. PMID: 33325628.
- Zhong J, Zhao M, Luo Q, Ma Y, Liu J, Wang J, Yang M, Yuan X, Sang J, Huang C. CCDC134 is down-regulated in gastric cancer and its silencing promotes cell migration and invasion of GES-1 and AGS cells via the MAPK pathway. *Mol Cell Biochem.* 2013 Jan;372(1-2):1-8. doi: 10.1007/s11010-012-1418-4. Epub 2012 Aug 18. PMID: 23070808.

7. Anexos

Caracterización de EVs liberadas de células epiteliales gástricas GES-1 infectadas o no con H. pylori purificadas mediante el kit Exo-spin™

Luego de obtener las EVs mediante el kit *Exo-spin*™ siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.6, las EVs se caracterizaron mediante NTA para determinar la concentración y tamaño y mediante *Western blot*, para la identificación de marcadores de Exosomas. Mediante la cuantificación de las proteínas totales de las EVs por BCA, como se observa en la Figura suplementaria 1.A, se pudo determinar que las *EVHp+* tienen mayor cantidad de proteínas totales comparadas con las *EVHp-*. A partir del análisis de las EVs mediante NTA (sección 2.8), se evidenció que las *EVHp+* tienen significativamente mayor concentración de partículas que las *EVHp-* (Figura suplementaria 1.B y Tabla suplementaria 1). En cuanto al tamaño de las EVs (Figura suplementaria 1.C), las *EVHp+* tienen un menor tamaño promedio comparado con las *EVHp-*. Al realizar la caracterización mediante *Western blot* se evidenció que las bandas correspondientes a los marcadores de exosomas eran muy tenues (Figura suplementaria 1.D). El marcador de retículo endoplasmático Calnexina se encuentra ausente en las muestras de

EVs, lo cual indica que las muestras no están contaminadas con restos de retículo endoplasmático.

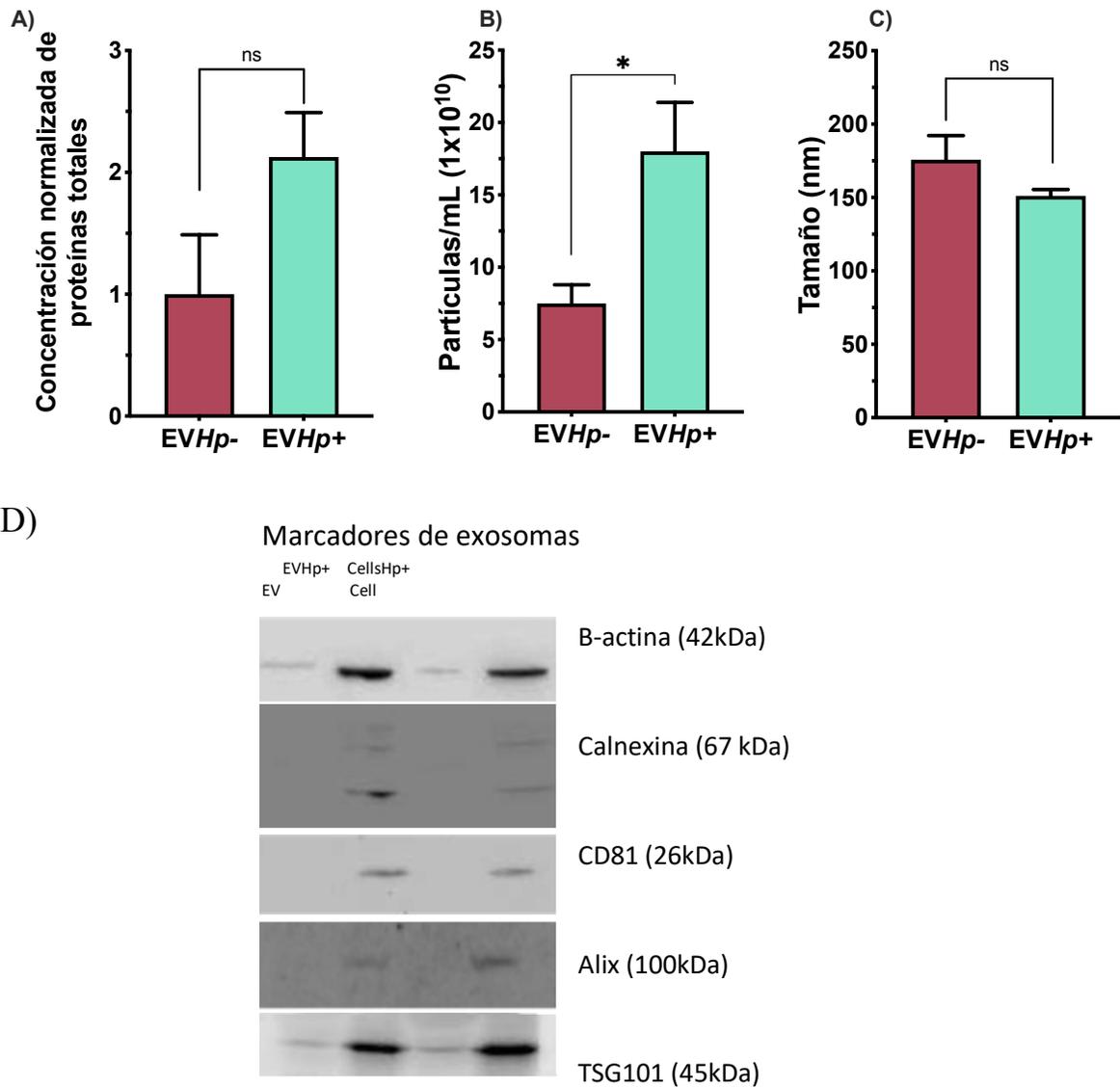


Figura suplementaria 1. Caracterización de EVs liberadas de células GES-1 infectadas (EVHp+) o sin infectar con *H. pylori* (EVHp-) purificadas mediante Exo-spin™. A) Concentración de proteínas totales en las EVs; B) Concentración de EVs; C) Tamaño promedio de las EVs y D)

Determinación mediante *Western blot* de la presencia de marcadores clásicos de exosomas como CD81, Alix y TSG101. A su vez, se verificó la ausencia de Calnexina, un marcador de retículo endoplasmático. Los resultados se analizaron estadísticamente con el T test (n=3). ns indica $p > 0.05$ y * indica $p < 0.05$.

Tabla suplementaria 1. Caracterización de EVs liberadas de células epiteliales gástricas GES-1 infectadas con *H. pylori*, purificadas mediante Exo-spin™. Los datos que se muestran son los promedios de 3 mediciones de purificaciones independientes.

| Características | EVHp- | EVHp+ |
|--|---|--|
| Concentración total de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) | $3,52 \pm 1,7$ | $7,49 \pm 1,3$ |
| Concentración de EVs (partículas/mL) | $7,5 \times 10^{10} \pm 1,3 \times 10^{10}$ | $1,08 \times 10^{11} \pm 4,5 \times 10^{10}$ |
| Tamaño promedio (nm) | $175,4 \pm 16,9$ | $152,03 \pm 4,3$ |

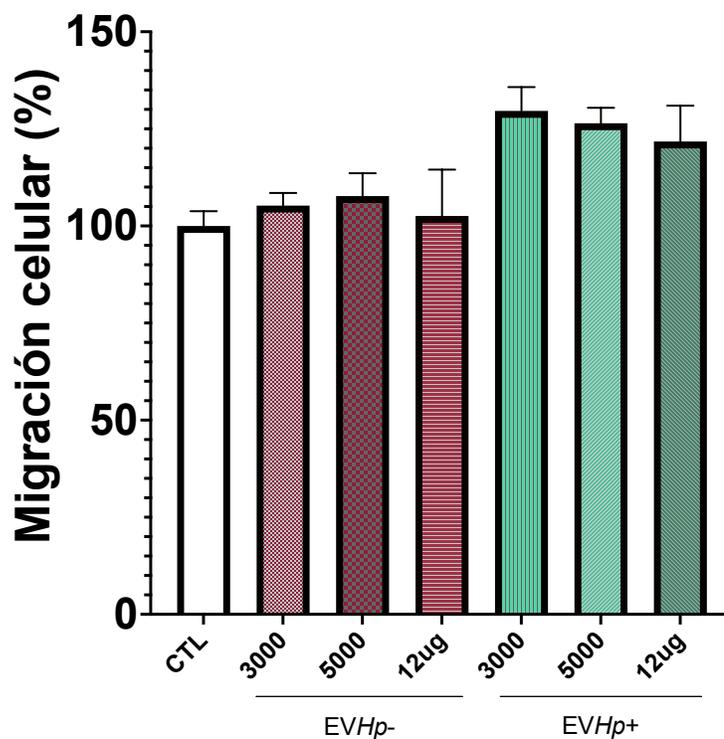


Figura suplementaria 2. Efecto de la concentración de EVs sobre la migración celular de células de la línea celular epitelial gástrica GES-1. Se determinó la migración celular en *transwell* de células de la línea celular GES-1 estimuladas con 3000, 5000 EVs por célula y 12 µg de EVs por 3×10^5 células.

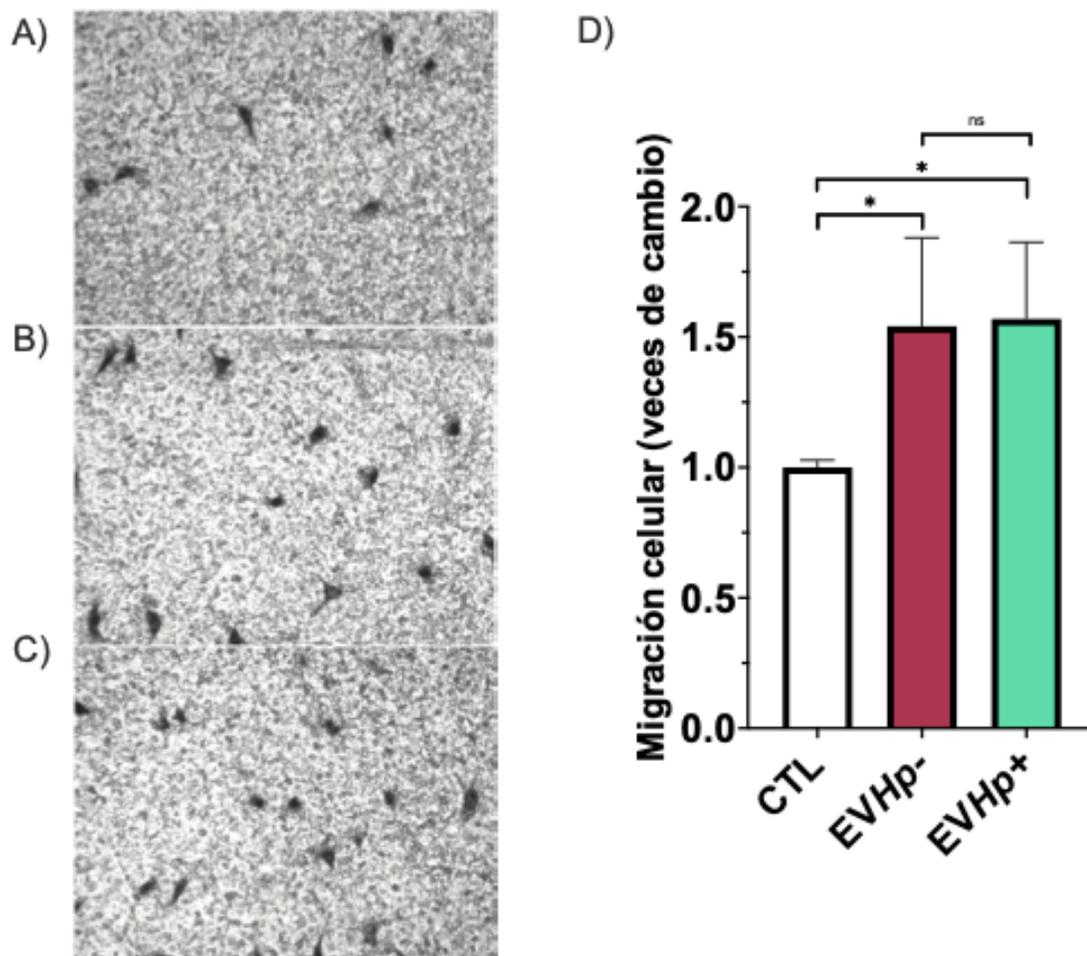


Figura suplementaria 3. Migración celular de células EA.hy926 estimuladas con EVHp- o EVHp+ durante 24 h. Se determinó la migración celular en transwell de: A) Células EA.hy926 sin estímulo (CTL); B) Células EA.hy926 estimuladas durante 24 h con EVHp- y C) Células EA.hy926 estimuladas durante 24 h con EVHp+. D) Cuantificación de la migración celular de tres experimentos independientes. El valor 1 corresponde a ~15 células. Los resultados se analizaron estadísticamente con el T test (n=4). ns indica $p > 0.0$ y * indica $p < 0.05$.

La migración celular en *transwell* de células endoteliales EA.hy926 aumentó de manera significativa cuando las células se estimularon con EVHp- o EVHp+. Además, no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos.

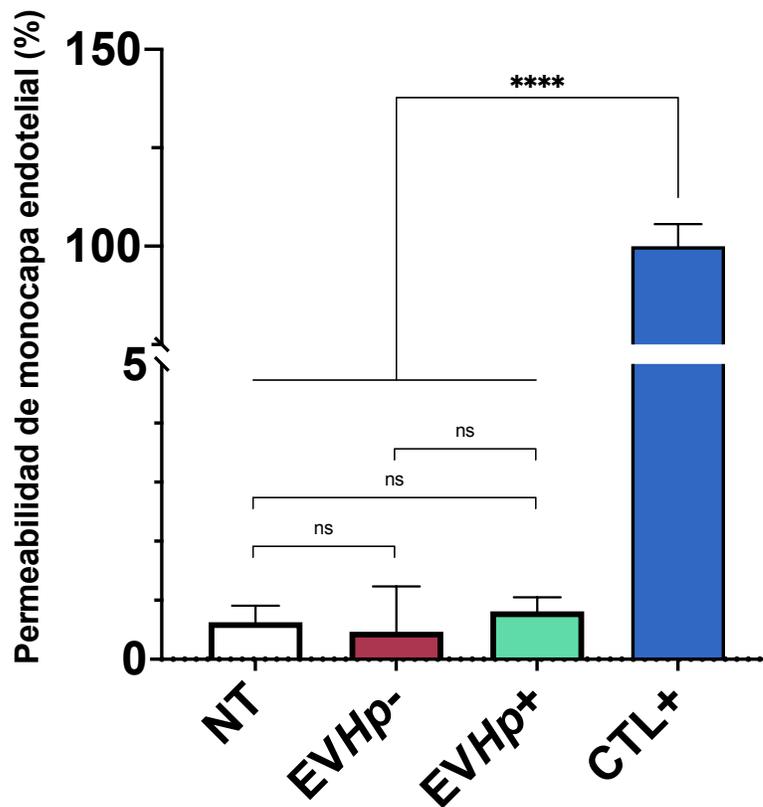


Figura suplementaria 4. Permeabilidad de monocapa de células endoteliales EA.hy926 luego de estímulo durante 24 h con *EVHp-* o *EVHp+*. Se estimó la permeabilidad de la monocapa de células endoteliales a través del traspaso del colorante azul dextrano. El control positivo es el valor de la densidad óptica a 620 nm de azul dextrano 10 mM. Los resultados se analizaron estadísticamente con el T test (n=4). ns indica $p > 0.05$ y **** indica $p < 0.0001$

Tabla suplementaria 2. Proteínas que se encuentran exclusivamente en *EVHp*-

| |
|--|
| 14-3-3 protein gamma;YWHAG |
| Alpha-1-antichymotrypsin;SERPINA3 |
| Apolipoprotein A-II;APOA2 |
| Apolipoprotein M;APOM |
| Collagen alpha-2(V) chain;COL5A2 |
| Complement decay-accelerating factor;CD55 |
| Fermitin family homolog 3;FERMT3 |
| Fibrinogen beta chain;FGB |
| Fibromodulin;FMOD |
| Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-3;GNAT3 |
| Heparin cofactor 2;SERPIND1 |
| Importin subunit beta-1;KPNB1 |
| Latent-transforming growth factor beta-binding protein 4;LTBP4 |
| Lumican;LUM |
| Myosin light chain 6B;MYL6B |
| Peroxiredoxin-2;PRDX2 |
| Tetraspanin-4;TSPAN4 |
| Thrombospondin-2;THBS2 |
| Tubulointerstitial nephritis antigen-like;TINAGL1 |
| Vascular cell adhesion protein 1;VCAM1 |
| X-ray repair cross-complementing protein 5;XRCC5 |

Tabla suplementaria 3. Proteínas enriquecidas en *EVHp*⁺ en comparación con *EVHp*-

| |
|--|
| 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2;PSMD2 |
| 40S ribosomal protein S3;RPS3 |
| 4F2 cell-surface antigen heavy chain;SLC3A2 |
| 5'-nucleotidase;NT5E |
| 60S acidic ribosomal protein P0-like;RPLP0P6 |
| 60S ribosomal protein L18;RPL18 |
| Actin, aortic smooth muscle;ACTA2 |
| Actin, cytoplasmic 1;ACTB |
| Adenosylhomocysteinase;AHCY |

| |
|--|
| Alpha-2-macroglobulin;A2M |
| Alpha-actinin-4;ACTN4 |
| Alpha-amylase 1;AMY1A |
| Alpha-enolase;ENO1 |
| Annexin A2;ANXA2 |
| Annexin A5;ANXA5 |
| Apolipoprotein B-100;APOB |
| Apolipoprotein E;APOE |
| Basigin;BSG |
| Beta-actin-like protein 2;ACTBL2 |
| Beta-enolase;ENO3 |
| Cation-independent mannose-6-phosphate receptor;IGF2R |
| CCN family member 1;CCN1 |
| CD44 antigen;CD44 |
| CD59 glycoprotein;CD59 |
| CD63 antigen;CD63 |
| CD81 antigen;CD81 |
| CD9 antigen;CD9 |
| Cell division control protein 42 homolog;CDC42 |
| Chloride intracellular channel protein 1;CLIC1 |
| Clathrin heavy chain 2;CLTCL1 |
| Clusterin;CLU |
| Coactosin-like protein;COTL1 |
| Coagulation factor X;F10 |
| Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3;C1QTNF3 |
| Complement factor B;CFB |
| Core histone macro-H2A.1;MACROH2A1 |
| Dermcidin;DCD |
| EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3;EDIL3 |
| Elongation factor 1-gamma;EEF1G |
| Elongation factor 2;EEF2 |
| Epidermal growth factor receptor;EGFR |
| Erythrocyte band 7 integral membrane protein;STOM |
| Eukaryotic initiation factor 4A-I;EIF4A1 |
| Ezrin;EZR |
| Filaggrin-2;FLG2 |
| Filamin-A;FLNA |
| Fructose-bisphosphate aldolase A;ALDOA |
| Galectin-3-binding protein;LGALS3BP |

| |
|---|
| Gelsolin;GSN |
| Glucose-6-phosphate isomerase;GPI |
| Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase;GAPDH |
| Glypican-1;GPC1 |
| GTP-binding nuclear protein Ran;RAN |
| Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2;GNB2 |
| Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4;GNB4 |
| Heat shock 70 kDa protein 1-like;HSPA1L |
| Heat shock 70 kDa protein 1A;HSPA1A |
| Heat shock cognate 71 kDa protein;HSPA8 |
| Heat shock protein HSP 90-alpha;HSP90AA1 |
| Heat shock protein HSP 90-beta;HSP90AB1 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K;HNRNPK |
| Histone H1.0;H1-0 |
| Histone H1.3;H1-3 |
| Histone H1.5;H1-5 |
| Histone H2A type 1-A;H2AC1 |
| Histone H2A type 1-J;H2AC14 |
| Histone H2A.Z;H2AZ1 |
| Histone H2B type 1-N;H2BC15 |
| Histone H2B type 1-O;H2BC17 |
| Histone H3.3C;H3-5 |
| HLA class I histocompatibility antigen, A alpha chain;HLA-A |
| Immunoglobulin superfamily member 8;IGSF8 |
| Insulin-like growth factor II;IGF2 |
| Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1;ITIH1 |
| Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3;ITIH3 |
| Keratin, type I cytoskeletal 10;KRT10 |
| Keratin, type I cytoskeletal 13;KRT13 |
| Keratin, type I cytoskeletal 14;KRT14 |
| Keratin, type I cytoskeletal 19;KRT19 |
| Keratin, type I cytoskeletal 28;KRT28 |
| Keratin, type I cytoskeletal 9;KRT9 |
| Keratin, type II cytoskeletal 1;KRT1 |
| Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal;KRT2 |
| Keratin, type II cytoskeletal 5;KRT5 |
| L-lactate dehydrogenase A chain;LDHA |
| L-lactate dehydrogenase B chain;LDHB |
| Large neutral amino acids transporter small subunit 1;SLC7A5 |

| |
|--|
| Lysosome-associated membrane glycoprotein 1;LAMP1 |
| Multifunctional protein ADE2;PAICS |
| Neutral amino acid transporter B(0);SLC1A5 |
| Nucleophosmin;NPM1 |
| Pentraxin-related protein PTX3;PTX3 |
| Peroxiredoxin-1;PRDX1 |
| Peroxiredoxin-6;PRDX6 |
| Phosphoglycerate kinase 2;PGK2 |
| Pigment epithelium-derived factor;SERPINF1 |
| Potassium-transporting ATPase alpha chain 2;ATP12A |
| Pregnancy zone protein;PZP |
| Profilin-1;PFN1 |
| Programmed cell death 6-interacting protein;PDCD6IP |
| Proteasome subunit alpha type-2;PSMA2 |
| Proteasome subunit alpha type-4;PSMA4 |
| Proteasome subunit alpha type-7;PSMA7 |
| Proteasome subunit beta type-1;PSMB1 |
| Proteasome subunit beta type-3;PSMB3 |
| Protein tweety homolog 3;TTYH3 |
| Putative elongation factor 1-alpha-like 3;EEF1A1P5 |
| Putative heat shock 70 kDa protein 7;HSPA7 |
| Pyruvate kinase PKM;PKM |
| Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1;IQGAP1 |
| Ras-related protein Rab-1A;RAB1A |
| Ras-related protein Rab-5C;RAB5C |
| Ras-related protein Rab-7a;RAB7A |
| Ras-related protein Rap-1b-like protein |
| Reticulon-4;RTN4 |
| RuvB-like 1;RUVBL1 |
| Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3;SNRPD3 |
| Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B';SNRPB |
| Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1;ATP1A1 |
| Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3;ATP1B3 |
| Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1;SLC2A1 |
| Syndecan-4;SDC4 |
| Syntenin-1;SDCBP |
| T-complex protein 1 subunit alpha;TCP1 |
| T-complex protein 1 subunit beta;CCT2 |
| T-complex protein 1 subunit delta;CCT4 |

| |
|--|
| T-complex protein 1 subunit epsilon;CCT5 |
| T-complex protein 1 subunit eta;CCT7 |
| T-complex protein 1 subunit gamma;CCT3 |
| T-complex protein 1 subunit theta;CCT8 |
| Testican-1;SPOCK1 |
| Thioredoxin;TXN |
| Thrombospondin-4;THBS4 |
| Thy-1 membrane glycoprotein;THY1 |
| Thyroxine-binding globulin;SERPINA7 |
| Transferrin receptor protein 1;TFRC |
| Transforming protein RhoA;RHOA |
| Transgelin-2;TAGLN2 |
| Tubulin alpha-1A chain;TUBA1A |
| Tubulin alpha-4A chain;TUBA4A |
| Tubulin beta chain;TUBB |
| Tubulin beta-2A chain;TUBB2A |
| Tubulin beta-4A chain;TUBB4A |

Tabla suplementaria 4. Proteínas enriquecidas en *EVHp-* en comparación con *EVHp+*

| |
|--|
| 14-3-3 protein beta/alpha;YWHAB |
| 14-3-3 protein epsilon;YWHAE |
| 14-3-3 protein eta;YWHAH |
| 14-3-3 protein theta;YWHAQ |
| 14-3-3 protein zeta/delta;YWHAZ |
| Acidic mammalian chitinase;CHIA |
| Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15;SUB1 |
| Adenylyl cyclase-associated protein 1;CAP1 |
| ADP-ribosylation factor 1;ARF1 |
| Agrin;AGRN |
| Alpha-actinin-2;ACTN2 |
| Annexin A1;ANXA1 |
| Annexin A4;ANXA4 |
| Annexin A6;ANXA6 |
| ATP-citrate synthase;ACLY |

| |
|--|
| Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein;HSPG2 |
| Beta-2-glycoprotein 1;APOH |
| Brain acid soluble protein 1;BASP1 |
| Cartilage oligomeric matrix protein;COMP |
| CD109 antigen;CD109 |
| CD151 antigen;CD151 |
| Choline transporter-like protein 1;SLC44A1 |
| Clathrin heavy chain 1;CLTC |
| Coagulation factor V;F5 |
| Cofilin-1;CFL1 |
| Collagen alpha-1(I) chain;COL1A1 |
| Collagen alpha-1(V) chain;COL5A1 |
| Collagen alpha-1(XII) chain;COL12A1 |
| Collagen alpha-1(XVIII) chain;COL18A1 |
| Collagen alpha-2(IV) chain;COL4A2 |
| Complement C3;C3 |
| Complement C4-B;C4B_2 |
| Complement C5;C5 |
| Complement component C7;C7 |
| Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10;ADAM10 |
| Endoplasmic reticulum chaperone BiP;HSPA5 |
| Fatty acid synthase;FASN |
| Fibronectin;FN1 |
| Filamin-C;FLNC |
| Fructose-bisphosphate aldolase C;ALDOC |
| Galectin-1;LGALS1 |
| Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific;GAPDHS |
| Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2;GNAI2 |
| Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha;GNAI3 |
| Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12;GNG12 |
| Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1;GNB1 |
| Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-3;GNB3 |
| Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha;GNAO1 |
| Heat shock protein beta-1;HSPB1 |
| Hemoglobin subunit zeta;HBZ |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2;HNRNPA1L2 |
| Integrin alpha-3;ITGA3 |
| Integrin beta-1;ITGB1 |
| Integrin beta-3;ITGB3 |

| |
|--|
| Interferon-induced transmembrane protein 1;IFITM1 |
| Keratin, type I cytoskeletal 16;KRT16 |
| Keratin, type II cytoskeletal 3;KRT3 |
| Lactadherin;MFGE8 |
| Laminin subunit alpha-5;LAMA5 |
| Laminin subunit beta-1;LAMB1 |
| Laminin subunit gamma-1;LAMC1 |
| Lysosome-associated membrane glycoprotein 2;LAMP2 |
| Lysyl oxidase homolog 2;LOXL2 |
| Major vault protein;MVP |
| Matrilin-2;MATN2 |
| Moesin;MSN |
| Monocarboxylate transporter 4;SLC16A3 |
| Myosin-9;MYH9 |
| Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate;MARCKS |
| Nidogen-1;NID1 |
| Nucleoside diphosphate kinase B;NME2 |
| Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A;PPIA |
| Peroxidasin homolog;PXDN |
| Phosphoglycerate kinase 1;PGK1 |
| Plasminogen;PLG |
| Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1;LRP1 |
| Prostaglandin F2 receptor negative regulator;PTGFRN |
| Proteasome subunit alpha type-1;PSMA1 |
| Proteasome subunit alpha type-3;PSMA3 |
| Proteasome subunit alpha type-5;PSMA5 |
| Proteasome subunit alpha type-6;PSMA6 |
| Proteasome subunit alpha-type 8;PSMA8 |
| Proteasome subunit beta type-2;PSMB2 |
| Proteasome subunit beta type-4;PSMB4 |
| Proteasome subunit beta type-5;PSMB5 |
| Proteasome subunit beta type-6;PSMB6 |
| Prothrombin;F2 |
| Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3;RAC3 |
| Ras-related protein Rab-11B;RAB11B |
| Ras-related protein Rab-35;RAB35 |
| RuvB-like 2;RUVBL2 |
| Serine protease 23;PRSS23 |
| Talin-1;TLN1 |

| |
|---|
| Talin-2;TLN2 |
| Tenascin;TNC |
| Thrombospondin-1;THBS1 |
| Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3;TGFBI |
| Transitional endoplasmic reticulum ATPase;VCP |
| Tropomyosin alpha-3 chain;TPM3 |
| WD repeat-containing protein 1;WDR1 |
| X-ray repair cross-complementing protein 6;XRCC6 |