



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
PROGRAMA DOCTORADO EN FARMACOLOGÍA**

**LABORATORIO INTERACCIÓN HUESPED-PATÓGENO, PROGRAMA DE
MICROBIOLOGÍA Y MICOLOGÍA, ICBM.
LABORATORIO DE COMUNICACIÓN CELULAR, PROGRAMA DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CELULAR, ICBM.**

**LA INFECCIÓN POR *HELICOBACTER PYLORI* EN NIÑOS SE
ASOCIA A UNA EXPRESIÓN DISMINUIDA DE *SLC5A8*, UN
GEN SUPRESOR DE CANCER**

Memoria para optar al título de Doctor en Farmacología

QF. ANDREA KATHERINE ORELLANA MANZANO

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Miguel O’Ryan

Dr. Andrew Quest

Santiago de Chile

2016

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
1. <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	5
1.1.Relevancia de <i>H. pylori</i> en el mundo y en Chile.....	5
1.2.Generalidades microbiológicas y alteraciones digestivas	5
b.Úlcera	6
c.Cáncer gástrico.....	6
d.Linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT).....	7
2.- Dinámica de la infección por <i>H. pylori</i> y la importancia de la infección a edades tempranas	7
3.- <i>H. pylori</i> : Cambios epigenéticos y su relación con Cáncer	8
4.- Estudios Preliminares: Identificación en niños de genes diferencialmente expresados en presencia de <i>H. pylori</i> . Potencial silenciamiento de <i>SLC5A8</i> , un gen supresor de tumores	9
5.- <i>SLC5A8</i>	13
5.1 <i>SLC5A8</i> como potencial supresor tumoral	13
5.2 <i>Helicobacter pylori</i> y <i>SLC5A8</i>	14

HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
METODOLOGIA	17
DISEÑO GLOBAL:	17
1 ESTUDIO CLÍNICO.....	19
i.Obtención y preparación de muestras.....	21
ii.Transporte y almacenamiento de muestras	22
2. ESTUDIO IN VITRO.....	26
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
RESULTADOS:	30
Objetivo 1.- Demostrar que la infección por <i>H. pylori</i> en niños asintomáticos y/o sintomáticos se asocia a una disminución de la expresión de SLC5A8.....	30
Expresión de SLC5A8 en muestras de sangre en una población piloto de niños asintomáticos infectados vs niños no infectados.	30
Expresión de SLC5A8 en sangre en estudio caso-control de niños asintomáticos infectados comparados con niños no infectados por <i>H. pylori</i>	31

Expresión de SLC5A8 en muestras de tejido gástrico de niños infectados comparados con niños no infectados.	33
Objetivo 2. Determinar el efecto de infección por <i>H. pylori</i> en la hipermetilación de la región promotora del gen SLC5A8 en el tejido epitelial gástrico.	38
Objetivo 3.- Expresión de SLC5A8 en líneas celulares infectadas y no infectadas con <i>H. pylori</i>	43
Efecto de infección de <i>H. pylori</i> en una línea celular con sobreexpresión de SLC5A8	45
Objetivo 4. Establecer si la disminución de la expresión de SLC5A8 se traduce en alteración de expresión de genes efectores del transportador: p21, COX2, p53 y survivina	48
Efecto de infección en línea celular MKN74 con baja expresión intrínseca de SLC5A8.....	48
Efecto de infección en línea celular con sobreexpresión de SLC5A8	49
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIÓN	58
REFERENCIAS	59
MATERIAL SUPLEMENTARIO	68
ADDENDUM	96

Índice Figuras

Figura 1. Análisis bioinformático de Microarray Illumina. _____	11
Figura 2. Identificación de genes blancos como <i>SLC5A8</i> , usando diferentes herramientas bioinformáticas. _____	12
Figura 3. Rol de <i>SLC5A8</i> como un supresor de inflamación/carcinogénesis, relación y su relevancia respecto al contenido de fibra dietaria (butirato). _____	14
Figura 4. Esquema explicativo de la hipótesis de esta tesis. _____	15
Figura 5. Diseño global de la tesis. _____	18
Figura 6. Diseño experimental de muestras clínicas. _____	20
Figura 7. Niveles de expresión del mRNA de <i>SLC5A8</i> de niños infectados vs niños no infectados en muestras de sangre. _____	30
Figura 8. Niveles de expresión de <i>SLC5A8</i> del estudio caso-control. _____	32
Figura 9. La expresión de <i>SLC5A8</i> se encuentra disminuida en niños infectados con <i>H. pylori</i> comparados con los niños no infectados en muestras de tejido gástrico. _____	37
Figura 10. Cambio de patrones de metilación. _____	40
Figura 11. Relación entre niveles de expresión de <i>SLC5A8</i> y porcentaje de metilación de los niños infectados y no infectados. _____	41

Figura 12. Correlación de Spearman entre niveles de expresión de <i>SLC5A8</i> y porcentaje de metilación. _____	42
Figura 13. Niveles de expresión <i>SLC5A8</i> de líneas celulares MKN74 en relación a tiempo de infección con <i>H. pylori</i> . _____	44
Figura 14. Nivel de expresión del mensajero <i>SLC5A8</i> en línea celular MKN28. _	46
Figura 15. Niveles de expresión del mensajero <i>SLC5A8</i> en línea celular MKN28 pcDNA3.1 hSLC5A8 al estar infectado con <i>H. pylori</i> . _____	47
Figura 16. Niveles de expresión de los distintos efectores de <i>SLC5A8</i> en las células MKN74 infectadas con <i>H. pylori</i> . _____	48
Figura 17. Niveles de expresión de los distintos efectores de <i>SLC5A8</i> en las líneas celulares MKN28 pcDNA3.1 hSLC5A8 al estar infectado con <i>H. pylori</i> . _____	49

Índice de Tablas

Tabla 1. Temperaturas y tiempos para la reacción de PCR en tiempo real para las sondas taqman. _____	23
Tabla 2. Partidor para la región CpG de SLC5A8. _____	25
Tabla 3. Reacción de PCR para la amplificación de la región CpG transformada con bisulfito. _____	25
Tabla 4. Demografía, clínica y características familiares de los niños enrolados en el estudio caso-control según el estado de infección por <i>H. pylori</i> . _____	31
Tabla 5. Demografía y resultados de biopsias gástricas en niños infectados y no infectados sometidos a endoscopia. _____	35
Tabla 6. Mediana de expresión de SLC5A8 (IQR) en 11 niños infectados y 9 no infectados según el grado de daño histológico. _____	36
Tabla 7: Relación de estatus de metilación con respecto al estado de infección.	39
Tabla 8: Número total de citocinas metiladas en 7 muestras de niños infectados y 7 no infectados. _____	39