

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



## *Titulo Tesis:*

Las vesículas de membrana externa (OMVs) de *Helicobacter pylori* inducen un fenotipo de astrocito reactivo a través de NF- $\kappa$ B provocando daño neuronal en un modelo murino.

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

***Esteban Del Carmen Palacios Contreras***

Director de Tesis:  
Dra. Lisette Leyton Campos

Santiago-CHILE

Marzo/2022

# UNIVERSIDAD DE CHILE

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

### INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

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

## Esteban Del Carmen Palacios Contreras

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen público rendido el día.

---

**Director de Tesis:**

**Dra. Lisette Leyton** \_\_\_\_\_

**Co-director de Tesis:**

**Dr. Manuel Valenzuela Valderrama** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dra. Jenny Fiedler (presidenta)** \_\_\_\_\_

**Dra. Paola Morales** \_\_\_\_\_

**Dr. Juan Carlos Sáez** \_\_\_\_\_

**Dr. Javier Bravo** \_\_\_\_\_

## **Dedicatoria**

*Para mi hermana Pamela quien, desde el amor, perseveró contra la adversidad y deseó un camino diferente para sus “hermanos” ❤️.*

**Esteban Palacios C.**

## **Agradecimientos**

Me gustaría expresar mis más sinceros agradecimientos a muchas personas con quienes compartí, aprendí de ellos y aportaron en mí un granito de arena en este proceso de crecimiento personal y profesional.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutores de tesis, los Drs. Lisette Leyton y Manuel Valenzuela, quienes me acogieron desde el primer día en sus respectivos laboratorios, confiaron en esta nueva línea de investigación que ha sido un poco controversial, y sin ustedes no habría podido llegar a buen puerto. Gracias por guiarme, potenciar mis fortalezas y notar mis debilidades. Además, quisiera agradecer a los miembros de mi comisión. Gracias por sus críticas constructivas, consejos y buena voluntad. Quiero agradecer también a mis compañeros de los laboratorios, quienes me han brindado su profesionalismo, alegría y compañerismo. Particularmente quisiera agradecer a mis amigos del Mini Team AR (Adidas Runners Santiago), con quienes compartí innumerables aventuras, en especial por acompañarme en dar el gran salto de correr mis primeras maratones nacionales. Sin duda fueron mi batería de energía positiva y la vía de escape en los momentos difíciles en el doctorado. De igual manera quisiera agradecer a mi amiga Clara por estar presente y aclarar mis dudas en los momentos de incertidumbre. Finalmente, quiero dar gracias a mi familia por apoyarme en cada decisión y proyecto, gracias a la vida porque cada día me demuestra lo hermosa que es y lo justa que puede llegar a ser.

¡A todos, muchas gracias!

## **Financiamiento**

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Comunicaciones Celulares de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y Laboratorio de Microbiología Celular, Facultad Ciencias de Salud, Universidad Central de Chile. y contó con los siguientes financiamientos:

Beca Conicyt de Doctorado Nacional, 2017-2020 (#21171433)

Beca Conicyt para Gastos Operacionales, 2019 y 2020 (#21171433)

Extensión de Beca, Marzo-Agosto 2021 (#21171433)

Proyecto Fondecyt Regular #1150744 #1200836 (Dra. Lisette Leyton)

Proyecto CONICYT-FONDAP # 15130011 (Drs. Lisette Leyton y Manuel Valenzuela)

Proyecto Fondecyt Regular #1171615 y CIP2019015(UCEN) (Dr. Manuel Valenzuela)

## **Productividad**

### **Docencia, ayudantías, unidades de investigación**

2017.- Unidad de investigación en Centro de Excelencia de Medicina de Precisión CEMP-Pfizer Chile. Tutor: Dr Ricardo Armisen. “Cuantificación de Survivina en IHQs mediante el software Image Pro Plus 6.0 ® en muestras de tumor subcutáneos generados por línea celular MDA-MB- 231 sobre-expresando ADAR p110 provenientes de ratones BALB/c-NOD/scid”.

2018.- Unidad de Investigación en Laboratorio de Microbiología Celular/Universidad Central de Chile. Tutor: Dr Manuel Valenzuela. Preparation of Outer Membrane Vesicles (OMVs) of *H. pylori*.

2020.- Co-tutor en Unidad de investigación para estudiantes de 2<sup>do</sup> año de Medicina titulada; “Las OMVs de *Helicobacter pylori* inducen la reactividad de los astrocitos a través de la activación de NF-κB y producción de TNF *in vitro*”. Alumnas: Catalina Nahum López y Macarena Ravest Miranda. Universidad de Chile.

### **Publicaciones**

2017.- Tapia-Bustos A, Perez-Lobos R, Vio V, Lespay-Rebolledo C, **Palacios E**, Chiti-Morales A, Bustamante D, Herrera-Marschitz M, Morales P. (2017). Modulation of Postnatal Neurogenesis by Perinatal Asphyxia: Effect of D1 and D2 Dopamine Receptor Agonists. *Neurotoxicity Research*. 31(1):109-121.

2017.- Perez-Lobos, R., Lespay-Rebolledo, C., Tapia-Bustos, A., **Palacios, E.**, Vio, V., Bustamante, D., & Herrera-Marschitz, M. (2017). Vulnerability to a metabolic challenge following perinatal asphyxia evaluated by organotypic cultures: neonatal nicotinamide treatment. *Neurotoxicity research*, 32(3), 426-443.

2019.- Leyton, L., Díaz J E., Martinez S., **Palacios E.** Pérez L A., Pérez R D. (2019). Thy-1/Cd90 a bidirectional and lateral signaling scaffold. *Front Cell Dev Biol. Frontiers in cell and developmental biology*, 7. doi: 10.3389/fcell.2019.00132

2021.- Carrasco N, Palavecino C; **Palacios E**, Garrido M; Villena J; Valenzuela M. Evaluation of the antitumoral activity of organic extracts of *Leptocarpha rivularis* on gastric cancer cells. (manuscrito en preparación).

2021.- Díaz J, Martínez S, Oróstica L, **Palacios E**, Tapia-Bustos A, Herrera-Marschitz M, Morales P, Contreras P, Chamorro A, Artigas R, Corvalán A, Quest A and Leyton L\*. Rab7/endocytic pathway regulates astrogliosis by modulating the expression of  $\beta_3$  integrin in reactive astrocytes (manuscrito en preparación).

2021.- Morales F, Perez P, Tapia J, Lobos-González L, Herranz J, Guevara F, **Palacios E**, Rojas P, Sagredo E, Marcelain K, Armisen R. Increase in ADAR1p110 activates the canonical Wnt signaling pathway associated with aggressive phenotype in triple negative breast cancer cells (aceptado por *Gene Journal*).

2021.- Carrasco-Veliz N, **Palacios E**, Garrido M, Andrew F.G. Quest, Hartley R, Villena J, Montenegro I and Valenzuela M\*. The 5' untranslated region of the inhibitor of apoptosis protein Survivin enables cap-independent translation initiation (manuscrito en preparación).

2022.- **Esteban Palacios**, Lorena Lobos-González, Simón Guerrero, Marcelo J. Kogan, Baohai Shao, Jay Heinecke, Andrew F.G. Quest, Lisette Leyton\* and Manuel Valenzuela-Valderrama\*. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles induce astrocyte reactivity through NF-kB activation and cause neuronal damage in a murine *in vivo* model. *Nature Communications* (en revisión).

2022. Díaz J, **Palacios E**, Pérez L, Martínez S, Pérez R, Emanuel, Avalos A.M, and Leyton L. The importance of establishing a correct model to study the reactivity process in astrocytes (manuscrito en preparación).

### **Simposios y congresos**

2017.- Asistencia a II Conferencia Internacional de Biotecnología Emprendimiento BIOTEC: Regulación y financiamiento y oportunidades. 6 de diciembre 2017. CORFO.

2018.- Asistencia a Simposio: Nuevos horizontes en epigenética. 16 de enero. Fundación Ciencia & Vida.

2019.- **Palacios E**, Quest A F, Valenzuela M\*, Leyton L\*. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles induce astrocyte reactivity which prevents neurite outgrowth *in*

*vitro*. XXXIII Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile. Puerto Varas, Chile. 2019. (presentación poster)

2019.- Carrasco N, Palavecino C; **Palacios E**, Garrido M; Villena J; Valenzuela M. Evaluation of the antitumoral activity of organic extracts of *Leptocarpus rivularis* on gastric cancer cells. Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile. Puerto Varas, Chile. 2019. (participación en abstract).

2020.- Simposio on line "Lineas de investigación del programa de doctorado en Bioquímica". Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 13-16 de octubre. (presentación oral).

2020.- **Esteban Palacios**, Andrew, F.G. Quest, Manuel Valenzuela\*, Lisette Leyton\*. Vesículas de membrana externa (OMVs) de *Helicobacter pylori* inducen un fenotipo reactivo en astrocitos provocando la inhibición del crecimiento de neuritas in vitro. Seminario en Ciencias Basicas Biomedicas Universidad de Antioquia 1-2 Diciembre (presentación oral).

2021.- Simposio on line "Líneas de investigación del programa de doctorado en Bioquímica". Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 19-23 de octubre. (presentación oral).

2021.- **Palacios E**, Lobos-González L, Guerrero S, Quest A, F., Leyton L,\* and Manuel Valenzuela M \*. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles induce astrocyte reactivity and cause neuronal damage through NF-κB activation in a murine model. Colloquium Series in Cell Biology: Young Investigators 2021 (Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile, Chile. 2021 (presentación oral).

### **Difusión y extensión**

2018.- Monitor científico en “Quitando el paradigma del científico Nacional”, en el laboratorio de Microbiología Celular en Universidad Central de Chile. Visita guiada para alumnos de 3° medio: electivo científico/Colegio Universal San Francisco de Asis de Talagante.

2019.- Monitor y Colaborador Científico en “Acercando la Ciencia a la educación primaria” con profesora Maria Hortencia, Colegio Primitiva Hecheverria de Renca. (Objetivo: Difundir los efectos nocivos de *Helicobacter pylori* y poder competir en ferias científicas escolares).

### **Participación en cursos**

2019.- Curso de manejo de animales de laboratorio para experimentación. Asociación Chilena en Ciencia y Tecnología de Animales de laboratorio & Facultad de Odontología- Universidad de Chile. 24, 25 y 26 de Julio, 2019.

2019.- Curso de Citometría de Flujo “Conceptos básicos en citometría de flujo y sus aplicaciones en investigación biomédica”. Genexespress & Facultad de Odontología- Universidad de Chile. 27 de Septiembre, 2019.

**Pasantía en el extranjero.**

ATTP Sandwich PhD: Abel Tasman Talent Program (ATTP) of the Graduate School of Medical Sciences of the University of Groningen 2022-2024 in Molecular Neuroscience and Ageing Research (MOLAR). Groningen, Netherlands.

# Índice general

<b>Dedicatoria</b> .....	<b>iii</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Financiamientos</b> .....	<b>v</b>
<b>Productividad</b> .....	<b>vi</b>
<b>Índice general</b> .....	<b>xii</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>xv</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>xvii</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>xix</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xxi</b>
<b>1 Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1- <i>H. pylori</i> y enfermedades neurodegenerativas.....	2
1.2- Las OMVs de <i>H. pylori</i> e inflamación sistémica.....	3
1.3- Neuroinflamación asociada a la infección por <i>H. pylori</i> .....	9
1.4- Astrocitos reactivos.....	11
1.5- Astrocitos reactivos y respuesta inflamatoria mediada por NF- $\kappa$ B.....	13
<b>2 Hipótesis</b> .....	<b>19</b>
<b>3 Objetivo general</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1 Objetivos específicos</b> .....	<b>19</b>
<b>4 Materiales, reactivos y métodos</b> .....	<b>20</b>
4.1- Materiales y reactivos.....	20
4.2- Cultivos líquidos de <i>H. pylori</i> 60190.....	22
4.2.1- Obtención de vesículas de membrana externa de <i>H. pylori</i> 60190.....	22
4.3- Cuantificación de proteínas de OMVs.....	23
4.4- Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) de OMVs.....	23
4.5- Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	24
4.6- Perfil de proteínas totales por electroforesis SDS-PAGE y tinción azul de Coomassie.....	24
4.7- Espectrometría de masa Shotgun.....	25

4.7.1- Extracción de fase sólida usando cartucho Waters HLB 1 de equilibrio hidrófilo-lipofílico.....	25
4.7.2- Análisis de proteómica <i>Shotgun</i> en equipo Lumos.....	26
4.7.3- Análisis de datos de espectrometría de masas e identificación de proteína.....	26
4.8- Cultivos celulares y obtención de cultivos primarios.....	27
4.8.1- Células CAD.....	27
4.8.2- Cultivo de astrocitos.....	28
4.8.3- Cultivos primarios de astrocitos de ratas neonatas.....	28
4.9- Cuantificación de proteínas de líneas celulares y cultivos primarios.....	29
4.10- Análisis por Western blot (WB).....	30
4.11- Inmunofluorescencia indirecta.....	30
4.12- Ensayo de migración celular por cierre de herida.....	33
4.13- Actividad de NF- $\kappa$ B por ELISA en extractos nucleares de astrocitos.....	34
4.14- Obtención del medio condicionado provenientes desde astrocitos primarios pretratados con OMVs de <i>H. pylori</i> .....	35
4.15- Cuantificación de IL-6, TNF, IFN-gamma y IL- 1 beta por kit MILLIPLEX.....	36
4.16- Viabilidad en células CAD tratadas con medio condicionado por citometría de flujo.....	36
4.17- Actividad de Caspasa 3 en células CAD tratadas con medio condicionado.....	37
4.18- Ensayo de diferenciación morfológica de células CAD sobre astrocitos.....	37
4.19- Modelo murino para el estudio de OMVs <i>in vitro</i> .....	38
4.20- Preparación de DiR y OMVs marcadas con DiR.....	39
4.21- Imágenes obtenidas por <i>in vivo</i> FX PRO.....	39
4.22- Tratamiento de los cerebros para obtener secciones en criostato.....	39
4.23- Tinción de Hematoxilina-Eosina e inmunofluorescencia indirecta en tejido cerebral.....	40
4.24- Inmunofluorescencia indirecta en tejido cerebral.....	41
4.25- Cuantificación de LPS en OMVs de <i>H. pylori</i> .....	41
4.26- Análisis estadísticos.....	42
<b>5 Resultados.....</b>	<b>43</b>
5.1- Objetivo específico 1: Estudiar sí las OMVs de <i>H. pylori</i> inducen un fenotipo reactivo en astrocitos <i>in vitro</i> .....	43

5.1.1- Caracterización de vesículas de membrana externa de <i>H. pylori</i> .....	43
5.1.2- Establecimiento de la dosis y tiempo del tratamiento con OMVs de <i>H. pylori</i> 60190 necesarios para inducir un fenotipo reactivo en astrocitos.....	50
5.1.3- Evaluación de la migración celular en astrocitos tratados con OMVs de <i>H.</i> <i>pylori</i> .....	58
5.2- Objetivo específico 2: Determinar si NF-κB participa en la inducción de la reactividad de astrocitos por OMVs de <i>H. pylori</i> y en la producción de citoquinas proinflamatorias.....	60
5.2.1- Determinar si NF-κB participa en la inducción de la reactividad de astrocitos por OMVs de <i>H. pylori</i> .....	60
5.2.2- Determinar si NF-κB participa en la inducción en la producción de citoquinas proinflamatorias.....	68
5.3- Objetivo específico 3: Estudiar la inhibición/retracción del crecimiento de procesos neuronaes y muerte neuronal en respuesta a astrocitos reactivados por OMVs de <i>H.</i> <i>pylori</i> .....	70
5.3.1- Evaluación de la diferenciación de células CAD cocultivadas sobre astrocitos fijados.....	71
5.3.2- Evaluación de la retracción de procesos de células CAD tratadas con OMVs de <i>H. pylori</i> .....	73
5.3.3- Medio condicionado de astrocitos tratados con OMVs de <i>H. pylori</i> aumenta la actividad de la Caspasa 3 y muerte celular en células CAD.....	73
5.4- Objetivo 4: Determinar sí las OMVs de <i>H. pylori</i> llegan al cerebro, inducen reactividad de astrocitos y daño neuronal en un modelo murino <i>in vivo</i> .....	80
5.4.1- Determinar sí las OMVs de <i>H. pylori</i> logran llegar al cerebro en un modelo murino <i>in vivo</i> .....	80
5.4.2- Determinar sí las OMVs de <i>H. pylori</i> en el cerebro inducen la reactividad de los astrocitos y daño neuronal <i>in vivo</i> .....	82
<b>6 Discusión.....</b>	<b>88</b>
6.1- Características de las OMVs.....	88
6.2- Astrocitos y reconocimiento de patógenos.....	91
6.3- Astrocitos reactivos y fenotipo proinflamatorio.....	93
6.3- Astrocito reactivos y daño neuronal.....	94
6.4- Las OMVs de <i>H. pylori</i> en modelo murino <i>in vivo</i> .....	96
6.5- Mecanismo molecular propuesto.....	98
<b>7 Conclusiones.....</b>	<b>100</b>
<b>8 Referencias.....</b>	<b>103</b>
<b>9 Anexos .....</b>	<b>113</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de los posibles mecanismos de entrada de <i>H. pylori</i> al SNC.....	7
<b>Figura 2.</b> Ilustración esquemática del proceso de liberación de OMVs desde una bacteria Gram negativa y sus posibles rutas de viaje desde el microbiota gastrointestinal hasta la circulación sanguínea.....	8
<b>Figura 3.</b> Respuesta celular de astrocitos A2 y A1 y sus efectos clínicos.....	16
<b>Figura 4.</b> Modelo de estudio.....	18
<b>Figura 5.</b> Caracterización de las OMVs provenientes de <i>H. pylori</i> 60190.....	46
<b>Figura 6.</b> Proteínas de las OMVs encontradas por proteómica.....	47
<b>Figura 7.</b> Evaluación dosis-respuesta de los marcadores de reactividad en astrocitos DITNC1 ATCC tratados con distintas concentraciones de OMVs de <i>H. pylori</i> 60190.....	52
<b>Figura 8.</b> Evaluación dosis-respuesta de marcadores de astrocitos DITNC1 tratados con OMVs de <i>H. pylori</i> 60190 a distintos tiempos.....	54
<b>Figura 9.</b> Caracterización y viabilidad celular en cultivos primarios de astrocitos tratados con OMVs de <i>H. pylori</i> .....	55
<b>Figura 10.</b> OMVs de <i>H. pylori</i> 60190 induce el aumento de marcadores de reactividad en cultivo primario de astrocitos.....	56
<b>Figura 11.</b> Localización subcelular de Vimentina, GFAP y Conexina 43 en astrocitos primarios tratados con OMVs de <i>H. pylori</i> .....	57
<b>Figura 12.</b> Thy-1 induce migración celular en cultivos primarios de astrocitos reactivos por OMVs de <i>H. pylori in vitro</i> .....	59
<b>Figura 13.</b> Efecto de las OMVs de <i>H. pylori</i> sobre los niveles de la subunidad p65 total y activo (pS536) de NF- $\kappa$ B en astrocitos.....	63
<b>Figura 14.</b> Translocación nuclear del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en astrocitos DITNC1 ATCC tratados con TNF.....	64
<b>Figura 15.</b> OMVs de <i>H. pylori</i> aumentan la translocación nuclear del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en astrocitos primarios.....	65
<b>Figura 16.</b> OMVs de <i>H. pylori</i> aumentan la actividad de NF- $\kappa$ B en astrocitos primarios.....	66
<b>Figura 17.</b> El aumento de Integrina $\beta_3$ y Conexina 43 inducido por OMVs de <i>H. pylori</i> requiere de la activación de NF- $\kappa$ B en astrocitos primarios:.....	67

<b>Figura 18.</b> Astrocitos pretratados con OMVs de <i>H. pylori</i> promueven la síntesis y liberación de IFN- $\gamma$ al medio extracelular.....	69
<b>Figura 19.</b> Efecto sobre el largo de los procesos neuronales de células CAD cocultivadas sobre astrocitos DITNC1 pretratados con las OMVs de <i>H. pylori</i> .....	72
<b>Figura 20.</b> Efecto del tratamiento con las OMVs de <i>H. pylori</i> sobre el largo de los procesos neuronales y viabilidad de células CAD diferenciadas.....	77
<b>Figura 21.</b> Medio condicionado obtenido de cultivos primarios de astrocitos pretratados con OMVs de <i>H. pylori</i> promueve activación de Caspasa 3 y muerte neuronas CAD diferenciadas.....	79
<b>Figura 22.</b> Las OMVs de <i>H. pylori</i> llegan al cerebro en un modelo murino <i>in vivo</i> .....	84
<b>Figura 23.</b> Cuantificación del LPS en las OMVs de <i>H. pylori</i> .....	85
<b>Figura 24.</b> Las OMVs de <i>H. pylori</i> inducen reactividad de astrocito y daño neuronal en un modelo murino <i>in vivo</i> .....	86
<b>Figura 25.</b> Modelo molecular propuesto.....	99

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> El listado de reactivos utilizados.....	20
<b>Tabla 2.</b> Los anticuerpos primarios y las diluciones utilizados en los estudios de Western blot y en Inmunofluorescencia indirecta.....	32
<b>Tabla 3.</b> El resumen de anticuerpos secundarios utilizados.....	32
<b>Tabla 4.</b> Las proteínas únicamente presentes en las OMVs de <i>H.pylori</i> mediante LC-ESI-MS-MS.....	48

## Abreviaturas

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ATP	Adenosin tri-fosfato.
BSA	Albúmina de suero bovino
PBS	Amortiguador de fosfato salino.
PBS	Amortiguador de fosfato salino.
ANOVA	Análisis de varianza.
BHE	Barrera hematoencefálica
SDS	Dodecil sulfato de Sodio.
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo.
IKK	IkappaB kinase
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
JAK	Janus kinase
LPS	Lipopolisacárido
DMEM	Medio Dubelco modificado.
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappaB
OCT	Óptima temperatura de corte compuesto
OMVs	Outer Membrane Vesicles
SNC	Sistema nervioso central.
HBSS	Solución salina balanceada de Hank.
SFB	Suero fetal bovino.
TLR	Toll-like receptors
TNF	Tumor necrosis factor

## Resumen

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infecta el estómago del 50% de la población mundial, aumentando la incidencia de patologías extragástricas, incluidas las enfermedades degenerativas. Los astrocitos, células macrogliales del cerebro, están implicados en la progresión de tales enfermedades porque cuando se exponen a un entorno inflamatorio se vuelven reactivos y neurotóxicos. A pesar de que hay estudios describiendo otras bacterias que llegan al cerebro en forma de pequeñas vesículas de la membrana externa (OMVs), no se sabe si las OMVs de *H. pylori* podrían llegar al sistema nervioso central (SNC). Aquí, probamos si la disponibilidad sistémica de OMVs de *H. pylori* afecta el cerebro activando a los astrocitos y dañando a las neuronas *in vitro* e *in vivo*. Para ello, aislamos OMVs de *H. pylori* 60190, y establecimos dosis/tiempo de tratamiento necesarios para la inducción de la reactividad de astrocitos. También evaluamos un posible mecanismo dependiente de NF- $\kappa$ B sobre la expresión de marcadores de reactividad en respuesta a las OMVs usando análisis por inmunoblots. La presencia de citoquinas proinflamatorias en el medio acondicionado de astrocitos tratados con OMVs (MCA) se ensayó usando el kit MILLIPLEX. Se probó, además, el efecto del MCA sobre la viabilidad de células tipo neuronas, la línea celular CAD. Adicionalmente, se marcaron las OMVs con DiR y se inyectaron en la vena de la cola de ratones BALB/c para evaluar la biodistribución de DiR-OMV en el cerebro. La expresión del marcador de reactividad de astrocitos GFAP y los marcadores de morfología neuronal Tubulina  $\beta$ III y Thy-1 se evaluaron *ex vivo* mediante inmunofluorescencia de secciones de tejido coronal. Encontramos que las OMVs indujeron la reactividad de los astrocitos y la liberación de IFN- $\gamma$  al medio extracelular

mediante un mecanismo que implicaba la actividad de NF- $\kappa$ B. Finalmente, probamos que el MCA contenía factores neurotóxicos que inhibían el crecimiento de neuritas y dañaban a las neuronas *in vitro*. Además, encontramos OMVs de *H. pylori* en el cerebro de ratones inyectados por la vena de la cola, y la presencia de OMVs en el cerebro coincidió con la reactividad de los astrocitos y el daño neuronal. Por lo tanto, en este trabajo de tesis proporcionamos evidencia de que las OMVs de *H. pylori* llegan al cerebro alterando la función neuronal y de los astrocitos *in vivo*. Los efectos de las OMVs sobre los astrocitos se confirmaron *in vitro* y se describen como dependientes de NF- $\kappa$ B/IFN- $\gamma$ . Estos hallazgos ayudan a aclarar cómo un patógeno gástrico como *H. pylori* puede alterar la homeostasis cerebral.

## Abstract

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infects the stomach of 50% of the world's population, increasing the incidence of extragastric pathologies, including degenerative diseases. Astrocytes, macroglial cells of the brain, are involved in the progression of such diseases because they become reactive and neurotoxic when exposed to an inflammatory environment. Although there are studies describing other bacteria that reach the brain in the form of small outer membrane vesicles (OMVs), it is unknown whether the OMVs from *H. pylori* could reach the central nervous system (CNS). Here, we tested whether the systemic availability of *H. pylori* OMVs affects the brain by activating astrocytes and damaging neurons *in vitro* and *in vivo*. To this end, we isolated OMVs from *H. pylori* 60190 and established the dose/time of treatment required for the induction of astrocyte reactivity. We also evaluated a possible NF- $\kappa$ B-dependent mechanism on the expression of reactivity markers in response to OMVs by using immunoblot analysis. The presence of pro-inflammatory cytokines in the conditioned medium of astrocytes treated with OMVs (ACM) was assessed using the MILLIPLEX kit. The effect of ACM on the viability of neuron-like cells, the CAD cell line, was also tested. Additionally, OMVs were labeled with DiR and injected into the tail vein of BALB/c mice. DiR-OMV biodistribution in the brain was monitored. The expression of the astrocyte reactivity marker GFAP and the neuronal morphology markers Tubulin  $\beta$ III and Thy-1 were evaluated *ex vivo* by immunofluorescence of coronal tissue sections. We found that OMVs induced astrocyte reactivity and IFN- $\gamma$  release to the extracellular medium by involving NF- $\kappa$ B activity. Finally, we proved that ACM contained neurotoxic factors that inhibited neurite outgrowth and damaged neurons.

Furthermore, we found *H. pylori* OMVs in the brain of mice injected through the tail vein, and the presence of OMVs in the brain coincided with astrocyte reactivity and neuronal damage. Therefore, in this thesis work, we prove that *H. pylori* OMVs reach the brain by altering astrocyte and neuronal function *in vivo*. The effects of OMVs on astrocytes were confirmed *in vitro* and described as dependent on NF- $\kappa$ B/IFN- $\gamma$ . These findings help clarifying how a gastric pathogen like *H. pylori* could alter brain homeostasis.

# 1 Introducción

La infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) puede tener consecuencias extra-gástricas y llevar al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas en el sistema nervioso central (SNC) (Franceschi et al., 2015). Sin embargo, en la actualidad no es claro cómo esta bacteria puede influenciar en patologías tan distantes del nicho gástrico de colonización. Algunas hipótesis incluyen una vía de acceso rápida al SNC mediante los axones que inervan el sistema gastrointestinal del sistema entérico y dos vías que favorecen la permeabilidad/disfunción de la Barrera Hemato Encefálica (BHE): i) vía oro-nasal, y ii) vía a través del sistema circulatorio. En esta segunda posibilidad, la bacteria infectaría a los monocitos evadiendo el sistema inmune como una especie de caballo de troya (Doulberis et al., 2018). Otra posibilidad emergente, es la acción de esta bacteria a distancia a través de la liberación de vesículas de membrana externa (OMVs, del inglés Outer Membrane Vesicles). Por ejemplo, se ha reportado que OMVs provenientes de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), otra bacteria Gram negativa vinculada al desarrollo de algún tipo de enfermedad neurodegenerativa, logran atravesar la BHE en un modelo murino (Han et al., 2019). No obstante, aún no existen reportes que vinculen las OMVs de *H. pylori* con fenómenos neurodegenerativos en el SNC.

Por otro lado, los astrocitos, una de las células gliales más abundantes del SNC, ganan cada vez más relevancia en los contextos de daño, infección, y enfermedades neurodegenerativas dado que adquieren un fenotipo denominado “reactivo” donde sufren modificaciones morfológicas y funcionales (Escartin et al., 2019, 2021). Los

astrocitos participan, entre otras cosas, en la formación de la BHE, la función neuronal, y homeostasis del SNC. Una pregunta aun no resuelta, es sí las OMVs de *H. pylori* llegan al cerebro e inducen la reactividad de los astrocitos y por esta vía dañen a las neuronas. Por tanto, el propósito de esta tesis fue estudiar si las OMVs de *H. pylori* inducen astrogliosis y dilucidar el mecanismo molecular por el cual la provocarían, además de determinar cómo estas alteraciones afectan la inhibición de crecimiento y la retracción de procesos neuronales *in vitro*.

### **1.1- *H. pylori* y enfermedades neurodegenerativas**

*H. pylori* es una bacteria Gram negativa, microaerofílica (Ndip et al., 2003) que coloniza el epitelio gástrico de aproximadamente el 50% de la población mundial, pero sólo el 15% de los casos desarrolla niveles graves de insuficiencia gástrica y/o duodenal (Blaser, 2008; Brenner et al., 2009). En ausencia de tratamiento de erradicación, la colonización de esta bacteria puede permanecer toda la vida (Cellini, 2014). Dentro de las patologías que han sido asociadas a la infección por *H. pylori*, podemos mencionar el desarrollo de la gastritis crónica, úlcera péptica, adenocarcinoma y linfoma gástrico MALT (MALT del inglés Mucosa Associated Lymphoid Tissue) (Aebischer et al., 2010; Danesh, 1999). Sin embargo, existen cada vez más antecedentes que dan cuenta de la relación directa entre la infección por *H. pylori* y varias patologías extra-gástricas (cardíacas, dermatológicas, hepáticas, autoinmune, oculares, etc.) (Franceschi et al., 2015) incluyendo algunas enfermedades neurodegenerativas (Doulberis et al., 2018; Franceschi et al., 2015). Por ejemplo, algunas publicaciones han reportado independientemente, que la prevalencia de la infección por *H. pylori* es alta

en pacientes que desarrollan la enfermedad de Parkinson (Dobbs et al., 2000, 2012; Hashim et al., 2014; Lee et al., 2008), relacionándose con síntomas graves (Tan et al., 2015) y afectando con más frecuencia a los adultos mayores de 80 años (Weller et al., 2005). Así también, la infección por *H. pylori* ha sido asociada con un aumento en la prevalencia a desarrollar la enfermedad de Alzheimer (J. Kountouras et al., 2007). En esta patología neurodegenerativa, se ha observado un aumento de los niveles de anticuerpos anti-*H. pylori* en muestras de suero y fluido cerebroespinal de los pacientes (Kountouras et al., 2009). Asimismo, la erradicación del patógeno del estómago, con tratamiento antibiótico incrementa en 5 años la supervivencia de los pacientes estudiados (J Kountouras et al., 2010). Por otro lado, en muestras de cerebro obtenidos post-mortem, mediante secuenciación del ARNr 16S, se encontró un aumento en el porcentaje de lecturas para distintos géneros bacterianos, entre ellos a las proteobacterias, al cual pertenece *H. pylori* (Emery et al., 2017). Estos hallazgos sugieren algún tipo de etiopatogenia (Kountouras et al. 2010) entre la infección por *H. pylori* y algunas enfermedades neurodegenerativas.

## **1.2- Las OMVs de *H. pylori* e inflamación sistémica**

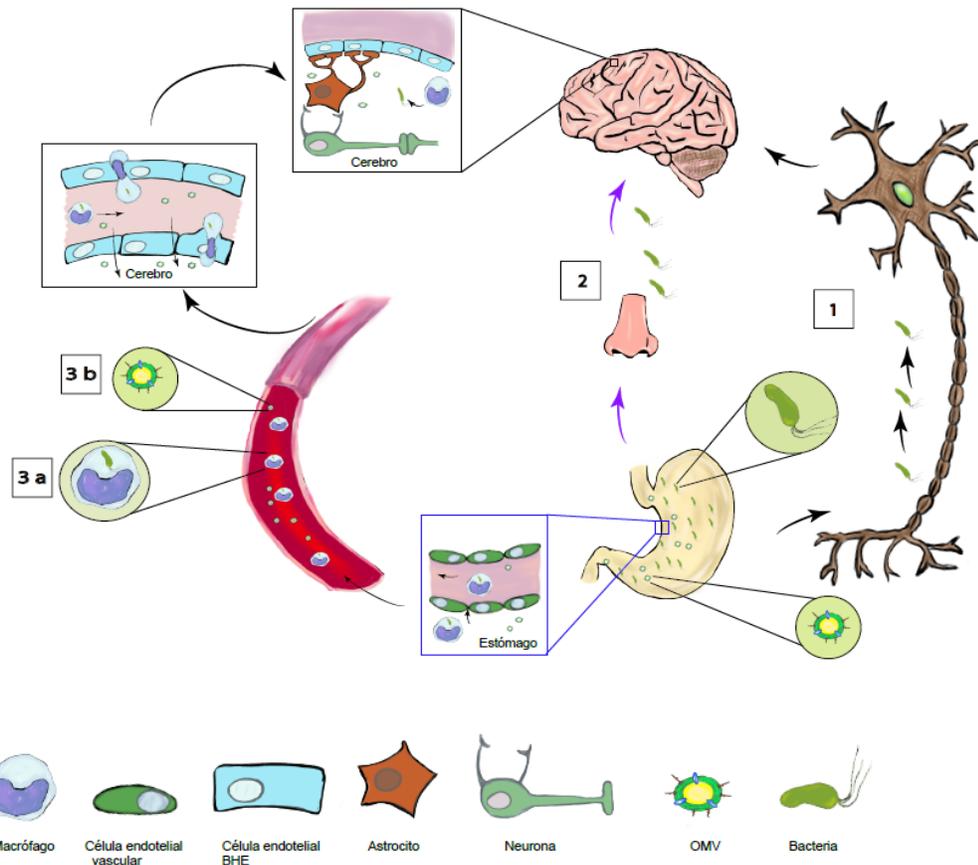
*H. pylori* es un patógeno que coloniza principalmente el epitelio gástrico (Hooi et al., 2017) y, logra sobrevivir en otros entornos biológicos, en consecuencia, se considera un factor de riesgo de contagio latente. Por ejemplo, hay reportes de *H. pylori* en la placa dental, en moscas domésticas y suministros de agua contaminados por aguas residuales que contienen líquidos o heces de personas infectadas (Cellini, 2014; Sasaki et al., 1999). Hasta ahora, existen evidencias epidemiológicas sobre la relación entre la

infección por *H. pylori* y las enfermedades neurodegenerativas (Doulberis et al., 2018); sin embargo, aún no se han establecido los mecanismos celulares y moleculares que puedan explicar tal asociación. Aunque existen varias hipótesis que explican cómo *H. pylori* podría llegar al cerebro, promover inflamación, y predisponer a algún tipo de enfermedad neurodegenerativa (Doulberis et al., 2018), una acción a distancia de OMVs, es posible (Figs. 1 y 2), dado que potencialmente podrían atravesar el epitelio gástrico mediante distintos mecanismos celulares/moleculares y llegar al cerebro vía circulación periférica (Fig. 2) (Stentz et al., 2018).

Las OMVs son liberadas por la bacteria durante su crecimiento e inducidas por diversos factores de estrés (Olofsson et al., 2010). Presentan un tamaño de 20-300 nm y portan varios componentes de la membrana externa involucrados en la respuesta inflamatoria (Fig. 2), incluyendo Lipopolisacárido (LPS) y un conjunto amplio de proteínas importantes en la colonización, adherencia y virulencia, tales como son las subunidades de la Ureasa (UreA y UreB), la citotoxina vacuolizante VacA, la oncoproteína CagA, y las adhesinas BabA, SabA (Anand et al., 2016). También se ha encontrado proteasas como HtrA, que degrada varias proteínas que participan en la unión célula-célula como la E-cadherina, Claudinas y las proteínas de la matriz extracelular como Fibronectina en las células epiteliales gástricas facilitando la trans migración tanto de la bacteria como de las OMVs (Wessler et al., 2017). Además, se ha reportado que las OMVs provenientes de la especie *Helicobacter suis* contienen la enzima gama glutamil-transpeptidasa (GGT), lo cual promueve la apoptosis de las células gástricas y afecta la función de los linfocitos presentes en la mucosa, inhibiendo

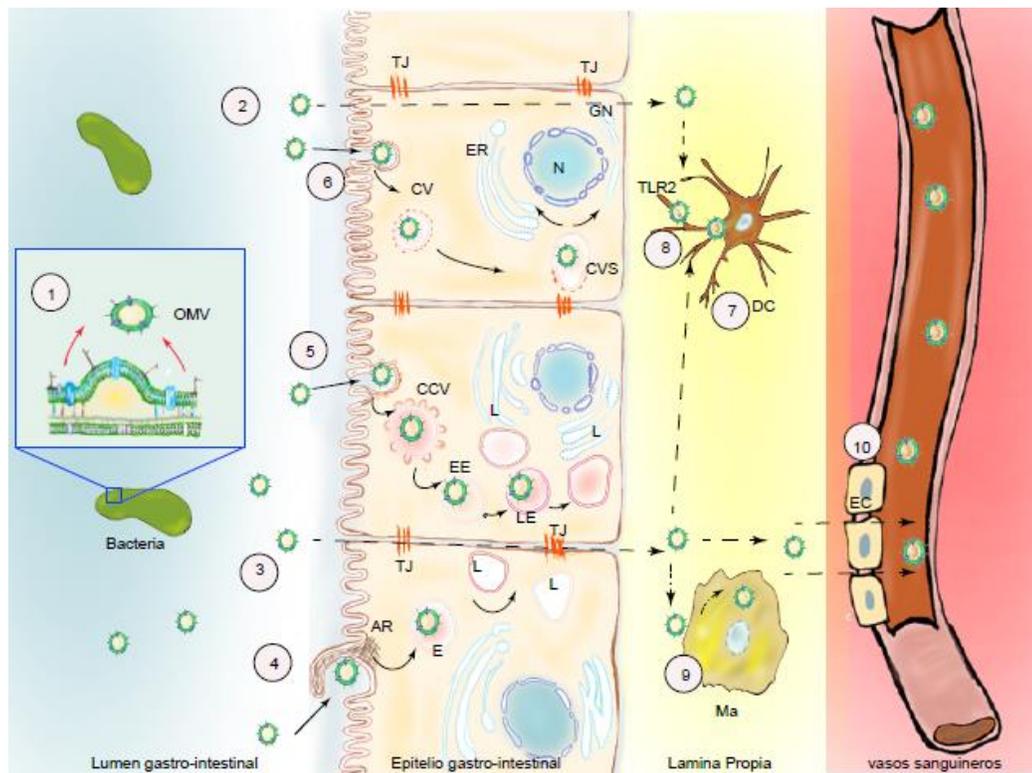
así su proliferación (Franzini et al., 2014; Zhang et al., 2013). Por lo demás, se ha logrado encontrar mediante microscopía electrónica de transmisión, OMVs de otras bacterias Gram negativas en el epitelio gástrico (Matsuo et al., 2017), así como también en el líquido cefalorraquídeo (Mirlashari et al., 2002) y suero plasmático (Brandtzaeg et al., 1992) lo que sugiere, la participación de OMVs en la patogénesis de una amplia gama de enfermedades como la periodontitis, gastritis, meningitis, sepsis, enfermedades cardiovasculares y pulmonares (Shah et al., 2012). Sin embargo, se desconocen los detalles de los mecanismos celulares y moleculares implicados en la inflamación asociada *in vivo* (Kaparakis-Liaskos & Ferrero, 2015). Además, la inyección intravenosa diaria y durante 7 días de sobrenadantes filtrados de cultivos líquidos de *H. pylori* en ratas, alteran el aprendizaje espacial y la memoria, eventos que han sido asociados al aumento del péptido A $\beta$ 42 en corteza e hipocampo *in vivo*. Asimismo, el tratamiento con sobrenadantes filtrados de cultivos líquidos de *H. pylori* en neuronas N2a/APP inducen aumento en la producción del péptido A $\beta$ 42 mediado por la presenilina 2 (PSEN2) *in vitro*, sugiriendo que existen elementos que pueden ser liberados por la bacteria *H. pylori* y que podrían causar alteraciones a nivel cerebral (Wang et al., 2014). Por otro lado, como mencionado anteriormente, un estudio reciente mostró que OMVs provenientes de la bacteria *Aa* marcadas con un fluoróforo lipídico e inyectadas en el torrente sanguíneo de ratones logran llegar exitosamente al cerebro después de atravesar la BHE, aumentando la expresión de TNF (Factor de Necrosis Tumoral), en el cerebro del roedor. Además, se encontró que las OMVs *Aa* modulan la expresión de TNF, principalmente a través de las vías de señalización TLR8 y nuclear

factor kappa B (NF- $\kappa$ B) (Han et al., 2019). Igualmente, *H. pylori* ha sido asociada a la predisposición de desarrollar algún tipo de enfermedad neurodegenerativa; no obstante, no existen reportes de la presencia ni las consecuencias de OMVs de *H. pylori* en el SNC.



**Figura 1. Representación esquemática de los posibles mecanismos de entrada de *H. pylori* al SNC: 1) A través de los axones del sistema entérico, 2) Vía oro-nasal olfatoria y 3) Vía circulación sanguínea.**

Las principales hipótesis indican que *H. pylori* podría acceder al cerebro principalmente a través de: **(1)** Vía rápida a través de axones el tracto gastrointestinal hasta el cerebro que conduce a la neurodegeneración. **(2)** Vía oral-nasal olfatoria: Esta vía es reconocida por ser un portal directo al cerebro para patógenos bacterianos. Hay evidencia que la cavidad oral puede actuar como reservorio permanente de *H. pylori* en la placa dental, saliva, lengua, tejido amigdalario, mucosa oral, entre otros. Incluso puede desplazarse al ojo por la cavidad nasal. **(3)** Vía circulación sanguínea, **(3a)** Monocitos: La bacteria puede permanecer dentro de monocitos evadiendo el sistema inmune, atravesar la BHE y finalmente llegar al SNC, **(3b)** OMVs: Se propone que las OMVs pudiesen atravesar el epitelio gástrico, llegando al cerebro y atravesando la BHE, mecanismo similar a lo que ocurre en la bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Imagen modificada de (Doulberis et al., 2018).



**Figura 2. Ilustración esquemática del proceso de liberación de OMVs desde una bacteria Gram negativa y sus posibles rutas de viaje desde el microbiota gastro-intestinal hasta la circulación sanguínea.**

En el esquema se indican las vías enumeradas con las etapas de liberación de las OMVs y los medios por los cuales las OMVs lograrían atravesar desde el lumen intestinal, la barrera epitelial accediendo a las células inmunes subyacentes, luego acceder al sistema circulatorio logrando acceder a otros sistemas del organismo. (1) Liberación de OMVs desde bacteria Gram negativa. (2) Migración transcelular. (3) Migración paracelular. (4) Macropinocitosis. (5) Endocitosis mediada por clatrina. (6) Endocitosis mediada por caveolinas. (7). Internalización de OMVs vía TLR2 en células dendríticas. (8) Migración en células dendríticas. (9) Internalización de OMVs en macrófagos. (10) Migración endotelial paracelular. OMVs, Outer Membrane Vesicles; TJ, uniones estrechas; AR, Remodelamiento de actina; ER, Retículo Endoplásmico; N, núcleo; GN, Aparato de Golgi; E, endosoma; L, lisosoma; CCV, Vesículas recubiertas de clatrina; EE, endosoma temprano; LE, Endosoma Tardío; CV, Vesícula Caveolar; CS, caveosome; DC, Células Dendríticas; Ma, Macrófagos; EC, Células endotelial. Modificada de (Stentz et al., 2018).

### **1.3- Neuroinflamación asociada a la infección por *H. pylori***

Estudios recientes indican que ratones infectados con *Helicobacter suis* o *Helicobacter felis*, ambas colonizadoras del epitelio gástrico presentan neuroinflamación luego de 1 a 18 meses post infección con estos patógenos, respectivamente (Albaret et al., 2020; Gorlé et al., 2018). Además, en muestras de cerebro provenientes de pacientes post-mortem con Alzheimer se ha encontrado la presencia de LPS, componente fundamental de la membrana externa de las bacterias Gram negativas (valores de 7 a 21 veces mayores que el control) en el tejido de neocorteza e hipocampo (Zhao et al., 2017). Estos hallazgos sugieren que los efectos de estos patógenos no sólo estarían restringidos al tracto gastrointestinal (Doulberis et al., 2018). Interesantemente, otros componentes de las bacterias, como los péptidos N-formilados producidos por la degradación de las bacterias en el organismo podrían también jugar un papel importante en la respuesta proinflamatoria en el hospedero (Mollica et al., 2012). Por ejemplo, se ha descrito que el péptido 2-20 de la proteína ribosomal L124 de *H. pylori* incubado con células gástricas MKN-28 es capaz de modular 77 genes, 65 de los cuales se encuentran descritos en la base de datos AlzBase de Alzheimer, tales como: APP, APOE, PSEN1 y PSEN2, y de los cuales 30 pertenecen a vías de inflamación (Felice et al., 2017). Estos antecedentes nos permiten conectar y explicar eventos moleculares que ocurren en pacientes con enfermedad de Alzheimer a infecciones bacterianas, ampliando el estudio de las enfermedades neurológicas (Doulberis et al., 2018).

La infección bacteriana en el SNC es una afección grave, potencialmente mortal y que puede llevar a déficits neurológicos (Robertson et al., 2019). Hasta la fecha, hay varias hipótesis que explicarían el efecto neurotóxico asociado a los cambios inmunes e inflamatorios inducidos por la infección por *H. pylori*: i) en el parkinsonismo, la infección crónica por *H. pylori* se encuentra asociada al daño de neuronas dopaminérgicas inducido por el aumento de ciertas citoquinas (Dobbs et al., 1999); ii) en Alzheimer, la vía de infección oro-nasal actuaría como reservorio directo de la bacteria (Payão, 2016) causando neurodegeneración y disfunción olfativa que afecta al 90% de los pacientes diagnosticados con esta patología (Attems et al., 2014); iii) el aumento de mediadores inflamatorios como citoquinas y quimioquinas también descritos en Parkinson, Alzheimer y glaucoma pueden inducir aumento en la permeabilidad de la BHE y/o Barrera Hemato Ocular (BHO) favoreciendo la neuroinflamación (Deretzi et al., 2011; Franceschi et al., 2015). Una de las citoquinas proinflamatorias que participa es TNF, la que se encuentra aumentada en la sangre de pacientes con Alzheimer diagnosticados con *H. pylori* (CagA-positivo) (Perri, 1999). TNF altera la permeabilidad de la BHE mediante la activación de la Metaloproteinasa de matriz extracelular 9 (MMP-9) mediada por la señalización de NF- $\kappa$ B en las células endoteliales que recubren las paredes de los vasos sanguíneos, neuronas y astrocitos del SNC *in vitro* e *in vivo* (Chou et al., 2010; Tsuge et al., 2010) y. Además, la hipótesis *iv*) es que los monocitos activados e infectados por *H. pylori* desencadenan el desarrollo y progresión de la enfermedad.

#### 1.4- Astrocitos reactivos

Los astrocitos son las células gliales más abundantes en el SNC y son esenciales para la homeostasis cerebral, cumpliendo un importante papel en el apoyo a las funciones neuronales. Los astrocitos modulan la transmisión sináptica, regulan el equilibrio ácido-base, liberan sustratos energéticos y/o factores tróficos (Sofroniew, 2015). Gracias a su ubicación estratégica y su estrecho contacto con las células residentes en el SNC (neuronas, pericitos, microglía, oligodendrocitos y otros astrocitos) y los vasos sanguíneos, los astrocitos participan en el mantenimiento y la permeabilidad de la BHE. Por otro lado, evidencias recientes indican que los astrocitos regulan las respuestas inmunes innatas y adaptativas en diversas condiciones patológicas del SNC (Geyer et al., 2019). De modo que cumplen un papel importante en este contexto, dado que al ser expuestos a moléculas proinflamatorias (tales como TNF y IL-1 $\beta$ ), como consecuencia de algún daño, la aparición de alguna enfermedad neurodegenerativa, por infección bacteriana (LPS) (Hung et al., 2016), enfermedades neurodegenerativas como en Alzheimer o Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), los astrocitos se reprograman alterando su expresión génica, cambiando su morfología, y sobre-expresando algunas proteínas. Estas proteínas incluyen la Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS), Conexina 43, Síndecan-4, Vimentina, Integrina  $\alpha_v\beta_3$  y la proteína acídica fibrilar glial (GFAP) (Lagos-Cabré et al., 2017; Pekny & Pekna, 2014). A estos cambios morfológicos y otros, se le denomina reactividad o astrogliosis y en el contexto de neuroinflamación y neurodegeneración presentan una tasa de proliferación baja, con valores que van desde 0-3% en Alzheimer, 7% en el ELA y 0% en infección con LPS *in*

*vivo* y *en vitro* (Sofroniew & Vinters, 2010). De este modo, los astrocitos alteran sus funciones fisiológicas desregulando la homeostasis que ellos mantienen normalmente en el cerebro. Estudios de nuestro laboratorio describen que la línea celular de astrocitos basalmente reactivos DITNC1 y astrocitos primarios tratados con TNF responden a la glicoproteína Thy-1 presente en la membrana de la línea celular tipo-neurona CAD, o cuando es agregada como proteína de fusión Thy-1-Fc (Leyton et al., 2001). Los cambios inducidos por Thy-1 incluyen cambios morfológicos, cambios en el citoesqueleto de actina, agregación de la Integrina  $\alpha_v\beta_3$  en la membrana, reclutamiento de Vinculina, Paxilina y la quinasa de adhesión focal (FAK, focal adhesion kinase), fosforilación de FAK y p130Cas, activación de RhoA y ROCK (Avalos et al., 2004, 2009; Lagos-Cabré et al., 2017; Leyton et al., 2001). Los cambios morfológicos de los astrocitos estimulados con Thy-1 también involucran un aumento del número y tamaño de las adhesiones focales (Cardenas et al., 2014), un activo recambio de estos puntos de adhesión, mediado por el reclutamiento de PAR3 a la membrana por unión a Síndecan-4 y activación de Tiam-1 (Rac1GEF) (Valdivia et al., 2020). Estas alteraciones en los astrocitos promueven su migración a través de la activación de FAK, fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) y la GTPasa Rac 1 (Henriquez et al., 2011; Kong et al., 2013; Lagos-Cabré et al., 2017). Estos cambios solo son posibles en astrogliosis, donde el astrocito adquiere un fenotipo denominado “astrocito reactivo”, dado el aumento de Integrina  $\alpha_v\beta_3$  y Síndecan-4 en la membrana a los cuales se une Thy-1. También hemos descrito que esta interacción de Thy-1 con sus receptores en el astrocito es responsable de la inhibición de la regeneración axonal (Burgos-Bravo et al., 2020; Maldonado et al.,

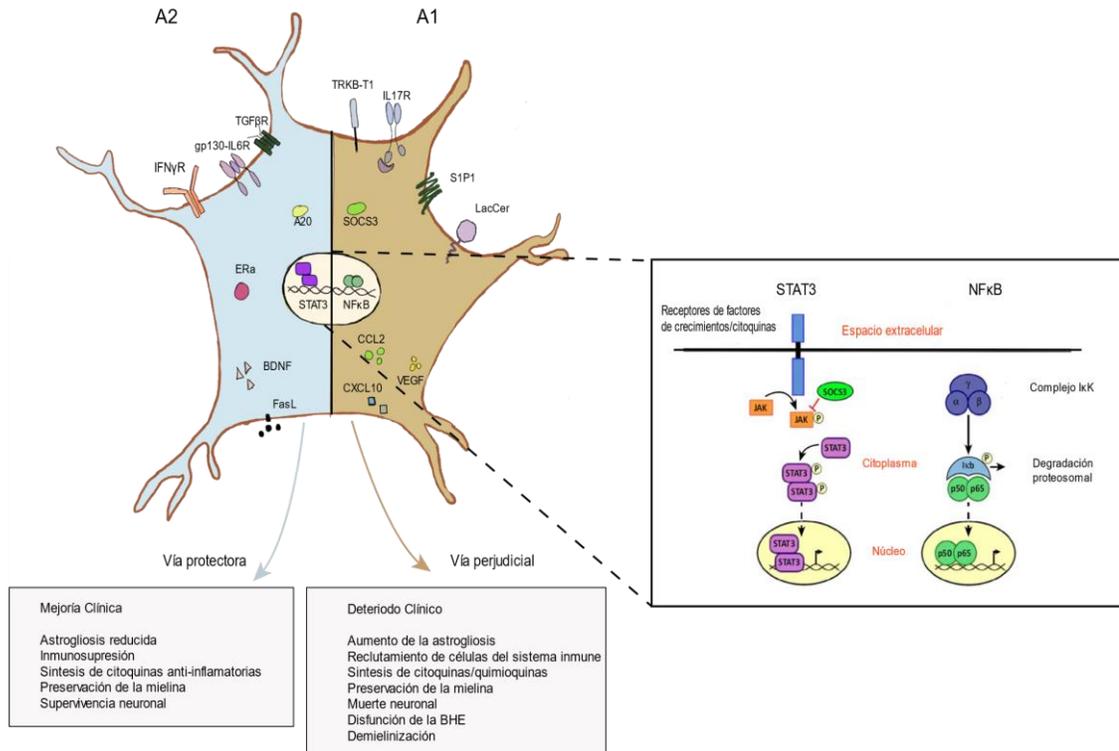
2017; Pekny & Pekna, 2014). Utilizando la línea neuronal CAD, y ensayos de cocultivos con astrocitos DITNC1, nuestro laboratorio ha determinado que la interacción entre la Integrina  $\alpha_v\beta_3$  astrocítica con Thy-1 neuronal actúa como una señal inhibitoria para la extensión de neuritas (Herrera-Molina et al., 2012). En este mismo estudio, se estableció que la proteína de fusión Integrina  $\beta_3$ -Fc es capaz de promover la retracción de los procesos neuronales en cultivos primarios de neuronas corticales y en células CAD, fenómeno que fue acompañado de un incremento en el agrupamiento y una disminución en la movilidad de las moléculas de Thy-1 en la membrana neuronal (Herrera-Molina et al., 2012, 2013), es decir, involucra la multimerización de Thy-1. Además, este *cluster* de Thy-1 en la membrana forma un complejo con la quinasa Csk (c-terminal Src kinase) y la proteína de unión a Csk, CPB (Csk binding protein) (Maldonado et al., 2017). Este complejo excluye a Src y la inactiva mediante fosforilación en la tirosina 527, lo que resulta en una disminución en la actividad de RhoGAP, y la consecuente activación de la vía RhoA/ROCK, y fosforilación de las proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina, como LIMK y cofilina (Maldonado et al., 2017). Específicamente, en respuesta a la Integrina  $\alpha_v\beta_3$ , la vía de señalización activada en neuronas induce la contracción del citoesqueleto de actina induciendo la inhibición del crecimiento y retracción de procesos neuronales (Herrera-Molina et al., 2012)

### **1.5- Astrocitos reactivos y respuesta inflamatoria mediada por NF- $\kappa$ B**

La reactividad de los astrocitos puede dar lugar a dos fenotipos distintos de células denominadas "astrocito A1: destructivo" y "astrocito A2: protector"(Zamanian

et al., 2012). Por un lado, se ha descrito que el fenotipo A2 puede ser inducido por isquemia y mediado por la activación de factor de transcripción STAT3, mientras que, en condiciones proinflamatorias se induce el subtipo de astrocitos A1 mediante la activación de NF- $\kappa$ B. Los astrocitos A1, son fuertemente neurotóxicos (Liddelow et al., 2017), poseen menos capacidad para promover la formación de nuevas sinapsis y provocan una disminución de la función excitatoria de las neuronas del SNC, además de otros cambios transcripcionales y funcionales que contribuyen al deterioro observado en algunas enfermedades neurodegenerativas, incluidas la enfermedad de Alzheimer, Huntington, Parkinson, ELA y esclerosis múltiple (Li et al., 2019). Cuando se activa NF- $\kappa$ B, éste favorece la transcripción de moléculas importantes en la amplificación de los procesos inflamatorios y neurodegenerativos (Tak & Firestein, 2001). Por ejemplo, para evaluar la participación de este factor en astrocitos, se ha generado ratones transgénicos que expresan una dominante negativo (dn) del I $\kappa$ B $\alpha$  (inhibidor de NF- $\kappa$ B) bajo el control del promotor de GFAP. La dominante negativa de I $\kappa$ B $\alpha$ , evita la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ , su degradación y permite la unión constitutiva de NF- $\kappa$ B (p50/p65)-I $\kappa$ B $\alpha$  en el citoplasma evitando la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B (Brambilla et al., 2014) (Fig 3). Esta inactivación de NF- $\kappa$ B disminuye la gravedad de enfermedades inflamatorias, en distintos modelos murinos, como por ejemplo en la encefalomiелitis, lesión medula espinal, lesión nerviosa, daño cerebral e isquemia retiniana (Colombo & Farina, 2016). Asimismo, induce la disminución de quimioquinas y estrés oxidativo dentro del sistema nervioso lesionado (Colombo & Farina, 2016), apoyando así la hipótesis de que la regulación de NF- $\kappa$ B en astrocitos en condiciones

proinflamatorias y las vías oxidativas son fundamentales para la neuroinflamación y la neurotoxicidad. Estos antecedentes resaltan la importancia de estudiar e inhibir la señalización de NF- $\kappa$ B como una potencial terapia farmacológica o genética en el contexto neurodegenerativo (Fig. 3).

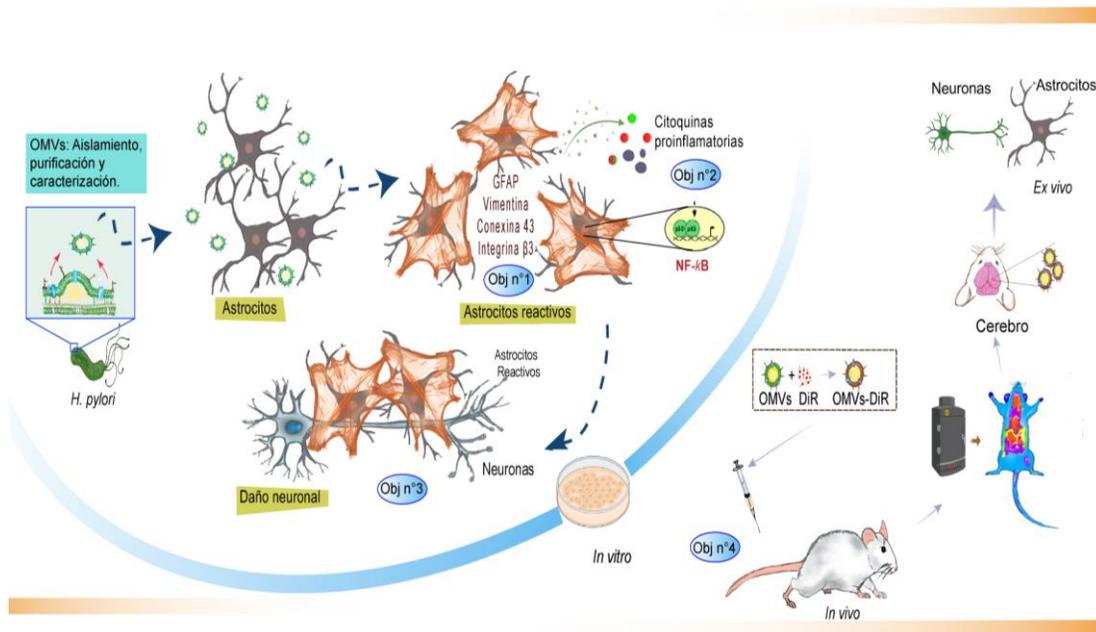


**Figura 3. Respuesta celular de astrocitos A2 y A1 y sus efectos clínicos.**

La figura ilustra las diferentes proteínas involucradas en las dos vías de activación de astrocitos, la vía protectora (A2) y la vía perjudicial (A1), junto a los cuadros clínicos observados en enfermedades neurodegenerativas. El recuadro destaca los detalles en las vías de señalización STAT3 y NF- $\kappa$ B. **Señalización de STAT3:** STAT3 es un miembro de la familia STAT de factores de transcripción citoplásmicos que en presencia de citoquinas o factores de crecimiento son fosforilados por una tirosina quinasa específica de las Janus (JAK) asociada a un receptor de citoquinas. La fosforilación promueve la formación de dímeros STAT, y posterior translocación al núcleo. La modulación de esta vía implica diferentes mecanismos, incluida la inhibición directa de la actividad de JAK por SOCS3 (supresor de la señalización de citoquinas 3). **Señalización de NF- $\kappa$ B:** NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción compuesto por las subunidades p50 y p65. Este dímero, en ausencia de estímulo queda atrapado en el citoplasma unido al inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$ . Por otro lado, la activación de la vía de señalización activa el complejo I $\kappa$ B quinasa (IKK) que fosforila a I $\kappa$ B $\alpha$  e induce su ubiquitinación/degradación proteasomal favoreciendo la liberación del dímero y permitiendo la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B. Este factor de transcripción participa en la expresión compleja de genes que codifican para citoquinas/quimioquinas, proteínas anti-apoptóticas, moléculas de adhesión celular, GFAP, iNOS y factores neurotróficos entre otros. Abreviaturas: BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro; CXCL2, Ligando de quimioquina 2; CXCL10, Ligando de quimioquina 10, ER $\alpha$ : Receptor de estrógeno  $\alpha$ ; IFN- $\gamma$ R, Receptor de IFN  $\gamma$ ; I $\kappa$ B, inhibidor del factor nuclear  $\kappa$ B; IKK, complejo de quinasa I $\kappa$ B; IL-17R, receptor de interleuquina 17; JAK, quinasa de Janus; NF- $\kappa$ B, factor nuclear *kappa* B; S1P1, Receptor 1 de esfingosina 1-fosfato; SOCS3, supresor de la señalización de citoquinas 3; STAT3, Transductor de señal y activador de transcripción 3; TGF $\beta$ R, Receptor del factor de crecimiento transformante  $\beta$ ; TRKB-T1, Receptor quinasa B de tropomiosina truncada; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular [Adaptado de (Colombo & Farina, 2016) ].

En resumen, existe evidencias en la literatura que relacionan la infección de *H. pylori* con enfermedades neurodegenerativas, y el efecto que tendrían las OMVs de bacterias Gram negativas en el SNC. Sin embargo, todavía **no hay reportes de un potencial vínculo entre las OMVs de *H. pylori* y la inducción de reactividad de astrocitos.** Además, **se desconoce el papel del factor NF- $\kappa$ B en tal proceso y del efecto que producirían, estos cambios en los astrocitos, sobre las neuronas.**

El conjunto de estas observaciones nos llevó a proponer que “Las OMVs de *H. pylori* inducen la reactividad de los astrocitos mediante la activación de NF- $\kappa$ B provocando daño neuronal en un modelo murino”. En la Figura 4 se resume el modelo propuesto.



**Figura 4. Modelo de estudio.**

En la Figura se muestran los modelos biológicos *in vitro* e *in vivo* de estudio y los objetivos planteados para el desarrollo experimental del trabajo de tesis. Las OMVs obtenidas desde la bacteria *H. pylori* *in vitro* podrían inducir reactividad en astrocitos en una dosis y tiempo de tratamiento (**objetivo 1**). Luego, la señalización molecular inducida por las OMVs en los astrocitos ocurriría a través de la señalización de NF-κB (**objetivo 2**) y astrocitos reactivos inducidos por las OMVs podrían ejercer daño neuronal en línea celular neuronal (**objetivo 3**). Finalmente, las OMVs marcadas con fluoróforo lipídico (DiR) podrían llegar al cerebro induciendo reactividad de astrocitos y daño neuronal (**objetivo 4**). Las flechas indican la temporalidad en el desarrollo experimental para cada objetivo.

## 2 Hipótesis

“Las OMVs de *H. pylori* inducen la reactividad de astrocitos mediante la activación de NF-κB provocando daño neuronal en un modelo murino”

## 3 Objetivo general

Estudiar la participación de NF-κB en fenotipo reactivo de astrocitos inducido por las OMVs de *H. pylori* y evaluar el efecto de estos cambios sobre procesos neuronales.

### 3.1 Objetivos específicos.

**Objetivo 1:** Estudiar si las OMVs inducen un fenotipo reactivo en astrocitos *in vitro*.

a) Aislar, purificar y caracterizar las OMVs de *H. pylori*.

b) Establecer la dosis/tiempo del tratamiento con las OMVs de *H. pylori* necesarios para inducir un fenotipo reactivo en astrocitos.

**Objetivo 2:** Determinar si NF-κB participa en la inducción de la reactividad de astrocitos por las OMVs de *H. pylori* y en la producción de citoquinas proinflamatorias.

**Objetivo 3:** Estudiar la inhibición/retracción del crecimiento de procesos neuronales y muerte celular en neuronas en respuesta a astrocitos reactivados por las OMVs de *H. pylori*.

**Objetivo 4:** Determinar si las OMVs de *H. pylori* llegan al cerebro, inducen reactividad de astrocitos y daño neuronal en un modelo murino *in vivo*.

## 4 Materiales, reactivos y métodos

### 4.1-Materiales y reactivos

**Tabla 1. El listado de los reactivos utilizados**

El listado de reactivos utilizados, se clasificaron separadamente por marca, con su respectivo número de catálogo.

Fabricante	Reactivo	Número de Catálogo
Bio-Rad	Solución acrilamida/bisacrilamida (29:1) al 40%	1610146
	Ensayo de Bradford	500-0201
Calbiochem	Antipaína	178220
	Benzamidina	199001
	Ciclosporina A	239835
	Leupeptina	108975
	Mowiol	475904
	PMSF	52332
Chemicon International	Re-Blot Plus Mild Antibody Stripping Solution	2502
	Sistema de detección quimioluminiscente ECL	2600
Falcon	Placas de cultivo de 24 y 96 pocillos	353047
	Placas plásticas para cultivo de 3.5, 6 y 10 cm	353004
Thermo	Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	SM0671
	Columnas exo spin	4484449
	Vitox	SR0090A
	Dent	SR0147E
	Fluoromount-G™	00-4958-02
	Sobre microaerofílica (Campygen)	CN0025A
GIBCO	Azul de Coomassie	27816
	Cloruro de calcio	21101
	Cloruro de magnesio	63072
	Cloruro de potasio	60129
	EDTA	3609
	Hidróxido de sodio	71691
	SDS	71729

GIBCO	2-mercaptoetanol para cultivo celular	11508916
	RPMI 1640	23400-013
	DMEM-F12	12400-24
Cell Guidance Systems LLC	Exo-spin	#EX-01
Merck	Columns Ultra 15 ml-100 kDa	UFC910008
Pierce	Kit para medición de proteínas con BCA	P23223
Riedel de Haen	Azul de Tripano	32700
Difco	Agar granulado	214530
Roche	Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	0469312401
Scharlau	Cloruro de sodio	SO0227
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	SO0337
Sigma-aldrich	β-Cyclodextrina	C4767
	Bicarbonato de sodio	S7795
	Dimetilsulfóxido para cultivo celular	D2438
	IMD 0354	I3159
	Fluoruro de Sodio	S7920
	BMS 345541	B9935
	Glicina	G7126
	Ortovanadato de sodio	O6508
	Paraformaldehído	P6148
	Rojo Ponceau	P3504
	DTT	GE17-1318-01
	Trizma base	T1503
	Tris-HCl	T3253
	Acetonitrilo	271004
	NP-40	I3021
CHAPS	C-3023	
TCL	Metanol grado técnico	142519
	Etanol grado técnico	142919
US Biological	Dimetilsulfóxido	D8050
	PBS 10X para cultivo celular	02-024-5A
	Penicilina-estreptomicina	03-031-1B
	Tripsina-EDTA	03-051-58
	Suero fetal de bovino	04-127-1A

Winkler	Acetato de sodio	BM-1560
	2-mercaptoetanol	BM-1200
	Isopropanol	BM-0210
	TEMED	BM-1970
	Tween 20	BM-2031
	Triton X-100	BM-2020
	Albúmina de Suero Bovino (BSA)	BM-0150

#### 4.2- Cultivos líquidos de *H. pylori* 60190

Se realizó cultivos líquidos de *H. pylori* 60190 (ATCC 49503) en 200 ml de medio Brucella Broth-0,24%  $\beta$ -ciclodextrina en condiciones microaerófilas (5% CO<sub>2</sub>, 70% humedad y 37°C) a 50×g durante 72 h, en donde alcanzaron una densidad óptica (DO=600 nm) de 0,05, correspondiente a un inóculo de 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias (UFC) por ml, según lo determinado por el recuento viable (Ko et al., 2016).

##### 4.2.1- Obtención de vesículas de membrana externa de *H. pylori* 60190:

##### concentración, precipitación, purificación y caracterización de las OMVs

Los cultivos líquidos de *H. pylori* fueron centrifugados a 2.241×g por 10 min a 4°C hasta obtener sedimento bacteriano. Luego se removió el sobrenadante obtenido y, para asegurar que todas las bacterias fueran removidas desde medio líquido, se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. Posteriormente, el sobrenadante obtenido se filtró en poro de 0,22  $\mu$ m y se concentró utilizando columnas Amicon 100 kDa (2.241×g por 10 min) por 6 veces hasta reducir el volumen total a 2 ml. Al concentrado líquido obtenido se le agregó 0,5 ml de buffer de precipitación Exo-spin (Cell Guidance Systems LLC, Helix Center, USA., #EX-01) y se incubó durante la noche a 4°C. La solución obtenida se centrifugó a 16.000×g durante 60 min a 4°C, se

desechó el sobrenadante y el sedimento obtenido se re-suspendió con 100  $\mu$ l de PBS estéril. Finalmente, las OMVs fueron eluidas en columnas de exclusión molecular Exo-spin y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso (Han et al., 2019; Olofsson et al., 2010).

#### **4.3- Cuantificación de proteínas de las OMVs**

Para determinar el contenido total de proteína en las OMVs se utilizó 10  $\mu$ l de las OMVs y se diluyó en 40  $\mu$ l de tampón de sonicación (PBS pH 7,4, SDS 10%, Benzamidina 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Fluoruro de Sodio 10 mM, Leupeptina 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , PMSF 1 mM y  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM). Posteriormente, las muestras se sonicaron 3 veces en hielo durante 5 seg y luego fueron diluidas (1:10) para la cuantificación de las proteínas usando el kit BCA (ácido bicinonínico) Protein Assay (Pierce, Rockford, USA) en placa de 96 pocillos. La concentración proteica se determinó con el mismo método de BCA utilizando seroalbúmina bovina para la curva de calibración medida a 562 nm de absorbancia en Tecan Infinite 200 PRO. Finalmente, el extracto proteico se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **4.4-Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) de OMVs**

Para determinar la distribución del tamaño y la concentración de las OMVs se utilizó el equipo análisis de nanopartículas Nanosight® NS300 (Malvern) evaluando el movimiento browniano en un sistema de dispersión de luz. Las muestras se diluyeron 1:1000 en PBS estéril para obtener de 10 a 100 partículas por imagen. El nivel de la cámara se configuró para capturar tres videos por muestra con 30 seg de duración por video. Luego, los videos se analizaron para determinar el tamaño de partícula promedio y la moda (distribución de tamaño), así como la cantidad de partículas (concentración).

#### **4.5- Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

Se montaron 5 µl de las OMVs de *H. pylori* sobre rejillas de cobre (FCF300-CU) fijando con paraformaldehído al 2% en medio PBS y Glutaraldehído al 1% en PBS durante 5 min. Luego se dejó secar a temperatura ambiente, absorbiendo el exceso de líquido con papel filtro. Después, se les agregó 15 µl de acetato de uranilo al 4% a pH 7,0 durante 5 min para contrastar las muestras. Finalmente, las imágenes se adquirieron en un microscopio de transmisión Philips Tecnai 12-BioTwin (Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile) en funcionamiento 80 vK.

#### **4.6- Perfil de proteínas totales por electroforesis SDS-PAGE y tinción azul de Coomassie**

Para la obtención del perfil proteico total de las proteínas presentes en cepa *H. pylori* 60190 y sus OMVs, se desnaturalizaron 60 µg del extracto total con buffer muestra 4X (Tris-HCl 1 M, pH 6,8 conteniendo SDS 10%, glicerol 30%, azul de bromofenol 0,1% y 2-mercaptoetanol 0,15%) y se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE (10%). Una vez finalizada esta etapa, el gel es retirado y teñido con 50 ml de solución de tinción (Azul Brillante Coomassie R-250 2,5 g/l, metanol 0,45 % v/v, ácido acético glacial 0,1% v/v en agua destilada) en agitación continua por 12 h a temperatura ambiente. A continuación, el gel es desteñido en 50 ml de solución (metanol 0,2% v/v, ácido acético glacial 0,15% en agua destilada) durante 1 h. El procedimiento fue repetido dos o tres veces más hasta observar las bandas teñidas de azul con fondo semitransparente. Finalmente, para la adquisición de imágenes se empleó el foto-documentador ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia).

#### **4.7- Espectrometría de masa Shotgun**

Para analizar el contenido proteómico de *H. pylori* 60190 y sus OMVs se utilizó una Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas (LC-MS/MS) Shotgun para lo cual se disolvieron los sedimentos bacterianos o de vesículas equivalentes a 10 µg de proteína total OMVs en una solución de desoxicolato de sodio (SDC 3% concentración final y bicarbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM) en un volumen final de 55 µl. Luego, la solución fue reducida con 5 µl de Ditiotreitól (DTT) 100 mM en agitación constante a 65°C por 45 min. Después de enfriar se incubó en oscuridad con 10 µl de Iodoacetamida 100 mM por 30 min para después agregar 5 µl de DTT 100 mM, 188 µl de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  500 mM y 727 µl de agua destilada. Para la digestión enzimática, a la solución anterior se agregó 6 µl de tripsina 0,05 µg/µl a un pH > 7,5 en agitación constante por 4 h a 37°C y se realizó una segunda digestión enzimática incubando con 4 µl de tripsina 0,05 µg/µl en agitación constante toda una noche (>14 h) a 37°C. Posteriormente, la digestión enzimática se detuvo agregando 80 µl de ácido trifluoroacético (TFA) al 20% a pH < 3,0. Luego, la solución fue centrifugada por durante 20 min a 20.000×g y el sobrenadante se traspasó a un tubo nuevo para continuar con la elución.

##### **4.7.1- Extracción de fase sólida usando cartucho Waters HLB 1 de equilibrio hidrófilo-lipofílico**

Las proteínas fueron extraídas por medio de una cromatografía de fase reversa, utilizando un cartucho Waters HLB (1 ml) con 1 ml TFA 0,3% diluido en acetonitrilo (ACN) 69%. Se lavó con 1 ml de la misma solución de TFA. Luego, se equilibró con 1 ml de TFA 0,3% diluido en agua. Se cargó toda la muestra al cartucho y se lavó con 1

ml de TFA 0,3 % diluido en agua y se eliminó el eluido. Para la etapa de elusión del digerido se eluyó el cartucho lentamente con 1 ml de TFA 0,3% en ACN 60% y se secó el eluido obtenido usando el concentrador SpeedVac por 6 h. Las muestras secas se almacenaron a -80°C hasta el análisis MS/MS.

#### **4.7.2- Análisis de proteómica *Shotgun* en equipo Lumos**

Las muestras digeridas se reconstituyeron en 80 µl de ACN 1% en ácido fórmico 0,1%, se agitaron en equipo vortex y se guardaron toda la noche a 4°C. Posteriormente, la muestra se agitó nuevamente a temperatura ambiente por 20 min y luego centrifugó a alta velocidad por 10 min para obtener el sobrenadante limpio. Finalmente se inyectó 2 µl (0,2 µg) al instrumento Lumos.

#### **4.7.3- Análisis de datos de espectrometría de masas e identificación de proteínas**

El análisis de LC-ESI-MS/MS fue hecho en modo ion positivo con el Espectrómetro de Masas Orbitrap Fusion Lumos Tribid (Thermo Fisher Scientific, San José, CA) acoplado al Cromatógrafo líquido de ultra nanoACQUITY (Waters, Milford, MA). Una vez inyectados en la columna, las mezclas de péptidos resultantes se separaron usando un gradiente lineal de solvente A que contenía ácido fórmico 0,1%/agua y solvente B que contenía ACN 60%/ácido fórmico 0,1%. Las muestras reconstituidas fueron desalinizadas en columna de extracción en fase sólida C-18 (0,1×200 mm) y luego separada en columna analítica C-18. Las columnas se mantuvieron a temperatura ambiente y los péptidos fueron eluidos desde la columna a 0,5 µl/min y separados usando el siguiente gradiente: 1 a 7% de solvente B en 1 min; 7 a 25% de solvente B en 75 min; 25 a 35% en 15 min y 35 a 80% en solvente B en 10 min. La columna posteriormente se lavó por 5 min en solvente B 80% y se reequilibró

con solvente A 99% por 13 min. El espectrómetro de masa se usó en modo de adquisición data-dependiente. Los espectros MS/MS fueron buscados usando la base de datos UniProtKB de *H. pylori* (UP000000429.fasta) usando el motor de búsqueda Comet MS/MS con modo fijo de modificaciones por alquilaciones en cisteína y modo variable para modificaciones por metilación en metionina. Se permitieron dos sitios de corte para búsquedas restringidas para tripsina. Los resultados de Comet fueron validados usando PeptideProphet y ProteinProphet, usando una probabilidad ajustada menor a 0,90 en péptidos y menor a 0,95 para proteínas. Para la identificación de una proteína, al menos 2 péptidos únicos de la proteína de interés tienen que ser detectados. Esto permite disminuir las probabilidades de detectar falsos positivos. El total de conteo de péptidos fue usado para comparar la abundancia de una proteína.

## **4.8 Cultivos celulares y obtención de cultivos primarios**

### **4.8.1- Células CAD**

Las células CAD ("CATH.a-differentiated") corresponden a un modelo celular tipo-neuronal derivado de la línea de neuronas catecolaminérgicas Cath.a, obtenidas desde tumor cerebelar del SNC de un ratón transgénico que expresa el antígeno T del virus SV40 (virus 40 de simio) bajo el control transcripcional del promotor de la tirosina hidroxilasa de rata (Qi et al., 1997). Estas células pueden ser diferenciadas a fenotipo neuronal en un medio privado de suero. Estas células se mantienen en medio completo DMEM-F12 con 8% de suero fetal bovino y antibióticos (penicilina 100 UI/ml y estreptomicina 100 µg/ml), a 37°C en incubadora humidificada (80%) y 5% de CO<sub>2</sub>. Los experimentos fueron realizados entre los pasajes 20 y 40 de cultivo.

#### 4.8.2- Cultivo de astrocitos

Se utilizó la línea celular de astrocitos DI TNC1 ATCC proveniente de cultivos primarios de astrocitos tipo I de tejido diencefálico de rata y se mantuvieron en medio RPMI completo, compuesto por medio RPMI 1640, 5% de SFB, 2-mercaptoetanol 0,1 mM y antibióticos (penicilina 100 UI/ml y estreptomycinina 100 µg/ml). Para el pasaje de las células, éstas se trataron con tripsina-EDTA 0,05% (p/v) durante 2-3 min en la incubadora a 37°C, se utilizaron células entre los pasajes 9-14 de cultivo.

#### 4.8.3- Cultivos primarios de astrocitos de ratas neonatas

Los cultivos primarios de astrocitos fueron obtenidos desde cultivos mixtos de células gliales recuperadas de la corteza de ratas Wistar neonatas de 1 ó 2 días de nacidos. Las ratas neonatas fueron sacrificadas por decapitación rápida y los cerebros fueron extraídos, y puestos en PBS refrigerado (4°C). Las cortezas separadas del cerebro y meninges fueron tratadas con 500 µl de tripsina (0,25%), para luego ser mecánicamente disgregadas. La suspensión resultante fue pasada por un filtro celular de 70 µm, lavadas con DMEM-F12 suplementado con SFB 10% (Biological Industries) y centrifugadas a 750×g por 10 min. Luego, las células fueron contadas y sembradas a una densidad de 1,5 millones por frasco T-25. El medio celular fue cambiado cada 48 h. Una vez que las células llegaron a confluencia durante 14-16 de cultivo *in vitro*, las neuronas y otros tipos celulares fueron liberados al sobrenadante a través de agitación en “shaker” orbital durante toda la noche a 180×rpm. **Luego** los cultivos fueron sometidos a pasaje de las células, para lo cual se trataron con tripsina-EDTA al 0,05% (p/v) durante 2-3 min en la incubadora a 37°C. Se utilizaron células entre los pasajes 9-14. Los cultivos fueron mantenidos en medio DMEM-F12 suplementado con SFB 10%

y con antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 10 µg/ml), a 37°C en incubadora humidificada (80%) y 5% de CO<sub>2</sub> (Lagos-Cabré et al., 2017). El protocolo para el manejo de animales y obtención de estas células primarias fue aprobado por el Comité de Bioética de Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Anexo CBA-FMED# 1123).

#### **4.9- Cuantificación de proteínas de líneas celulares y cultivos primarios**

Para la extracción de proteínas desde las células, placas con células se lavaron con PBS frío más un coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (PMSF 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, Fluoruro de Sodio 10 mM, Benzamida 100 µg/ml, Antipaina 10 µg/ml y Leupeptina 12,5 µg/ml). Posteriormente, las muestras fueron recolectadas raspando las placas utilizando “scrapers” en un volumen de 80 µl de la solución anterior a 4°C. Luego las muestras obtenidas fueron centrifugadas por 6 min a 5.000×g. Se eliminó el sobrenadante y a las muestras en tubo Eppendorf se les agregó 80 µl de tampón de sonicación (PBS, SDS 10%, Benzamidina 10 µg/ml, Fluoruro de Sodio 10 mM, Leupeptina 1 µg/ml, PMSF 1 mM y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM). Cada muestra en hielo fue sonicada 3 veces durante 5 seg. Se preparó una dilución 1:10 de cada extracto para la cuantificación de las muestras de proteínas haciendo uso del kit BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, USA) en placa de 96 pocillos para medir en Tecan Infinite 200 PRO. La cuantificación proteica se realizó con el método de BCA utilizando seroalbúmina bovina para la curva de calibración medida a 562 nm de absorbancia. Finalmente, el extracto proteico se conservó a -80°C hasta su uso.

#### **4.10- Análisis por Western blot (WB)**

Para el análisis de WB los extractos proteicos fueron hervidos a 100°C durante 5 min. Luego se cargaron 50 µg de proteína por carril en geles de acrilamida 10%. Los geles se corrieron a voltaje constante (100 volts) hasta que el frente de corrida llegó al final del gel. A continuación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con poro de 0,45 µm (Millipore, Billerica, USA) a voltaje constante (100 volts 2 h o 30 volts toda una noche). Las membranas fueron bloqueadas utilizando leche descremada o BSA en PBS con Tween 0,1% (según Tabla 2) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se incubó con los anticuerpos primarios correspondientes toda la noche a 4°C (Tabla 3). Posteriormente, se realizó 3 lavados de 10 min con PBS con Tween 0,1%, y se incubó con el segundo anticuerpo 1 h a temperatura ambiente (Tabla 3). A continuación, se realizó 3 lavados de 10 min con PBS con Tween 0,1%. Las bandas fueron visualizadas con un kit de quimioluminiscencia (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), según instrucciones del fabricante y finalmente se expuso la membrana contra un sistema de revelado con cámara digital en fotodocumentador ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). Se realizó la cuantificación de los WB mediante densitometría con la utilización del software Image J (Schneider et al., 2012).

#### **4.11-Inmunofluorescencia indirecta**

Para la inmunofluorescencia de los astrocitos, las células se sembraron a una densidad de  $4 \times 10^3/\text{cm}^2$  en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos circulares pretratados con solución de poli-L-lisina al 0,1% (p/v) en agua (Sigma) durante 5 min. Después de 24 h de cultivo, las células se sometieron a procedimientos experimentales.

Luego se eliminó el medio, se fijaron las células con paraformaldehído al 4%, se lavaron tres veces con PBS y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% en PBS (15 min; temperatura ambiente) y finalmente se bloquearon con BSA al 5%. Las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 2) durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizó 3 lavados con PBS. Luego se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente (Tabla 3) y DAPI (0,025 µg/ml). Finalmente, las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS por 5 min y montadas en portaobjeto con 8 µl de Fluoromount. Los experimentos fueron realizados 3 veces en forma independiente. Las muestras se analizaron utilizando un microscopio confocal Nikon C2 plus Espectral, con un objetivo de 60X y utilizando el software ImageJ.

**Tabla 2.** Los anticuerpos primarios y las diluciones utilizados en los estudios de Western blot y en Inmunofluorescencia indirecta.

Anticuerpo contra	Especie hospedera	Solución bloqueo	Clonalidad	Empresa	Aplicación	Dilución
GFAP	Ratón	Leche descremada 5%	Monoclonal	Sigma-Aldrich	WB	1:5000
					IFI	1:500
Vimentina	Ratón	Leche descremada 5%	Monoclonal	Santa Cruz	WB	1:1000
					IFI	1:200
Conexina 43	Conejo	BSA 3%	Policlonal	Santa Cruz	WB	1:500
					IFI	1:400
Integrina $\alpha_v\beta_3$	Conejo	Leche descremada 5%	Policlonal	Millipore	WB	1:2000
					IFI	1:2000
p65 (NF $\kappa$ B)	Conejo	BSA 5%	Monoclonal	Cell Signaling	WB	1:1000
					IFI	1:200
Actina	Ratón	Leche descremada 5%	Monoclonal	Sigma-Aldrich	WB	1:5000
Nuclear lamina asociada al péptido 2	Ratón	Leche descremada 5%	Monoclonal	Millipore	WB	---
					IFI	1:500
pS536 p65 (NF $\kappa$ B)	Conejo	5 % BSA	Monoclonal	Cell Signaling	WB	1:1000
					IFI	---
Thy-1/CD90	Ratón	Sección 4.24	Monoclonal	BD Biosciences	WB	---
					IFI	1:200
Tubulina $\beta$ III	Ratón	Sección 4.24	Monoclonal	Promega	WB	---
					IFI	1:500

**Tabla 3.** El resumen de anticuerpos secundarios utilizados.

Anticuerpo contra	Conjugado con	Especie hospedera	Empresa	Aplicación	Dilución
Ratón	HRPO	Cabra	KPL	WB	1:5000
Conejo	HRPO	Cabra	KPL	WB	1:5000
Ratón	Alexa 488	Cabra	Life Technologies	IFI	1:250
Conejo	Alexa 546	Cabra	Life Technologies	IFI	1:250

#### **4.12- Ensayo de migración celular por cierre de herida**

El ensayo de migración celular por cierre de heridas se realizó como se describió anteriormente (Kong et al., 2013). Se sembró alrededor de  $10^5$  astrocitos primarios de rata por pocillo en placas de 24 pocillos con 500  $\mu$ l de medio DMEM F12 completo y cultivados hasta alcanzar el 90% de confluencia. Las células fueron pretratadas con las OMVs de *H. pylori* (previamente caracterizadas y evaluado el efecto dosis-respuesta en astrocitos), con 10 ng/ml de TNF por 48 h (control positivo) y sin ningún tipo de tratamiento (control negativo). Luego, se realizó una herida en cada pocillo con punta de pipeta estéril no biselada. Los pocillos se lavaron dos veces con PBS y luego se agregaron 500  $\mu$ l de medio DMEM F12 sin suero. Se sacó 5 fotografías de cada herida para registrar el tiempo 0. Los astrocitos luego se estimularon con los complejos Thy-1-Fc/Proteína-A (4  $\mu$ g/0,4  $\mu$ g) en 500  $\mu$ l de medio DMEM F12 sin suero. Como controles negativos se utilizó TRAIL-R2- Fc/Proteína-A (4  $\mu$ g/0,4  $\mu$ g) en 500  $\mu$ l de medio DMEM F12 sin suero, DMEM F12 sin suero (500  $\mu$ l por pocillo), mientras que DMEM F12 con SFB 3% se usó como control positivo (500  $\mu$ l por pocillo) de migración. Luego de la estimulación, se sacó fotografías a las heridas a las 24 h. El área promedio de cada herida se estimó usando el programa ImageJ/Plugins/Area calculator, tomando 5 fotografías por pocillo de los distintos pocillos con objetivo 5X en el microscopio

Motic™ Trinicular AE31E [Modificado de (Kong et al., 2013)]. El cierre de herida fue calculado usando la ecuación:

$$\% \text{ cierre de herida} = \left[ \frac{A_{0h} - A_{24h}}{A_{0h}} \right] \times 100$$

En donde  $A_{0h}$  es el área de la herida calculada después de scratching ( $t=0h$ ) y  $A_{24h}$  es el área de la herida sin cicatrizar (que no está cubierta por las células) que permaneció 24 h después del estímulo.

#### **4.13- Actividad de NF- $\kappa$ B por ELISA en extractos nucleares de astrocitos**

Los astrocitos primarios fueron tratados con las OMVs (2,5  $\mu$ g/ml, 12 h) o TNF (10 ng/ml, 48 h) durante 60 min, con o sin inhibidores de IKK [(IMD 0354 (Onai et al., 2004) o BMS345541 (Burke et al., 2003)]. Para conseguir muestras enriquecidas en fracciones citosólicas o nucleares se usó el siguiente protocolo de fraccionamiento subcelular. Después de los tratamientos correspondientes, las células fueron despegadas de la placa con un “scraper” en PBS con inhibidores de proteasas y fosfatasa a 4°C, luego fueron centrifugadas 5 min a 1.000 $\times$ g y resuspendidas en un tampón hipotónico (HEPES 10 mM pH 7.9, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 1 mM, DTT 1 mM) con inhibidores de proteasa y fosfatasa y NP40 0,6%. Los lisados se agitaron durante 10 min con vortex a máxima velocidad y se centrifugaron a 1.000 $\times$ g durante 60 seg. En este punto el sobrenadante contiene el extracto citosólico, y el pellet está constituido de núcleos. Se recogió el extracto citosólico y fue almacenado a -80°C, y los núcleos se lavaron en el mismo tampón por resuspensión y centrifugación. Los extractos nucleares se obtuvieron

incubando los núcleos con: HEPES 10 mM pH 7,9, glicerol 25%, NaCl 400 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM con inhibidores de proteasas y fosfatasas durante 30 min en agitación suave a 4°C. A continuación, los extractos se centrifugaron a 13.000×g durante 15 min, se recogió el sobrenadante en el que están disueltos las proteínas nucleares y fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

Para medir la actividad de NF-κB (p65) en los extractos nucleares de las células, se utilizó el Transcription Factor Assay Kit (Ann Arbor, MI, USA.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Básicamente, se agregaron 10 µl del extracto nuclear normalizados en la placa activada de ELISA que contiene secuencias de ADN que contiene sitios de unión a p65. Posteriormente, a cada pocillo se adiciona un anticuerpo primario específico contra p65 (NF-κB) seguido por un anticuerpo secundario conjugado a HRP y finalmente, se agrega un cromógeno cuya absorbancia es leída a los 450 nm.

#### **4.14- Obtención del medio condicionado provenientes desde astrocitos primarios pretratados con las OMVs de *H. pylori***

Cultivos primarios de astrocitos fueron tratados sin o con TNF (10 ng/ml por 48 h) o con las OMVs de *H. pylori* (2,5 µg/ml por 12 h) en presencia o ausencia sin y con inhibidores de IKK [IMD 0354 (Onai et al., 2004) ó BMS 345541(Burke et al., 2003)]. Luego, los cultivos fueron lavados 3 veces con PBS hasta eliminar cualquier rastro del medio completo (DMEM-F12 más 10% SFB). Posteriormente, los cultivos fueron mantenidos en DMEM-F12 (libre de suero) durante 5 días en cultivo a 37°C en incubadora humidificada (80%) y 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, el medio condicionado fue recolectado desde el cultivo de los astrocitos, filtrado en poro de 0,22 µm y almacenado

a -80 °C hasta su utilización.

#### **4.15- Cuantificación de IL-6, TNF, IFN-gamma y IL- 1 beta por kit MILLIPLEX**

Se utilizó el kit cuantitativo MILLIPLEX map (RECYTMAG-65K) para cuantificar la concentración de citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ ) desde medio condicionado obtenido desde cultivos de astrocitos primarios (sección 4.14) y los datos obtenidos fueron analizados siguiendo las directrices dadas por el fabricante usando el software Q-View (Quansys Biosciences) del equipo Luminex ® 200™.

#### **4.16- Viabilidad en células CAD tratadas con medio condicionado por citometría de flujo**

Para los ensayos de viabilidad de neuronas diferenciadas se usó el kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen™) por citometría de flujo, primero se recolectó medio condicionado desde astrocitos primarios cultivados en DMEM F12 durante 5 d post estímulo inductor de reactividad (sección 4.14). Luego, el medio condicionado fue agregado e incubado por 24 h o etopósido 10  $\mu$ M (Nakajima et al., 1994) sobre las neuronas CAD con 48 h de diferenciación. Luego, las células fueron lavadas y cuidadosamente desprendidas de la placa de cultivo usando tripsina-EDTA al 0,05% (p/v) durante 1 min en la incubadora a 37°C. Posteriormente, las células suspendidas fueron teñidas y tratadas según las recomendaciones del fabricante para el kit de apoptosis Anexina V/FITC (BD Pharmingen™) por citometría de flujo (Vermes et al., 1995). Finalmente, las lecturas fueron realizadas en el citómetro FACS Canto (BD Bioscience, Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos) que previamente fue calibrado y se adquirió al menos 3.000 eventos para obtener un resultado representativo

de las poblaciones celulares a estudiar. Los datos obtenidos se analizaron usando el software FlowJo versión 10.8.0.

#### **4.17- Actividad de Caspasa 3 en células CAD tratadas con medio condicionado**

Para los ensayos de actividad de Caspasa 3 en neuronas diferenciadas, primero se usó el medio condicionado obtenido y detallado previamente (sección 4.14). Luego, el medio condicionado fue agregado e incubado con las neuronas CAD diferenciadas por 48 h. La determinación de la actividad de la Caspasa 3 se realizó utilizando la fracción citoplasmática de células CAD diferenciadas. Las células fueron lisadas con 150  $\mu$ l de tampón de lisis (HEPES 50 mM pH 7,4), CHAPS 0,3%, DTT 5 mM durante 15 min en hielo. Posteriormente, se agitaron los tubos con los extractos proteicos en vortex durante 15 seg y se centrifugaron a 8.000 $\times$ g durante 1 min a 4°C. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante (extracto citosólico). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford. Se incubaron 20  $\mu$ g de proteína con 20  $\mu$ M del sustrato fluorogénico Ac-DEVD-AFC en tampón de reacción (HEPES 20 mM pH 7,4), CHAPS 0,1%, EDTA 0,1 mM, DTT 2 mM). La secuencia del péptido DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) corresponde al sitio de corte de la Poli-(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) por Caspasa 3 en apoptosis. La mezcla de reacción se incubó durante 180 min a 37°C. La actividad de las caspasas se calculó a partir de la intensidad de la fluorescencia emitida ( $\lambda_{exc} = 375$  nm y  $\lambda_{em} = 530$  nm), en Tecan Infinite 200 PRO. Los resultados se presentaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (Valenzuela et al., 2014).

#### **4.18- Ensayo de diferenciación morfológica de células CAD sobre astrocitos**

Los astrocitos DITNC1 se sembraron a una densidad de 5x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> y se incubaron hasta una confluencia del 90% en placas de fondo de vidrio de 6 pocillos.

Luego fueron tratados sin y con las OMVs, o con TNF (10 ng/ml, 48 h) por 12 h ó 48 h respectivamente en medio RPMI FBS 5%, con antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 10 µg/ml). Luego, la monocapa de células fue fijada con paraformaldehído al 4% durante 15 min a temperatura ambiente. Luego las células fueron lavadas una vez con glicina 0,1 mM y luego con abundante PBS. Posteriormente, se sembraron células CAD ( $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) marcadas con Cell Tracker Green CMFDA (10 mM) sobre vidrio o monocapas de astrocitos fijados en DMEM/F12 con SFB 8% con antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 10 µg/ml) (Burgos-Bravo et al., 2020). Al día siguiente, se retiró el medio completo, se lavaron las células con abundante PBS y se cambió a medio libre de suero suplementado con 50 ng/ml de Selenito de sodio (S5261, Sigma-Aldrich) durante 24 h a 37°C. Este procedimiento reduce la tasa de proliferación e induce diferenciación morfológica de las células CAD. Finalmente, las imágenes de las células fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia Spinning disk microscope Olympus con objetivos de inmersión en aceite de 40X. La longitud de las neuritas se midió utilizando el complemento NeuronJ para el software ImageJ (Herrera-Molina et al., 2012; Maldonado et al., 2017).

#### **4.19- Modelo murino para el estudio de OMVs *in vivo***

Se usaron 11 ratones macho (*Mus musculus*) de la cepa BALB/c, de 6–8 semanas de edad y fueron mantenidos en jaulas de policarbonato colocadas en una habitación ventilada con luz controlada con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, temperatura controlada a 20°C, humedad relativa del 10% y alimentación *ad libitum* (comida estándar para ratón y agua filtrada). Los animales se aclimataron a este entorno durante al menos 1 día antes del procedimiento experimental en la unidad de manejo animal del Laboratorio de

Microbiología, Universidad Central de Chile. Las prácticas sobre procedimientos pre y post experimentales fueron aplicadas según las recomendaciones del Comité de Bioética del Instituto de Investigación, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Central de Chile (Anexo proyecto #28/2021).

#### **4.20- Preparación de DiR y OMVs marcadas con DiR**

Las OMVs recién aisladas se incubaron con 1  $\mu$ M con la sonda lipófilo fluorescente DiR [D12731 (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindotricarbocyanine Iodide), LifeTechnologies] a 4°C durante 30 min. Luego se colocaron 100  $\mu$ l de cada muestra en la parte superior de una columna de exclusión por tamaño (Exo-spin®) y se centrifugaron a 50 $\times$ g durante 1 min para eluir las OMVs-DiR y eliminar el exceso de DiR. Finalmente, se cuantificó la concentración de proteínas descrito en la sección 4.3 y finalmente se diluyeron en 100  $\mu$ l de suero fisiológico.

#### **4.21- Imágenes obtenidas por *in vivo* FX PRO**

Los ratones, fueron inyectados a través de la vena de la cola con 5, 10, 20 o 100  $\mu$ g de las OMVs de *H. pylori* marcadas con DiR o con suero fisiológico sin y con DiR. Posteriormente, al término del tratamiento (24 ó 72h), los ratones fueron sacrificados y se diseccionó los órganos principales (pulmones, corazón, bazo, timo, riñones, hígado, estómago, intestinos y cerebro) para ser observados durante 2 h en un sistema de imagenología *in vivo* FX PRO (Bruker, Massachusetts, USA). Se utilizó una longitud de onda de excitación de 410 nm y de lectura de emisión a 600 nm para cuantificar la fluorescencia y utilizando el software ImageJ.

#### **4.22- Tratamiento de los cerebros para obtener secciones en criostato**

Los cerebros diseccionados fueron lavados con PBS y fijados con

paraformaldehído al 4% en buffer PBS a 4°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, los cerebros fueron sumergidos en una batería de concentraciones ascendentes de sacarosa (10 y 30%) por 24 h cada uno. La solución de sacarosa tiene como función actuar como crio-protector para conservar la morfología del tejido durante la congelación. Posteriormente, los cerebros se colocaron sobre un medio de soporte OCT (Jung®), y se cortaron en secciones coronales de 20 micrómetros hasta el bregma de cada cerebro mediante micrótopo de congelación (Leica CM1860 UV). Dichos cortes fueron adheridos en portaobjetos cargados positivamente (CITOGLAS®) y enumerados de acuerdo con la zona del cerebro cortada y mantenidos a -80°C hasta su utilización.

#### **4.23-Tinción de Hematoxilina-Eosina e inmunofluorescencia indirecta en tejido cerebral**

Para el análisis morfológico de los cortes de tejidos cerebral, se utilizó una muestra de cada grupo (sin y con tratamiento con las OMVs de *H. pylori*). Los cortes de tejido fueron hidratados con agua destilada durante 3 min. A cada corte, se les realizó una tinción por 60 seg con Hematoxilina de Harrias (Thermo Scientific ®), la cual fue lavada en agua destilada y luego dejada por 15 min en agua corriente para el azulamiento nuclear. La tinción citoplasmática, fue realizada por 2 min en Eosina amarillenta (Chemix ®) al 0,2% con ácido acético, la cual fue lavada rápidamente en etanol 70°. Cada muestra fue deshidratada en una batería de etanoles ascendentes por 5 min cada uno (95° y 100°) y seguida por 3 cambios de xilol (Winfiler ®) por 5 min cada uno. Finalmente, las muestras de tejidos se montaron con medio hidrófobo Entellan® para posteriormente ser analizadas a través de microscopía óptica de campo claro (Zhang & Xiong, 2014).

#### **4.24- Inmunofluorescencia indirecta en tejido cerebral**

Los cortes de tejidos fueron lavados con PBS (3 veces con 5 min cada uno) para eliminar todo el medio de soporte residual. Luego los tejidos cerebrales fueron permeabilizados con 1% de Tritón X-100 por 10 min en cámara húmeda. Posteriormente, se incubaron las muestras con solución de bloqueo (0,5% de suero de caballo, 2% de BSA y 0,5% Tritón X-100 en PBS) por 1 h. Luego, se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 2) diluido en solución de bloqueo durante toda noche a 4°C. Las muestras fueron lavadas 3 veces con 0,5% suero de caballo en PBS durante 5 min a temperatura ambiente para eliminar el exceso de anticuerpo primario. Posteriormente, las muestras fueron incubadas con anticuerpo secundario (Tabla 3), preparado en 0,5% suero de caballo en PBS, durante 2 h en cámara húmeda oscura. A continuación, las muestras fueron lavadas 5 veces con PBS durante 5 min y finalmente montadas con Fluoromount® y cubiertas con un cobreobjeto de vidrio. Las muestras se analizaron utilizando un microscopio confocal Nikon C2 plus Espectral, con un objetivo de 40X y utilizando el software ImageJ.

#### **4.25- Cuantificación de LPS en las OMVs de *H. pylori***

La concentración de LPS contenido en las OMVs de *H. pylori* se midió usando el kit comercial cromogénico LAL Pierce (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, El LPS comercial de la curva de calibrado o el LPS del analito de la muestra cataliza la activación de la proenzima del lisado de amebocitos de *Limulus* modificado (LAL), siendo esta actividad directamente proporcional al contenido del LPS de la muestra, la proenzima activada cataliza el clivaje de p-nitroanilina (pNA) desde el péptido incoloro (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA).

Después de detener la reacción, la pNA liberada se mide fotométricamente a 405-410 nm. Se utilizó LPS (O55:B5, Sigma-Aldrich) de *Escherichia coli* (*E. coli*) de concentración conocida (2 mg/ml) como patrón interno en la cuantificación.

#### **4.26- Análisis estadísticos**

Los experimentos se repitieron al menos 3 veces por separado. Al comparar dos grupos se estableció los límites de confianza, comparando los percentiles mediante el uso de la distribución T-Student (dos colas) o la prueba de Mann-Whitney. Para la comparación de tres o más grupos experimentales se utilizó el análisis de ANOVA de dos vías y seguido de comparación post hoc con test Bonferroni. Los datos se expresaron como promedio  $\pm$  error estándar medio (S.E.M.) en todos los casos. Se consideró significativo un valor probabilístico  $p < 0,05$ . El software utilizado para estadísticas fue GraphPad prisma versión 9.

## 5 Resultados

### 5.1- Objetivo específico 1: Estudiar sí las OMVs de *H. pylori* inducen un fenotipo reactivo en astrocitos *in vitro*

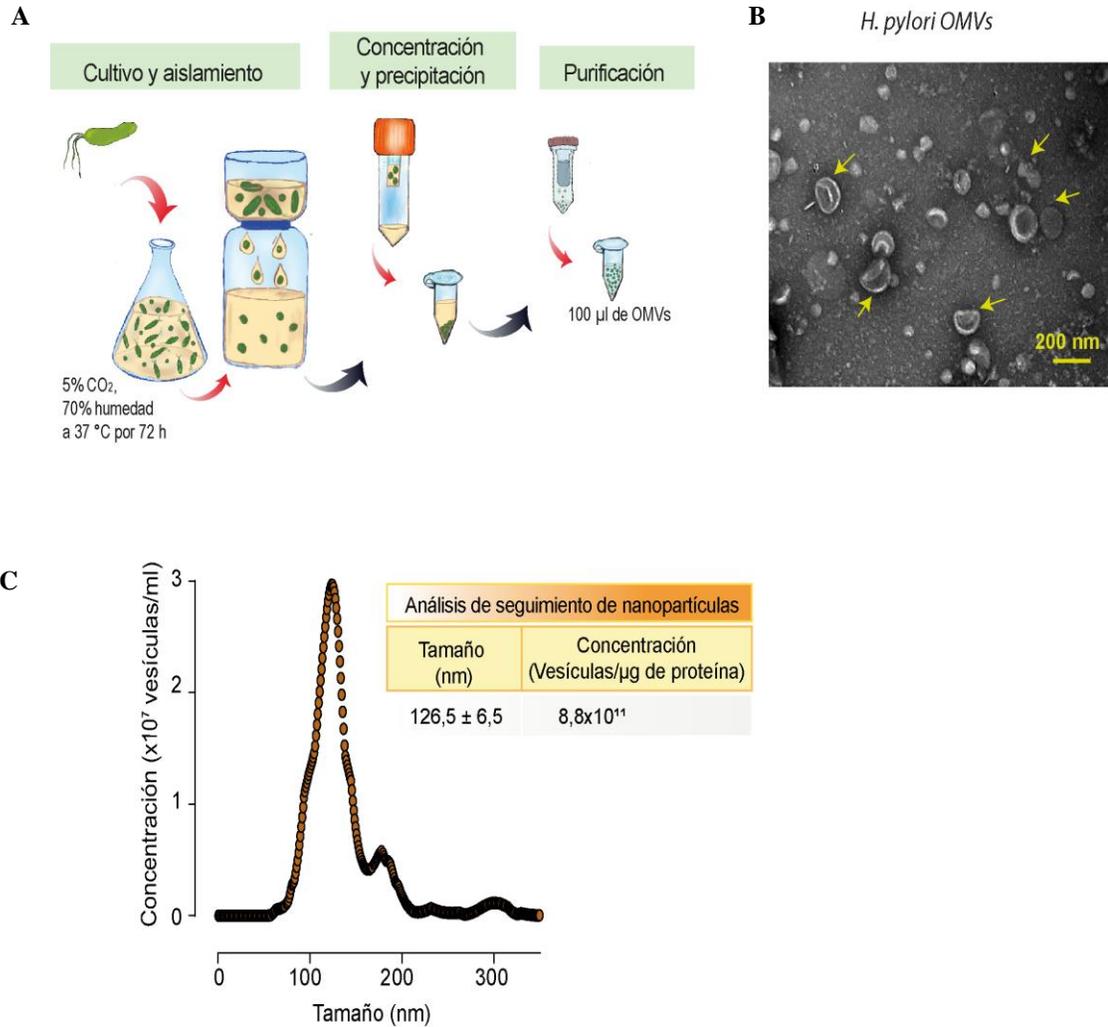
Resultados recientes indican que tratamientos con 50 µg/ml de OMVs provenientes de bacterias del microbioma de paciente diagnosticado con Alzheimer promueven la activación de astrocitos y microglía, desencadenando la respuesta inflamatoria, y el deterioro de la función cognitiva en modelo murino *in vivo* (Wei et al., 2020). Por otro lado, a pesar del incremento de los antecedentes que conectan las enfermedades extra gástricas con la infección por *H. pylori*, se desconoce el efecto de OMVs de *H. pylori in vivo* e *in vitro* en el contexto de infección en el SNC. En este estudio se realizó un protocolo para el cultivo, aislamiento, concentración, precipitación y purificación de OMVs de *H. pylori*, y se estudió el efecto dosis-respuesta de estas OMVs en astrocitos *in vitro*.

#### 5.1.1 Caracterización de las vesículas de membrana externa de *H. pylori*

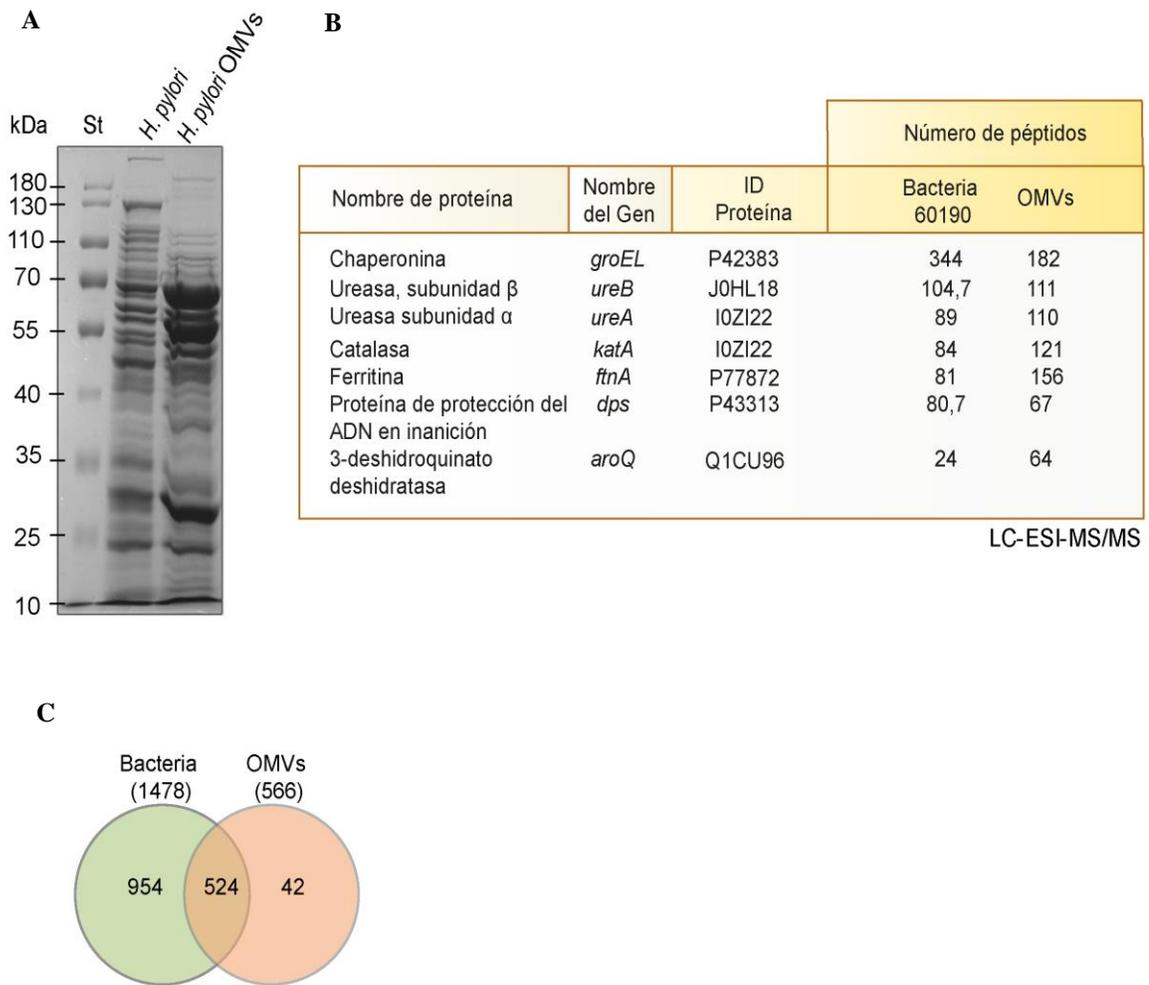
En el presente estudio se desarrolló e implementó un protocolo para la obtención de OMVs desde cultivos líquidos de la cepa *H. pylori* 60190 (Wild-Type ATCC 49503) crecido por 72 h en condiciones microaerofílicas (5% CO<sub>2</sub>, 70% humedad y 37°C) (Fig. 5A). Esta es una cepa de referencia utilizada en estudios con modelos murinos dado su elevada capacidad infectiva y patogénica multisistémica (Keenan et al., 2000). Como se muestra en la Fig. 5B, mediante Microscopía Electrónica de Transmisión visualizamos y comprobamos la integridad estructural de las OMVs de *H. pylori* aisladas desde la

cepa parental. Así también, determinamos la distribución de los tamaños para las OMVs con Nanosight, obteniendo un diámetro promedio de  $126,5 \pm 6,5$  nm y concentración de  $8,8 \times 10^{11}$  partículas/ $\mu\text{g}$  de proteínas (Fig. 5C). Luego evaluamos el perfil proteico total de las OMVs de *H. pylori* comparado con el extracto total de bacteria parental mediante electroforesis de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE), seguida por tinción con azul de Coomassie, y observamos que las OMVs de *H. pylori* tienen un alto contenido de proteínas presentes en el lisado parental bacteriano, con algunas proteínas altamente enriquecidas en las OMVs, como las de  $M_r$  en el rango de 55–77 kDa y aquellas de aproximadamente 30 kDa (Fig. 6A). Posteriormente, evaluamos mediante Cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS/MS) la abundancia relativa y perfil proteómico de las OMVs de *H. pylori*. Entre las proteínas más abundantes se encontraron: Chaperona GroEL, Ureasa (UreA y UreB), Catalasa, Ferritina y la proteína Dps (Fig. 6B) de las OMVs de *H. pylori* 60190. Obtuvimos 1.478 proteínas en la bacteria parental, 566 proteínas en las OMVs, de las cuales, 524 proteínas son compartidas con las de la muestra de la bacteria parental (Fig. 6C) y 42 corresponden a proteínas únicas presentes en las OMVs de *H. pylori* detalladas en la Tabla 4. Por ejemplo, en esta tabla se incluyen: factores de virulencia relevantes (VacA, SabA y Cag5); enzimas relacionadas con el metabolismo energético bacteriano (GDP-L-fucosa sintasa, la N-acetilgalactosamina epimerasa) y enzimas relacionadas con la modificación del ADN (ADN-metiltransferasa de sitio específico). Estos resultados sugieren que las OMVs de *H. pylori* poseen un cargo abundante de factores de virulencia y enzimas similar al encontrado en la bacteria parental y podrían cumplir un rol como mensajeros a distancia para conectar el microbioma del estómago con el resto

de los sistemas incluyendo el SNC, como un efecto extra-gástrico de la infección por *H. pylori*.



**Figura 5. Caracterización de las OMVs provenientes de *H. pylori* 60190.** (A) Esquema general del protocolo para el aislamiento, concentración y purificación de las OMVs de *H. pylori*. (B) Imagen representativa que muestra la morfología de las OMVs mediante microscopía electrónica de transmisión (barra de magnificación = 200 nm). (C) Gráfico muestra la concentración (vesículas/ml) vs distribución de tamaño (nm) determinadas por Nanosight para las OMVs purificadas de A, y la tabla muestra la concentración de las OMVs (vesículas/µg de proteínas). El gráfico muestra el promedio de 3 muestras independientes. La tabla muestra valores promedio obtenidos de  $n = 3$  (promedio  $\pm$  S.E.M.).



**Figura 6. Proteínas de las OMVs encontradas por proteómica.** (A) Perfil proteico de las proteínas totales en *H. pylori* 60190 y sus OMVs resueltos mediante SDS-PAGE al 12%. La imagen muestra un gel representativo teñido con azul de Coomassie. Los marcadores de peso molecular (10-180 kDa) se muestran en el primer carril (St) y los  $M_r$  están indicados a la izquierda. (B) Identificación de las proteínas totales provenientes de la bacteria parental y de las OMVs mediante la cuantificación de números de péptidos únicos analizados mediante LC-ESI-MS/MS. Se indica número de péptidos más abundantes encontrados en las muestras de bacteria y de OMVs. Este experimento se repitió 3 veces con similares resultados. (C) Diagrama de Venn de proteínas detectadas en bacteria parental y en las OMVs de *H. pylori* 60190. Se detectaron un total de 1.478 proteínas en la bacteria parental, 566 proteínas en las OMVs de las cuales 524 proteínas son compartidas entre las OMVs y bacteria parental y 42 corresponden a proteínas únicas en las OMVs.

**Tabla 4:** Proteínas únicamente presentes en las OMVs de *H.pylori* mediante LC-ESI-MS-MS.

	Nombre de Proteína	Nombre del Gen	ID Proteína (UniProt)	Promedio número de péptidos
1	Proteína no caracterizada	<i>HP_0018</i>	O24863	8
2	VacA (Citotoxina vacuolizante)	<i>HPF51_0869</i>	A0A1Q2QJT4	6,5
3	5-Oxoprolinasa	<i>hyuA1</i>	I9TQZ0	6,5
4	Proteína no caracterizada	<i>Sin información</i>	A0A496E2R0	6
5	Ácido delta-aminolevulínico deshidratasa	<i>C2R61_07810</i>	A0A2T6W1C5	5
6	2', 3'-nucleótido cíclico 2'-fosfodiesterasa (CpdB)	<i>HP_0104</i>	O24930	4,5
7	3-Hidroxiacil- [proteína transportadora de acilo] deshidratasa FabZ	<i>fabZ</i>	O25928	4,25
8	S-adenosilhomocisteína nucleosidasa	<i>L931_01435</i>	T2SXD1	4
9	Subunidad de proteasa dependiente de ATP HslV	<i>hslV</i>	O25253	4
10	Arginina-tRNA ligasa	<i>Arginine--tRNA ligase</i>	Ta0a438whg0	4
11	SabA_proteína que contiene el dominio de adhesión	<i>EC518_12205</i>	A0A2T6PYB1	4
12	Biotin sulfóxido reductasa BisC	<i>bisC-frg</i>	E6NI38	4
13	Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolasa	<i>duT</i>	O25536	3
14	3-Deshidroquinato sintasa	<i>aroB</i>	P56081	3
15	Proteína no caracterizada de la subunidad beta de ureasa	<i>HP_1018</i>	O25662	3
16	Proteína que contiene el dominio DUF5644	<i>C2R70_03290</i>	A0A2T6VRX2	3
17	Asp-tRNA (Asn)/Glu-tRNA (Gln) amidotransferasa GatCAB subunidad B	<i>gatB</i>	A0A438VX87	2,5
18	ADN-metiltransferasa de sitio específico	<i>EGW01_04155</i>	A0A3N5CG40	2,5
19	Formamidasa	<i>amiF_1</i>	A0A238GWJ0	2,25
20	GDP-L-fucosa sintasa	<i>fcl</i>	O24886	2
21	Modulador de la actividad del fármaco (Mda66)	<i>HP_0630</i>	O25347	2

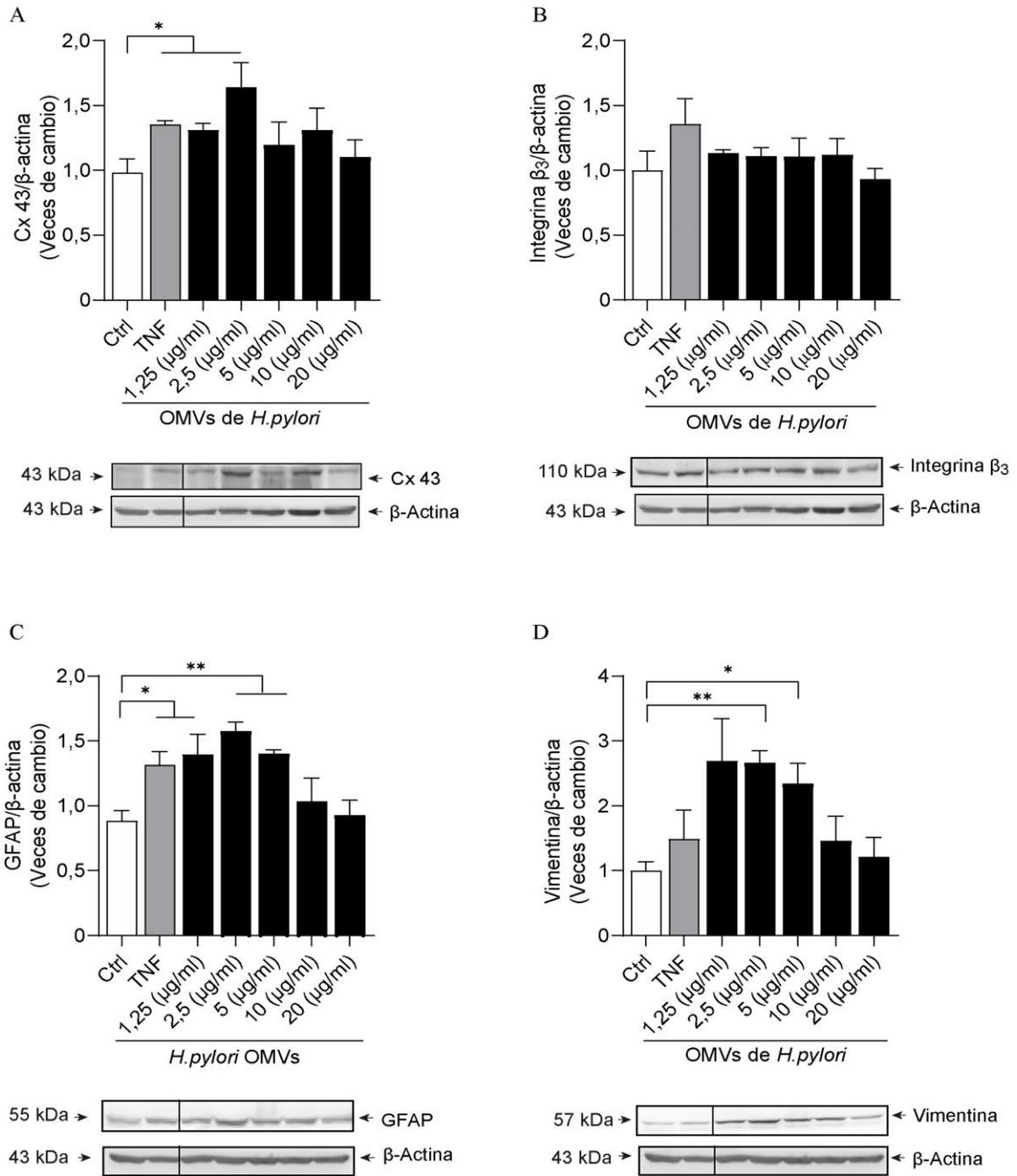
22	Proteína de la familia de la ketopantoato hidroximetiltransferasa	<i>HPSA50_1461</i>	T2SCF6	2
23	Transportador de dipéptidos ABC, proteína de unión a dipéptidos periplásmicos (DppA)	<i>HP_0298</i>	O25069	2
24	5'-metiltioadenosina/S-adenosilhomocisteína nucleosidasa	<i>L935_00105</i>	T2SIH2	2
25	NAD (P) H-hidrato epimerasa	<i>L935_00105</i>	T2SUF7	2
26	Nucleasa NucT	<i>EC594_07795</i>	A0A439B0S4	2
27	Proteína no caracterizada	<i>HP9810_889g27</i>	B9XWD6	2
28	Proteína no caracterizada	<i>HCW_05695</i>	I0EN82	2
29	Proteína no caracterizada	<i>HP_1455</i>	O25994	2
30	Citotoxina vacuolante	<i>vacA2</i>	JOJA73	2
31	Acetil-CoA C-aciltransferasa	<i>EC590_07740</i>	A0A439AEL1	2
32	N-acetil glucosamina/N-acetil galactosamina epimerasa	<i>L934_05215</i>	T2SMH9	2
33	Piranopterina monofosfato sintasa cíclica	<i>moaC</i>	A0A0M0MRV5	2
34	Proteína D asociada a virulencia	<i>C2R49_00200</i>	A0A2T6UPV5	2
35	Proteína no caracterizada	<i>HP9810_491g33</i>	B9XW95	2
36	Proteína bifuncional GlnU	<i>glmU</i>	A0A1V3BFG9	2
37	Metalohidrolasa de la familia M20/M25/M40	<i>EC551_07705</i>	A0A438XQM5	2
38	Biotin sulfóxido reductasa	<i>bisC</i>	M5A5V9	2
39	Proteína no caracterizada	<i>DD783_03775</i>	A0A496GQY0	2
40	Pirrolina-5-carboxilato reductasa	<i>BB411_08815</i>	A0A2A6X862	2
41	Proteína de la isla de patogenicidad cag5 (Cag5)	<i>HP_0524</i>	O25260	2
42	Proteína no caracterizada	<i>C2S02_00025</i>	A0A2T6PQ64	2

Los resultados del análisis LC-ESI-MS/MS y la búsqueda en la base de datos UniProtKB de *H. pylori* (UP000000429.fasta) permitieron identificar las proteínas únicas en las OMVs *H. pylori* 60190. Los resultados de la tabla muestran el código identificador ID de las proteínas y el número promedio de péptidos únicos que se encontraron en las OMVs.

### **5.1.2- Establecimiento de la dosis y tiempo del tratamiento con las OMVs de *H. pylori* 60190 necesarios para inducir un fenotipo reactivo en astrocitos**

La reactividad de los astrocitos se ha utilizado para describir las respuestas de los astrocitos a eventos inflamatorios en el SNC, incluidas las enfermedades neurodegenerativas y desmielinizantes, la epilepsia, los traumatismos, la isquemia, las infecciones y el cáncer (Sofroniew et al., 2010). Además, se define como el proceso por el cual los astrocitos sufren cambios en la regulación transcripcional, así como remodelación morfológica, metabólica, bioquímica, y fisiológica, que finalmente resulta en pérdida o ganancia de nuevas funciones. Los astrocitos detectan una señal patológica, esta señal puede ser extracelular (citoquinas, purinas, proteínas agregadas y residuos de mielina), transcelulares (moléculas de adhesión transmembrana como Efrinas o Integrinas), unidas a la membrana (por ejemplo, fosfatidilserina), o intracelulares (proteínas agregadas, ácidos nucleicos de patógenos infecciosos, iones como  $Ca^{2+}$ ) desencadenando el proceso molecular iniciador de la reactividad en los astrocitos (Escartin et al., 2019, 2021). Los astrocitos reactivos además sobre-expresan algunas proteínas que incluyen a iNOS, Conexina 43, Vimentina, Integrina  $\alpha_v\beta_3$ , Síndecan-4 y GFAP (Lagos-Cabré et al., 2017). Además, varias moléculas se liberan en el espacio extracelular, incluyendo ATP, adenosina y varias citoquinas, como el TNF, que actúa como una señal de alerta e induce la reactividad de los astrocitos vecinos. Se ha visto además que los astrocitos pueden ser activados *in vivo* por las OMVs provenientes del microbioma de pacientes diagnosticados con Alzheimer (Wei et al., 2020). Sin embargo, los cambios provocados por las OMVs de bacterias directamente sobre astrocitos y el mecanismo por el cual estos cambios ocurren no han sido estudiados aún.

En este estudio, usamos como control positivo de “astrocitos reactivos”, células DITNC1 ATCC tratadas con 10 ng/ml TNF por 48 h, concentración y tiempo previamente determinados como inductor de reactividad. Este control positivo fue usado en los experimentos para comparar los niveles de Conexina 43, Vimentina, Integrina  $\alpha_v\beta_3$ , GFAP en células tratadas con concentraciones crecientes de las OMVs, desde 1,25 a 20  $\mu\text{g/ml}$  de OMVs de *H. pylori*, durante 24 h (Fig. 7). Nuestros resultados muestran que 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de OMVs incrementan significativamente los niveles de Vimentina, GFAP y Conexina 43 (Figs. 7A, C y D). Asimismo, al aumentar la dosis de OMVs a 5  $\mu\text{g/ml}$ , solo los niveles de Vimentina y GFAP aumentaron (Figs. 7C y D). No hubo cambios en los niveles de Integrina  $\alpha_v\beta_3$  (Fig. 7B) como respuesta al incremento de las OMVs de *H. pylori* en astrocitos DITNC1 ATCC durante las 24 h de tratamiento. Por consiguiente, la concentración establecida de tratamiento es de 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de OMVs.

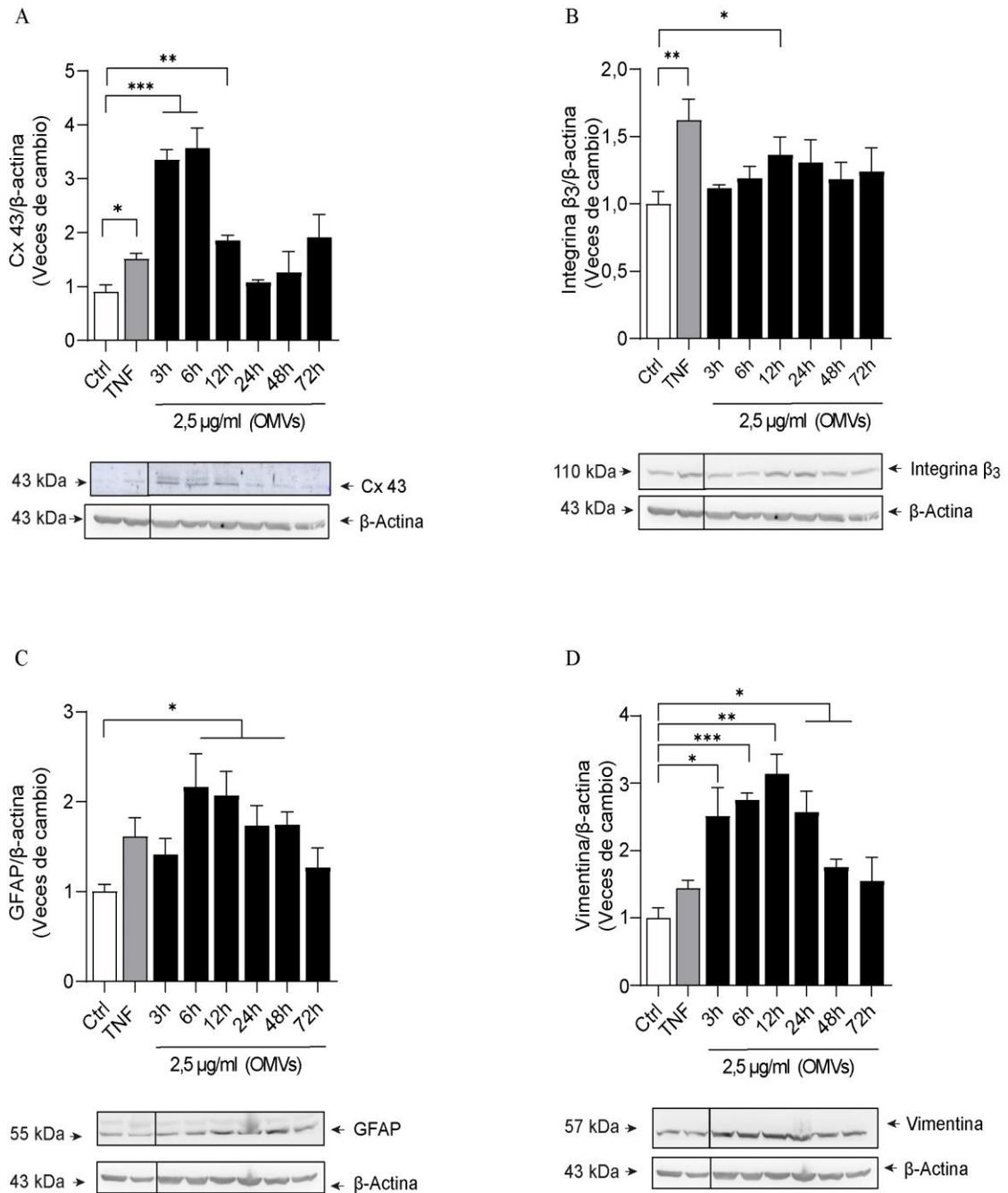


**Figura 7. Evaluación dosis-respuesta de los marcadores de reactividad en astrocitos DITNC1 ATCC tratados con distintas concentraciones de las OMVs de *H. pylori* 60190.** Se evaluó por Western blot los niveles de las proteínas Conexina-43 [Cx 43] (A), Integrina  $\beta_3$  (B), GFAP (C) y Vimentina (D) normalizados con  $\beta$ -Actina, en muestras obtenidas de astrocitos DITNC1 ATCC tratadas con las OMVs (1,25 a 20  $\mu$ g/ml) de *H. pylori* 60190 por 24 h. Como control positivo de reactividad se usó muestras obtenidas de astrocitos incubados con TNF (10 ng/ml por 48h). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs Control. Promedio  $\pm$  S.E.M. (n = 3).

Para ensayar la dependencia de la temporalidad, las células se trataron con las OMVs a tiempos crecientes 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h para determinar las veces de cambios en los marcadores de reactividad. Con estos resultados establecimos concentración y tiempo adecuado para el desarrollo de nuestro trabajo.

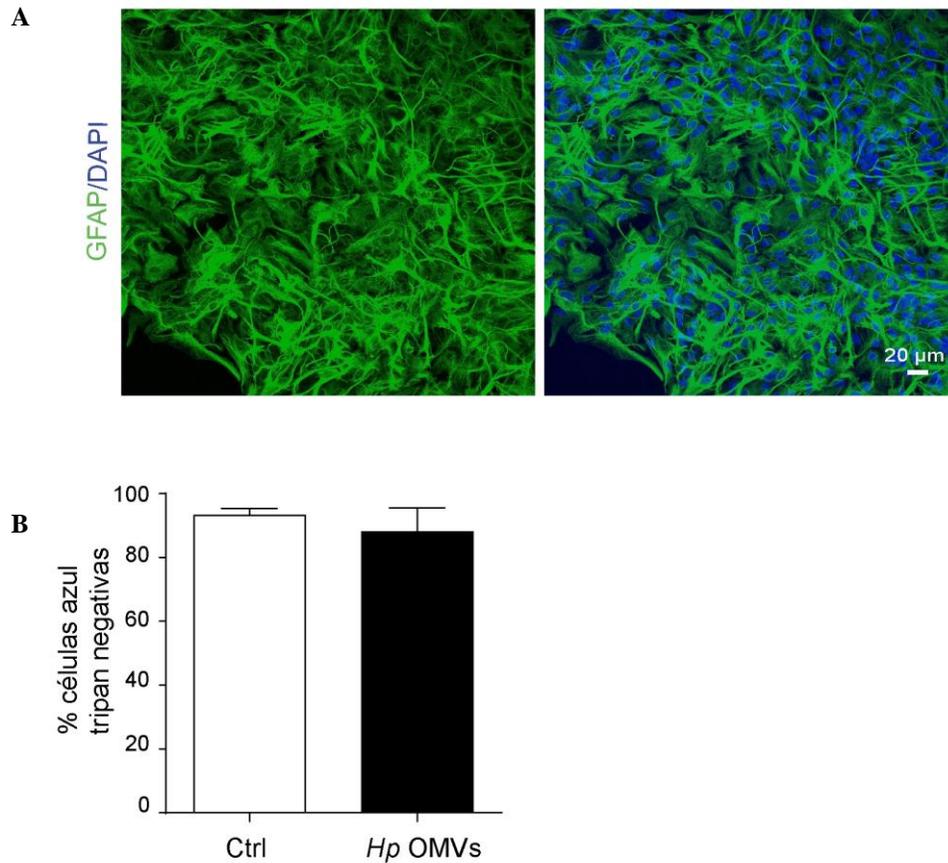
Tratamiento con 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de las OMVs de *H. pylori* indujo el aumento en células DITNC1 ATCC de Conexina 43 desde las 6 a 12 h (Fig. 8A), Integrina  $\alpha_v\beta_3$  a las 12 h (Fig. 8B), GFAP aumenta desde las 6 a las 48 h (Fig. 8C) y Vimentina aumenta desde las 3 a las 48 h (Fig. 8D) comparado con el control sin tratamiento. Observamos que el tratamiento por 12 h con 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de OMVs de *H. pylori* induce el aumento de las 4 proteínas asociadas al fenotipo reactivo de astrocitos en las células DITNC1.

Como paso siguiente, desarrollamos cultivos primarios de astrocitos obtenidos de ratas neonatas (Fig. 9A) y ensayamos si las OMVs a este tiempo y concentración no producen cambios en la viabilidad celular (Fig. 9B). Siguiendo la misma metodología señalada en el punto anterior, evaluamos los marcadores de reactividad en astrocitos primarios. Se observa que el tratamiento por 12 h con 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de OMVs de *H. pylori* aumentan también los niveles de Conexina 43, Integrina  $\alpha_v\beta_3$ , GFAP y Vimentina en astrocitos primarios (Fig. 10). Del mismo modo, corroboramos mediante inmunofluorescencia indirecta la localización subcelular de al menos 3 marcadores de reactividad: Vimentina, GFAP y Conexina 43 (Fig. 11). En conjunto estos resultados muestran que 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de OMVs de *H. pylori* por 12 h inducen un aumento de los marcadores indicando un cambio de los astrocitos al fenotipo reactivo.

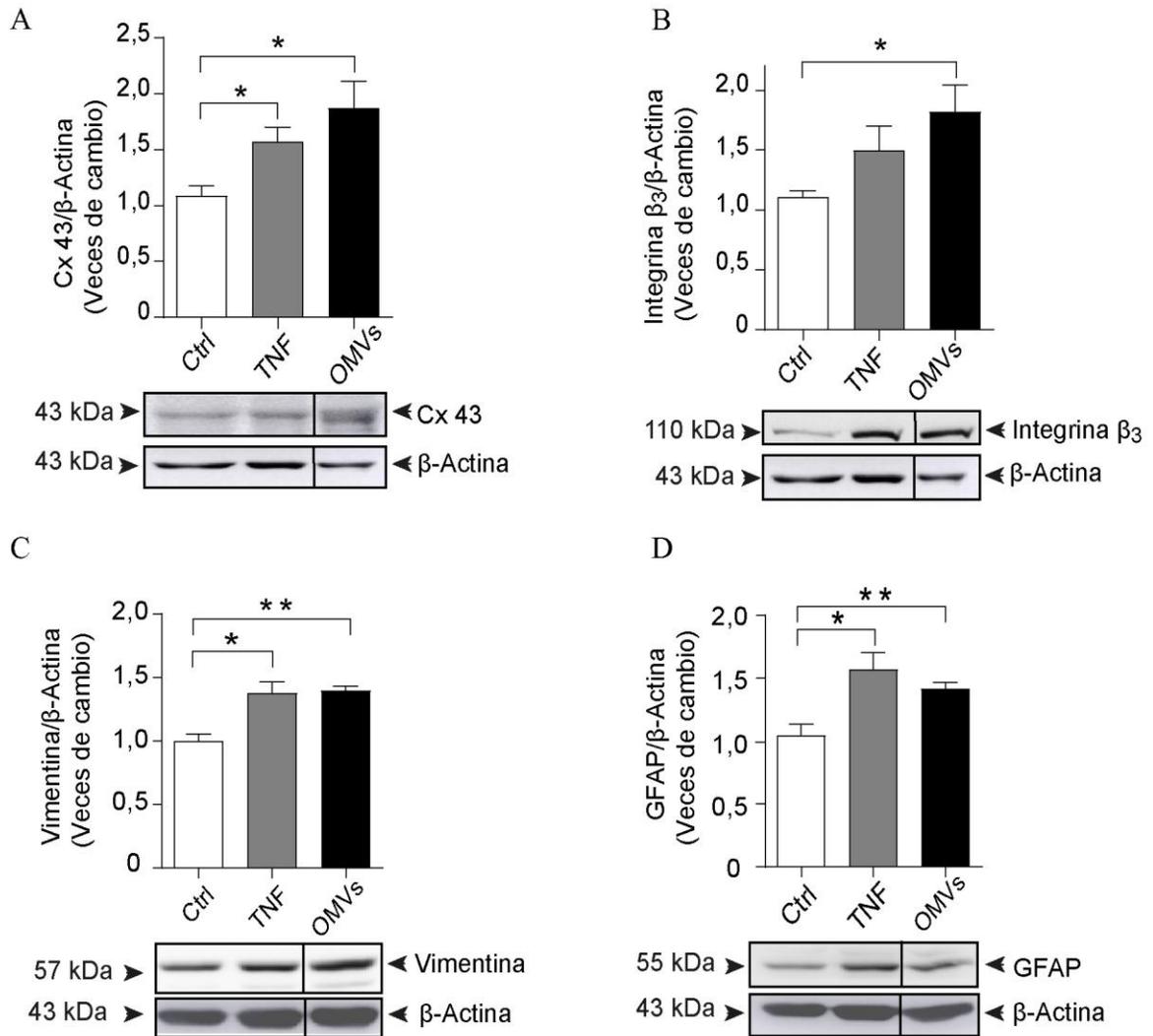


**Figura 8. Evaluación dosis-respuesta de marcadores de astrocitos DITNC1 ATCC tratados con OMVs de *H. pylori* 60190 a distintos tiempos.** Se evaluó por Western blot los niveles de las proteínas Conexina 43 [Cx 43] (A), Integrina β<sub>3</sub> (B), GFAP (C) y Vimentina (D) normalizados con β-actina, en muestras obtenidas de astrocitos DITNC1 ATCC tratadas con 2,5 μg/ml de OMVs de *H. pylori* a distintos tiempos (3 a 72 h), utilizando como control positivo muestras obtenidas de astrocitos incubados con TNF (10 ng/ml por 48h). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs Control. Promedio ± S.E.M. (n = 3).

## Astrocitos primarios

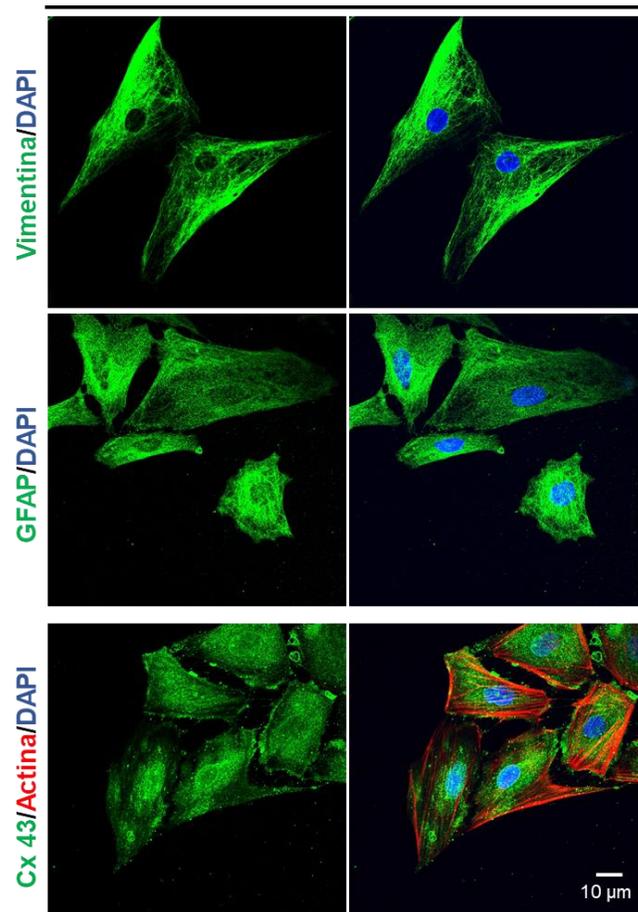


**Figura 9. Caracterización y viabilidad celular en cultivos primarios de astrocitos tratados con OMVs.** (A) Los cultivos mixtos de células gliales provenientes de la corteza de ratas neonatas con maduración de 14–16 días *in vitro* (14–16 DIV) fueron agitados en "shaker" orbital a 180×rpm toda una noche para liberar neuronas y otros tipos celulares. Posteriormente, las células adheridas fueron usadas y plaqueadas hasta pasaje 3 para los experimentos de este trabajo de investigación. En el panel se muestra una microfotografía que representa a los astrocitos GFAP (verde) y DAPI (azul) como marcador nuclear mediante inmunofluorescencia indirecta. (B) Astrocitos primarios post 17 DIV fueron tratados con 2,5 μg/ml de las OMVs durante las 12 h de tratamiento y luego se evaluó la viabilidad con azul de tripan. Se realizó el conteo celular para las células azul de tripan positivas y negativas en cámara de Neubauer. Los gráficos representan el porcentaje de células azul de tripan negativas. Los valores muestran el promedio de 3 experimentos independientes (promedio ± S.E.M.).



**Figura 10. OMVs de *H. pylori* 60190 induce el aumento de marcadores de reactividad en cultivo primario de astrocitos.** Se evaluó los niveles de las proteínas Conexina 43 [Cx 43] (A), Integrina β<sub>3</sub> (B), GFAP (C) y Vimentina (D) por Western blot y se normalizó con β-actina, en muestras obtenidas de cultivos primarios de astrocitos tratados con 2,5 μg/ml de OMVs de *H. pylori* por 12 h y muestras obtenidas de astrocitos incubados con TNF (10 ng/ml por 48 h) usados como control positivo. En el panel superior de cada figura se muestra el gráfico obtenido del análisis densitométrico y en el panel inferior se muestra las imágenes representativas de cada WB. Valores en los gráficos mostrados como promedio ± S.E.M. de al menos 3 experimentos independientes. Se consideró significativo un valor \*p<0,05; \*\*p<0,01.

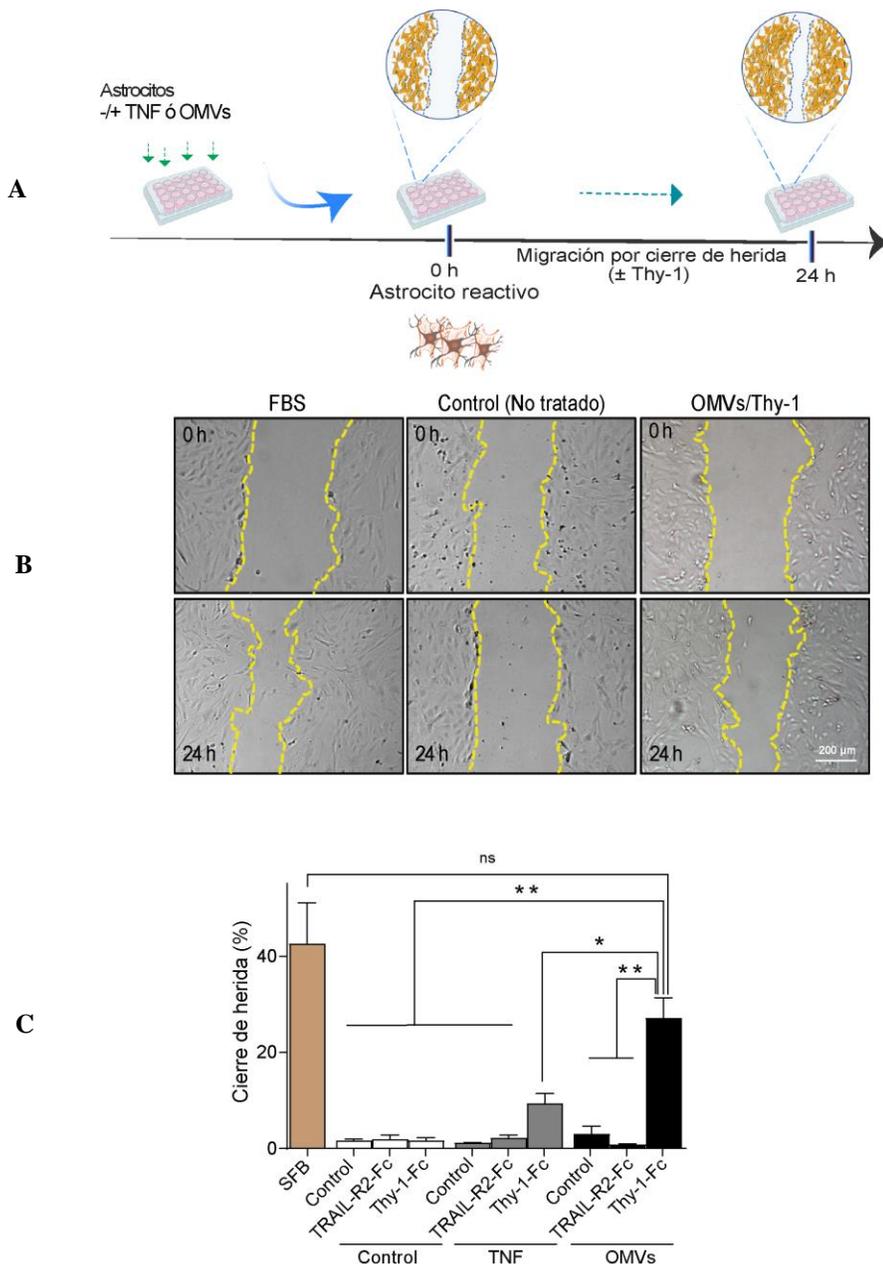
### OMVs de *H. pylori*



**Figura 11. Localización subcelular de Vimentina, GFAP y Conexina 43 en astrocitos primarios tratados con OMVs de *H. pylori*.** Astrocitos primarios fueron sembrados sobre cubreobjetos de vidrio y luego tratados con las OMVs de *H. pylori* durante 12 h. Posteriormente, las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpos primarios para filamentos intermedios: Vimentina (**panel superior**) y GFAP (**panel medio**). Además del hemicanal Conexina 43 (**panel inferior**) en astrocitos teñidos también con rodamina-faloidina, marcador de actina filamentososa (F-actina) (rojo). Todas las muestras fueron teñidas con anticuerpo secundario Alexa 488 (verde) y DAPI como marcador nuclear. En los paneles de la izquierda se muestra solo las tinciones de las proteínas Vimentina, GFAP y Conexina 43, mientras en los paneles de la derecha aparecen las tinciones de núcleos y F-actina (barra de magnificación = 10 μm).

### **5.1.3- Evaluación de la migración celular en astrocitos tratados con OMVs de *H. pylori***

Astrocitos reactivos expresan niveles aumentados de Integrina  $\alpha_v\beta_3$ , Síndecan-4, el receptor purinérgico P2X7, los hemicanales Conexina 43 y Panexina 1 (Alvarez et al., 2016; Lagos-Cabré et al., 2017). Todas estas moléculas están involucradas en la migración de astrocitos y particularmente, en nuestro laboratorio se ha descrito que la comunicación de la glicoproteína neuronal Thy-1 y las proteínas astrocíticas Síndecan-4 e Integrina  $\alpha_v\beta_3$  promueven la migración solo de astrocitos primarios pretratados con TNF, es decir, de astrocitos reactivos. De este modo y para evaluar funcionalmente la reactividad de los astrocitos, estudiamos la migración en astrocitos primarios tratados con OMVs o TNF. Empleamos el ensayo de cierre de herida representado esquemáticamente en la Fig. 12A. Astrocitos controles, tratados previamente con OMVs o con TNF, se incubaron en presencia y ausencia de la proteína de fusión neuronal Thy-1-Fc, o con su control negativo, la proteína de fusión del receptor del ligando soluble inductor de apoptosis, TRAIL-R2-Fc. Se incluyó, además, células tratadas con FBS al 3% como control positivo de migración durante 24 h. Nuestros resultados indican que astrocitos primarios pretratados con OMVs de *H. pylori* en presencia de Thy-1-Fc aumentan en un ~25% su migración celular en comparación al 1% de sus respectivos controles. Siendo este aumento significativamente mayor al ~10%, observado en la migración de astrocitos pretratados con TNF en presencia de Thy-1-Fc: mientras que, astrocitos controles tratados con FBS al 3% migran en ~40% (Figs. 12B y 12C). Estos resultados indican que el tratamiento con OMVs de *H. pylori* induce la reactividad de los astrocitos, los que responden funcionalmente al estímulo de Thy-1.



**Figura 12. Thy-1 induce migración celular en cultivos primarios de astrocitos reactivos por OMVs de *H. pylori* in vitro.** (A) Representación esquemática del ensayo de migración por herida desde el tratamiento de las células pre y post “scratch”. (B) Imágenes representativas a 0 y 24 h de la migración de los astrocitos sin (control) y con el pretratamiento de OMVs y estimulados con Thy-1-Fc, o con FBS. Thy-1 induce migración sólo en las células tratadas previamente con TNF o con OMVs. (C) Gráficos con la cuantificación del % de cierre de herida de astrocitos controles, tratados previamente con TNF, u OMVs estimulados con TRAIL-R2-Fc, Thy-1-Fc, o con FBS como control positivo de migración durante 24 h. (sección 4.12). Los valores muestran el promedio  $\pm$  S.E.M. en tres experimentos independientes. ns = no significativo, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

## **5.2- Objetivo específico 2: Determinar si NF-κB participa en la inducción de la reactividad de astrocitos por las OMVs de *H. pylori* y en la producción de citoquinas proinflamatorias**

Los resultados obtenidos en el objetivo específico 1 indican que las OMVs de *H. pylori* inducen un fenotipo reactivo en astrocitos, y estas células reactivas se comportan de un modo similar al reportado con TNF (Lagos-Cabré et al., 2017). Por otra parte, la unión de TNF a su receptor activa la vía de señalización de NF-κB en astrocitos humanos, y ésta, la expresión génica de citoquinas y quimioquinas en condiciones inflamatorias (Choi et al., 2014). Del mismo modo, las OMVs de *Aa* incrementan la expresión de TNF en macrófagos humanos y cerebro murino, principalmente a través de las vías de señalización TLR8 y NF-κB (Han et al., 2019). Estos antecedentes nos llevaron a plantear que NF-κB podría estar participando en la inducción de la reactividad de astrocitos en respuesta a tratamientos con las OMVs de *H. pylori* y posiblemente en la producción de citoquinas proinflamatorias.

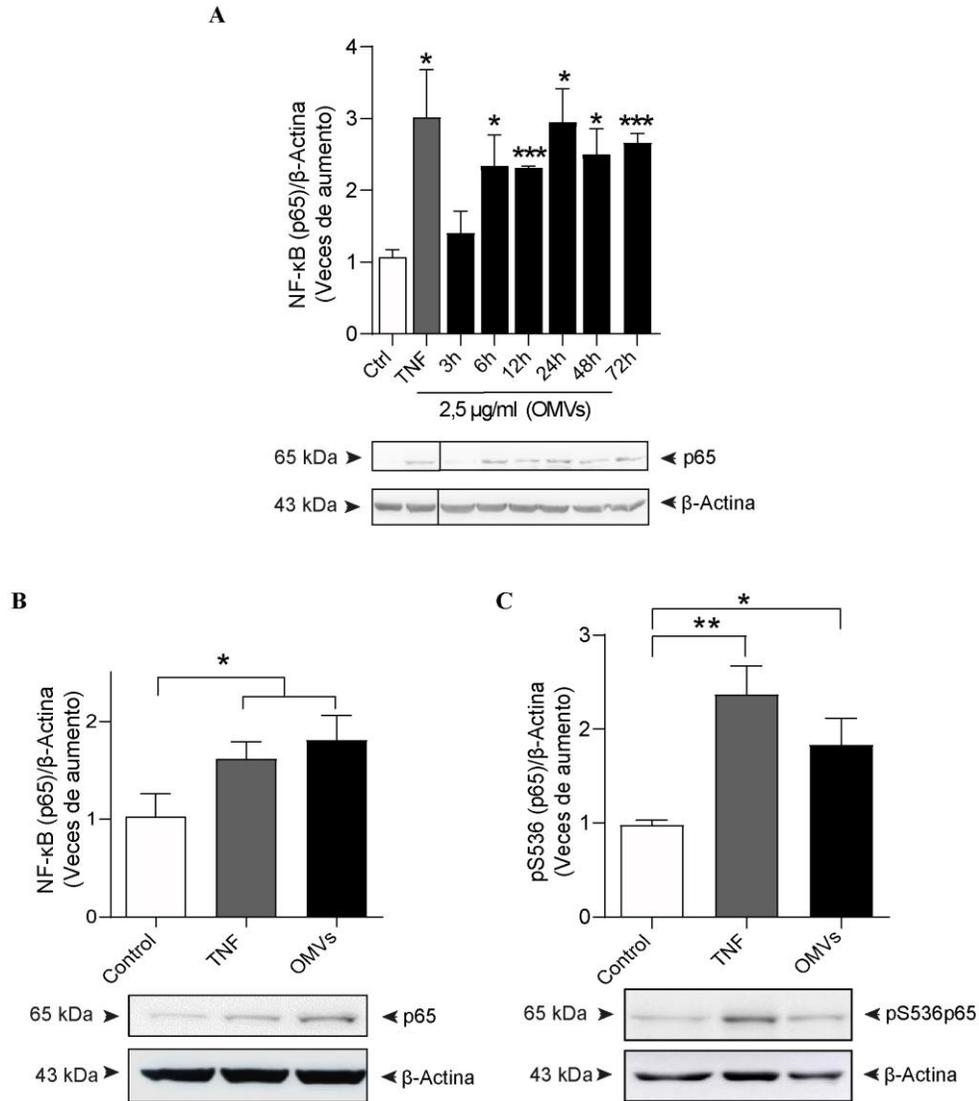
### **5.2.1 Determinar si NF-κB participa en la inducción de la reactividad de astrocitos por OMVs de *H. pylori***

Para descifrar el rol de NF-κB como factor de transcripción en el tratamiento con las OMVs en los astrocitos, el primer paso fue medir por WB los niveles totales de la subunidad p65 (NF-κB) en las condiciones experimentales ya descritas en el objetivo 1. Encontramos que las OMVs aumentan los niveles de p65 (NF-κB) sostenidamente desde las 6 a las 72 h en células DITNC1 (Fig. 13A) sugiriendo la participación de este factor de transcripción en la señalización activada por las OMVs. Considerando este resultado, evaluamos en astrocitos primarios los niveles totales de p65 y pS536p65

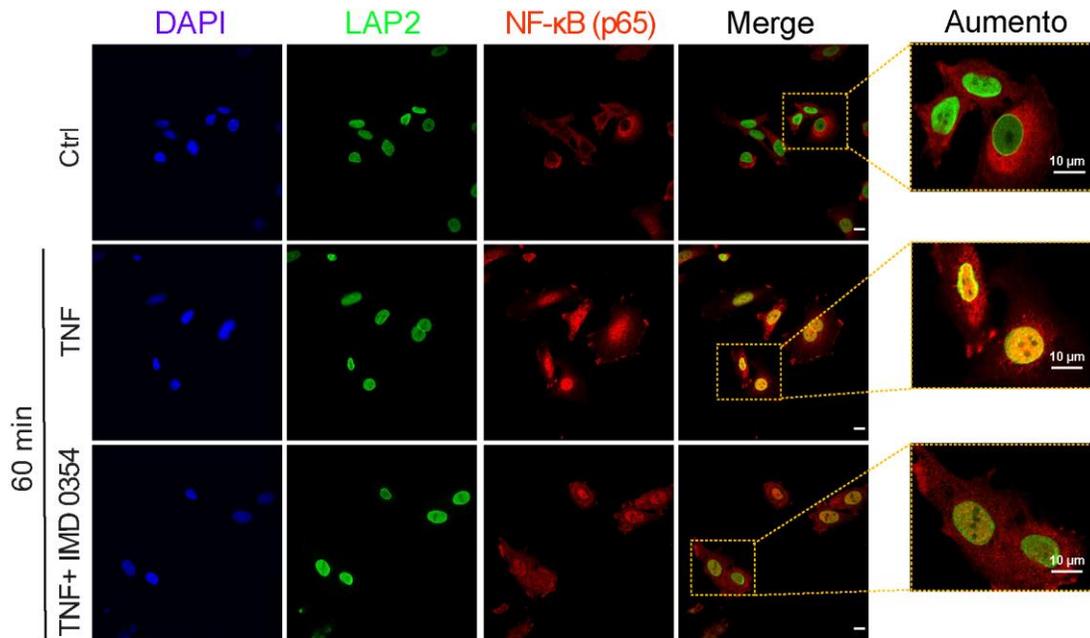
(fosforilado en S536), como un indicador de funcionalidad del factor de transcripción. Observamos que ambas señales aumentan (Figs. 13B y C) sugiriendo la participación de NF- $\kappa$ B activado en el efecto de las OMVs en astrocitos. Por otro lado, tratamos astrocitos primarios con TNF (10 ng/ml) durante 1 h (Trindade et al., 2020) para evaluar la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B mediante inmunofluorescencia indirecta (Trindade et al., 2020) en ausencia y presencia del inhibidor de IKK $\beta$  (IMD 0354, 1  $\mu$ M). Se observa que TNF induce el traspaso de NF- $\kappa$ B al núcleo y que este efecto se ve inhibido por IMD 0345 (Fig. 14). Evaluamos luego, la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B en astrocitos tratados con 2,5  $\mu$ g/ml de OMVs de *H. pylori* durante 1 h en presencia y ausencia del inhibidor IMD 0354 (Inhibidor de IKK $\beta$ ) o BMS 345541 (Inhibidor de IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ). Se observa que las OMVs de *H. pylori* también inducen translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B (Fig. 15A) y hay un aumento significativo de ~65% de colocalización entre NF- $\kappa$ B con la proteína polipéptido 2 asociado a Lamina (LAP2) en astrocitos tratados con OMVs, mientras que esto solo se observa en ~10% de los astrocitos control (Fig. 15B). Por otro lado, los inhibidores IMD 0354 o BMS 345541 evitan que NF- $\kappa$ B se vaya al núcleo mostrando niveles similares a la condición control (Fig. 15B). Luego evaluamos si la translocación nuclear del NF- $\kappa$ B estaba asociada a cambios en su actividad de unión al ADN mediante el Kit ELISA Transcription Factor Assay (Ann Arbor, MI, USA) (Figs. 16 A y B). Encontramos que astrocitos tratados con TNF o OMVs aumentan la actividad de NF- $\kappa$ B, efecto que es inhibido a niveles de astrocitos control en ambas condiciones al coincubar las células con el inhibidor BMS 345541. Sin embargo, la coincubación con IMD 0354 solo previene el aumento significativo en células tratadas con las OMVs y no en aquella tratadas con TNF durante 60 min (Fig.

16B). Estos resultados en su conjunto sugieren que NF- $\kappa$ B estaría participando en la transcripción de genes en respuesta al tratamiento con las OMVs de *H. pylori*. Finalmente, se estudió el efecto de los inhibidores de IKK sobre el aumento inducido por las OMVs en los niveles de las proteínas Integrina  $\alpha_v\beta_3$  y Conexina 43 por Western blot. Nuestros resultados indican que ambos inhibidores de IKK bloquean el aumento de ambas proteínas provenientes de astrocitos tratados con TNF (Fig. 17). Además, BMS y IMD previenen significativamente el aumento de Integrina  $\alpha_v\beta_3$  (Fig. 17A) y Conexina 43 (Fig. 17B), respectivamente, sugiriendo que la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B es necesaria para inducir el fenotipo reactivo en astrocitos tratados con OMVs de *H. pylori*.

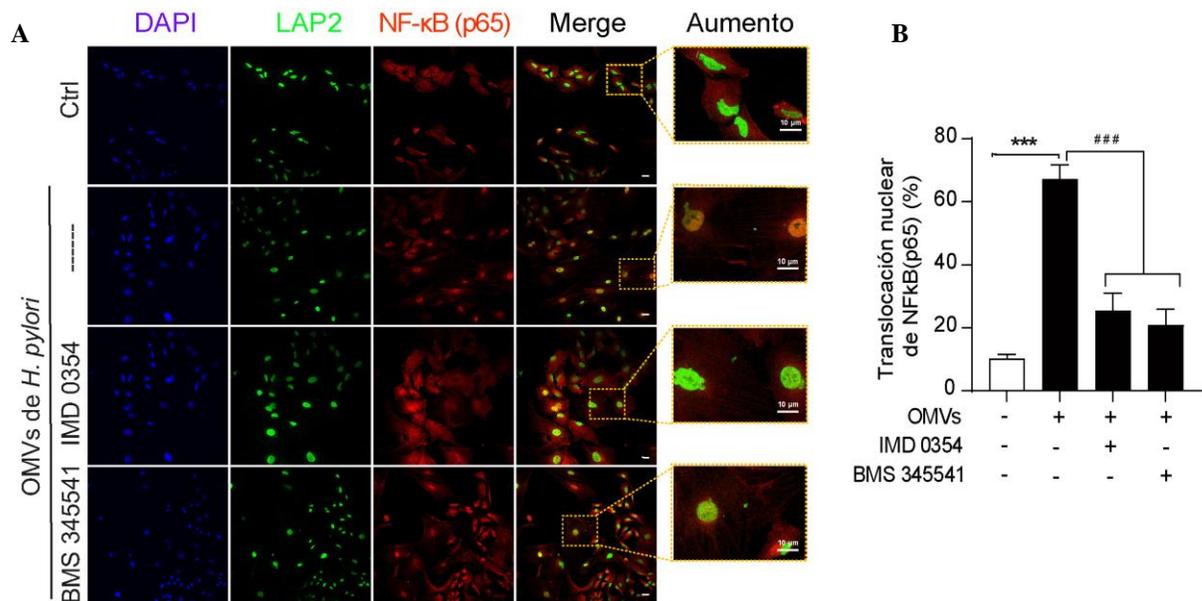
En resumen, en este objetivo se sugiere que astrocitos tratados con OMVs de *H. pylori* induce fenotipo reactivo a través de un mecanismo molecular dependiente de la señalización de NF- $\kappa$ B.



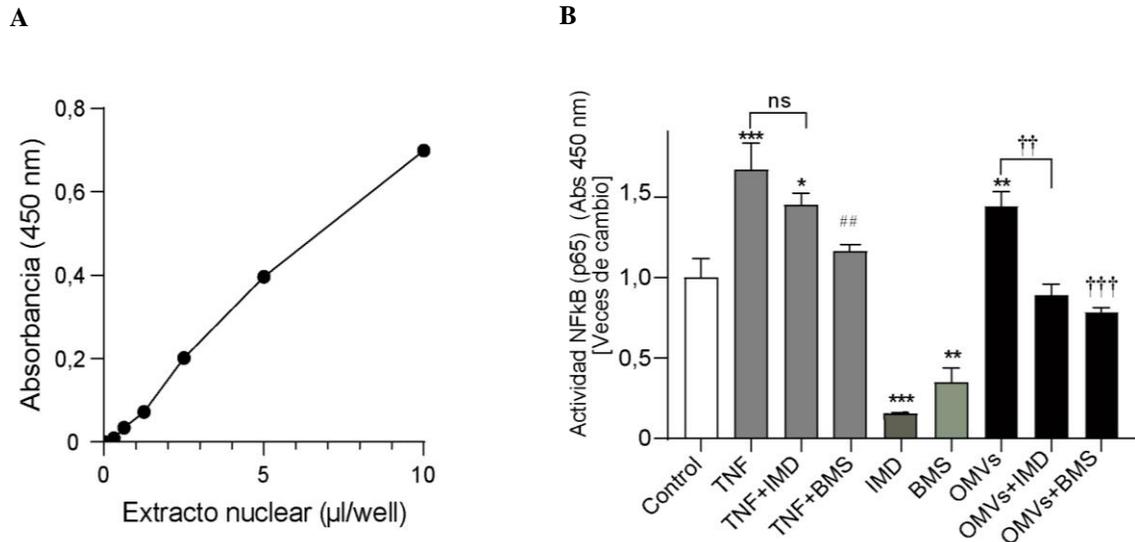
**Figura 13. Efecto de las OMVs de *H. pylori* sobre los niveles de la subunidad p65 total y activo (pS536) de NF-κB en astrocitos.** Células DITNC1 ATCC se incubaron en ausencia o presencia de 2,5 μg/ml de OMVs de 3 a 72 h (A). Por otro lado, astrocitos primarios se incubaron en ausencia o presencia de 2,5 μg/ml de OMVs por 12 h (B y C). Como control positivo de reactividad, los astrocitos se incubaron con TNF (10 ng/ml para 48 h). En A, se muestran el gráfico con los niveles de las proteínas p65 NF-κB en astrocitos DITNC1 ATCC evaluados por Western blot en las condiciones mencionadas anteriormente. En B y C se muestran los gráficos con los niveles de p65 NF-κB y la subunidad p65 fosforilada (pS536) respectivamente provenientes de extractos proteicos provenientes desde astrocitos primarios tratados con 2,5 μg/ml OMVs por 12 h. Los resultados fueron normalizados con β-actina. Paneles bajo los gráficos muestran las imágenes representativas de cada resultado de WB. Valores en los gráficos se obtuvieron por análisis densitométrico de los WB. Datos expresados como promedio ± S.E.M. de al menos 3 experimentos independientes. (\*p<0,05; \*p<0,01; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).



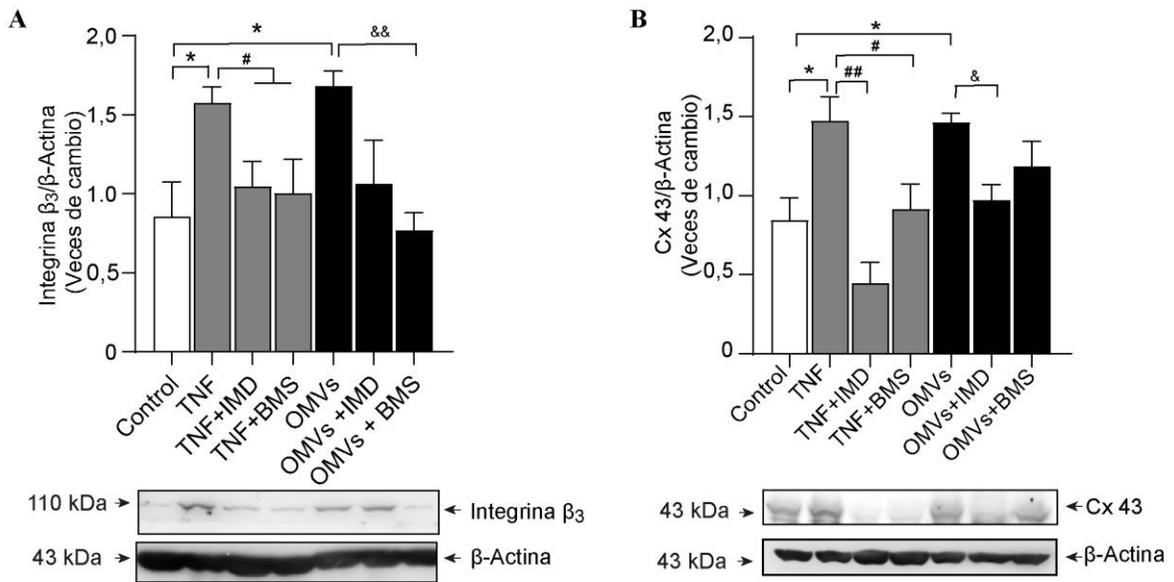
**Figura 14. Translocación nuclear del factor de transcripción NF-κB en astrocitos DITNC1 ATCC tratados con TNF.** Las células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio y luego tratadas con TNF (10 ng/ml) durante 60 min en presencia y ausencia del inhibidor IMD 0354 1μM (Inhibidor de IKKβ). Posteriormente, las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpos primarios para la proteína nuclear péptido 2 asociado a Lamina (LAP-2) y la subunidad p65 del factor de transcripción NF-κB seguido del anticuerpo secundario Alexa 488 (verde) y Alexa 546 (rojo), respectivamente. Imágenes representativas tomadas a 60X en Microscopio confocal Nikon C2 plus. Recuadro amarillo representa la zona elegida para mostrar las células de interés con magnificación digital (barra de magnificación = 10 μm).



**Figura 15. Las OMVs de *H. pylori* aumentan la translocación nuclear del factor de transcripción NF-κB en astrocitos primarios.** (A) Astrocitos primarios fueron sembrados sobre cubreobjeto de vidrio y luego tratados con 2,5 μg/ml de OMVs de *H. pylori* durante 60 min en presencia y ausencia del inhibidor IMD 0354 1μM (Inhibidor de IKKβ) o BMS 345541 1μM (Inhibidor de IKKα y IKKβ). Posteriormente, las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpos primarios para la proteína nuclear péptido 2 asociada a Lamina (LAP-2) y la subunidad p65 del factor de transcripción NF-κB seguido del anticuerpo secundario Alexa 488 (verde) y Alexa 546 (rojo), respectivamente. Imágenes representativas tomadas a 20X y magnificación digital para la última columna de la derecha, con Microscopio confocal Nikon C2 Plus (barra de magnificación = 10 μm). (B) Gráfico representa el porcentaje de células positivas p65 (rojo) nucleares comparadas del total de núcleos (DAPI/LAP2). Datos expresados como promedio ± S.E.M. de al menos 3 experimentos independientes (\*\*p<0,001; ###p<0,001).



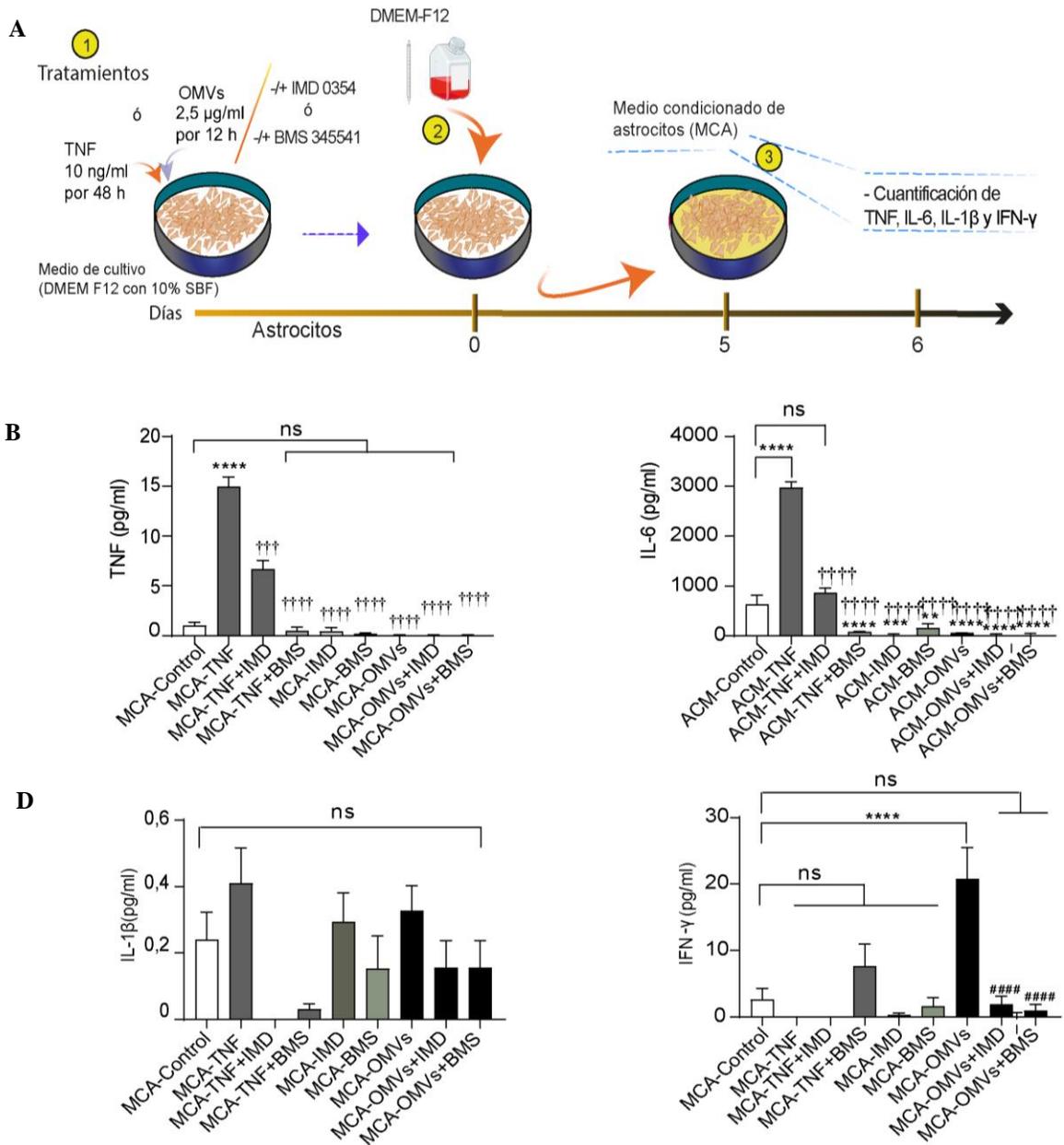
**Figura 16. Las OMVs de *H. pylori* aumentan la actividad de NF-κB en astrocitos primarios.** Se evaluó la actividad de unión al ADN de NF-κB mediante el Kit ELISA Transcription Factor Assay (Ann Arbor, MI, USA) en cantidades iguales de extractos nucleares de cultivos primarios de astrocitos que fueron tratados con 2,5 µg/ml de las OMVs de *H. pylori* o TNF (10 ng/ml) como control positivo en presencia y ausencia del inhibidor IMD 0354 1µM (Inhibidor de IKKβ) o BMS 345541 1µM (Inhibidor de IKKα y IKKβ) durante 60 min. **(A)** Curva de calibración correspondiente a la actividad de unión al ADN del control positivo NF-κB (p65 humano) del ensayo ELISA. **(B)** Gráfico correspondiente a los valores de las actividades de NF-κB registradas a 450 nm de muestras nucleares. Los resultados están expresados como promedio ± S.E.M. (n = 3). \*p<0,05, \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 versus valores correspondientes en control, ††p<0,01, †††p<0,001 vs valores obtenidos con TNF. ††p<0,01, †††p<0,001 vs valores obtenidos con OMVs.



**Figura 17. El aumento de Integrina  $\beta_3$  y Connexina 43 inducido por las OMVs de *H. pylori* requiere de la activación de NF- $\kappa$ B en astrocitos primarios.** Se evaluaron por Western blot los niveles de las proteínas Connexina 43 [Cx 43] (A), Integrina  $\beta_3$  (B), normalizados con  $\beta$ -actina, en muestras obtenidas de cultivos primarios de astrocitos tratados con 2,5  $\mu$ g/ml de OMVs de *H. pylori* por 12 h y muestras obtenidas de astrocitos incubados con TNF (10 ng/ml por 48 h), en ausencia y presencia del inhibidor 1  $\mu$ M IMD 0354 (Inhibidor de IKK $\beta$ ) ó 1  $\mu$ M de BMS 345541 (Inhibidor de IKK $\alpha$  y IKK $\beta$ ). En el panel superior de cada figura se muestra el gráfico obtenido del análisis densitométrico y el panel inferior muestra las imágenes representativas de cada WB. Los valores en los gráficos se obtuvieron por análisis densitométricos de los WBs. Datos expresados como promedio  $\pm$  S.E.M. de al menos 3 experimentos independientes. \* $p$ <0,05 vs el control. ## $p$ <0,01 # $p$ <0,05 vs TNF. &&  $p$ <0,01 &  $p$ <0,05 vs valores obtenidos con las OMVs

### **5.2.2- Determinar si NF- $\kappa$ B participa en la inducción en la producción de citoquinas proinflamatorias**

Posteriormente, evaluamos en los astrocitos reactivos por las OMVs de *H. pylori* si NF- $\kappa$ B participa en la producción de citoquinas proinflamatorias. Para responder esta pregunta los astrocitos fueron tratados con 2,5  $\mu$ g/ml de las OMVs durante 12 h o con TNF (10 ng/ml por 48 h), con o sin IMD 0354 1 $\mu$ M o BMS 345541 1 $\mu$ M. Luego, el medio de cultivo fue removido y cambiado a medio DMEM-F12 libre de suero para descartar la participación de las OMVs o TNF usados en el tratamiento. Las células tratadas fueron mantenidas durante 5 días para la obtención del medio condicionado de astrocitos (MCA). Posteriormente, el MCA fue recolectado, filtrado y finalmente empleado para cuantificar las citoquinas proinflamatorias (TNF, IL-6, IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ ) mediante el kit cuantitativo MILLIPLEX map [RECYTMAG-65K] (Fig 18A). Nuestros resultados indican que la concentración de las citoquinas TNF e IL-6 aumentan sólo en el MCA obtenido de astrocitos pretratados con TNF, y disminuyen significativamente al utilizar los inhibidores IMD 0354 o BMS 345541 (Figs. 18B y C). Por otro lado, la citoquina IL-1 $\beta$  no aumenta significativamente en los MCA obtenidos con ninguno de los dos tratamientos (Fig. 18D) y la citoquina IFN- $\gamma$  aumenta en MCA obtenido de astrocitos reactivos pretratados con las OMVs de *H. pylori* y su aumento es inhibido a niveles del control al coincubar las células con IMD 0354 o BMS 345541 (Fig. 18E). En resumen, nuestros resultados sugieren que astrocitos cuya reactividad es inducida por las OMVs de *H. pylori* liberan al medio extracelular IFN- $\gamma$  y que su síntesis es dependiente de la señalización y actividad de NF- $\kappa$ B (Figs. 15B, 16B y 18E).



**Figura 18. Astrocitos pretratados con las OMVs de *H. pylori* promueven la síntesis y liberación de IFN- $\gamma$  al medio extracelular.** (A) Representación esquemática con el protocolo experimental: (1) tratamiento inductor de la reactividad en astrocitos primarios, con TNF (10 ng/ml por 48 h) ó 2,5  $\mu$ g/ml de las OMVs, en presencia y ausencia del inhibidor IMD 0354 1 $\mu$ M (Inhibidor de IKK $\beta$ ) o BMS 345541 1 $\mu$ M (Inhibidor de IKK $\alpha$  y IKK $\beta$ ), (2) lavado y cambio de medio DMEM-F12 libre de suero, (3) recolección del medio condicionado de astrocitos (MCA), y (4) Cuantificación de TNF, IL-6, IL-1 $\beta$  y IFN- $\gamma$  del MCA mediante el kit MILLIPLEX RCYTMAK-65K. (B-E) Se muestran los gráficos para la cuantificación de citoquinas TNF (B), IL-6 (C), IL-1 $\beta$  (D) y IFN- $\gamma$  (E) obtenidos según las indicaciones del fabricante para ello se empleó la tecnología xMAP Luminex $^{\text{®}}$  con los reactivos Milliplex de Millipore para citoquinas de alta sensibilidad. Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  S.E.M. (n = 3-4).

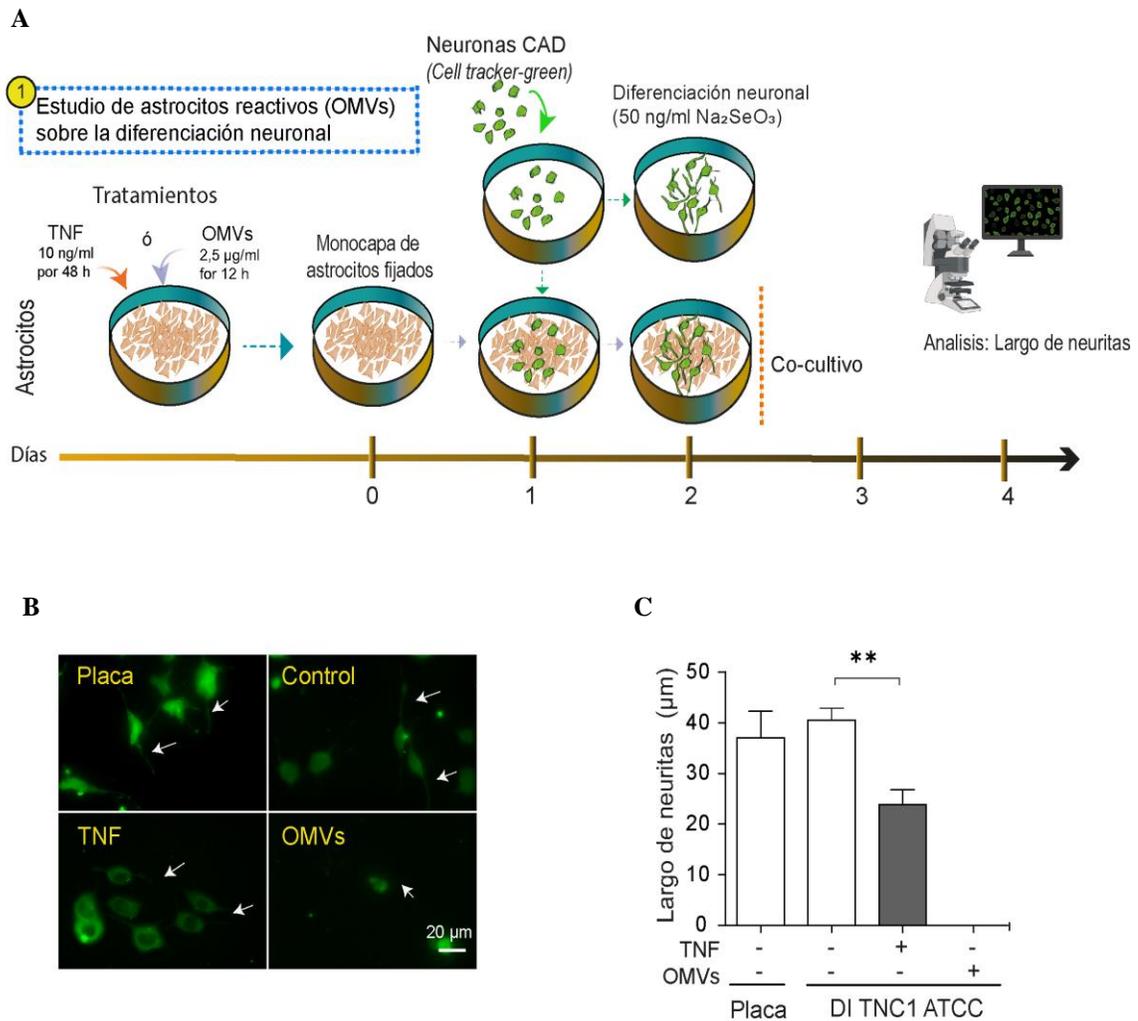
\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001 vs valores correspondientes en MCA-control, #####p<0,0001 versus valores correspondientes en MCA-OMVs. †††p<0,001, ††††p<0,0001 vs valores correspondientes en MCA-TNF.

### **5.3- Objetivo específico 3: Estudiar la inhibición/retracción del crecimiento de procesos neuronales y muerte neuronal en respuesta a astrocitos reactivados por las OMVs de *H. pylori***

Nuestro laboratorio reportó que la comunicación entre neuronas y astrocitos mediada por la interacción entre Thy-1 (glicoproteína neuronal)/Integrina  $\alpha_v\beta_3$ -Síndecan-4 (astrocito), es bidireccional. Inicialmente, promueve la formación de adhesiones focales y fibras de estrés, mientras que a tiempos mayores promueve la migración en los astrocitos. Además, las Thy-1 mutante sin dominio de unión a Síndecan-4 (Thy-1-AEAAA) o a Integrina  $\alpha_v\beta_3$  (Thy-1-RLE) no tiene efecto en la migración de astrocitos (Avalos et al., 2009; Hermosilla et al., 2008; Kong et al., 2013). Por otro lado, la comunicación entre Thy-1 y la Integrina  $\alpha_v\beta_3$ -Síndecan-4 de astrocitos tiene un efecto también en la neurona, actuando como una señal inhibitoria para la extensión de neuritas (Burgos-Bravo et al., 2020; Herrera-Molina et al., 2012; Maldonado et al., 2017). Así, para responder el objetivo específico 3, los astrocitos fueron pretratados con las OMVs y luego fijados. Las neuronas fueron cocultivadas sobre los astrocitos fijados para estudiar el efecto de la superficie de los astrocitos reactivos sobre la diferenciación neuronal. Adicionalmente, se estudió el efecto directo de las OMVs sobre las células tipo neuronas, la línea celular CAD. Finalmente, se evaluó si la viabilidad neuronal puede ser indirectamente afectada por el MC proveniente de astrocitos tratados con OMVs de *H. pylori*.

### **5.3.1- Evaluación de la diferenciación de células CAD cocultivadas sobre astrocitos fijados**

Para evaluar el efecto de astrocitos reactivos por las OMVs en la retracción de procesos neuronales, los astrocitos fueron tratados con 2,5 µg de OMVs de *H. pylori* durante 12 h o TNF (10 nM, 48 h), y después fueron fijados. Las células CAD fueron sembradas sobre vidrio (control positivo de diferenciación) o cocultivadas sobre astrocitos pretratados y fijados. Se indujo luego la diferenciación de las células CAD en ausencia de suero durante 24 h (Fig. 19A). Para distinguir las neuronas de los astrocitos en los cocultivos, las neuronas fueron marcadas con Cell tracker green. Nuestros resultados indican que células CAD cocultivadas sobre astrocitos pretratados con TNF disminuyen ~37% el largo de neuritas en comparación a largo de neuritas obtenidas en astrocitos control (no tratados) o en monocultivo de neuronas (diferenciadas sobre vidrio). Sin embargo, células CAD cocultivadas sobre astrocitos pretratados con las OMVs de *H. pylori* no logran diferenciarse indicando que existen cambios en la superficie de los astrocitos tratados con las OMVs de *H. pylori* que podrían impedir la extensión de las neuritas sobre la monocapa de astrocitos (Figs. 19B y C).



**Figura 19. Efecto sobre el largo de los procesos neuronales de células CAD cocultivadas sobre astrocitos DITNC1 pretratados con OMVs de *H. pylori*.** (A) Representación esquemática de la línea temporal experimental para evaluar el efecto de monocapa de astrocitos reactivos por OMVs sobre la diferenciación neuronal *in vitro*. Astrocitos DITNC1 fueron pretratadas sin y con OMVs (2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 12 h), o con TNF (10 ng/ml, 48 h) y fijados. Posteriormente neuronas CAD ( $10^4$  células/ $\text{cm}^2$ ) marcadas con Cell Tracker Green CMFDA (10  $\mu\text{M}$ ) fueron sembradas sobre placas o sobre las monocapas de los astrocitos pretratados. en un medio libre de suero en presencia de selenito de sodio (50 ng/ml) durante 24 h a 37°C. (B) Microfotografías representativas de neuronas CAD (teñidas con cell tracker green) en las diferentes condiciones experimentales. Las flechas blancas indican neuritas que están esparcidas en la placa de cultivo de tejidos (placa) o en astrocitos sin tratar (Control), tratados con TNF o tratados con OMVs de *H. pylori* (barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ ). (C) Cuantificación de la longitud de las neuritas ( $\mu\text{m}$ ). Medimos la longitud de las neuritas provenientes de 50 neuronas por experimento utilizando el programa Neuron J. Los resultados son expresados como promedio  $\pm$  S.E.M. (n = 3). \*\*p<0,01.

### **5.3.2- Evaluación de la retracción de procesos de células CAD tratadas con OMVs de *H. pylori***

Otra interpretación del resultado de los cocultivos es que las OMVs permanezcan adheridas a los astrocitos y ejerzan un efecto directo sobre las neuronas. Para estudiar este posible efecto, ensayamos si la adición de las OMVs de *H. pylori* altera directamente la retracción de procesos neuronales y viabilidad en células CAD. Neuronas CAD diferenciadas durante 48 h fueron tratadas o no con OMVs de *H. pylori* durante 24 h, luego de lo cual las células fueron fijadas y fotografiadas en campo claro. El largo de las neuritas fue medido como descrito previamente (Herrera-Molina et al., 2012) con el software Neuron J (Fig 20A). Nuestras observaciones indican que células CAD tratadas con OMVs de *H. pylori* disminuyen el largo de las neuritas en ~ 65% con respecto a CAD control (Figs. 20B y C). Sin embargo, el tratamiento de las células CAD con las OMVs no altera la viabilidad celular según resultados obtenidos con ensayo MTS (Fig. 20D). Por lo tanto, es posible que el dramático efecto de los astrocitos tratados con las OMVs, comparado con los tratados con TNF, sobre la diferenciación neuronal (Fig 19C) se deba a una combinación del efecto de las OMVs sobre los astrocitos y las neuronas (Figs. 19B y 20B).

### **5.3.3- Medio condicionado de astrocitos tratados con las OMVs de *H. pylori* aumenta la actividad de la Caspasa 3 y muerte celular en células CAD**

En el desarrollo de los objetivos específicos 1 y 2 pudimos describir el fenómeno de reactividad de astrocitos inducido por las OMVs y la dependencia de la activación de NF- $\kappa$ B. A continuación, ratificamos que el medio condicionado obtenido de astrocitos reactivos con OMVs, así como también las OMVs adicionadas directamente sobre las

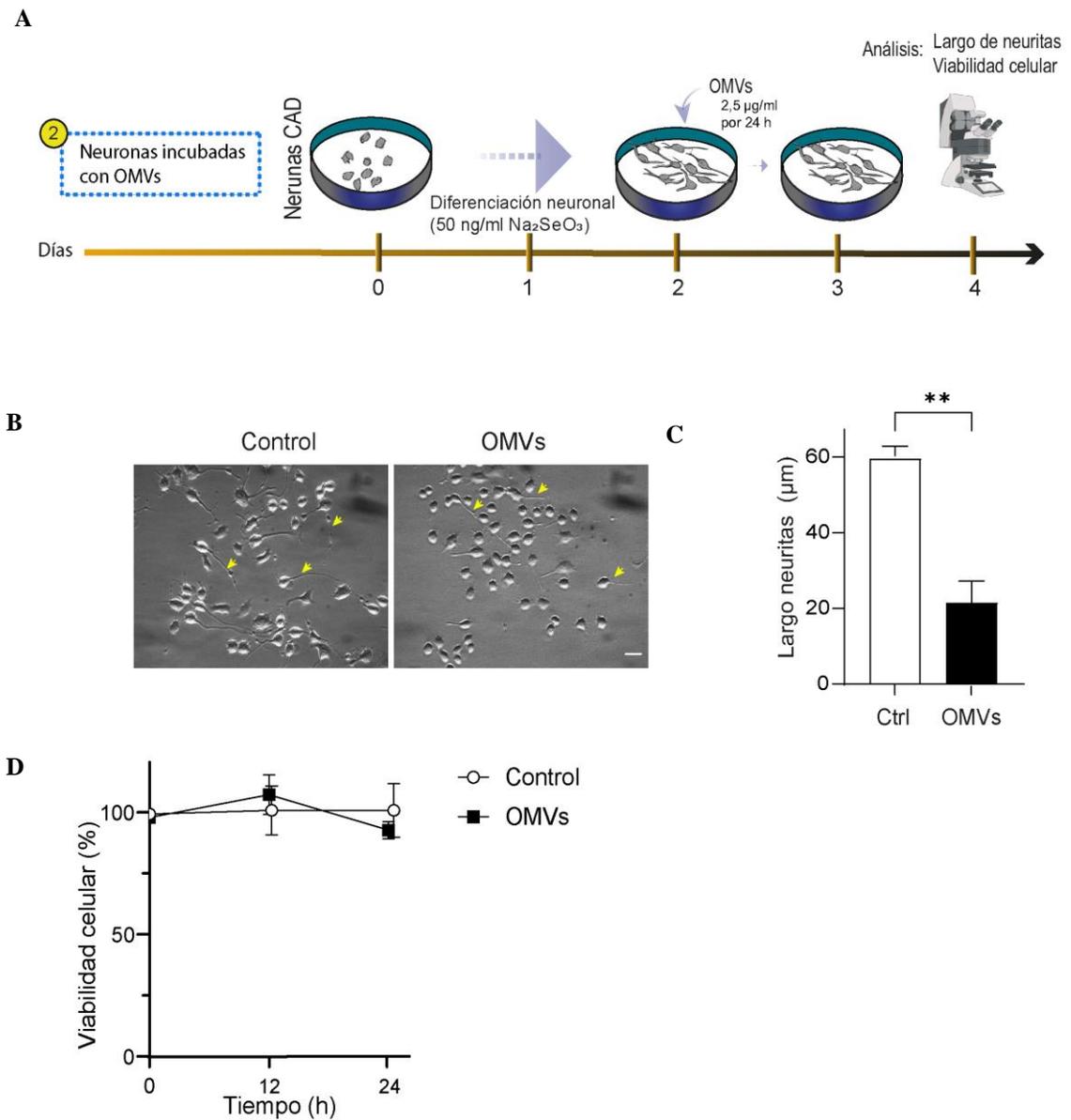
neuronas inhiben la diferenciación de las células CAD. Además, determinamos que las OMVs no inducen directamente la muerte de las neuronas. Sin embargo, dado que se sabe que los astrocitos reactivos liberan factores tóxicos para las neuronas (Bi et al., 2013; Escartin et al., 2021), evaluamos si el medio condicionado obtenido de astrocitos reactivos tratados con OMVs podrían inducir muerte celular en neuronas CAD diferenciadas.

Para ello, los astrocitos fueron tratados con las OMVs o TNF sin como agentes inductores de la reactividad, sin y con IMD. Luego, el medio fue cambiado por medio fresco sin suero para descartar la presencia de las OMVs o TNF usados en el tratamiento. Para este propósito el medio sin suero en que se incubaron los astrocitos se mantuvo por 5 d para luego ser recolectado y filtrado para remover cualquier desecho celular (Trindade et al., 2020). El medio condicionado fue agregado a las neuronas CAD diferenciadas durante 24 h. Además, como control positivo de daño neuronal, se usó un tratamiento con etopósido 10  $\mu$ M (Nakajima et., al 1994). Finalmente, se determinó la viabilidad celular de las células mediante la externalización de la fosfatidilserina de la membrana plasmática utilizando anexina V marcada con fluorescencia/tinción con yoduro de propidio (IP) por citometría de flujo y la actividad de Caspasa 3 en CAD sometidas a los distintos tratamientos (Fig. 21A).

Nuestros resultados en citometría de flujo muestran que neuronas CAD tratadas con control de MCA, el 82% de las células vivas están ubicadas en el cuadrante inferior izquierdo, donde las células eran tanto anexina V como negativas para PI. En el panel de etopósido, el % de células en el cuadrante superior derecho aumentó (del 8% al

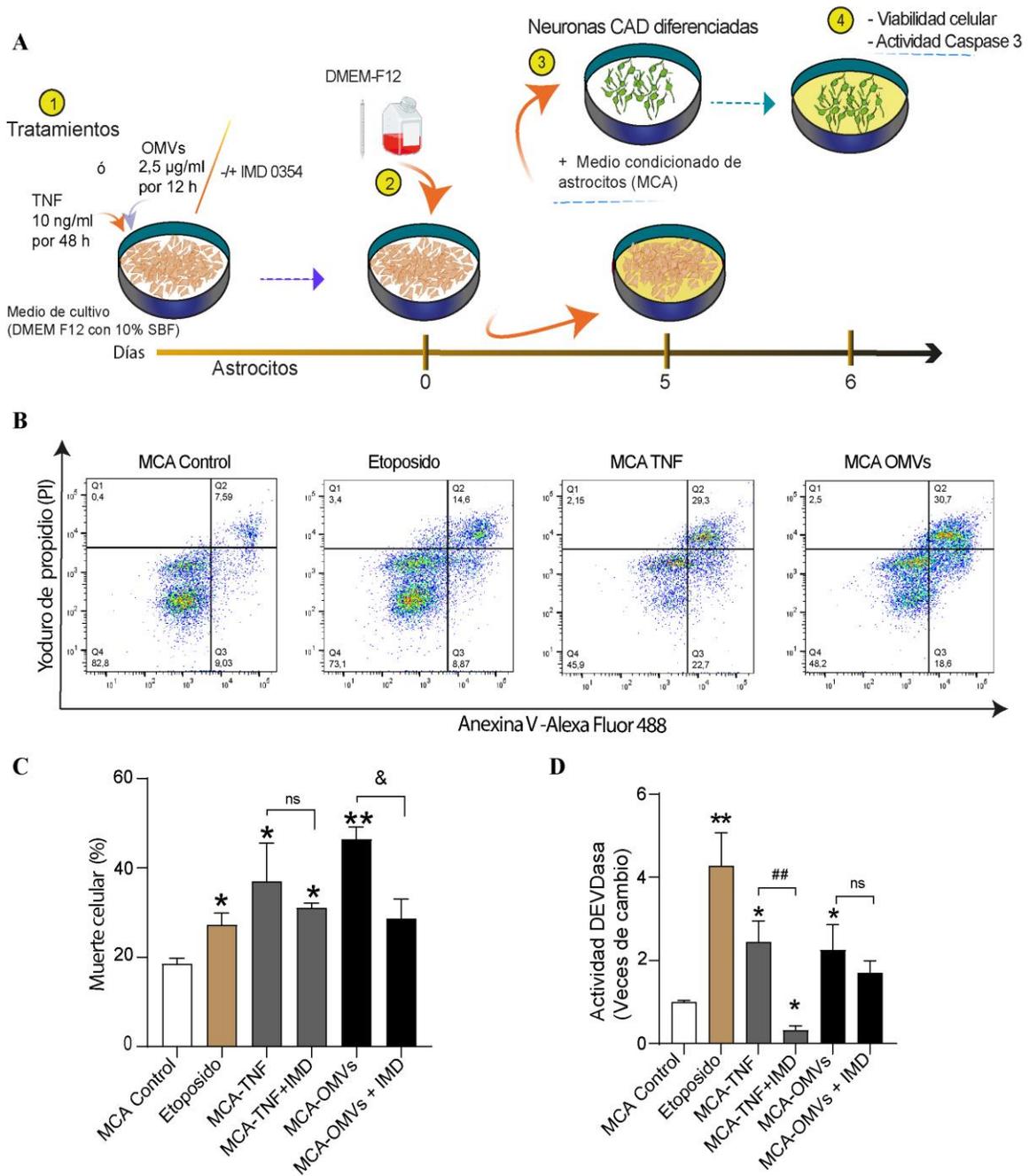
15%). Estas células son positivas tanto para anexina V como para PI y son células en las últimas etapas de la apoptosis que han perdido la integridad de la membrana plasmática (necrosis secundaria). Los eventos en el cuadrante inferior derecho solo son positivos para la anexina V y son células en las primeras etapas de la apoptosis con fosfatidilserina externalizada, pero con la membrana plasmática intacta. Según estos histogramas, cuando se tratan con MCA-TNF, el 52% de las células son positivas para la anexina V. Sin embargo, de estas células positivas para anexina V, el 23% se encuentra en las etapas iniciales de la apoptosis (solo positivas a la anexina V), mientras que el 29% se encuentra en las etapas tardías de la apoptosis, avanzando hacia la necrosis secundaria. Asimismo, el tratamiento con MCA-OMVs indica que el 50% de las células positivas a la anexina V, el 19% están en apoptosis temprana, mientras que el 31% se mueven hacia una necrosis secundaria. Las células que entran en necrosis directamente se vuelven positivas para PI y corresponden al 2-4% de la población total de células tratadas con etopósido, MCA de TNF o de OMVs (Fig. 21B). El análisis de cuantificación de 4 experimentos independientes se muestra en la Figura 21C. El % de muerte celular refleja la suma de células en los cuadrantes Q1, Q2 y Q3. Los resultados indican que el efecto de MC obtenido de astrocitos tratados con TNF o OMVs es significativamente mayor al control de MCA. Cuando el MCA se obtuvo de los astrocitos tratados TNF con IMD, no se observó el efecto y los valores obtenidos fueron similares a los de las muestras de control de MCA-TNF (Fig. 21C). En cambio, cuando se obtuvo MCA tratados las OMVs con IMD, los valores fueron similares al MCA control.

Adicionalmente nuestros resultados indican que el MCA tratados con las OMVs aumentó 2 veces la actividad de la Caspasa 3 en neuronas CAD diferenciadas, similar al valor obtenido al tratar con MCA tratados con TNF (Fig. 21D), pero menor al aumento obtenido con células CAD tratadas con etoposido. Además, al usar el inhibidor de NF- $\kappa$ B se perdió el efecto del MCA tratados con TNF, pero no el efecto del MCA tratados con las OMVs. Estos resultados sugieren que el tratamiento de astrocitos por las OMVs de *H. pylori* conduce a la liberación de algún factor soluble que reduce viabilidad neuronal y que puede ser independiente de la activación de NF- $\kappa$ B.



**Figura 20. Efecto del tratamiento con las OMVs de *H. pylori* sobre el largo de los procesos neuronales y viabilidad de células CAD diferenciadas.** (A) Representación esquemática de la línea temporal experimental para evaluar el efecto de OMVs sobre neuronas diferenciadas *in vitro*. Células CAD (5.000 células/cm<sup>2</sup>) fueron sembradas sobre la placa a 37°C y la extensión de los procesos neuronales fue inducida mediante depleción de suero en presencia de selenito de sodio (50 ng/ml) por 48 h a 37°C. Luego, las células CAD fueron tratadas con 2,5 µg/ml de OMVs de *H. pylori*. (B) Microfotografías representativas por contraste de fase de neuronas CAD tratadas sin y con OMVs por 24 h. Las puntas de flecha amarillas indican neuritas que se extienden sobre la placa de cultivo (barra de escala = 20 µm). (C) Cuantificación del largo de

las neuritas obtenido al medir la longitud de neuritas de 50 neuronas por experimento, utilizando el programa Neuron. Datos expresados como promedio  $\pm$  S.E.M. de 3 experimentos independientes. \*\* $p < 0,01$ . **(D)** Ensayo colorimétrico MTS para determinar viabilidad de células CAD diferenciadas durante 48 h luego del tratamiento con 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de OMVs de *H. pylori* entre 0 y 24 h. Se calculó el porcentaje de muerte de acuerdo con las lecturas de absorbancias obtenidas a 540 nm. Los resultados son expresados como promedio  $\pm$  S.E.M. (n = 3).



**Figura 21. Medio condicionado obtenido de cultivos primarios de astrocytes pretratados con OMVs de *H. pylori* promueve activación de Caspasa 3 y muerte neuronas CAD diferenciadas.** (A) Representación esquemática de la línea temporal experimental *in vitro*: (1) tratamiento inductor de la reactividad en astrocytes primarios, con TNF o con OMVs, en ausencia o presencia de IMD 0354 (2) recolección del medio condicionado de astrocytes primarios (MCA), (3) incubación del MCA durante 24 h con neuronas CAD diferenciadas

morfológicamente por 48 h, y (4) determinación de la viabilidad celular por citometría de flujo (Kit Anexina V/Yoduro de Propidio) [sección 4.16] y determinación de la actividad de Caspasa 3 mediante la liberación del fluoróforo AFC desde el sustrato DEVD-AFC (sección 4.17). (B) Gráficos de puntos de células CAD mediante citometría de flujo. Células CAD recolectadas 24 h después del tratamiento con ACM de astrocitos, o con etopósido (10  $\mu$ M) durante 24 h. Las células ( $10^5$ ) se incubaron con anexina V conjugada con Alexa Fluor 488 y Yoduro de propidio (PI). Se detectaron células viables en el cuadrante inferior izquierdo (Q4), células apoptóticas tempranas en el cuadrante inferior derecho (Q3, AV positivo, PI negativo), células muertas (Q1, AV negativo, pero PI positivo) en la parte superior izquierda o necróticas. Se muestran las células apoptóticas (Q2, AV positivas y PI positivas) en el cuadrante superior derecho. (C) El gráfico muestra el porcentaje de poblaciones totales de células muertas (Q1+Q2+Q3) de células CAD diferenciadas después de los diferentes tratamientos (etopósido o MCA) con o sin inhibidor de IMD 0354, durante 24 h. Los valores en el gráfico son la media  $\pm$  S.E.M; n = 4, ns, no significativo. \* p<0,05; \*\* p<0,01 en comparación con el control MCA, & p<0,05 en comparación con los MCA-OMVs. (D) Se muestra el gráfico con las veces de cambio en la actividad enzimática de Caspasa 3 de células CAD tratadas con etopósido 10  $\mu$ M como inductor positivo de inducción de apoptosis, CAD tratadas con MCA tratados con TNF, OMVs sin y con inhibidor IMD 0354 1  $\mu$ M (Inhibidor de IKK $\beta$ ). Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  S.E.M. (n = 3). \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs valores correspondientes en MC-control, ##p<0,01 vs valores correspondientes en MC-TNF.

#### **5.4- Objetivo 4: Determinar si las OMVs de *H. pylori* llegan al cerebro, inducen reactividad de astrocitos y daño neuronal en un modelo murino *in vivo***

##### **5.4.1- Determinar si las OMVs de *H. pylori* logran llegar al cerebro en modelo un murino *in vivo***

En el desarrollo de los objetivos específicos *in vitro* 1, 2 y 3 describimos que las OMVs de *H. pylori* inducen la reactividad de los astrocitos mediante un mecanismo dependiente de la señalización de NF- $\kappa$ B lo que involucra daño neuronal en neuronas CAD. Sin embargo, se desconoce si las OMVs de *H. pylori* logran llegar al cerebro, a pesar de que estudios contemporáneos sugieren que la naturaleza proteoliposomal de las OMVs les permite atravesar varias barreras celulares e ingresar al torrente sanguíneo *in vivo* e incluso podrían llegar al cerebro. Tal como ha sido demostrado experimentalmente inoculando las OMVs de diferentes bacterias vía sanguínea en modelos murinos, sin producir síntomas de sepsis en ratones *in vivo* (Han et al., 2019; Wei et al., 2020).

Por consiguiente, para responder el objetivo **específico 4** evaluamos en un modelo murino *in vivo* si las OMVs de *H. pylori* logran llegar al cerebro. Ratones BALB/c machos fueron inyectados con dosis única de 10 ó 100 µg de OMVs (contenido proteico) marcadas con DiR, a través de la vena de cola de estos animales (Fig. 22A). Posteriormente, se evaluó la biodistribución/acumulación de las OMVs-DiR *ex vivo* en los órganos diseccionados de los animales (eutanasiados) con el equipo *in-vivo* FX PRO a las 24 h de inoculación. Observamos acumulación de las OMVs en el estómago, intestino, corazón, pulmones y cerebro de estos ratones tratados con ambas dosis de OMVs. El sistema gastro-intestinal e hígado se destacaron por poseer mayor señal OMVs-DiR en comparación con los otros órganos durante las 24 h que duró el experimento (Fig. 22B). Además, al enfocar nuestro estudio en el cerebro, observamos un aumento en la acumulación de las OMVs en el cerebro del ratón inyectado con 10 µg de OMVs por sobre los 100 µg de OMVs de *H. pylori* (Fig. 22C) sugiriendo con estos resultados que las OMVs poseen algún tipo de tropismo específico por algunos órganos y que pueden llegar al cerebro *in vivo* (Figs. 22B y C). Luego, para confirmar que las OMVs llegan al cerebro, repetimos el experimento utilizando tres dosis crecientes de OMVs-DiR (5, 10 y 20 µg) (Figs. 22A y D) y evaluamos su distribución en cerebro a las 72 h. Elegimos sacrificar los animales a los 3 días porque es el tiempo en que se observa peak de tinción de GFAP en cerebro con inflamación. GFAP es el marcador clásico de reactividad de astrocitos frente a un daño. Las OMVs marcadas con DiR se detectaron en las secciones sagitales del cerebro (área amarillo-rojo), tanto interior como exteriormente, en los animales que recibieron la inyección con 10 µg ó 20 µg, pero no en aquellos que recibieron 5 µg de OMVs de *H. pylori* (Figs. 22D y E). Por otro lado, como los resultados del análisis proteico obtenido por espectrometría de masas mostraron que la Ureasa es una de las proteínas más abundantes en las OMVs (Fig. 6B) realizamos una inmunofluorescencia con anticuerpo anti-Ureasa en secciones coronales de estos cerebros provenientes de ratones tratados con OMVs para identificar su presencia. Los resultados obtenidos indicaron señal positiva para aquellas muestras provenientes de ratones inyectados con 10 µg de OMVs (Fig. 22F), respaldando el ingreso de las OMVs al cerebro cuando éstas fueron inyectadas en el torrente sanguíneo.

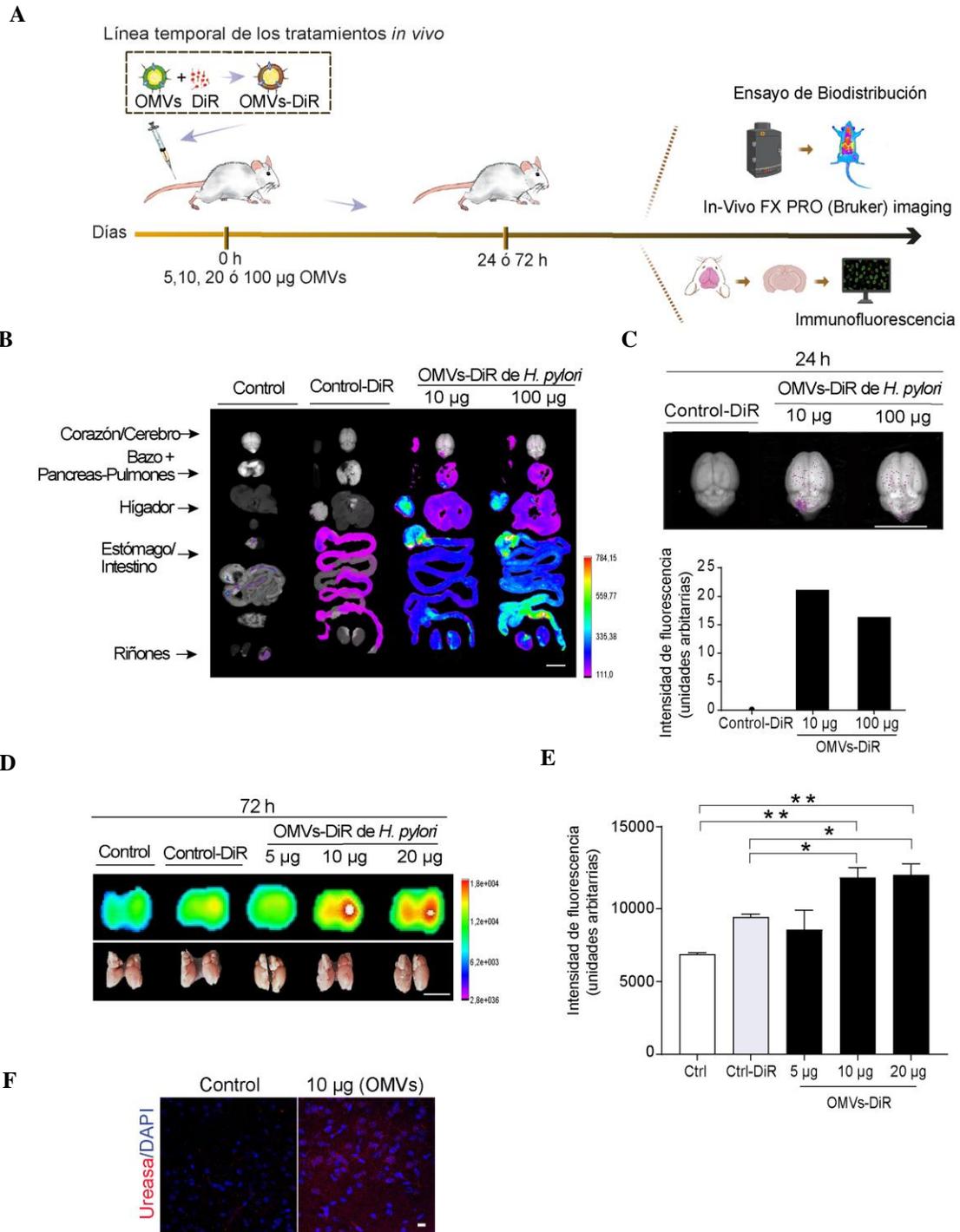
Importante notar que, los niveles de LPS en las OMVs corresponde a 5  $\mu\text{g}$  de LPS en 10  $\mu\text{g}$  de OMVs de *H. pylori* (Fig. 23), una cantidad aproximadamente cuatro veces menor a la dosis usada *in vivo* en ratones con LPS de *E. Coli* como modelo de estudio de sepsis bacteriana (LPS 20 mg/kg  $\sim$  40  $\mu\text{g}$  de LPS) (Thomas et al., 2014) (Fig. 23C). Por tanto, nuestros resultados sugieren que las OMVs de *H. pylori* poseen un tropismo por algunos órganos del sistema gastrointestinal, y una parte de ellas se detectan en el cerebro con una permanencia de al menos 72 h *in vivo*.

#### **5.4.2- Determinar sí las OMVs de *H. pylori* en el cerebro inducen la reactividad de los astrocitos y daño neuronal *in vivo***

Por consiguiente, los cerebros provenientes de ratones inyectados con 10  $\mu\text{g}$  OMVs y control fueron procesados y usados para evaluar GFAP, un clásico marcador de la reactividad de los astrocitos, mediante inmunofluorescencia indirecta en cortes coronales. Se observó mayor intensidad de fluorescencia GFAP positiva en secciones coronales de estos tejidos cerebrales en animales tratados con OMVs en comparación con los controles (Figs. 24A y B). De este modo, las OMVs-DiR que fueron encontradas en el cerebro de ratón, podrían explicar el aumento de la reactividad de los astrocitos dado el aumento en la tinción GFAP encontrada en el cerebro. Estos resultados corroboran los datos obtenidos en los objetivos específicos 1, 2 y 3 *in vitro* y sugieren que las OMVs llegan al cerebro y promueven la reactividad de los astrocitos.

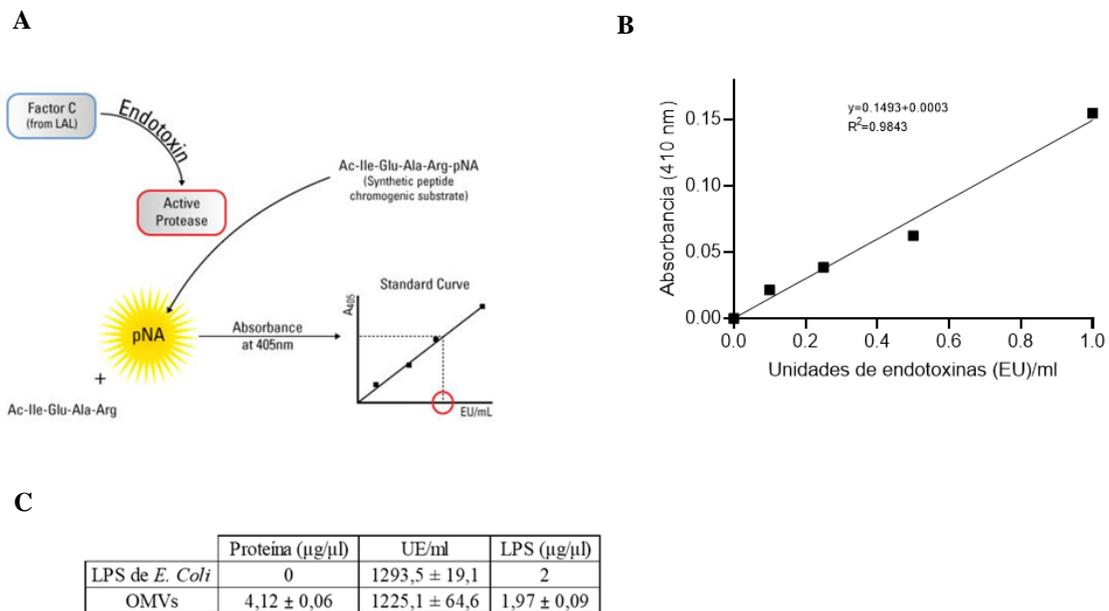
Además, teñimos las neuronas con anticuerpos, para evaluar tubulina  $\beta\text{III}$ , proteína expresada en neuronas en el SNC y que forma parte estructural de los microtúbulos de los axones y dendritas (Sullivan & Cleveland, 1986) o Thy-1/CD90, proteína de superficie más abundante en neuronas y localizada en el soma, dendritas y axón de las neuronas (Rege & Hagood, 2006). Observamos discontinuidad en la tinción de tubulina  $\beta\text{III}$  y Thy-1 en neuronas, como un indicador de la fragmentación del axón y/o dendritas, indicadas con flechas blancas en la microfotografía de secciones de tejido cerebral de ratón tratadas con OMVs en comparación con los controles, donde se puede observar procesos extendidos y continuos de neuronas (Figs. 24C, D y F).

Por lo tanto, en conjunto los resultados del objetivo específico 4 indican que las OMVs pueden llegar al cerebro y además de inducir la reactividad de los astrocitos, dañan a las neuronas *in vivo*.

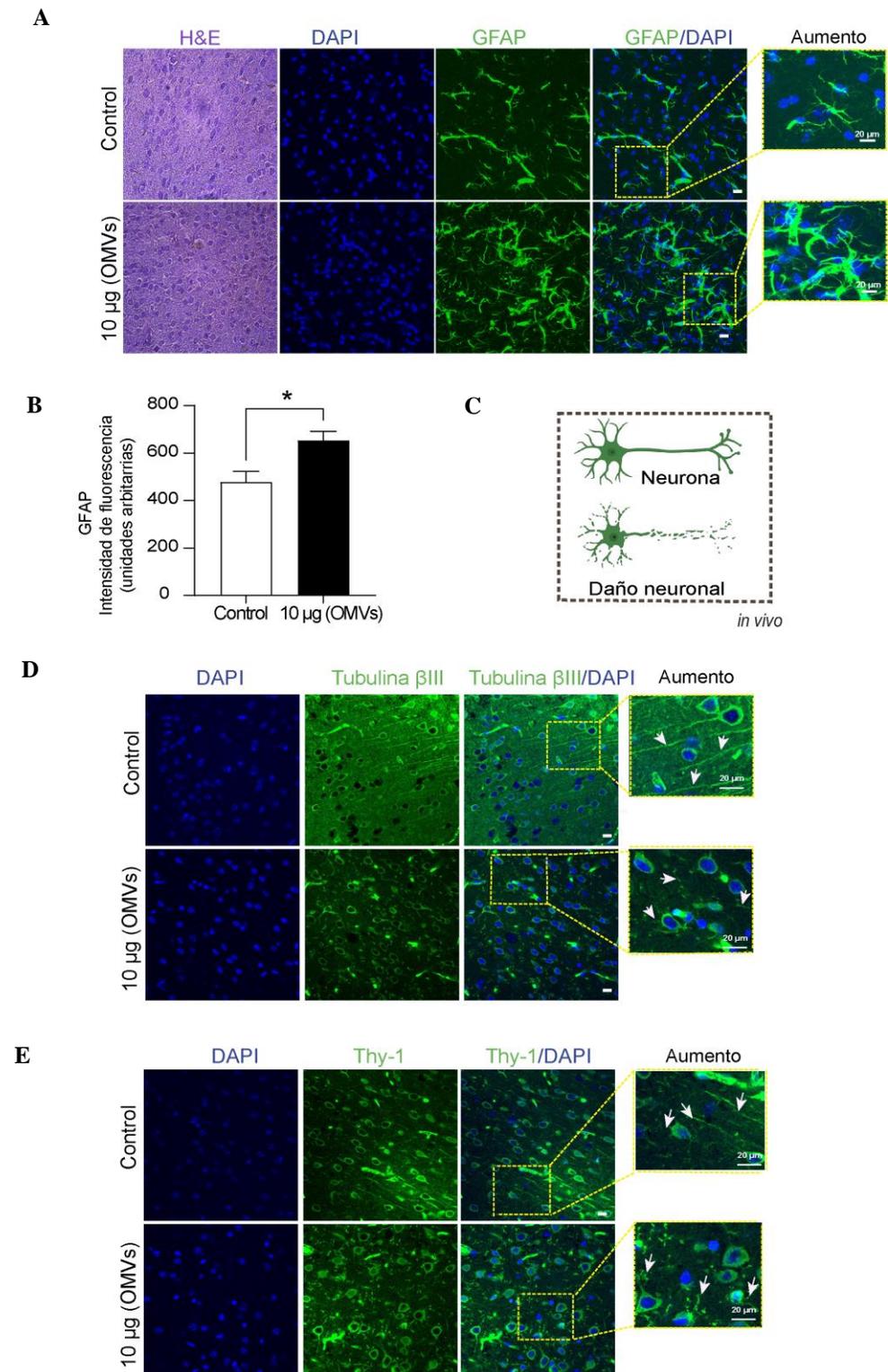


**Figura 22. Las OMVs de *H. pylori* llegan al cerebro en un modelo murino *in vivo*.** (A) Representación esquemática de la línea temporal del experimento *in vivo*. Ratones macho BALB/c de 6-8 semanas de edad fueron inyectados a través de la vena de la cola con distinta cantidad de proteínas de OMVs de *H. pylori* (5, 10, 20 ó 100 µg) marcadas con DiR. Luego, los animales fueron sacrificados a las 24 ó 72 h post tratamiento y se tomaron imágenes para registrar la acumulación/biodistribución de las OMVs en distintos órganos de estos animales con el equipo FX PRO (Bruker) *ex vivo*. Posteriormente, los cerebros fueron procesados y

utilizados para analizar diferentes proteínas a través de inmunofluorescencia indirecta. **(B)** Imágenes representativas de la biodistribución y acumulación de OMVs-DiR representadas con las intensidades de la fluorescencia en los distintos órganos provenientes de los ratones que fueron tratados sin y con DiR o con 10 ó 100 µg de OMVs-DiR a las 24 h *ex vivo*. Las imágenes fueron tomadas con fuente de longitud de onda múltiple con un tiempo de exposición de 2 seg (barra magnificación = 1 cm). **(C)** Imágenes amplificadas de los cerebros en B y su cuantificación respectiva de intensidad de la fluorescencia para los cerebros provenientes de ratones que fueron tratados con DiR y con 10 ó 100 µg OMVs-DiR (barra magnificación = 1 cm). **(D)** Imágenes fluorescentes de los hemisferios cerebrales provenientes de los ratones que al día 0 se inyectaron con 5, 10 ó 20 µg de OMV en la vena de la cola y que fueron sacrificados a las 72 h (A). Las imágenes fueron tomadas utilizando una fuente de longitud de onda múltiple con un tiempo de exposición de 2 min (barra magnificación = 1 cm) y en **(E)** se muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia y que se estimó utilizando el software Bruker Molecular Imaging Software. Los valores corresponden al promedio ± S.E.M. de las unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . **(F)** Inmunofluorescencia de muestra teñida con anticuerpo contra la subunidad UreB de la proteína bacteriana Ureasa (rojo). DAPI (azul) muestra núcleos en secciones de tejido cerebral coronal provenientes de un ratón inyectado con 10 µg de OMVs de *H. pylori* y tomada con microscopio confocal Nikon C2 Plus (barra magnificación = 20 µm).



**Figura 23. Cuantificación del LPS en OMVs de *H. pylori*.** **(A)** Diagrama esquemático con las etapas experimentales para cuantificar LPS mediante el kit comercial cromogénico LAL Pierce (Thermo Fisher Scientific) descrita en la sección 4.25 de Materiales y Métodos. **(B)** Curva de calibrado estándar de LPS de *E. coli* obtenida usando el kit comercial con concentraciones conocidas. **(C)** Tabla resumen con el contenido de LPS realizado en tres mediciones independientes con las OMVs *d*preparadas y aisladas en distintos días. Los valores corresponden al promedio ± S.E.M.



**Figura 24.** Las OMVs de *H. pylori* inducen reactividad de astrocito y daño neuronal en un modelo murino *in vivo*. (A) Microfotografía representativa de cortes histológicos coronales de cerebros control y provenientes de ratones tratados con OMVs (10 µg). Las muestras fueron

teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) o con anticuerpos contra la proteína GFAP (en verde) para astrocitos y la tinción DAPI (azul) para el núcleo de las células. En la microfotografía confocal aumentada se muestran los astrocitos GFAP positivos provenientes de los cerebros control y provenientes de ratones tratados con OMVs (10  $\mu$ g) (barra magnificación = 20  $\mu$ m). **(B)** Gráfico muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia para GFAP medida con Image J en (n = 6-7) de las secciones coronal del encéfalo (barra de magnificación = 20  $\mu$ m). Las barras de error representan promedio  $\pm$  S.E.M. (\*p<0,05). **(C)** Esquema representativo que muestra el cambio de morfología neuronal observada en nuestros experimentos. En **(D)** y **(E)** se muestran las microfotografías confocales representativas de cortes histológicos coronales de cerebros control y provenientes de ratones tratados con las OMVs (10  $\mu$ g) que fueron teñidos usando anticuerpos contra la proteína Tubulina  $\beta$ III (en verde) o Thy-1/CD90 (verde) respectivamente, y la tinción DAPI (azul) para el núcleo de las células. En la microfotografía confocal aumentada se muestran las neuronas positivas para Tubulina  $\beta$ III (en verde) o Thy-1/CD90 (verde) en muestras de tejido coronales provenientes del cerebro control y tejidos provenientes de ratón tratado con las OMVs (10  $\mu$ g) (barra de magnificación = 20  $\mu$ m).

## 6 Discusión

La infección por *H. pylori* puede llevar al desarrollo de varias patologías extragástricas, incluyendo algunas enfermedades neurodegenerativas y aunque existen varias teorías que explican cómo *H. pylori* podría llegar al cerebro, una posibilidad emergente es a través de sus OMVs, que potencialmente podrían llevar señales y carga a sitios alejadas de su nicho de colonización, en particular al cerebro. Sin embargo, en este contexto la llegada de las OMVs de *H. pylori* al cerebro y los mecanismos moleculares y celulares de su efecto, son aún desconocidos y poco explorados tanto en modelos de estudios *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, en este trabajo, nos centramos en dilucidar por primera vez, sí las OMVs administradas sistémicamente llegan al cerebro y los efectos que éstas causan en un modelo murino *in vivo* y en un modelo celular de astrocitos y neuronas *in vitro*. En particular, explorar el mecanismo molecular por el cual las OMVs inducen reactividad de los astrocitos y como esta reactividad vuelve a los astrocitos nocivos para las neuronas

### 6.1- Características de las OMVs

Considerando que las OMVs de *H. pylori* poseen un tamaño de 20-300 nm en este trabajo caracterizamos las OMVs provenientes de la cepa 60190 y calculamos un tamaño promedio de  $126,5 \pm 6,5$  nm para estas vesículas. Asimismo, en un estudio equivalente determinaron que el tamaño promedio de las OMVs va desde 89 nm a 127 nm de *H. pylori* aisladas de distintos pacientes con trastornos gastrointestinales, tales como gastritis (cepa 13.149), úlcera gástrica (cepa 12.807), úlcera duodenal (cepa

13.209), MALT (cepa 13.223) y adenocarcinoma grado gástrico IA (cepa 10.417), III B (cepa 11.749) y IB (cepa 11.766) (Chew et al., 2021). Por otro lado, la superficie de las OMVs está compuesta de bicapas fosfolípicas con una capa externa de LPS, y varios componentes proteicos de la membrana externa de la bacteria involucrados en la respuesta inflamatoria. Este conjunto amplio de proteínas es importante en la colonización, adherencia y virulencia de *H. pylori* (Voss et al., 2014). Nuestros resultados muestran que las OMVs poseen un cargo proteico alto, similar al encontrado en la bacteria parental, pero enriquecido en proteínas menos abundantes en la bacteria parental, sugiriendo una selección en el proceso de biogénesis y/o liberación de las vesículas. Sin embargo, los mecanismos moleculares relacionados a la biogénesis de las OMVs de bacterias Gram negativas y en particular de *H. pylori* no han sido descritos totalmente, y en la actualidad, solo hay mecanismos generales que explican la biogénesis de las OMVs (Anand et al., 2016). Estos son: **a) Cambios en las interacciones y carga eléctrica entre las moléculas del LPS que componen la membrana externa de las bacterias Gram negativas**, por ejemplo, se ha reportado que cationes  $Mg^{2+}$  inducen la estabilidad de la membrana externa de la bacteria *E. coli* reprimiendo la liberación de OMVs y disminuyendo la cantidad de vesículas que se liberan desde la bacteria parental (Elhenawy et al., 2016; Volgers et al., 2018); **b) Biogénesis de OMVs inducida por la interrupción del mantenimiento de la asimetría de fosfolípidos en la membrana externa**. En este contexto, se ha descrito que la delección de un transportador de fosfolípidos dependiente de ATP VacJ/Yrb ABC, presente en varias bacterias, modifica la composición de la membrana y altera su asimetría, incrementa el enriquecimiento de fosfolípidos y ácidos grasos en una cara de la membrana externa

aumentando la producción de las OMVs (Roier et al., 2016); **c) Biogénesis de OMV inducidas por acumulación de proteínas mal plegadas.** El aumento sostenido de las proteínas mal plegadas en el periplasma bacteriano amplía la distancia física entre la membrana externa y los peptidoglicanos que la conforman, y así, se favorece la formación y liberación de más OMVs al espacio extracelular (McBroom & Kuehn, 2007). Nuestro estudio apoya este último mecanismo dado que describimos que las OMVs de *H. pylori* poseen un cargo enriquecido en la proteína Chaperonina de 60 kDa GroEL. Esta proteína ha sido descrita en la literatura como chaperona molecular que favorece el plegamiento de proteínas mal plegadas intra o extracelular en varios géneros bacterianos (O'Neil et al., 2018). Interesantemente, GroEL ha sido identificada en estudios de proteómica en OMVs de otras bacterias como *Acinetobacter baumannii* (Kwon et al., 2009).

Adicionalmente, la Chaperonina de 60 kDa tiene una estrecha relación funcional con otro factor de virulencia altamente representado en nuestros resultados de caracterización de las OMVs de *H. pylori*, particularmente con la Ureasa. Se ha especulado que la Chaperonina participa en el ensamblaje la Ureasa en la superficie externa de la bacteria y evita su agregado en un ambiente ácido. Específicamente, se ha reportado que la Chaperonina se une a la subunidad UreA (32 kDa) de *H. pylori* y participa en la maduración de la Ureasa a nivel del citosol y en la superficie bacteriana (Zhao et al., 2019). Por lo tanto, nuestros antecedentes sugieren que la Chaperonina podría participar en la biogénesis de las OMVs y apoyar la funcionalidad de la Ureasa y quizás de otras proteínas cargo en las OMVs. Sin embargo, estos hallazgos requieren ser explorados en más detalle.

## 6.2- Atrocitos y reconocimiento de patógenos

En general, los patógenos bacterianos invaden el SNC a través del torrente sanguíneo. Aunque se sabe que las bacterias pueden infectar células de su huésped para evadir la respuesta del sistema inmune (Drevets et al., 2004), los mecanismos de ingreso al SNC siguen siendo controversiales y poco precisos. Una vez que los patógenos rompen las barreras del SNC, las células residentes reconocen entidades infecciosas a través de una serie de receptores e inician una respuesta inmune rápida. Esto puede ser mediado por los receptores tipo Toll (TLR) (Jack et al., 2005). En astrocitos humanos, por ejemplo, TLR3 participa en el reconocimiento de partículas endosomales virales y su expresión basal es regulada positivamente por citoquinas (IL-1 $\beta$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$ ) (Colombo et al., 2016; Jack et al., 2005; Mielcarska et al., 2020). Por otro lado, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9 están también presentes basalmente en los astrocitos y reconocen ligandos bacterianos (Jack et al., 2005); por ejemplo, en astrocitos, TLR5 reconoce flagelina bacteriana (McNamara et al., 2006), TLR9 reconoce oligodesoxinucleótidos de ADN bacteriano (Kielian, 2006) y TLR2/4 pueden reconocen peptidoglicanos, lipoproteínas y oligopéptidos activando NF- $\kappa$ B (Geyer et al., 2019) promoviendo la síntesis de citoquinas proinflamatorias. Además, resultados de nuestro laboratorio indican que TLR2 y TLR4 aumentan su expresión en modelo murino de astrogliosis *in vivo* (Perez-Nuñez et al., 2022. Resultados no publicados). En particular, TLR2 ha sido descrito en los astrocitos como un receptor que aumenta su sensibilidad frente al precondicionamiento con citoquinas proinflamatorias y genera memoria frente la infección por un patógeno bacteriano (Henn et al., 2011). Interesantemente, TLR2 también participa en la internalización de las OMVs de *Moraxella catarrhalis* en células

epiteliales *in vitro* en el contexto de infección con esta bacteria Gram negativa causante de Bronconeumonía (Schaar et al., 2011). Por otro lado, resultados de nuestro laboratorio indican que TLR2 reconoce a Ureasa de *H. pylori* desencadenando la inducción del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  en células gástricas (Valenzuela-Valderrama et al., 2019). En conjunto, estos antecedentes podrían sugerir que Ureasa contenida en las OMVs de *H. pylori* podrían gatillar a través de TLR2 el reconocimiento y reactividad en los astrocitos en nuestro modelo de estudio (Fig. 22).

Además, los astrocitos expresan receptores tipo NOD (NOD1 y NOD2) que reconocen también patógenos intracelulares como *H. pylori*. Por ejemplo, NOD2 reconoce a *M. tuberculosis*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *B. burgdorferi* y *N. meningitidis* activando la inmunidad innata como respuesta a la infección por estas bacterias en el SNC (Chauhan et al., 2009). Además, los astrocitos desencadenan la señalización proinflamatoria e inducen la producción de la citoquina IL-1 $\beta$  (Geyer et al., 2019), sin embargo, no se observan cambios en los niveles de IL-1 $\beta$  en MCA proveniente de astrocitos reactivos por las OMVs en los tiempos estudiados en esta tesis. Además, nuestros resultados muestran que astrocitos que se vuelven reactivos en respuesta a OMVs aumentan la producción de IFN- $\gamma$  a través de NF- $\kappa$ B. Este resultado nos sugiere que las OMVs podrían activar receptores que señalizan río arriba y aumentan la expresión de IFN- $\gamma$ , como ocurre con los receptores endosomales TLR3 y/o NOD2 (Farina et al., 2005; Jack et al., 2005). Se ha reportado que los astrocitos producen IFN- $\gamma$  frente a un daño o a tratamiento con TNF (Monteiro et al., 2017). Sin embargo, nuestros resultados muestran que astrocitos tratados con TNF no liberan IFN- $\gamma$ , pero si TNF e IL-6, 5 días post inducción de la reactividad. Otra posibilidad es que TLR2 actúe

como receptor de las OMVs dado su descrita asociación con la Ureasa en células gástricas (Valenzuela-Valderrama et al., 2019). En definitiva, hasta la fecha, no se sabe qué receptor(es) es(son) responsable(s) del efecto de las OMVs de *H. pylori* en nuestro modelo celular, y serán necesarios estudios adicionales para aclarar la contribución específica de ellos.

### **6.3- Astrocitos reactivos y fenotipo proinflamatorio**

Los astrocitos reactivos del tipo A1 son neurotóxicos, su activación depende de NF- $\kappa$ B, y están implicados en una serie de enfermedades neurodegenerativas (Garber et al., 2018). Además, en su estado hiperactivo disminuyen su fagocitosis, sinaptogénesis y pierden la capacidad de mantener la homeostasis del SNC (Garber et al., 2018). En este sentido, nuestros resultados indican que la reactividad de los astrocitos inducida por las OMVs de *H. pylori* es dependiente de la señalización de NF- $\kappa$ B. Una posibilidad es que las OMVs actúen como *nanocarriers* para llevar factores de virulencia al cerebro, conectando así el microbioma gástrico con el cerebro (Pirolli et al., 2021). Por ejemplo, se ha reportado que OMVs aisladas del microbioma de pacientes diagnosticados con Alzheimer favorecen la activación de células gliales (astrocitos y microglías) y la fosforilación de Tau en neuronas hipocámpales cuando son inyectadas en un modelo murino *in vivo* (Wei et al., 2020). Nuestros resultados muestran, por primera vez, que las OMVs aisladas de *H. pylori* inducen un “fenotipo reactivo del tipo A1” en los astrocitos, y aumentan los niveles de diversas proteínas como aquellas de filamentos intermedios (GFAP y Vimentina), de hemicanales (Cx43), y de membrana plasmática (Integrina  $\alpha_v\beta_3$ ). Además, mostramos que astrocitos cuya reactividad es inducida con OMVs liberan IFN- $\gamma$  al medio extracelular. Esta citoquina aumenta sus niveles en

sangre y líquido cefalorraquídeo proveniente de pacientes o ratones en estado séptico. Consecuentemente, la deficiencia de IFN- $\gamma$  y/o su receptor IFN- $\gamma$ R previene la activación del fenotipo astrocito reactivo A1, restaurando la neurogénesis y la función cognitiva del modelo murino (Lu et al., 2020). Además, IFN- $\gamma$  activa la vía de señalización JAK/STAT3 en astrocitos humanos conduciendo también neurotoxicidad (Hashioka et al., 2011). Sin embargo, IFN- $\gamma$  también puede inducir el fenotipo astrocito reactivo A2 a través de la transcripción dependiente de JAK/STAT3 y se ha descrito que este fenotipo es predominante neuroprotector en isquemia, lesión a la sustancia blanca neonatal, lesión traumática cerebral, lesión a la médula espinal y lesión a las neuronas motoras (Liddel & Barres, 2017).

En este contexto, toma relevancia la hipótesis que las endotoxinas bacterianas causan o contribuyen a la neurodegeneración (Brown, 2019). Sin embargo, el papel de las OMVs de *H. pylori in vivo* y la activación de reactividad de astrocitos, hasta la fecha no había sido explorada.

### **6.3- Astrocito reactivos y daño neuronal**

En nuestro estudio encontramos que neuronas CAD cocultivadas sobre astrocitos pretratados con OMVs no logran la extensión de sus prolongaciones o neuritas, sugiriendo la posibilidad de un efecto causado por adherencia de las OMVs a la superficie de los astrocitos o a cambios moleculares a nivel de su membrana plasmática. En este sentido, se ha reportado que astrocitos tratados con citoquinas proinflamatorias (TNF, IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ ) y activados vía TLR3 aumentan la producción de agregados de fibronectina en la superficie de los astrocitos, inhibiendo la remielinización de axones

dañados (Werkman et al., 2020). Siguiendo esta misma línea, las OMVs de *H. pylori* podrían eventualmente activar la vía de señalización de TLR3 y aumentar la formación de agregados de fibronectina en los astrocitos inhibiendo procesos celulares que incluirían el crecimiento de neuritas. Además, estudios *in vitro* publicados previamente por nuestro laboratorio, demuestran la inhibición del crecimiento de neuritas y retracción de éstas causada por la comunicación neurona-astrocito mediada por la interacción en *Trans* entre Thy-1 neuronal y la Integrina astrocítica  $\alpha_v\beta_3$  (Burgos-Bravo et al., 2020; Maldonado et al., 2017). Importantemente, en nuestro trabajo, la Integrina  $\alpha_v\beta_3$  es sobreexpresada en astrocitos tratados con OMVs de *H. pylori*, lo que podría eventualmente promover la inhibición de la extensión de procesos neuronales contribuyendo al ambiente no-permisivo para la regeneración axonal en el SNC.

Por otro lado, medios condicionados (MC) provenientes de astrocitos pretratados (con TNF u OMVs) y luego incubados con neuronas CAD diferenciadas inducen el aumento en la actividad de la Caspasa 3, un indicador de activación de muerte celular. En este contexto, MC obtenidos luego de inhibir la vía de señalización de NF- $\kappa$ B en los astrocitos tratados con TNF, bloquea la activación de la Caspasa 3 en neuronas CAD. Sin embargo, este mismo tratamiento en astrocitos tratados con OMVs inhibe la señalización de NF- $\kappa$ B, pero genera un MC que no evita el aumento en la actividad de la Caspasa 3 en neuronas CAD tratadas. Especulamos que astrocitos tratados con las OMVs inducen la liberación de algún factor neurotóxico independiente de la señalización de NF- $\kappa$ B. Los resultados obtenidos nos llevan a proponer que las OMVs de *H. pylori* inducen un fenotipo reactivo/proinflamatorio en astrocitos a través de un mecanismo molecular que involucra la vía de señalización de NF- $\kappa$ B y la producción de

IFN- $\gamma$ , culminando en muerte neuronal *in vitro*. Adicionalmente, las OMVs promueven la migración de los astrocitos reactivos cuando son estimulados por una proteína de la superficie neuronal (Thy-1) y especulamos que eventualmente en un contexto multicelular esta migración del astrocito reactivo podría desencadenar un daño adicional a sus células vecinas.

#### **6.4- Las OMVs de *H. pylori* en modelo murino *in vivo*.**

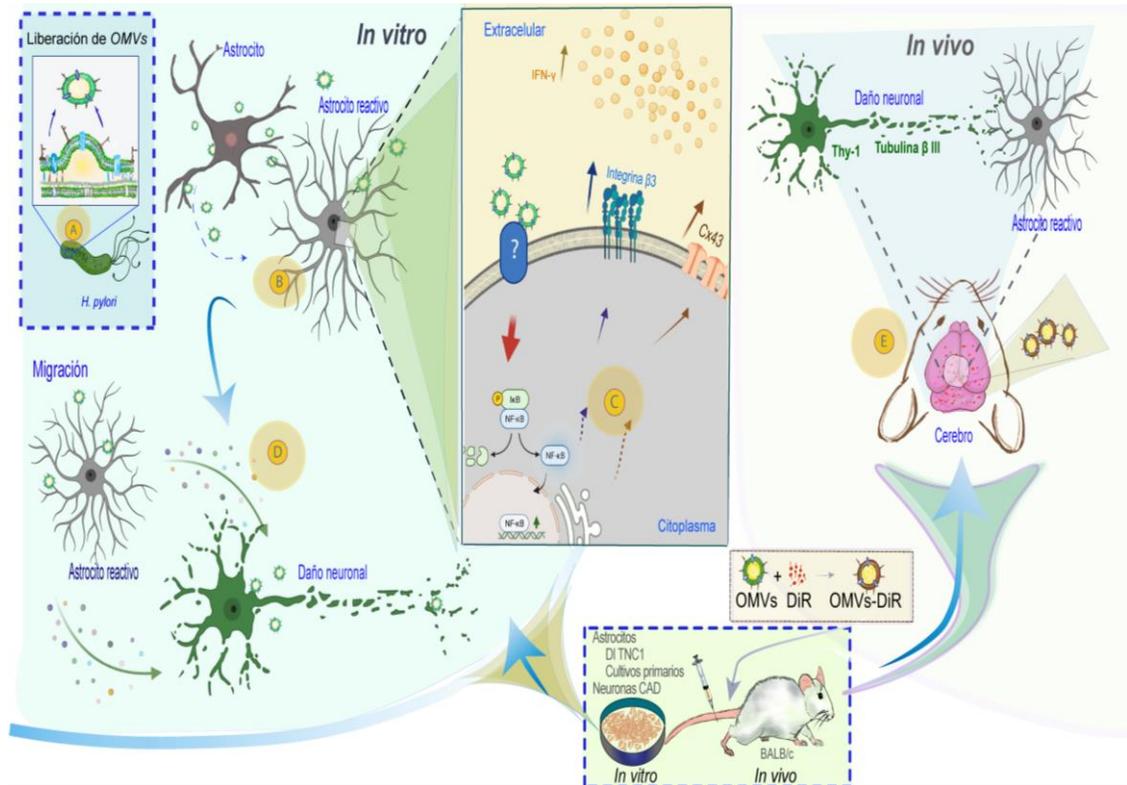
Los niveles fisiológicos y patológicos de las OMVs de *H. pylori* en los humanos son desconocidos y poco explorados (Dhital et al., 2021). No obstante, un estudio analizó e identificó, a través de la secuencia del ARNr 16s, las distintas bacterias y sus OMVs en los jugos gástricos provenientes de pacientes sanos y con diferentes patologías gástricas, incluyendo cáncer gástrico. Así, los investigadores encontraron que los niveles de bacterias y sus OMVs estaban aumentados en jugos gástricos provenientes de pacientes con cáncer gástrico siendo *H. pylori* y sus OMVs las más abundantes en este tipo de análisis (Choi et al., 2017). En consecuencia, para reproducir y profundizar estos hallazgos, los autores inocularon ratones C57BL/6 vía oral con 100  $\mu$ g de OMVs-*H. pylori* o con  $10 \times 10^6$  UFC de *H. pylori* marcadas con una sonda fluorescente hidrofóbica (Cy7) para registrar su biodistribución/acumulación durante el tratamiento hasta las 24 h *in vivo* en el equipo IVIS spectrum CT. Por tanto, obtuvieron que sólo las OMVs poseen un tropismo específico por el estómago, pero no la bacteria, durante las 24 h que duró el experimento. Sin embargo, no se detectó o no se estudió la biodistribución de las OMVs de *H. pylori* en otros órganos del ratón con la tecnología utilizada (Choi et al., 2017). Al contrario, un estudio similar y más contemporáneo, encontró que las OMVs provenientes de otras bacterias Gram negativas, como, por

ejemplo, OMVs de bacteroides intestinales marcadas con DiD y administradas también por vía oral en ratones fueron encontradas en el sistema gastrointestinal, corazón, pulmones e hígado a las 8 h post inoculación mediante el equipo Bruker *in vivo* Xtreme imaging system (Jones et al., 2020). Estos resultados sugieren que la naturaleza proteoliposomal de las OMVs les permiten probablemente atravesar varias barreras celulares e ingresar al torrente sanguíneo *in vivo*. En este contexto, nuestros resultados también dan cuenta también que la inyección sistémica de las OMVs de *H. pylori* y en concentraciones equivalentes a Choi et al., 2017 marcadas con DiR vía vena de la cola en ratones, también presentan tropismo por órganos del sistema gastrointestinal y una parte de ellas fueron detectadas en el cerebro *in vivo*. Adicionalmente, informes muy recientes indican que la inyección vía vena de la cola en ratones con OMVs del microbioma del paciente de Alzheimer induce la pérdida del aprendizaje espacial y la memoria, fosforilación de Tau, activación de microglia y astrocitos, aumento de citoquinas proinflamatorias en el cerebro y aumento de la permeabilidad de la BHE en un modelo murino (Wei et al., 2020). Además, las OMV de *Paenacaligenes hominis* en un modelo murino pueden llegar al cerebro a través de la circulación sanguínea o al nervio vago provocando trastornos cognitivos similares a los que se encuentran en la enfermedad de Alzheimer (Lee et al., 2020). Asimismo, las inyecciones intraperitoneales diarias con filtrados de cultivo de *H. pylori* inducen una pérdida de memoria espacial y aprendizaje en ratas (Wang et al., 2014). Igualmente, varios estudios indican que las OMVs bacterianas aumentan la permeabilidad de la BHE (Wei et al., 2020, Wispelwey et al., 1989). En el presente estudio de tesis, mostramos por primera vez que una inyección sistémica de las OMVs de *H. pylori* llegan al cerebro, donde

inducen la reactividad de los astrocitos y daño neuronal. Se desconoce el mecanismo por el cual estas OMVs llegan al cerebro y esto requiere que se realicen más investigaciones.

### **6.5- Mecanismo molecular propuesto**

Considerando todos los datos obtenidos durante el desarrollo de esta tesis proponemos el siguiente modelo de mecanismo molecular para la acción de las OMVs de *H. pylori* en astrocitos *in vitro* e *in vivo*. *H. pylori* libera sus OMVs con un tamaño promedio de  $126,5 \pm 6,5$  con un cargo proteico enriquecido en: Chaperona GroEL, Ureasa (UreA y UreB), Catalasa, Ferritina y la proteína Dps (Fig. 25A). Además, proponemos que las OMVs de *H. pylori* podrían actuar como mensajeros moleculares conectando el microbioma gástrico y el cerebro. Así, las OMVs al entrar en contacto con los astrocitos (Fig 25B y E), aumentan los marcadores de reactividad GFAP, Vimentina, Conexina 43, y la Integrina  $\alpha_v\beta_3$ , a través de un mecanismo dependiente de la señalización de NF- $\kappa$ B. Además, astrocitos tratados con las OMVs responden funcionalmente a la proteína neuronal Thy-1 al migrar *in vitro* (Figs. 25C y 25D) y aumentan la síntesis y liberación de IFN- $\gamma$  al espacio extracelular (Fig. 25C). Además, astrocitos reactivos por las OMVs de *H. pylori* inducen daño neuronal a través del contacto célula-célula y liberación de factores neurotóxicos al medio extracelular (Fig. 25D). Adicionalmente, en el presente estudio de tesis, mostramos por primera vez que una inyección sistémica de las OMVs de *H. pylori* llegan al cerebro, donde inducen la reactividad de los astrocitos y daño neuronal (Fig. 25E)



**Figura 25. Modelo molecular propuesto.** (A) *H. pylori* libera OMVs que corresponden a nanovesículas que poseen un cargo proteico alto de factores de virulencia y enzimas similares al encontrado en la bacteria parental. Estas cualidades únicas les podrían facilitar cumplir un rol de mensajeros proinflamatorios que conectarían el microbioma del estómago y órganos distantes como el cerebro. (B) Las OMVs inducen fenotipo reactivo en astrocitos aumentando los marcadores de reactividad (GFAP, Vimentina, Integrina  $\beta_3$  y Conexina 43). (C) Astrocitos reactivos aumentan los niveles de Integrina  $\beta_3$  y Conexina 43 a través de la señalización dependiente de NF- $\kappa$ B, aumentando también la producción y liberación de IFN- $\gamma$  al espacio extracelular. (D) Astrocitos reactivos adquieren fenotipo migratorio mediante estímulo neuronal e inducen daño neuronal a través del contacto célula-célula y liberación de elementos neurotóxicos al medio extracelular. (E) Los resultados de la inyección sistemática de OMVs-DiR a través de la vena de cola en ratones indican que las OMVs llegan al cerebro y son detectadas hasta 72 h post tratamiento. Además, las OMVs también *in vivo* inducen la reactividad de astrocitos (aumento de GFAP) e inducen daño neuronal evaluado mediante la fragmentación de axón/dendritas (tinción particulada de Thy-1 y Tubulina  $\beta$ III).

## 7 Conclusiones

En este estudio determinamos que las OMVs de *H. pylori* corresponden a nanovesículas con un tamaño promedio de 120-130 nm formadas por un cargo proteico cercano al contenido de factores de virulencia en la bacteria parental enriquecidas en proteínas como: Chaperona GroEL, Ureasa (UreA y UreB), Catalasa, Ferritina y la proteína Dps. Además, determinamos que las OMVs pueden contener proteínas que no aparecen representadas en la bacteria parental por espectrometría de masas, sugiriendo con estos antecedentes un proceso selectivo en la biogénesis y/o liberación de las vesículas. Con estas características, las OMVs atraviesan epitelios celulares, llegan al torrente sanguíneo y con ello envían señales alejadas del nicho de colonización e incluso llegan al cerebro. Por otro lado, en este trabajo determinamos que las OMVs de *H. pylori* inducen un “fenotipo reactivo del tipo A1” en astrocitos aumentando los niveles de las proteínas GFAP, Vimentina, Conexina 43 e Integrina  $\alpha_v\beta_3$ , la migración celular a través de un estímulo de neurona (Thy-1) y liberación de IFN- $\gamma$  al medio extracelular a través de un mecanismo dependiente de la señalización y actividad de NF- $\kappa$ B. Por otro lado, determinamos que neuronas cocultivadas sobre astrocitos reactivos-OMVs no logran extender sus neuritas, sugiriendo la posibilidad de cambios moleculares a nivel de la membrana de los astrocitos o a la adherencia de las OMVs a la superficie celular y a un efecto directo de OMVs sobre las neuronas. Además, el medio condicionado proveniente de astrocitos reactivos (OMVs) adicionado a neuronas diferenciadas induce muerte celular y aumento en la actividad de la Caspasa 3, como parte del mecanismo molecular involucrado en el proceso de muerte celular. En este

contexto, la inhibición en la señalización de NF- $\kappa$ B en los astrocitos tratados con TNF bloquea el aumento de la actividad de la Caspasa 3 en neuronas tratadas con este medio condicionado, pero no la muerte celular. Por otro lado, el bloqueo en la señalización de NF- $\kappa$ B evita el aumento en la muerte celular en neuronas CAD tratadas con medio condicionado proveniente de OMVs, pero no en la actividad de la Caspasa 3. Así, sugerimos que astrocitos reactivos por OMVs podrían inducir la liberación de factores neurotóxicos dependientes e independientes de la señalización de NF- $\kappa$ B. Adicionalmente, la administración sistémica de las OMVs *in vivo* da cuenta que poseen un tropismo alto por el sistema gastro intestinal y una parte de ellas llega al cerebro, estas OMVs inducen la reactividad de astrocitos y dañan las neuronas. Sin embargo, estos efectos en el cerebro podrían estar mediados directa e indirectamente por los astrocitos reactivos u otras células activadas por las OMVs como ocurre debido a las respuestas multicelulares en el SNC. En conjunto nuestros resultados entregan información valiosa sobre la respuesta exacerbada de los astrocitos reactivos en respuesta a las OMVs causando un daño mayor que el efecto de las OMVs por sí mismas. Con esto se podría responsabilizar a las OMVs como efector de los efectos extra-gástricos en la infección por *H. pylori* en especial como efector en los efectos de bacterias sobre las enfermedades neurodegenerativas.

En resumen, los resultados de este estudio comprenden la primera evidencia disponible en relación con los efectos de las OMVs de *H. pylori* sobre un modelo celular astrocito y neurona *in vitro*. Así, con estos antecedentes pretendemos contribuir a esclarecer en parte la comunicación entre el microbioma gástrico y el SNC a través de

las OMVs de *H. pylori*, y entender la señalización de OMVs como un inductor de reactividad de astrocitos mediante la señalización de NF- $\kappa$ B en astrocitos.

## 8 Referencias

- Aebischer, T., Meyer, T.F. and Andersen, L.P.,** 2010. Inflammation, immunity, and vaccines for *Helicobacter*. *Helicobacter*, 15, pp.21-28.
- Albaret, G., Sifré, E., Floch, P., Laye, S., Aubert, A., Dubus, P., Azzi-Martin, L., Giese, A., Salles, N., Mégraud, F. and Varon, C.,** 2020. Alzheimer's Disease and *Helicobacter pylori* Infection: Inflammation from Stomach to Brain?. *Journal of Alzheimer's Disease*, 73(2), pp.801-809.
- Alvarez, A., Lagos-Cabré, R., Kong, M., Cárdenas, A., Burgos-Bravo, F., Schneider, P., Quest, A.F. and Leyton, L.,** 2016. Integrin-mediated transactivation of P2X7R via hemichannel-dependent ATP release stimulates astrocyte migration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(9), pp.2175-2188.
- Anand, D. and Chaudhuri, A.,** 2016. Bacterial outer membrane vesicles: New insights and applications. *Molecular membrane biology*, 33(6-8), pp.125-137.
- Attems, J., Walker, L. and Jellinger, K.A.,** 2014. Olfactory bulb involvement in neurodegenerative diseases. *Acta neuropathologica*, 127(4), pp.459-475.
- Avalos, A.M., Arthur, W.T., Schneider, P., Quest, A.F., Burridge, K. and Leyton, L.,** 2004. Aggregation of integrins and RhoA activation are required for Thy-1-induced morphological changes in astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), pp.39139-39145.
- Avalos, A.M., Valdivia, A.D., Muñoz, N., Herrera-Molina, R., Tapia, J.C., Lavandero, S., Chiong, M., Burridge, K., Schneider, P., Quest, A.F. and Leyton, L.,** 2009. Neuronal Thy-1 induces astrocyte adhesion by engaging syndecan-4 in a cooperative interaction with  $\alpha\beta3$  integrin that activates PKC $\alpha$  and RhoA. *Journal of cell science*, 122(19), pp.3462-3471.
- Bi, F., Huang, C., Tong, J., Qiu, G., Huang, B., Wu, Q., Li, F., Xu, Z., Bowser, R., Xia, X.G. and Zhou, H.,** 2013. Reactive astrocytes secrete lcn2 to promote neuron death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(10), pp.4069-4074.
- Blaser, M.J.,** 2008. Disappearing microbiota: *Helicobacter pylori* protection against esophageal adenocarcinoma. *Cancer Prevention Research*, 1(5), pp.308-311.
- Brambilla, R., Morton, P.D., Ashbaugh, J.J., Karmally, S., Lambertsen, K.L. and Bethea, J.R.,** 2014. Astrocytes play a key role in EAE pathophysiology by orchestrating in the CNS the inflammatory response of resident and peripheral immune cells and by suppressing remyelination. *Glia*, 62(3), pp.452-467.
- Brandtzaeg, Á., Bryn, K., Kierulf, P., Ovstebø, R., Namork, E., Aase, B. and Jantzen, E.,** 1992. Meningococcal endotoxin in lethal septic shock plasma studied by gas chromatography, mass-spectrometry, ultracentrifugation, and electron microscopy. *The Journal of clinical investigation*, 89(3), pp.816-823.
- Brenner, H., Rothenbacher, D. and Arndt, V.,** 2009. Epidemiology of stomach cancer. *Cancer epidemiology*, pp.467-477.
- Brown, G.C.,** 2019. The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. *Journal of neuroinflammation*, 16(1), pp.1-10.

- Burgos-Bravo, F., Martínez-Meza, S., Quest, A.F., Wilson, C.A. and Leyton, L.,** 2020. Application of force to a Syndecan-4 containing complex with Thy-1- $\alpha\text{v}\beta_3$  Integrin accelerates neurite Retraction. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 582257.
- Cardenas, A., Kong, M., Alvarez, A., Maldonado, H. and Leyton, L.,** 2014. Signaling pathways involved in neuron-astrocyte adhesion and migration. *Current molecular medicine*, 14(2), pp.275-290.
- Cellini, L.,** 2014. *Helicobacter pylori*: a chameleon-like approach to life. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(19), p.5575.
- Chauhan, V.S. and Marriott, I.,** 2007. Bacterial infections of the central nervous system: a critical role for resident glial cells in the initiation and progression of inflammation. *Current Immunology Reviews*, 3(2), pp.133-143.
- Chew, Y., Chung, H.Y., Lin, P.Y., Wu, D.C., Huang, S.K. and Kao, M.C.,** 2021. Outer membrane vesicle production by helicobacter pylori represents an approach for the delivery of virulence factors CagA, VacA and Urea into human gastric adenocarcinoma (Ags) cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), p.3942.
- Choi, H.I., Choi, J.P., Seo, J., Kim, B.J., Rho, M., Han, J.K. and Kim, J.G.,** 2017. *Helicobacter pylori*-derived extracellular vesicles increased in the gastric juices of gastric adenocarcinoma patients and induced inflammation mainly via specific targeting of gastric epithelial cells. *Experimental & molecular medicine*, 49(5), pp.e330-e330.
- Choi, S.S., Lee, H.J., Lim, I., Satoh, J.I. and Kim, S.U.,** 2014. Human astrocytes: secretome profiles of cytokines and chemokines. *PloS one*, 9(4), p.e92325.
- Chou, Y.C., Sheu, J.R., Chung, C.L., Chen, C.Y., Lin, F.L., Hsu, M.J., Kuo, Y.H. and Hsiao, G.,** 2010. Nuclear-targeted inhibition of NF- $\kappa$ B on MMP-9 production by N-2-(4-bromophenyl) ethyl caffeamide in human monocytic cells. *Chemico-biological interactions*, 184(3), pp.403-412.
- Colombo, E. and Farina, C.,** 2016. Astrocytes: key regulators of neuroinflammation. *Trends in immunology*, 37(9), pp.608-620.
- Contaldi, F., Capuano, F., Fulgione, A., Cigliano, R.A., Sanseverino, W., Iannelli, D., Medaglia, C. and Capparelli, R.,** 2017. The hypothesis that *Helicobacter pylori* predisposes to Alzheimer's disease is biologically plausible. *Scientific reports*, 7(1), pp.1-14.
- Danesh, J.,** 1999. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: systematic review of the epidemiological studies. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 13(7), pp.851-856.
- Deretzi, G., Kountouras, J., A Polyzos, S., Zavos, C., Giartza-Taxidou, E., Gavalas, E. and Tsiftsios, I.,** 2011. Gastrointestinal immune system and brain dialogue implicated in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *Current molecular medicine*, 11(8), pp.696-707.
- Dhital, S., Deo, P., Stuart, I. and Naderer, T.,** 2021. Bacterial outer membrane vesicles and host cell death signaling. *Trends in Microbiology*, 29(12). pp.1106-1116.

- Dobbs, R.J., Charlett, A., Purkiss, A.G., Dobbs, S.M., Weller, C. and Peterson, D.W.,** 1999. Association of circulating TNF-alpha and IL-6 with ageing and parkinsonism. *Acta Neurol Scand*, 100, pp.34-41.
- Dobbs, R.J., Charlett, A., Dobbs, S.M., Weller, C. and Peterson, D.W.,** 2000. Parkinsonism: differential age-trend in *Helicobacter pylori* antibody. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 14(9), pp.1199-1205.
- Dobbs, R.J., Charlett, A., Dobbs, S.M., Weller, C., Ibrahim, M.A., Iguodala, O., Smee, C., Plant, J.M., Lawson, A.J., Taylor, D. and Bjarnason, I.,** 2012. Leukocyte-subset counts in idiopathic parkinsonism provide clues to a pathogenic pathway involving small intestinal bacterial overgrowth. A surveillance study. *Gut pathogens*, 4(1), pp.1-16.
- Doulberis, M., Kotronis, G., Thomann, R., Polyzos, S.A., Boziki, M., Gialamprinou, D., Deretzi, G., Katsinelos, P. and Kountouras, J.,** 2018. Impact of *Helicobacter pylori* on Alzheimer's disease: What do we know so far?. *Helicobacter*, 23(1), p.e12454.
- Drevets, D.A., Leenen, P.J. and Greenfield, R.A.,** 2004. Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria. *Clinical microbiology reviews*, 17(2), pp.323-347.
- Elhenawy, W., Bording-Jorgensen, M., Valguarnera, E., Haurat, M.F., Wine, E. and Feldman, M.F.,** 2016. LPS remodeling triggers formation of outer membrane vesicles in *Salmonella*. *MBio*, 7(4), pp.e00940-16.
- Emery, D.C., Shoemark, D.K., Batstone, T.E., Waterfall, C.M., Coghill, J.A., Cerajewska, T.L., Davies, M., West, N.X. and Allen, S.J.,** 2017. 16S rRNA next generation sequencing analysis shows bacteria in Alzheimer's post-mortem brain. *Frontiers in aging neuroscience*, 9, p.195.
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J.P., Petzold, G.C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A. and Allen, N.J.,** 2021. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature neuroscience*, 24(3), pp.312-325
- Escartin, C., Guillemaud, O. and Carrillo-de Sauvage, M.A.,** 2019. Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia*, 67(12), pp.2221-2247.
- Farina, C., Krumbholz, M., Giese, T., Hartmann, G., Aloisi, F. and Meinl, E.,** 2005. Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes. *Journal of neuroimmunology*, 159(1-2), pp.12-19.
- Franceschi, F., Gasbarrini, A., Polyzos, S.A. and Kountouras, J.,** 2015. Extragastric diseases and *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 20, pp.40-46.
- Franzini, M., Corti, A., Fierabracci, V. and Pompella, A.,** 2014. *Helicobacter*, gamma-glutamyltransferase and cancer: further intriguing connections. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(47), p.18057.
- Garber, C., Vasek, M.J., Vollmer, L.L., Sun, T., Jiang, X. and Klein, R.S.,** 2018. Astrocytes decrease adult neurogenesis during virus-induced memory dysfunction via IL-1. *Nature immunology*, 19(2), pp.151-161.
- Geyer, S., Jacobs, M. and Hsu, N.J.,** 2019. Immunity against bacterial infection of the central nervous system: an astrocyte perspective. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, p.57.

- Gorlé, N., Blaecher, C., Bauwens, E., Vandendriessche, C., Balusu, S., Vandewalle, J., Van Cauwenberghe, C., Van Wonterghem, E., Van Imschoot, G., Liu, C. and Ducatelle, R., 2018.** The choroid plexus epithelium as a novel player in the stomach-brain axis during *Helicobacter infection*. *Brain, behavior, and immunity*, 69, pp.35-47.
- Han, E.C., Choi, S.Y., Lee, Y., Park, J.W., Hong, S.H. and Lee, H.J., 2019.** Extracellular RNAs in periodontopathogenic outer membrane vesicles promote TNF- $\alpha$  production in human macrophages and cross the blood-brain barrier in mice. *The FASEB Journal*, 33(12), pp.13412-13422.
- Hashim, H., Azmin, S., Razlan, H., Yahya, N.W., Tan, H.J., Manaf, M.R.A. and Ibrahim, N.M., 2014.** Eradication of *Helicobacter pylori* infection improves levodopa action, clinical symptoms and quality of life in patients with Parkinson's disease. *PLoS One*, 9(11), p.e112330.
- Hashioka, S., Klegeris, A., Qing, H. and McGeer, P.L., 2011.** STAT3 inhibitors attenuate interferon- $\gamma$ -induced neurotoxicity and inflammatory molecule production by human astrocytes. *Neurobiology of disease*, 41(2), pp.299-307.
- Henn, A., Kirner, S. and Leist, M., 2011.** TLR2 hypersensitivity of astrocytes as functional consequence of previous inflammatory episodes. *The Journal of Immunology*, 186(5), pp.3237-3247.
- Henríquez, M., Herrera-Molina, R., Valdivia, A., Alvarez, A., Kong, M., Muñoz, N., Eisner, V., Jaimovich, E., Schneider, P., Quest, A.F. and Leyton, L., 2011.** ATP release due to Thy-1-integrin binding induces P2X7-mediated calcium entry required for focal adhesion formation. *Journal of cell science*, 124(9), pp.1581-1588.
- Hermosilla, T., Muñoz, D., Herrera-Molina, R., Valdivia, A., Muñoz, N., Nham, S.U., Schneider, P., Burridge, K., Quest, A.F. and Leyton, L., 2008.** Direct Thy-1/ $\alpha_v\beta_3$  integrin interaction mediates neuron to astrocyte communication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783(6), pp.1111-1120.
- Herrera-Molina, R., Frischknecht, R., Maldonado, H., Seidenbecher, C.I., Gundelfinger, E.D., Hetz, C., Aylwin, M., Schneider, P., Quest, A.F. and Leyton, L., 2012.** Astrocytic  $\alpha_v\beta_3$  integrin inhibits neurite outgrowth and promotes retraction of neuronal processes by clustering Thy-1. *PLoS One*, 7(3), p.e34295.
- Herrera-Molina, R., Valdivia, A., Kong, M., Alvarez, A., Cárdenas, A., Quest, A.F. and Leyton, L., 2013.** Thy-1-interacting molecules and cellular signaling in cis and trans. *International review of cell and molecular biology*, 305, pp.163-216.
- Hooi, J.K., Lai, W.Y., Ng, W.K., Suen, M.M., Underwood, F.E., Tanyingoh, D., Malfertheiner, P., Graham, D.Y., Wong, V.W., Wu, J.C. and Chan, F.K., 2017.** Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*, 153(2), pp.420-429.
- Hung, C.C., Lin, C.H., Chang, H., Wang, C.Y., Lin, S.H., Hsu, P.C., Sun, Y.Y., Lin, T.N., Shie, F.S., Kao, L.S. and Chou, C.M., 2016.** Astrocytic GAP43 induced by the TLR4/NF- $\kappa$ B/STAT3 axis attenuates astroglial-mediated

- microglial activation and neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, 36(6), pp.2027-2043.
- Jack, C.S., Arbour, N., Manusow, J., Montgrain, V., Blain, M., McCrea, E., Shapiro, A. and Antel, J.P.**, 2005. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *The Journal of Immunology*, 175(7), pp.4320-4330.
- Jones, E.J., Booth, C., Fonseca, S., Parker, A., Cross, K., Miquel-Clopés, A., Hautefort, I., Mayer, U., Wileman, T., Stentz, R. and Carding, S.R.**, 2020. The uptake, trafficking, and biodistribution of *Bacteroides thetaiotaomicron* generated outer membrane vesicles. *Frontiers in microbiology*, 11, p.57.
- Kaparakis-Liaskos, M. and Ferrero, R.L.**, 2015. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nature Reviews Immunology*, 15(6), pp.375-387.
- Keenan, J., Day, T., Neal, S., Cook, B., Perez-Perez, G., Allardyce, R. and Bagshaw, P.**, 2000. A role for the bacterial outer membrane in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *FEMS microbiology letters*, 182(2), pp.259-264.
- Kielian, T.**, 2006. Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *Journal of neuroscience research*, 83(5), pp.711-730.
- Ko, S.H., Rho, D.J., Jeon, J.I., Kim, Y.J., Woo, H.A., Kim, N. and Kim, J.M.**, 2016. Crude preparations of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles induce upregulation of heme oxygenase-1 via activating Akt-Nrf2 and mTOR–IκB kinase–NF-κB pathways in dendritic cells. *Infection and immunity*, 84(8), pp.2162-2174.
- Kong, M., Muñoz, N., Valdivia, A., Alvarez, A., Herrera-Molina, R., Cárdenas, A., Schneider, P., Burridge, K., Quest, A.F. and Leyton, L.**, 2013. Thy-1-mediated cell–cell contact induces astrocyte migration through the engagement of  $\alpha_v\beta_3$  integrin and syndecan-4. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(6), pp.1409-1420.
- Kountouras, J., Boziki, M., Gavalas, E., Zavos, C., Deretzi, G., Chatzigeorgiou, S., Katsinelos, P., Grigoriadis, N., Giartza-Taxidou, E. and Venizelos, I.**, 2010. Five-year survival after *Helicobacter pylori* eradication in Alzheimer disease patients. *Cognitive and behavioral neurology*, 23(3), pp.199-204.
- Kountouras, J., Boziki, M., Gavalas, E., Zavos, C., Deretzi, G., Grigoriadis, N., Tsolaki, M., Chatzopoulos, D., Katsinelos, P., Tzilves, D. and Zabouri, A.**, 2009. Increased cerebrospinal fluid *Helicobacter pylori* antibody in Alzheimer's disease. *International Journal of Neuroscience*, 119(6), pp.765-777.
- Kountouras, J.M.D.P., Tsolaki, M., Boziki, M., Gavalas, E., Zavos, C., Stergiopoulos, C., Kapetanakis, N., Chatzopoulos, D. and Venizelos, I.**, 2007. Association between *Helicobacter pylori* infection and mild cognitive impairment. *European journal of neurology*, 14(9), pp.976-982.
- Kountouras, J., Zavos, C., Polyzos, S.A. and Deretzi, G.**, 2015. The gut-brain axis: interactions between *Helicobacter pylori* and enteric and central nervous systems. *Annals of gastroenterology*, 28(4) pp.506-506.
- Kwon, S.O., Gho, Y.S., Lee, J.C. and Kim, S.I.**, 2009. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS microbiology letters*, 297(2), pp.150-156.

- Lagos-Cabré, R., Alvarez, A., Kong, M., Burgos-Bravo, F., Cárdenas, A., Rojas-Mancilla, E., Pérez-Nuñez, R., Herrera-Molina, R., Rojas, F., Schneider, P., Herrera-Marschitz, M., Quest, A.F., Van Zundert, B and Leyton, L., 2017.**  $\alpha_v\beta_3$  Integrin regulates astrocyte reactivity. *Journal of neuroinflammation*, 14(1), pp.1-13.
- Lee, K.E., Kim, J.K., Han, S.K., Lee, D.Y., Lee, H.J., Yim, S.V. and Kim, D.H., 2020.** The extracellular vesicle of gut microbial *Paenaltcaligenes hominis* is a risk factor for vagus nerve-mediated cognitive impairment. *Microbiome*, 8(1), pp.1-18.
- Leyton, L., Schneider, P., Labra, C.V., Rüegg, C., Hetz, C., Quest, A.F. and Bron, C., 2001.** Thy-1 binds to integrin  $\beta_3$  on astrocytes and triggers formation of focal contact sites. *Current Biology*, 11(13), pp.1028-1038.
- Li, T., Chen, X., Zhang, C., Zhang, Y. and Yao, W., 2019.** An update on reactive astrocytes in chronic pain. *Journal of neuroinflammation*, 16(1), pp.1-13.
- Liddelw, S.A. and Barres, B.A., 2017.** Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential. *Immunity*, 46(6), pp.957-967.
- Liddelw, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Münch, A.E., Chung, W.S., Peterson, T.C. and Wilton, D.K., 2017.** Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), pp.481-487.
- Lu, Y., Yang, Y., Peng, Z., Xie, L., Zhong, X., Liang, F., Yuan, C. and Lu, B., 2020.** Silencing IFN- $\gamma$  inhibits A1 astrocytes and attenuates neurogenesis decline and cognitive impairment in endotoxemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 533(4), pp.1519-1526.
- Maldonado, H., Calderon, C., Burgos-Bravo, F., Kobler, O., Zuschratter, W., Ramirez, O., Härtel, S., Schneider, P., Quest, A.F., Herrera-Molina, R. and Leyton, L., 2017.** Astrocyte-to-neuron communication through integrin-engaged Thy-1/CBP/Csk/Src complex triggers neurite retraction via the RhoA/ROCK pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1864(2), pp.243-254.
- Matsuo, Y., Kido, Y. and Yamaoka, Y., 2017.** *Helicobacter pylori* outer membrane protein-related pathogenesis. *Toxins*, 9(3), p.101.
- McBroom, A.J. and Kuehn, M.J., 2007.** Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Molecular microbiology*, 63(2), pp.545-558.
- McNamara, N., Gallup, M., Sucher, A., Maltseva, I., McKemy, D. and Basbaum, C., 2006.** AsialoGM1 and TLR5 cooperate in flagellin-induced nucleotide signaling to activate Erk1/2. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 34(6), pp.653-660.
- Mielcarska, M.B., Gregorczyk-Zboroch, K.P., Szulc-Dąbrowska, L., Bossowska-Nowicka, M., Wyżewski, Z., Cymerys, J., Chodkowski, M., Kielbik, P., Godlewski, M.M., Gieryńska, M. and Toka, F.N., 2020.** Participation of Endosomes in Toll-Like Receptor 3 Transportation Pathway in Murine Astrocytes. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14.

- Mirlashari, M.R., Høiby, E.A., Holst, J. and Lyberg, T.,** 2002. Outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*: Effects on leukocyte adhesion molecules and reactive oxygen species. *Apmis*, 110(3), pp.193-204.
- Mollica, A., Stefanucci, A., Costante, R. and Pinnen, F.,** 2012. Role of formyl peptide receptors (FPR) in abnormal inflammation responses involved in neurodegenerative diseases. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents)*, 11(1), pp.20-36.
- Monteiro, S., Roque, S., Marques, F., Correia-Neves, M. and Cerqueira, J.J.,** 2017. Brain interference: revisiting the role of IFN- $\gamma$  in the central nervous system. *Progress in neurobiology*, 156, pp.149-163.
- Nakajima, M., Kashiwagi, K., Ohta, J., Furukawa, S., Hayashi, K., Kawashima, T. and Hayashi, Y.,** 1994. Etoposide induces programmed death in neurons cultured from the fetal rat central nervous system. *Brain research*, 641(2), pp.350-352.
- Nakshatri, H., Bhat-Nakshatri, P., Martin, D.A., Goulet Jr, R.J. and Sledge Jr, G.W.,** 1997. Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Molecular and cellular biology*, 17(7), pp.3629-3639.
- Ndip, R.N., MacKay, W.G., Farthing, M.J. and Weaver, L.T.,** 2003. Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 36(5), pp.616-622.
- Olofsson, A., Vallström, A., Petzold, K., Tegtmeier, N., Schleucher, J., Carlsson, S., Haas, R., Backert, S., Wai, S.N., Gröbner, G. and Arnqvist, A.,** 2010. Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles. *Molecular microbiology*, 77(6), pp.1539-1555.
- Onai, Y., Suzuki, J.I., Kakuta, T., Maejima, Y., Haraguchi, G., Fukasawa, H., Muto, S., Itai, A. and Isobe, M.,** 2004. Inhibition of I $\kappa$ B phosphorylation in cardiomyocytes attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular research*, 63(1), pp.51-59.
- O'Neil, P., Machen, A., Deatherage, B., Trecuzzi, C., Tischer, A., Machha, V., Auton, M., Baldwin, M., White, T.A. and Fisher, M.T.,** 2018. The chaperonin GroEL: a versatile tool for applied biotechnology platforms. *Frontiers in molecular biosciences*, 5, p.46.
- Payão, S.L.M. and Rasmussen, L.T.,** 2016. *Helicobacter pylori* and its reservoirs: A correlation with the gastric infection. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*, 7(1), p.126.
- Pekny, M. and Pekna, M.,** 2014. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiological reviews*, 94(4), pp.1077-1098.
- Perez-Nuñez, Ramón., Chamorro, A., Artigas, R., Corvalán, A., Van Zundert, B., Reyes, C., Moya, P., Avalos, A.M., Schneider, P., Quest, A.F. and Leyton, L.,** 2022. Differential gene expression analysis in murine astrocytes identifies alterations in the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B (AKT)/Connexin43 signaling pathway important for astrogliosis. *Journal of Neuroinflammation* (en revisión).

- Perri, F., Clemente, R., Festa, V., De Ambrosio, C.C., Quitadamo, M., Fusillo, M., Grossi, E. and Andriulli, A.,** 1999. Serum tumour necrosis factor-alpha is increased in patients with *Helicobacter pylori* infection and CagA antibodies. *Italian journal of gastroenterology and hepatology*, 31(4), pp.290-294.
- Pirolli, N.H., Bentley, W.E. and Jay, S.M.,** 2021. Bacterial Extracellular Vesicles and the Gut-Microbiota Brain Axis: Emerging Roles in Communication and Potential as Therapeutics. *Advanced Biology*, p.2000540.
- Qi, Y., Wang, J. K., McMillian, M. and Chikaraishi, D. M.,** 1997. Characterization of a CNS cell line, CAD, in which morphological differentiation is initiated by serum deprivation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(4), 1217–1225.
- Rege, T.A. and Hagood, J.S.,** 2006. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *The FASEB journal*, 20(8), pp.1045-1054.
- Robertson, F.C., Lepard, J.R., Mekary, R.A., Davis, M.C., Yunusa, I., Gormley, W.B., Baticulon, R.E., Mahmud, M.R., Misra, B.K., Rattani, A. and Dewan, M.C.,** 2018. Epidemiology of central nervous system infectious diseases: a meta-analysis and systematic review with implications for neurosurgeons worldwide. *Journal of neurosurgery*, 130(4), pp.1107-1126.
- Roier, S., Zingl, F.G., Cakar, F., Durakovic, S., Kohl, P., Eichmann, T.O., Klug, L., Gadermaier, B., Weinzerl, K., Prassl, R. and Lass, A.,** 2016. A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nature communications*, 7(1), pp.1-13.
- Sasaki, K., Tajiri, Y., Sata, M., Fujii, Y., Matsubara, F., Zhao, M., Shimizu, S., Toyonaga, A. and Tanikawa, K.,** 1999. *Helicobacter pylori* in the natural environment. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 31(3), pp.275-279.
- Schaar, V., De Vries, S.P., Perez Vidakovics, M.L.A., Bootsma, H.J., Larsson, L., Hermans, P.W., Bjartell, A., Mörgelin, M. and Riesbeck, K.,** 2011. Multicomponent *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles induce an inflammatory response and are internalized by human epithelial cells. *Cellular microbiology*, 13(3), pp.432-449.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. and Eliceiri, K.W.,** 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), pp.671-675.
- Shah, B., Sullivan, C.J., Lonergan, N.E., Stanley, S., Sault, M.C. and Britt, L.D.,** 2012. Circulating bacterial membrane vesicles cause sepsis in rats. *Shock*, 37(6), pp.621-628.
- Sofroniew, M.V. and Vinters, H.V.,** 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), pp.7-35.
- Stentz, R., Carvalho, A.L., Jones, E.J. and Carding, S.,** 2018. Fantastic voyage: the journey of intestinal microbiota-derived microvesicles through the body. *Biochemical Society Transactions*, 46(5), pp.1021-1027.
- Sullivan, K.F. and Cleveland, D.W.,** 1986. Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(12), pp.4327-4331.

- Tak, P.P. and Firestein, G.S.**, 2001. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of clinical investigation*, 107(1), pp.7-11.
- Tan, A.H., Mahadeva, S., Marras, C., Thalha, A.M., Kiew, C.K., Yeat, C.M., Ng, S.W., Ang, S.P., Chow, S.K., Loke, M.F. and Vadivelu, J.S.**, 2015. *Helicobacter pylori* infection is associated with worse severity of Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, 21(3), pp.221-225.
- Thomas, R.C., Bath, M.F., Stover, C.M., Lambert, D.G. and Thompson, J.P.**, 2014. Exploring LPS-induced sepsis in rats and mice as a model to study potential protective effects of the nociceptin/orphanin FQ system. *Peptides*, 61, pp.56-60.
- Trindade, P., Loiola, E.C., Gasparotto, J., Ribeiro, C.T., Cardozo, P.L., Devalle, S., Salerno, J.A., Ornelas, I.M., Ledur, P.F., Ribeiro, F.M. and Ventura, A.L.**, 2020. Short and long TNF-alpha exposure recapitulates canonical astrogliosis events in human-induced pluripotent stem cells-derived astrocytes. *Glia*, 68(7), pp.1396-1409.
- Tsuge, M., Yasui, K., Ichiyawa, T., Saito, Y., Nagaoka, Y., Yashiro, M., Yamashita, N. and Morishima, T.**, 2010. Increase of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the blood induces early activation of MMP-9 in the brain. *Microbiology and immunology*, 54(7), pp.417-424.
- Valdivia, A., Cárdenas, A., Brenet, M., Maldonado, H., Kong, M., Díaz, J., Burrige, K., Schneider, P., San Martín, A., García-Mata, R., Quest, A.F. and Leyton, L.**, 2020. Syndecan-4/PAR-3 signaling regulates focal adhesion dynamics in mesenchymal cells. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), pp.1-19.
- Valenzuela, M., Glorieux, C., Stockis, J., Sid, B., Sandoval, J.M., Felipe, K.B., Kwiecinski, M.R., Verrax, J. and Calderon, P.B.**, 2014. Retinoic acid synergizes ATO-mediated cytotoxicity by precluding Nrf2 activity in AML cells. *British journal of cancer*, 111(5), pp.874-882.
- Valenzuela-Valderrama, M., Cerda-Opazo, P., Backert, S., González, M.F., Carrasco-Véliz, N., Jorquera-Cordero, C., Wehinger, S., Canales, J., Bravo, D. and Quest, A.F.**, 2019. The *Helicobacter pylori* urease virulence factor is required for the induction of hypoxia-induced factor-1 $\alpha$  in gastric cells. *Cancers*, 11(6), p.799.
- Vermes, I., Haanen, C., Nakken, S.H. and Reutelingsperger, C.**, 1995. Property-based design: optimization of drug absorption and pharmacokinetics. *J. Immunol. Methods*, 184, pp.39-51.
- Voss, B.J., Gaddy, J.A., McDonald, W.H. and Cover, T.L.**, 2014. Analysis of surface-exposed outer membrane proteins in *Helicobacter pylori*. *Journal of bacteriology*, 196(13), pp.2455-2471.
- Wang, X.L., Zeng, J., Feng, J., Tian, Y.T., Liu, Y.J., Qiu, M., Yan, X., Yang, Y., Xiong, Y., Zhang, Z.H. and Wang, Q.**, 2014. *Helicobacter pylori* filtrate impairs spatial learning and memory in rats and increases  $\beta$ -amyloid by enhancing expression of presenilin-2. *Frontiers in aging neuroscience*, 6, p.66.
- Wei, S., Peng, W., Mai, Y., Li, K., Wei, W., Hu, L., Zhu, S., Zhou, H., Jie, W., Wei, Z. and Kang, C.**, 2020. Outer membrane vesicles enhance tau phosphorylation

- and contribute to cognitive impairment. *Journal of cellular physiology*, 235(5), pp.4843-4855.
- Weller, C., Oxlade, N., Dobbs, S.M., Dobbs, R.J., Charlett, A. and Bjarnason, I.T.,** 2005. Role of inflammation in gastrointestinal tract in aetiology and pathogenesis of idiopathic parkinsonism. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 44(2), pp.129-135.
- Werkman, I., Sikkema, A.H., Versluijs, J.B., Qin, J., de Boer, P. and Baron, W.,** 2020. TLR3 agonists induce fibronectin aggregation by activated astrocytes: a role of pro-inflammatory cytokines and fibronectin splice variants. *Scientific reports*, 10(1), pp.1-16.
- Wessler, S., Schneider, G. and Backert, S.,** 2017. Bacterial serine protease HtrA as a promising new target for antimicrobial therapy?. *Cell Communication and Signaling*, 15(1), pp.1-5.
- Wispelwey, B., Hansen, E.J. and Scheld, W.M.,** 1989. *Haemophilus influenzae* outer membrane vesicle-induced blood-brain barrier permeability during experimental meningitis. *Infection and immunity*, 57(8), pp.2559-2562.
- Zamanian, J.L., Xu, L., Foo, L.C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R.G. and Barres, B.A.,** 2012. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *Journal of neuroscience*, 32(18), pp.6391-6410.
- Zhang, G., Ducatelle, R., Pasmans, F., D'Herde, K., Huang, L., Smet, A., Haesebrouck, F. and Flahou, B.,** 2013. Effects of *Helicobacter suis*  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase on lymphocytes: modulation by glutamine and glutathione supplementation and outer membrane vesicles as a putative delivery route of the enzyme. *PLoS One*, 8(10), p.e77966.
- Zhang, J. and Xiong, H.,** 2014. Brain tissue preparation, sectioning, and staining. In *Current Laboratory Methods in Neuroscience Research* (pp. 3-30). Springer, New York, NY.
- Zhao, H., Wu, Y., Xu, Z., Ma, R., Ding, Y., Bai, X., Rong, Q., Zhang, Y., Li, B. and Ji, X.,** 2019. Mechanistic insight into the interaction between *Helicobacter pylori* urease subunit  $\alpha$  and its molecular chaperone Hsp60. *Frontiers in microbiology*, 10, p.153.
- Zhao, Y., Cong, L. and Lukiw, W.J.,** 2017. Lipopolysaccharide (LPS) accumulates in neocortical neurons of Alzheimer's disease (AD) brain and impairs transcription in human neuronal-glia primary co-cultures. *Frontiers in aging neuroscience*, 9, p.407.

## 9 Anexos



Santiago, 15 de mayo de 2020

Certificado N°: **20365-MED-UCH**

### CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **CBA 1123 FMUCH**, del Proyecto de Investigación titulado **“Mecanismos que gatillan la expresión de la integrina avb3 en astrocitos reactivos”**, de la Investigadora Responsable **Dra. Lisette Leyton**, Profesora Titular, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales. Así mismo, la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

La Investigadora se ha comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de un total de **28** hembras preñadas y **84** neonatos de ratas (***Rattus norvegicus***), cepa Wistar. La hembras serán obtenidas del Bioterio Central de la Facultad de Medicina, desde junio de 2020 a diciembre de 2023, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por **Proyecto FONDECYT Regular Nro. 1200836**.

*El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.*

Ronald Vargas Casanova  
Director  
CICUA – VID  
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla  
Presidente  
CICUA - VID  
Universidad de Chile

**Carta de Aprobación de Proyectos**

**Proyecto 28/2021**

**Dirigida a Investigador: Manuel Valenzuela**

Copia: Vicerrector Académico, Director de Investigación  
Copia: Archivo Comité de Ética

**Identificación del Proyecto**

<b>1. Título</b>	"Alteraciones epiteliales producidas por exposición a vesículas de membrana externa de <i>Helicobacter pylori</i> ".
<b>2. Investigador Responsable</b>	Manuel Valenzuela
<b>3. Unidad académica</b>	Instituto de Investigación, Facultad de Ciencias de la Salud
<b>4. Concurso al que está postulando</b>	Trabajo previo para postular a Fondecyt regular 2022

Documentos recibidos:

- Formulación del proyecto de investigación

En este proyecto se trabajará con el modelo murino BALB/c , al cual se le inyectará, a través de la vena de la cola, vesículas de membrana externa (OMVs) de *Helicobacter pylori* purificadas a partir de cultivos líquidos. Estos experimentos considerarán un grupo reducido de animales por experimento (1 animal control y 3-4 condiciones experimentales).

Luego de 72h post-inyección, se recolectarán muestras de varios órganos, incluyendo cerebro, estómago y corazón que serán fijadas en formalina para su posterior análisis mediante inmunohistoquímica.

Como método de eutanasia se usará dislocación cervical.

Se respetan los criterios éticos de la investigación con animales de experimentación en laboratorio.



Se detallan las condiciones adecuadas para la conservación y resguardo en el bioterio.  
Se detalla bien el método de eutanasia que se utilizará después de la investigación con cada animal.

Queda aprobada esta investigación por el Comité de Ética de la Universidad Central

A handwritten signature in black ink, which appears to read 'F. León', is enclosed in a thin yellow rectangular border.

**Firmado:**

Francisco León Correa.  
Presidente CEC Universidad Central

**Fecha:** 28 de abril 2021

Este Comité sigue la Declaración de Helsinki, Normas CIOMS y demás declaraciones internacionales, así como la legislación existente en Chile sobre investigación con seres humanos y animales.