

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
ESCUELA DE POSTGRADO



**PAPEL DE HIF-1 α EN LA TRANSICIÓN DESDE LA ACTIVACIÓN
DE PI3K HACIA EL ARRESTO DEL CICLO CELULAR
PROMOVIDOS POR *HELICOBACTER PYLORI* EN CÉLULAS
GÁSTRICAS HUMANAS**

**Presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctora en Farmacología por:**

JIMENA ANDREA CANALES URRIOLA

Directores

Dr. Andrew Quest

Dra. Denisse Bravo

**Santiago, Chile
2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

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

JIMENA ANDREA CANALES URRIOLA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctora en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día.....de de 2016.

Directores de Tesis:

Dr. Andrew Quest

Dra. Denisse Bravo

Comisión Informante:

Dra. María Antonieta Valenzuela (Presidenta)

Dr. Guillermo Díaz

Dr. Martin Gotteland

Dr. Julio Tapia

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis de Doctorado se realizó en el Laboratorio de Comunicaciones Celulares de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, dirigido por el Dr. Andrew Quest, en conjunto con el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, dirigido por el Dr. Héctor Toledo.

Para su realización, este trabajo fue financiado por los siguientes proyectos:

- Beca CONICYT de Doctorado Nacional 2011-2015 (Jimena Canales)
- Beca CONICYT de Asistencia a Eventos y Cursos Cortos para Estudiantes de Doctorado. 2015 (Jimena Canales)
- Beca CONICYT de Asistencia a Eventos y Cursos Cortos para Estudiantes de Doctorado. 2014 (Jimena Canales)
- Beca CONICYT de Asistencia a Eventos y Cursos Cortos para Estudiantes de Doctorado. 2013 (Jimena Canales)
- Beca CONICYT de Asistencia a Eventos y Cursos Cortos para Estudiantes de Doctorado. 2012 (Jimena Canales)
- Fondos de Financiamiento para Centros de Investigación en Áreas Prioritarias FONDAF n° 15130011 (Dr. Andrew Quest)
- Proyecto de Investigación Asociativa. Anillo Némesis ACT1111 (Dr. Andrew Quest)
- Proyecto FONDECYT Regular n°1130250 (Dr. Andrew Quest)
- Proyecto FONDECYT Regular n°1120126 (Dr. Héctor Toledo)
- Proyecto FONDECYT de Iniciación en la Investigación n°11110076 (Dra. Denisse Bravo)

Los análisis bioinformáticos presentados en esta Tesis fueron obtenidos gracias a la colaboración de Ignacio Wichmann (Pontificia Universidad Católica de Chile), de Juan Cruz Rodríguez (Universidad Católica de Córdoba, Argentina) y del Dr. Elmer Fernández (Director de Biodatamining Group, Universidad Católica de Córdoba, Argentina)

PRODUCTIVIDAD

1. Publicaciones

Canales J., Valenzuela M.A., Bravo J., Cerda-Opazo P., Toledo H., Bravo D., Quest A.F. ***Helicobacter pylori* induced phosphatidylinositol-3-OH kinase/mTOR activation increases hypoxia inducible factor-1 α to promote loss of cyclin D1 and G0/G1 cell cycle arrest in human gastric cells.** [Enviado]

Valenzuela M.A., **Canales J.**, Corvalán A.H., Quest A.F. ***Helicobacter pylori*-induced inflammation and epigenetic changes during gastric carcinogenesis.** World J Gastroenterol. 2015 Dec 7;21(45):12742-56.

Ávalos Y., **Canales J.**, Bravo-Sagua R., Criollo A., Lavandero S., Quest A.F. **Tumor suppression and promotion by autophagy.** Biomed Res Int. 2014; 603980.

Valenzuela M., Bravo D., **Canales J.**, Sanhueza C., Díaz N., Almarza O., Toledo H., Quest A.F. ***Helicobacter pylori*-induced loss of survivin and gastric cell viability is attributable to secreted bacterial gamma-glutamyl transpeptidase activity.** J Infect Dis. 2013 Oct 1;208(7):1131-41.

2. Presentaciones en Congresos

***Helicobacter pylori* promotes transient HIF-1 α induction through a PI3K-AKT-mTOR pathway.** **Canales J.**, Valenzuela M., Bravo D., Toledo H., Quest A.F.G. XXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología Celular de Chile. Puerto Varas, Chile. 2015

***Helicobacter pylori*-induced HIF-1 α stabilization and transcriptional activation is linked to virulence factor CagA-dependent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway.** Canales J., Valenzuela M., Bravo D., Toledo H., Quest A.F.G. XXXVII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile. 2014.

Role of the Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-AKT pathway in *Helicobacter pylori*-induced HIF-1 α stabilization and transcriptional activation. Canales J., Bravo D., Leyton L., Toledo H., Quest A.F.G. XXVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología Celular de Chile. Puerto Varas, Chile. 2013.

***Helicobacter pylori* gamma glutamyl transpeptidase triggers Fe²⁺-dependent loss of survivin expression and gastric cell viability.** Valenzuela M., Bravo D., Canales J., Toledo H., Quest A.F.G. XXXIX Congreso Chileno de Gastroenterología, V Simposio Internacional de *Helicobacter pylori*. Viña del Mar, Chile. 2012

***Helicobacter pylori* induced loss of survivin expression and gastric cell viability is linked to secretion of bacterial gamma glutamyl transpeptidase.** Valenzuela M., Bravo D., Canales J., Toledo H., Quest A.F.G. XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile. 2012

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN	XIV
SUMMARY.....	XVI
INTRODUCCIÓN	1
1. Cáncer gástrico	1
2. <i>Helicobacter pylori</i>	2
2.1. <i>H. pylori</i> y cáncer gástrico	3
2.2. Efecto de <i>H. pylori</i> sobre células epiteliales gástricas	3
2.2.1. <i>H. pylori</i> y apoptosis de células epiteliales gástricas.....	5
2.2.2. <i>H. pylori</i> , proliferación y sobrevivencia de células epiteliales gástricas.....	6
2.2.2.1. <i>H. pylori</i> y activación de la vía PI3K/Akt	8
2.2.3. Efectos de <i>H. pylori</i> sobre el ciclo celular.....	10
3. HIF-1α	13
3.1. Regulación de HIF-1 α	13
3.2. HIF-1 α : papel protumoral y efecto sobre la proliferación celular.....	16
3.2.1. Papel no transcripcional de HIF-1 α	18
3.3. HIF-1 α y <i>H. pylori</i>	20
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS.....	23
Objetivo General.....	23
Objetivos Específicos	23
METODOLOGÍA	24
1. Materiales	24
1.1. Reactivos.....	24
1.2. Inhibidores farmacológicos.....	25
1.3. Anticuerpos	25
1.4. Plasmidios	26
2. Cultivo celular y condiciones experimentales	27
2.1. Cultivo de líneas celulares	27
2.2. Cepas y condiciones de cultivo bacteriano	27
2.3. Infección de células gástricas con <i>H. pylori</i>	28

3. Generación de líneas establemente transfectadas.....	28
4. Generación de la mutante de <i>H. pylori</i> 26695 ΔcagA	29
4.1. Interrupción del gen <i>cagA</i>	29
4.2. Transformación de <i>H. pylori</i>	31
5. Obtención de concentrado de sobrenadante de cultivo	31
6. Extracción de proteínas y análisis por western blot	32
6.1. Obtención de extractos totales de proteínas.....	32
6.2. Obtención de extractos de proteínas nucleares y citoplasmáticas	32
6.3. Análisis por western blot	33
7. Inmunofluorescencia indirecta	34
8. Ensayo de reportero de luciferasa	35
9. Determinación de la expresión de genes blancos de HIF-1α mediante RT- qPCR.....	36
9.1. Extracción de RNA	36
9.2. Obtención de cDNA.....	37
9.3. Análisis por PCR en tiempo real (qPCR)	37
10. Ensayos de viabilidad.....	39
10.1. Exclusión de azul de tripán	39
10.2. Ensayo de MTS.....	39
10.3. Determinación de apoptosis.....	40
11. Ciclo Celular	40
12. Determinación de adhesión de <i>H. pylori</i> a células gástricas.....	41
13. Análisis bioinformático de expresión de genes en tejido gástrico infectado con <i>H. pylori</i>.....	41
14. Análisis estadístico.....	42
RESULTADOS.....	43
O.E.1. Caracterizar la inducción de HIF-1α por <i>H. pylori</i> en células gástricas humanas.....	43
O.E.2. Evaluar el papel de la vía PI3K/Akt/mTOR en la inducción de HIF-1α por <i>H. pylori</i>.....	53
O.E.3. Evaluar el papel de HIF-1α inducido por <i>H. pylori</i> sobre el arresto del ciclo celular promovido por la infección	66
O.E.4. Determinar el factor de virulencia de <i>H. pylori</i> involucrado en la inducción de HIF-1α en células gástricas humanas.....	75
DISCUSIÓN	86
1. Caracterización de la inducción de HIF-1α por <i>H. pylori</i> en células gástricas humanas.....	87
2. Papel de la vía PI3K/Akt/mTOR en la inducción de HIF-1α por <i>H. pylori</i>.....	90
3. Papel de HIF-1α inducido por <i>H. pylori</i> sobre el arresto del ciclo celular promovido por la infección	95

4. Determinación del factor de virulencia de <i>H. pylori</i> involucrado en la inducción de HIF-1 α en células gástricas humanas.....	102
5. Alcances fisiopatológicos	107
6. Limitaciones del estudio	110
CONCLUSIONES	111
ANEXOS	113
REFERENCIAS.....	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Apoptosis de células epiteliales gástricas inducida por <i>H. pylori</i>	6
Figura 2. Activación de la vía PI3K/Akt y respuestas carcinogénicas promovidas por <i>H. pylori</i>	10
Figura 3. Regulación de HIF-1 α dependiente de oxígeno	14
Figura 4. Regulación de HIF-1 α independiente de oxígeno.....	16
Figura 5. Esquema del método de interrupción del gen <i>cagA</i>	30
Figura 6. Efecto de <i>H. pylori</i> sobre los niveles proteicos y del mRNA de HIF-1 α	44
Figura 7. Localización de HIF-1 α en células gástricas infectadas con <i>H. pylori</i>	46
Figura 8. Efecto de la infección con <i>H. pylori</i> sobre la actividad transcripcional de HIF-1.	47
Figura 9. Efecto temporal de <i>H. pylori</i> sobre la actividad transcripcional de HIF-1.....	48
Figura 10. Efecto de <i>H. pylori</i> sobre la expresión de genes blancos de HIF-1 α	50
Figura 11. Efecto de la infección con <i>H. pylori</i> sobre el ciclo celular.	52
Figura 12. Efecto temporal de <i>H. pylori</i> sobre la actividad de PI3K	53
Figura 13. Efecto de la inhibición de PI3K sobre los niveles de HIF-1 α inducidos por <i>H. pylori</i>	55
Figura 14. Efecto de la inhibición de PI3K sobre la actividad transcripcional de HIF-1 inducida por <i>H. pylori</i>	57
Figura 15. Efecto del inhibidor LY294002 sobre la adhesión de <i>H. pylori</i> a células gástricas	58
Figura 16. Efecto de la inhibición de Akt sobre los niveles de HIF-1 α inducidos por <i>H. pylori</i>	59
Figura 17. Efecto de la inhibición de Akt sobre la actividad transcripcional de HIF-1 inducida por <i>H. pylori</i>	60
Figura 18. Efecto del inhibidor Akti sobre la adhesión de <i>H. pylori</i> a células gástricas	60
Figura 19. Efecto de la inhibición de mTOR sobre los niveles de HIF-1 α inducidos por <i>H. pylori</i>	63
Figura 20. Efecto de la inhibición de mTOR sobre la actividad transcripcional de HIF-1 inducida por <i>H. pylori</i>	63
Figura 21. Efecto del inhibidor Rapamicina sobre la adhesión de <i>H. pylori</i> a células gástricas	64
Figura 22. Efecto de la inhibición de MEK sobre los niveles de HIF-1 α y la actividad transcripcional de HIF-1 inducidos por <i>H. pylori</i>	65
Figura 23. Caracterización de células MKN45 sh-HIF-1 α	67
Figura 24. Papel de HIF-1 α en el arresto del ciclo celular promovido por <i>H. pylori</i>	70
Figura 25. Papel de HIF-1 α en la viabilidad de células gástricas infectadas con <i>H. pylori</i>	71

Figura 26. Papel de HIF-1 α en la promoción de la expresión de GLUT-1 y VEGFA inducida por <i>H. pylori</i>	72
Figura 27. Efecto de los componentes bacterianos de <i>H. pylori</i> sobre los niveles de HIF-1 α y la actividad transcripcional de HIF-1	76
Figura 28. Caracterización de cepas de <i>H. pylori</i> mutantes para el factor de virulencia CagA	78
Figura 29. Efecto de <i>H. pylori</i> 84-183 y su mutante isogénica Δ cagA sobre la actividad transcripcional de HIF-1	79
Figura 30. Efecto de <i>H. pylori</i> 26695 Δ cagA sobre los niveles de HIF-1 α y la actividad transcripcional de HIF-1	80
Figura 31. Efecto de los factores de virulencia de <i>H. pylori</i> sobre los niveles de HIF-1 α y la actividad transcripcional de HIF-1	81
Figura 32. Efecto del factor de virulencia γ -glutamil transpeptidasa (GGT) de <i>H. pylori</i> en la apoptosis y la caída de survivina promovida por la infección.....	83
Figura 33. Efecto del silenciamiento de HIF-1 α sobre los niveles de survivina en células gástricas infectadas con <i>H. pylori</i>	84
Figura 34. Modelo propuesto para la inducción de HIF-1 α por <i>H. pylori</i> y su papel durante la infección de células gástricas.....	112
Figura Anexa 1. Papel de HIF-1 α en la viabilidad de células gástricas infectadas con <i>H. pylori</i>	113
Figura Anexa 2. Efecto de los componentes bacterianos de <i>H. pylori</i> sobre los niveles de HIF-1 α	113
Figura Anexa 3. Efecto de <i>H. pylori</i> 26695 Δ oipA sobre la fosforilación de Akt (Ser473) y sobre los niveles de HIF-1 α	114

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores utilizados en la construcción del alelo interrumpido hp0547::cat ..	30
Tabla 2. Partidores utilizados para la determinación de la expresión de genes blancos de HIF-1 α	38
Tabla 3. Expresión de genes blancos de HIF-1 α en muestras antrales de pacientes infectados con <i>H. pylori</i>	74

ABREVIATURAS

°C	: grado Celsius
μg	: microgramo
μl	: microlitro
μm	: micrometro
μM	: micromolar
4E-BP1	: proteína 1 de unión al factor iniciador de la traducción eIF4E
BCA	: ácido bicincoínico
Bcl-xL	: proteína extra-larga del linfoma de células B
BSA	: albúmina de suero bovino
CAT	: cloranfenicol acetil transferasa
CagA	: gen A asociado a la citotoxina
cagPAI	: isla de patogenicidad <i>cag</i>
CDK	: quinasa dependiente de ciclina
cDNA	: ácido desoxirribonucleico complementario
COX-2	: ciclooxigenasa 2
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DFO	: deferroxamina
DMSO	: dimetilsulfóxido
DNA	: ácido desoxirribonucleico
dNTP	: desoxirribonucleótido trifosfato
DTT	: ditioneitol
EDTA	: ácido etilendiaminotetraacético
eEF2	: factor 2 de elongación de la traducción eucarionte
EGFR	: receptor del factor de crecimiento epidermal
EGTA	: ácido etilén glicol-bis(γ-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetracético
eIF4E	: factor 4E de iniciación de la traducción eucarionte
ERK	: proteína quinasa activada por señal extracelular
GAPDH	: deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato
GGT	: γ-glutamyl transpeptidasa
GLUT-1	: transportador de glucosa 1
GSK-3β	: glicógeno sintetasa quinasa 3β
<i>H. pylori</i>	: <i>Helicobacter pylori</i>
h	: hora
HEPES	: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico
HIF-1α	: factor inducible por hipoxia 1α
HK	: muerta por calor
HRE	: elementos de respuesta a HIF
HSP90	: proteína de <i>shock</i> térmico de 90 KDa
IgG	: inmunoglobulina G
LAP2	: polipéptido 2 asociado a la lámina nuclear

LDHA	: lactato deshidrogenasa A
LPS	: lipopolisacárido
M-MLV	: transcriptasa inversa del virus Moloney de leucemia murina
MAPK	: proteína quinasa activada por mitógenos
MCM	: complejo de mantención del minicromosoma
MEK	: quinasa de ERK
min	: minuto
ml	: mililitro
mm	: milímetro
mM	: milimolar
MOI	: multiplicidad de infección
mRNA	: ácido ribonucleico mensajero
mTOR	: blanco de rapamicina mamífero
mTORC2	: complejo 2 del blanco de rapamicina mamífero
MTS	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil) 2H-tetrazolio)
NF-κB	: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de las células B activadas
nm	: nanómetro
nM	: nanomolar
OD	: densidad óptica
OipA	: proteína inflamatoria externa
ONPG	: 2-nitrofenil-β-D-galactopiranosido
PAGE	: electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	: tampón fosfato salino
PCR	: reacción en cadena de la polimerasa
PDK1	: quinasa 1 dependiente de fosfatidilinositol
PGN	: peptidoglicán
PHD	: prolilhidroxilasa
PI3K	: quinasa de fosfatidilinositol 3-OH
PI(3,4,5)P₃	: fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato
PIPES	: piperazina-N,N-bis(ácido 2-etanosulfónico)
qPCR	: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RDD3	: proteína 3 relacionada al dominio D
RNA	: ácido ribonucleico
RNAse A	: ribonucleasa A
ROS	: especies reactivas de oxígeno
RPS13	: proteína ribosomal S13
RT-qPCR	: transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
s	: segundo
S6	: proteína ribosomal S6
S6K	: quinasa de la proteína ribosomal S6
SD	: desviación estándar

SDS	: dodecil sulfato de sodio
SEM	: error estándar de la media
SFB	: suero fetal bovino
sh-RNA	: horquilla pequeña de ácido ribonucleico
SN	: sobrenadante
STAT-3	: transductor de señal y activador de la transcripción 3
T4SS	: sistema de secreción tipo 4
TBS	: tampón tris salino
TGF-α	: factor de crecimiento transformante α
TSA	: agar tripticasa de soya
UFC	: unidades formadoras de colonias
VacA	: citotoxina A vacuolizante
VEGF-A	: factor de crecimiento vascular endotelial A
VHL	: proteína de von Hippel-Lindau

RESUMEN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es un patógeno gástrico humano asociado al desarrollo de cáncer gástrico. En células epiteliales gástricas, la infección con *H. pylori* promueve la activación de diversas vías de señalización asociadas tanto a la progresión como al arresto del ciclo celular. Por otro lado, *H. pylori* ha demostrado inducir los niveles del Factor Inducible por Hipoxia-1 α (HIF-1 α), un factor transcripcional relacionado con la expresión de genes necesarios para la progresión tumoral. Fuera de sus funciones canónicas, se ha descrito que, en el contexto de la hipoxia, HIF-1 α es capaz de promover el arresto del ciclo celular en la fase G1 como parte de una acción no transcripcional. No obstante esto, HIF-1 α puede ser inducido por la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR, vía de señalización relacionada con la progresión del ciclo celular que ha sido asociada también a la acción de *H. pylori*. Aunque se ha descrito que la infección con *H. pylori* promueve la inducción de HIF-1 α , actualmente no hay antecedentes precisos acerca de la vía de señalización precedente a este fenómeno, así como tampoco de su efecto sobre el destino de las células epiteliales gástricas.

En este trabajo se buscó determinar si HIF-1 α representa una transición desde señales que promueven un progreso del ciclo celular hacia un arresto del ciclo celular en la infección con *H. pylori*. En consecuencia, se propuso estudiar si *H. pylori*, al activar la vía PI3K/Akt/mTOR, podría llevar a un aumento de los niveles de HIF-1 α y éste, a su vez, llevar a una respuesta de arresto del ciclo celular. Para estudiar esto, se utilizó un modelo *in vitro* basado en células humanas derivadas de cáncer gástrico MKN45 y AGS y la cepa de *H. pylori* 26695.

Los resultados indican que *H. pylori* induce un aumento transitorio de HIF-1 α con localización principalmente nuclear. Al inhibir farmacológicamente la vía PI3K/Akt/mTOR, se obtuvo que la inhibición de PI3K con LY294002 y de

mTOR con Rapamicina fueron capaces de prevenir la inducción de HIF-1 α por *H. pylori*. Al silenciar HIF-1 α se obtuvo una reducción del arresto del ciclo celular en G0/G1 promovido por la bacteria. Consecuente con esto, los niveles de la proteína ciclina D1, importante para lograr la transición G1/S del ciclo celular, fueron disminuidos por la infección con *H. pylori*, sin embargo, esta disminución fue menos severa en las células que se silenció HIF-1 α . En cuanto a su actividad transcripcional, se observó que al silenciar HIF-1 α se previno el aumento del mRNA de GLUT-1 promovido por *H. pylori* sólo a tiempos tempranos de infección, pero éstos no fueron afectados a tiempos mayores. Por lo demás, el análisis bioinformático mostró que la infección con *H. pylori* no incrementó significativamente la expresión de genes blancos clásicos de HIF-1 α en la mucosa antral. Finalmente, al analizar la acción de los componentes solubles o de la pared de *H. pylori* sobre la inducción de HIF-1 α , se obtuvo que ninguno de ellos fue capaz de promover este efecto, sólo el contacto directo entre el patógeno vivo y el hospedero fue necesario para promover un aumento de los niveles de la proteína.

En resumen, los resultados sugieren que *H. pylori* promueve un aumento de HIF-1 α a través de la activación de PI3K y mTOR, y que esta inducción permite el arresto de células gástricas en la fase G0/G1 del ciclo celular. Además, HIF-1 α tendría una participación menor en la expresión de su gen blanco GLUT-1. Finalmente, los datos sugieren que el factor de virulencia posiblemente implicado en este fenómeno requiere de la interacción directa entre *H. pylori* y la célula gástrica para ejercer su función.

SUMMARY

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a human gastric pathogen whose presence is linked to gastric carcinogenesis. In gastric epithelial cells, *H. pylori* infection promotes activation of several signaling pathways associated with both cell cycle progression and cell cycle arrest. On another hand, *H. pylori* has been linked to the induction of Hypoxia Inducible Factor -1 α (HIF-1 α), a transcription factor involved in the expression of several genes required for tumor progression. In addition to its canonical functions, in the context of hypoxia, HIF-1 α has been shown to promote cell cycle arrest in G1 phase as a non-transcriptional mode of action. HIF-1 α induction in normoxia by activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway has been described, and signaling via this pathway related to cell cycle progression also has been linked to *H. pylori* infection. However, although *H. pylori* reportedly promotes HIF-1 α induction, currently little data is available concerning the signaling pathway(s) by which *H. pylori* promotes HIF-1 α induction, as well as the consequences of such induction for cell fate.

In this study, we sought to determine whether HIF-1 α mediates the transition from cell cycle progression to cell cycle arrest observed following *H. pylori* infection. Thus, we evaluated whether activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway increases HIF-1 α levels and whether this leads to cell cycle arrest. To do so, these studies employed as *in vitro* models the human gastric cancer cell lines MKN45 and AGS as well as the *H. pylori* 26695 strain.

The results indicate that *H. pylori* induces transient HIF-1 α increases and enhances nuclear localization of the transcription factor. Pharmacological inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway revealed that the PI3K inhibitor LY294002 and the mTOR inhibitor Rapamycin precluded *H. pylori*-enhanced HIF-1 α induction. HIF-1 α silencing prevented *H. pylori*-induced cell cycle arrest

in G0/G1 phase. Consequently, cyclin D1, an important protein for G1-S phase transition, decreased following *H. pylori* infection, and this decrease was less dramatic in HIF-1 α knockdown gastric cells. With respect to HIF-1 α transcriptional activity, we observed that HIF-1 α silencing precluded increases in GLUT-1 mRNA promoted by *H. pylori* at early stages of infection only. Furthermore, bioinformatic analysis revealed that *H. pylori* infection was not associated with an increase in the expression of classical HIF-1 α target genes in antral mucosa. Finally, analysis of the contribution of soluble components or components from the bacterial wall to HIF-1 α induction, revealed that none of them individually were sufficient to promote the effect. Rather, the direct interaction between live bacteria and gastric cells was necessary for *H. pylori* to increase HIF-1 α protein levels.

In summary, the results obtained in this thesis suggest that *H. pylori* increases of HIF-1 α protein levels in normoxia through PI3K and mTOR activation, and that this induction promotes cell cycle arrest in the G0/G1 phase. Furthermore, HIF-1 α appears to participate to some extent in modulating the expression of the target gene GLUT-1. Finally, the putative virulence factor involved in these events requires the direct interaction between bacteria and the host cell to exert its effect.

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer gástrico

El cáncer gástrico es una patología de alta relevancia a nivel global, posicionándose como el quinto cáncer más prevalente y como la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo, con una estimación de 951.000 nuevos casos y 723.000 muertes el año 2012 (GLOBOCAN, 2012). Los antecedentes indican que el cáncer gástrico presenta una mayor incidencia en países en vías de desarrollo que en países desarrollados, siendo los primeros a quienes se le atribuye el 70% de los nuevos casos y muertes asociadas a la patología. (GLOBOCAN, 2012). Concordante con esto, en Chile el cáncer gástrico se sitúa como el tercer cáncer más común en la población y la primera causa de muerte por cáncer en ambos sexos (MINSAL, 2012). A pesar que las estadísticas muestran un declive en la incidencia y mortalidad por cáncer gástrico en países desarrollados y en desarrollo, estos últimos aún presentan tasas muy altas de dichos índices (Torre *et al*, 2015). Frente a esta problemática, todavía es perentorio realizar estudios sobre las causas asociadas a esta patología que contribuyan a un conocimiento acabado de su etiología y, así, contar con las herramientas que permitan generar nuevas estrategias para promover su prevención.

En ese sentido, han sido descritos diversos factores de riesgo para el desarrollo del cáncer gástrico, siendo actualmente el más importante la infección crónica con el patógeno humano *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (Polk y Peek, 2010). A partir de este antecedente, el estudio de los efectos de la infección con esta bacteria se ha vuelto relevante para entender cómo contribuye o predispone al desarrollo de la patología.

2. *Helicobacter pylori*

H. pylori es un patógeno bacteriano microaerófilico Gram negativo que coloniza el epitelio gástrico humano. Para colonizarlo, requiere de sus 3 a 5 flagelos polares necesarios para su motilidad, así como del factor de virulencia ureasa que le permite sobrevivir al pH ácido gástrico por hidrolizar urea en dióxido de carbono y amonio, neutralizando así el microambiente que la rodea. De este modo, flagelos y ureasa permiten al patógeno movilizarse y superar la barrera bactericida del contenido luminal gástrico para finalmente entrar en la capa mucosa (Suerbaum y Michetti, 2002). Una vez colonizada la mucosa gástrica, *H. pylori* puede persistir allí durante décadas, debido a las diversas estrategias que ha desarrollado para evadir la respuesta inmune del hospedero (Salama *et al*, 2013).

En términos epidemiológicos, la infección con *H. pylori* es altamente prevalente, afectando aproximadamente a un 50% de la población mundial, cifra que puede variar según la región: diversos países en vías de desarrollo presentan una prevalencia mayor al 80%, en cambio, países desarrollados presentan una prevalencia del 20-50% (Parkin, 2006). En la mayoría de los casos, *H. pylori* lleva a una gastritis silente que puede persistir por décadas debido a un equilibrio generado entre patógeno y hospedero, sin embargo, una fracción menor de la población afectada puede llegar a manifestar alguna patología gástrica severa, tal como gastritis atrófica crónica, úlcera gástrica y duodenal, linfoma gástrico o adenocarcinoma gástrico (Polk y Peek, 2010). A pesar que sólo el 1% de los infectados con *H. pylori* llegan a desarrollar cáncer gástrico (Ding *et al*, 2010), la relación entre la infección y el desarrollo de la patología maligna está bien establecida, habiendo sido sindicada como un carcinógeno tipo I por la Organización Mundial de la Salud (IARC, 1994).

2.1. *H. pylori* y cáncer gástrico

La infección con *H. pylori* produce un estado permanente de inflamación en la mucosa gástrica que puede ser asintomático durante décadas. La inflamación crónica, en conjunto con características genéticas propias del patógeno y del hospedero, determinarán si la gastritis superficial se mantiene, o bien, progresa hacia una gastritis atrófica, el primer paso de la llamada cascada preneoplásica descrita para el desarrollo del adenocarcinoma gástrico del tipo intestinal. Desde este estado, la lesión puede progresar a metaplasia intestinal, luego a displasia para finalmente derivar en un adenocarcinoma gástrico (Correa y Houghton, 2007).

Si bien se entiende que la inflamación crónica producida por la infección con *H. pylori* en la mucosa gástrica puede explicar la susceptibilidad del hospedero al desarrollo de cáncer gástrico, también se deben considerar los efectos directos que la bacteria produce sobre las células epiteliales, a modo de entender de qué forma la bacteria contribuye directamente a la alteración de esta barrera biológica y a la transformación celular.

2.2. Efecto de *H. pylori* sobre células epiteliales gástricas

Los efectos producidos por *H. pylori* sobre las células epiteliales gástricas son diversos y explican, en su globalidad, el deterioro de la barrera mucosa gástrica y la compensación a esta pérdida con una exacerbación de respuestas que tienen un carácter carcinogénico (Xia y Talley, 2001). Consistente con esta idea, se ha reportado que en muestras gástricas de pacientes que presentan infección con *H. pylori*, la apoptosis y la proliferación celular se encuentran ambas aumentadas respecto a lo observado en tejido gástrico de voluntarios sanos (Jang y Kim, 2000).

Para entender cómo dos fenómenos en apariencia tan contradictorios, como lo son la apoptosis y la proliferación celular, pueden ocurrir frente a un mismo estímulo *-H. pylori-*, es necesario entender que la diversidad de respuestas celulares que el agente infeccioso es capaz de promover en las células epiteliales gástricas, derivan a su vez de la diversidad de factores de virulencia provenientes de la bacteria.

De acuerdo con el resultado clínico derivado de la infección con *H. pylori*, se han descrito diversos factores de virulencia que determinan la severidad de la respuesta del hospedero a la infección. Los mayormente descritos son las citotoxinas vacuolizante (VacA) e inyectada (CagA), ambas ligadas a la aparición de ulceraciones gastroduodenales y al desarrollo de cáncer gástrico (Yamaoka, 2010). También se ha descrito a la enzima γ -glutamil transpeptidasa (GGT) bacteriana como un factor de virulencia relacionado con el desarrollo de úlcera péptica (Gong *et al*, 2010). Por otro lado, estudios en animales han definido que el lipopolisacárido (LPS) de *H. pylori* estaría involucrado en la colonización de la mucosa gástrica y la promoción de gastritis (Eaton *et al*, 2004). Asimismo, la proteína de membrana externa OipA ha demostrado participar de la colonización del epitelio gástrico y de la respuesta inflamatoria frente a la infección (Yamaoka *et al*, 2002). Aún cuando cada uno de ellos parece ser importante para la patogénesis derivada de la infección, la naturaleza de los efectos que producen en las células epiteliales gástricas difieren considerablemente en términos de apoptosis y proliferación. A continuación se hará referencia de la participación de éstos, y de otros menos descritos en la patología gástrica, en los procesos de proliferación y apoptosis promovidos por *H. pylori*.

2.2.1. *H. pylori* y apoptosis de células epiteliales gástricas

La muerte apoptótica de células epiteliales gástricas producida por *H. pylori* es un efecto de la infección observado tanto en muestras humanas como en ensayos *in vitro* (Jang y Kim, 2000; Cover *et al*, 2003; Jain *et al*, 2011; Kim *et al*, 2007; Valenzuela *et al*, 2013). Comúnmente este fenómeno se ha asociado a la citotoxina vacuolizante VacA proveniente de la bacteria. VacA es uno de los factores de virulencia de *H. pylori* más estudiados, puesto que ha mostrado tener gran relevancia clínica: pacientes infectados con cepas bacterianas que contienen en su genoma la variante más activa de VacA, presentan más riesgo de desarrollar úlcera péptica y cáncer gástrico (Yamaoka, 2010). En un plano más celular, VacA ha sido asociado con la inducción de formación de vacuolas y formación de canales en membranas celulares (Yamaoka, 2010). Este último efecto está directamente relacionado con su capacidad de alterar la estructura mitocondrial y promover la liberación del citocromo *c*, lo que concluye finalmente con la inducción de apoptosis (Cover *et al*, 2003). También se ha reportado que VacA promueve apoptosis al inducir fisión mitocondrial, efecto inicial que produjo la activación de la proteína proapoptótica Bax con la consecuente liberación del citocromo *c* desde la mitocondria y, finalmente, la muerte celular (Jain *et al*, 2011).

Más allá de la acción de VacA como promotora de apoptosis, estudios posteriores han descrito un nuevo actor en la muerte celular inducida por la infección: la proteína GGT bacteriana. Este factor se ha relacionado con la inducción de apoptosis de células epiteliales gástricas por promover el aumento de la proteína proapoptótica Bax, efecto que fue acompañado por la liberación del citocromo *c*, activación de caspasa 9 y de caspasa 3 (Kim *et al*, 2007). Por otro lado, se ha descrito que GGT bacteriano es responsable de disminuir los niveles de la proteína antiapoptótica survivina en células gástricas, efecto presumiblemente derivado de un mecanismo que involucra un aumento del

estrés oxidativo asociado a la acción enzimática de este factor de virulencia (Valenzuela *et al*, 2013).

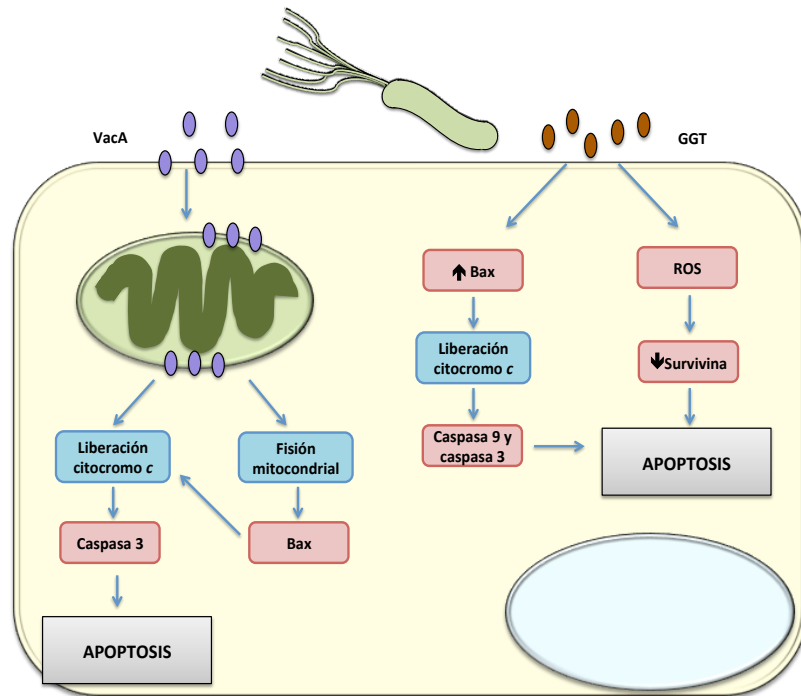


Figura 1. Apoptosis de células epiteliales gástricas inducida por *H. pylori*

La infección con *H. pylori* ha demostrado inducir muerte apoptótica de células epiteliales gástricas, principalmente a través de los factores de virulencia VacA y GGT. VacA se asocia a efectos directos sobre la mitocondria que llevan a una liberación del citocromo c y, consecuentemente, a la apoptosis. GGT se asocia a la regulación de los niveles de proteínas anti y proapoptóticas, promoviendo de este modo la muerte celular

2.2.2. *H. pylori*, proliferación y sobrevida de células epiteliales gástricas

Entre las respuestas celulares asociadas a la infección con *H. pylori*, la proliferación y sobrevida de células epiteliales gástricas han sido ampliamente descritas, no sólo porque explican de manera directa el desarrollo de una patología maligna, sino también porque, en el contexto más acotado de

infección con la bacteria, sería la respuesta compensatoria, y paradójica a la vez, a la apoptosis promovida por la misma. Este tipo de respuestas ha sido asociada a la acción de diversos factores de virulencia tales como la proteína SlyD, la proteína JHP0290 y el LPS de *H. pylori* (Yokota *et al*, 2010 ; Kang *et al*, 2013; Tavares y Pathak, 2014), sin embargo, la citotoxina CagA de la bacteria es la que actualmente ha demostrado tener una mayor relevancia en términos de promover proliferación y activar vías de sobrevida (Alzahrani *et al*, 2014).

CagA es el factor de virulencia de *H. pylori* más estudiado en la actualidad, debido a la fuerte evidencia científica que lo indica como la proteína más relevante para el desarrollo de cáncer gástrico: estudios epidemiológicos han demostrado que cepas de *H. pylori* que contienen este factor de virulencia aumentan el riesgo de desarrollar cáncer gástrico y úlcera péptica; estudios *in vivo* han evidenciado que CagA se comporta por sí solo como un carcinógeno derivado de la bacteria (Yamaoka, 2010). CagA es una proteína codificada en la isla de patogenicidad *cagPAI* de *H. pylori*, donde también está codificado el sistema de secreción tipo 4 (T4SS), que es la maquinaria que necesita la bacteria para inyectar esta citotoxina en la célula hospedera. Una vez inyectada en la célula, CagA promueve respuestas celulares normalmente asociadas a la carcinogénesis, de nuestro interés, respuestas de sobrevida y proliferación (Alzahrani *et al*, 2014).

Las respuestas de sobrevida y proliferación, inducidas por la CagA y por otros factores de virulencia, han sido vinculadas con la activación de vías oncogénicas tales como β -catenina, PI3K/Akt, MAPK y NF κ B, entre las más connotadas (Ding *et al*, 2010). Para nuestro interés particular, nos centraremos en los antecedentes existentes respecto de la activación de la vía PI3K/Akt luego de la infección con *H. pylori*.

2.2.2.1. *H. pylori* y activación de la vía PI3K/Akt

PI3K es la quinasa de fosfatidilinositol 3-OH. Su acción sobre el lípido de membrana fosfatidilinositol (4,5) bifosfato (PI(4,5)P₂) lleva a la formación de fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PI(3,4,5)P₃), este último necesario para la traslocación de Akt hacia la membrana plasmática, debido a que esta proteína, mediante su dominio PH, interactúa con él. La traslocación de Akt hacia la membrana es un evento esencial para que pueda ser fosforilada por la quinasa 1 dependiente de fosfatidilinositol (PDK1), que, a su vez, también requiere de PI(3,4,5)P₃ para traslocar a la membrana y fosforilar a Akt en el residuo Thr308, evento crítico para la activación de esta última. Sin embargo, para que su actividad sea completa, Akt debe ser fosforilada adicionalmente por el complejo mTORC2 en su residuo Ser473 (Vanhaesebroeck *et al*, 2012). Una vez activada completamente, Akt trasloca de la membrana al citoplasma o al núcleo para ejercer su actividad quinasa sobre sus proteínas blanco (Du y Tschlis, 2005).

Como se mencionó previamente, *H. pylori* puede activar la vía oncogénica PI3K/Akt en células epiteliales gástricas. Inicialmente, un estudio *in vivo* determinó que el factor de virulencia CagA es el responsable de la activación de dicha vía, llevando a una posterior activación de β -catenina y NF- κ B, con las respectivas respuestas proliferativa e inflamatoria en el epitelio gástrico (Suzuki *et al*, 2009). Sin desmedro de esta evidencia, en los últimos años se ha ido profundizando en el entendimiento de la activación de PI3K/Akt por *H. pylori*, reconociéndose nuevos factores de virulencia asociados a esta vía de señalización. Por un lado, Tabassam *et al* han sindicado como responsables de la activación del receptor de crecimiento epidermal (EGFR) y, consecutivamente, de la vía PI3/Akt/ β -catenina, no sólo a CagA, sino que a éste en conjunto con la proteína de membrana OipA (Tabassam *et al*, 2009). Por otro lado, el grupo de Nakayama ha descrito que la citotoxina VacA es capaz de activar la vía de PI3K/Akt con la finalidad de activar a β -catenina mediante la

fosforilación y posterior degradación de GSK-3 β , lo que deriva en la activación transcripcional de β -catenina en el promotor de ciclina D1, una proteína relevante en la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Nakayama *et al*, 2009).

Más allá de la activación de la vía PI3K/Akt/ β -catenina, se ha reportado que *H. pylori* activa la ruta PI3K/Akt para posteriormente activar a mTOR. La activación de esta proteína promueve la fosforilación y consecuente inactivación de 4E-BP1, represor del factor de iniciación de la traducción eIF4E, por tanto, la activación de este último y el inicio de la traducción. Por lo demás, también se obtuvo una supresión de la fosforilación y, por lo tanto, activación del factor de elongación eEF2, lo que confirma el aumento de la traducción de proteínas eucariontes, consecuente con las necesidades de las células en proliferación. En este caso, el fenómeno observado fue independiente de CagA y del T4SS que posibilita su inyección en la célula hospedera (Sokolova *et al*, 2014).

Por otro lado, la activación de la vía PI3K/Akt por *H. pylori* ha demostrado tener otras implicancias en el destino de las células infectadas. Se ha descrito esta ruta como una relevante para la respuesta de sobrevida que manifiesta la célula frente a la infección por el patógeno (Nagy *et al*, 2009; Yu *et al*, 2013; Yang *et al* 2015). Por lo demás, Nagy *et al* definieron que para la activación de PI3K/Akt no fue necesario el factor CagA, pero sí su sistema de secreción y el peptidoglicán (PGN) que también es inyectado por esa vía en la célula epitelial gástrica. La inyección de PGN indujo la activación de EGFR y esto, posteriormente, llevó a la activación de la vía PI3K/Akt (Nagy *et al*, 2009)

En resumen, la activación de PI3K/Akt por *H. pylori* ha demostrado tener una clara implicancia en las respuestas celulares promovidas por la infección y que tienen un alto potencial carcinogénico: proliferación y sobrevida. Aún cuando diversos estudios han asociado estos efectos a la citotoxina CagA, nuevos antecedentes han refutado esta idea, o bien, han identificado nuevos

factores de virulencia implicados en la activación de esta ruta. Todos estos hallazgos están resumidos en la Figura 2.

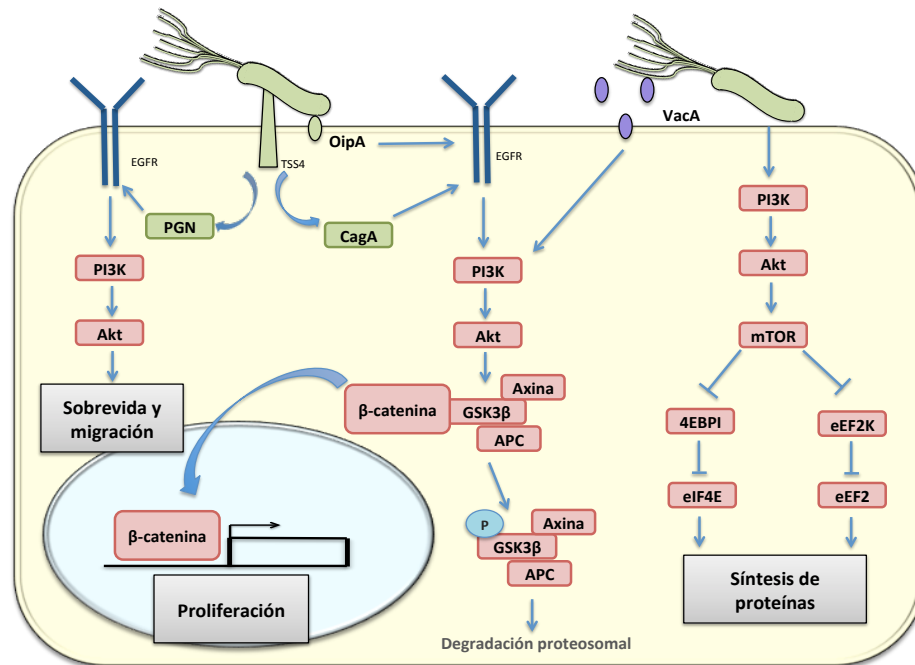


Figura 2. Activación de la vía PI3K/Akt y respuestas carcinogénicas promovidas por *H. pylori*

Se ha descrito que *H. pylori* promueve la activación de la vía PI3K/Akt a través de diversos factores de virulencia. CagA, OipA y VacA han sido asociados a la activación de β-catenina a través de la vía PI3K/Akt, lo que promueve expresión de genes necesarios para la proliferación. Por otro lado, el peptidoglicán (PGN) se ha asociado a la activación de PI3K para llevar a un aumento de la supervivencia y migración celular. Por último, se ha reportado que *H. pylori* lleva a un aumento de la síntesis de proteínas a través de la vía PI3K/Akt/mTOR, pero el factor de virulencia implicado en esto aún no ha sido identificado.

2.2.3. Efectos de *H. pylori* sobre el ciclo celular

El ciclo celular es un proceso altamente regulado que consta de 4 fases: la fase G1 (*gap 1*), donde la célula crece y a partir de la que puede pasar a la fase S (síntesis), donde la célula replica el DNA. Luego de la fase S, la célula

entra en la fase G2 (*gap 2*), donde sigue creciendo para luego entrar en la fase M (mitosis), donde se produce la división celular. Además, se describe la fase G0, donde la célula se encuentra en un estado de quiescencia. La progresión y transición de cada una de las fases del ciclo celular está regulado principalmente por las proteínas ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDK) (Harashima *et al*, 2013).

Concordante con los disímiles fenómenos asociados a la infección con *H. pylori*, a saber, aumento de la apoptosis por un lado, y de la sobrevivencia y proliferación celular por otro, los efectos promovidos por la bacteria sobre el ciclo celular de las células epiteliales gástricas también son materia de debate.

De acuerdo con los efectos proliferativos ejercidos por *H. pylori* sobre las células epiteliales gástricas, se reportó que diversas cepas de la bacteria aumentaron la cantidad de células en la fase G2/M del ciclo celular a tiempos tempranos de infección, efecto que fue atenuado en cepas *cag-*; sin embargo, en el mismo estudio se observó que a tiempos prolongados de infección se obtuvo un aumento de la población celular en subG0/G1 (apoptóticas), lo que fue menguado en cepas *cag-* y *vacA-* (Peek *et al*, 1999). Siguiendo la idea de los disímiles efectos sobre el ciclo celular, otro grupo ha descrito que CagA de *H. pylori* fomenta la progresión del ciclo celular desde la fase G1 hacia la fase S en un modelo de células epiteliales polarizadas, consecuente con el concepto del aumento de la proliferación por la infección; sin embargo, el mismo trabajo mostró que en células no polarizadas la expresión de CagA inhibió la proliferación y promovió arresto del ciclo celular en G1 por aumentar la expresión de la proteína p21^{cip1}, inhibidora de CDKs (Saito *et al*, 2010). Respecto al arresto en G1 por la bacteria, otros autores han demostrado que este efecto estaría asociado diferencialmente a la activación de las proteínas MAPK ERK, p38 y JNK: mientras la inhibición de ERK y p38 aumentó el arresto celular en G1 promovido por *H. pylori*, la inhibición de JNK promovió un progreso del ciclo celular (Ding *et al*, 2008), indicando el efecto dual que

promueve la infección respecto a este fenómeno. Así, estos antecedentes confirman lo expuesto anteriormente: *H. pylori* promueve efectos duales en células epiteliales gástricas en cuanto a la alteración del ciclo celular: si bien se activan vías de señalización asociadas a proliferación celular, también hay otras que tienen un efecto contrario de arresto celular.

No obstante la evidencia previa, otros autores han sido categóricos en indicar efectos claros de la infección sobre el ciclo celular. En este sentido, se ha descrito *H. pylori* induce arresto en la fase G1 del ciclo celular independiente del factor de virulencia CagA (Shirin *et al*, 1999). Posteriormente, se ha sindicado a la proteína L-asparraginasa de la bacteria como responsable de la inhibición del ciclo celular (Scotti *et al*, 2010). Otros trabajos han apuntado hacia los efectos de *H. pylori* en pos de la proliferación celular: se ha descrito que los factores CagA y HspB de la bacteria, en conjunto e independientemente de la infección, fueron capaces de aumentar la cantidad de células en las fases S y G2/M y, consecuentemente, la proliferación celular (De Luca *et al*, 2003); por otro lado, un estudio más reciente demostró que la proteína bacteriana JHP0290, funcionalmente poco descrita en la actualidad, promueve aumento del porcentaje de células en las fases S y G2/M, aumento de la proliferación y efectos antiapoptóticos (Tavares y Pathak, 2015)

Frente a la dualidad de efectos promovidos por la bacteria sobre el ciclo celular, apoptosis y proliferación, se vuelve interesante determinar si existe alguna vía de señalización o proteína del hospedero que responda a la infección con *H. pylori* y que pudiese explicar este fenómeno. En este sentido, aparece como un blanco interesante la proteína HIF-1 α , puesto que ha mostrado aumentar sus niveles frente a la infección con *H. pylori*, aunque el destino celular que esta inducción implica no es aún muy clara (Park *et al*, 2003; Bhattacharyya *et al*, 2010; Kang *et al*, 2014). De interés para nuestro trabajo es la doble funcionalidad que en otros contextos se le ha atribuido a HIF-1 α : desempeña un papel protumorigénico en su actividad como factor

transcripcional, pero, por otro lado, afecta negativamente la proliferación celular independientemente de su actividad transcripcional (Semenza, 2012; Huang, 2013). A continuación nos referiremos a HIF-1 α en extensión.

3. HIF-1 α .

El factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) es un factor de transcripción que facilita la entrega de oxígeno y la adaptación a la privación de oxígeno por regular la expresión de genes involucrados en procesos celulares tales como captación de glucosa y metabolismo glicolítico, angiogénesis, eritropoyesis, supervivencia celular y apoptosis. De esta forma, participa de procesos relacionados al desarrollo y la fisiología del mamífero, así como en la patogénesis de enfermedades tales como el cáncer (Semenza, 2012).

HIF-1 es un heterodímero conformado por las subunidades α , que es inducible, y β , que es constitutiva. Por esta razón, la conformación del factor transcripcional funcional dependerá directamente de la regulación de los niveles de la subunidad HIF-1 α (Semenza, 2012).

3.1. Regulación de HIF-1 α

HIF-1 α es una proteína que en normoxia se transcribe y degrada continuamente. Esto es debido a que prolihidroxilasas (PHD) se encuentran activas bajo concentraciones normales de oxígeno, pudiendo así hidroxilar a este factor en los residuos prolina P402 y P564 de su dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD). Esta modificación llama a reclutamiento a la proteína von Hippel-Lindau (VHL), un componente de reconocimiento del complejo ligasa de ubiquitina 3, para la ubiquitinación de HIF-1 α y su

consecuente degradación por el proteosoma. En hipoxia, HIF-1 α no sufre tal hidroxilación debido a la inhibición de la actividad de PHD, por lo tanto, es capaz de estabilizarse y traslocar al núcleo para dimerizar con HIF-1 β . La heterodimerización de las subunidades α y β permite el reclutamiento de los activadores transcripcionales p300 y CBP, interacción que llevará a una completa activación de HIF-1. Así, se inicia la transcripción de genes asociados a la adaptación de la célula al contexto hipóxico (Figura 3) (Rankin y Gaccia, 2008).

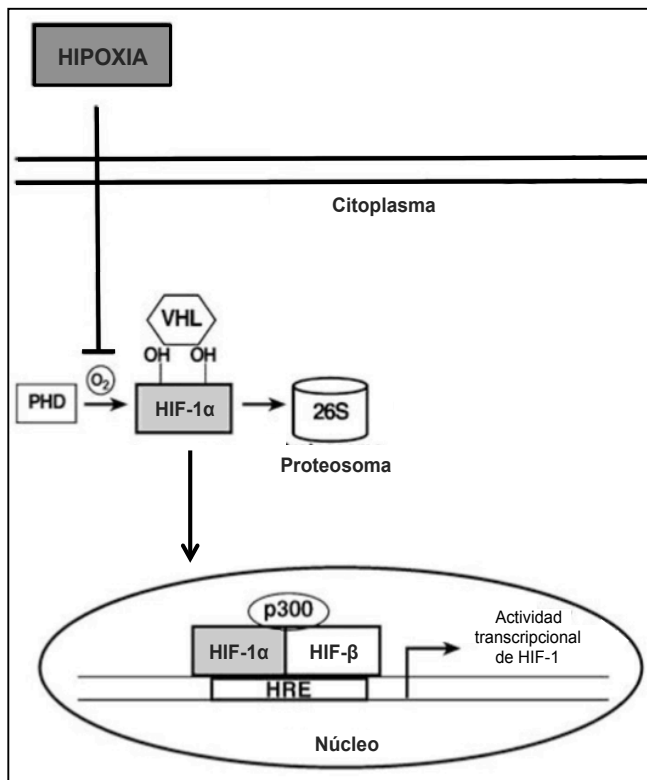


Figura 3. Regulación de HIF-1 α dependiente de oxígeno

En normoxia, HIF-1 α es continuamente degradada por el proteosoma, ya que la enzima PHD, dependiente de O₂, está activa. Ella hidroxila a HIF-1 α , modificación que permite el reclutamiento de la ligasa de ubiquitina E₃ VHL, promoviendo su consecuente ubiquitinación y posterior degradación proteosomal. En hipoxia, este mecanismo es inhibido, por tanto, HIF-1 α es estabilizado y, así, puede migrar al núcleo para dimerizar con HIF- β . La unión del activador p300 al heterodímero permite promover su actividad transcripcional (Adaptado de Rankin y Gaccia, 2008).

No obstante esto, diversos estudios han determinado que la expresión de HIF-1 α también puede ser promovida en normoxia bajo condiciones particulares. Diversas alteraciones genéticas específicas del cáncer, tanto de oncogenes como MYC, como de genes supresores de tumores como p53, PTEN y VHL, pueden llevar a la expresión de HIF-1 α en normoxia (Semenza, 2002). Por lo demás, la activación de receptores tirosina quinasa influyen los niveles de HIF-1 α a través de la consecuente activación de las vías PI3K/Akt/mTOR y Ras/MEK/ERK. Ambas rutas de señalización promueven la fosforilación e inhibición de 4E-BP1, represor del factor de iniciación de la traducción eIF4E, permitiendo así un aumento de la traducción del transcrito de HIF-1 α y un consecutivo aumento de sus niveles proteicos (Fukuda *et al*, 2002), tal como se esquematiza en la Figura 4. Paralelamente, mTOR y ERK llevan a una activación de la quinasa de S6 (S6K), lo que promueve a su vez la activación de la proteína ribosomal S6, favoreciendo también de esta forma la traducción del factor transcripcional (Figura 4) (Laughner *et al*, 2001; Semenza, 2003)

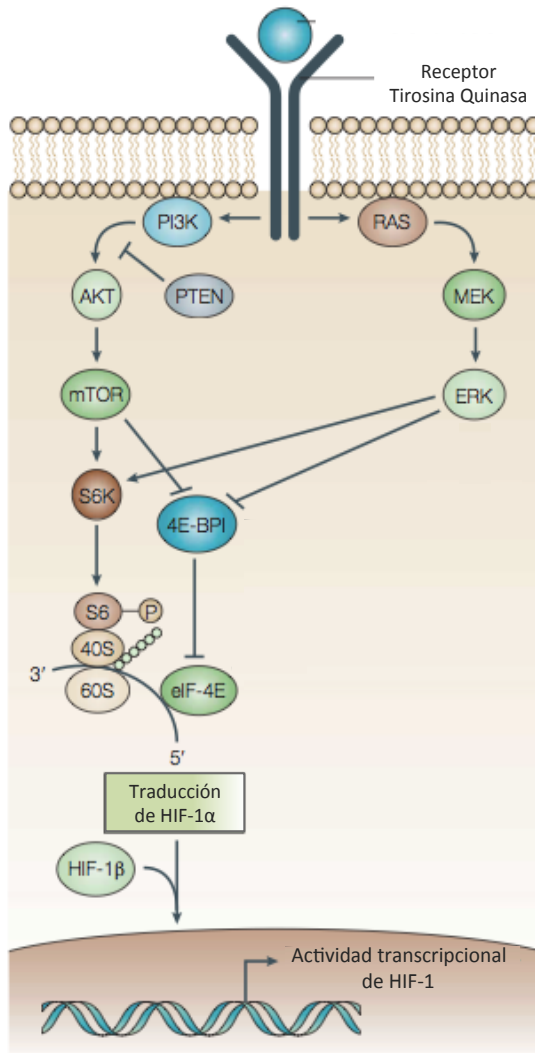


Figura 4. Regulación de HIF-1 α independiente de oxígeno

La activación de receptores tirosina quinasa activa la vía de PI3K, que a su vez activa a Akt y consecutivamente a mTOR. mTOR fosforila a 4E-BP1, modificación inhibitoria, por tanto, activa indirectamente al factor iniciador de la traducción eIF4E. Además, mTOR activa a S6K, lo que lleva a la fosforilación y activación la proteína ribosomal S6. Por otro lado, la activación del receptor permite la activación la vía RAS/MEK/ERK, que también promueve la inhibición de 4E-BP1 y la activación de S6K, con las consecuencias previamente descritas. Todo esto, lleva a un aumento de la traducción del transcrito de HIF-1 α , aumentando así los niveles de la proteína (Adaptado de Semenza, 2003)

3.2. HIF-1 α : papel protumoral y efecto sobre la proliferación celular

HIF-1 α ha sido descrito como un factor transcripcional clave en el desarrollo del cáncer, puesto que comanda la expresión de diversos genes que colaboran con distintos aspectos esenciales para la tumorigénesis y la

progresión tumoral: genes asociados a la angiogénesis (*VEGF*, *SDF1*, *ANGPT1*), sobrevida (*BIRC5*, *BCL2L1*, *EPO*), reprogramación desde un metabolismo oxidativo hacia un metabolismo glicolítico (*SLC2A1*, *LDHA*, *PDK1*, *GAPDH*, *PGK1*, *PKM2*), transición epitelio-mesénquima (*SNAI1*, *SNAI2*, *ZEB1*, *ZEB2*) y metástasis (*LOX*, *MMP2*, *MMP9*) (Peng *et al*, 2006; Chen *et al*, 2009; Semenza, 2012).

Aún cuando la hipoxia ha demostrado permitir la expresión de diversos genes protumorales a través de la inducción de HIF-1 α , es necesario destacar que esta proteína no tiene relación con un aumento de la proliferación, sino más bien con un aumento de la sobrevida y con la adaptación al contexto hipóxico en el tumor sólido (Carmeliet *et al*, 1998; Peng *et al*, 2006; Chen *et al*, 2009). En términos de proliferación en el contexto hipóxico, la proteína que contribuye con una regulación transcripcional de genes asociados con este fenómeno es HIF-2 α , factor transcripcional que también responde a hipoxia con un mecanismo de regulación similar al de HIF-1 α , que dimeriza con la subunidad HIF- β para su actividad transcripcional y que comparte los elementos de respuesta a HIF (HRE) en el DNA; pero que a pesar de ello, no siempre maneja la expresión de los mismos genes que su contraparte HIF-1 α (Keith *et al*, 2011). En algunos casos, HIF-2 α tiene funciones redundantes con las de HIF-1 α , como ocurre con la regulación de la expresión de genes asociados a la angiogénesis (Hu *et al*, 2003). Por otro lado, hay algunos genes que sólo son regulados por HIF-1 α : genes que codifican para transportadores de glucosa y para enzimas glicolíticas (Hu *et al*, 2003; Semenza, 2012). Por último, algunos genes asociados a proliferación celular son regulados por HIF-2 α , tal como se mostró con aquellos que codifican para ciclina D1 y TGF- α en células de carcinoma renal (Raval *et al*, 2005).

Respecto a las respuestas proliferativas mediadas por hipoxia, es importante destacar que, en este contexto, HIF-1 α ha demostrado ejercer un efecto contrario a HIF-2 α . Este antagonismo tiene base en nuevas funciones

descritas para ambas proteínas, más allá de las transcripcionales: mientras HIF-2 α promueve la actividad transcripcional de la oncoproteína Myc, involucrada en la transición G1/S del ciclo celular, HIF-1 α la inhibe (Koshiji *et al*, 2004; Gordan *et al*, 2007). Aún cuando estos efectos parecen una contradicción – el hecho que un mismo estímulo lleve a dos efectos opuestos –, se puede entender la diferencia entre la respuesta de HIF-1 α y la de HIF-2 α por la regulación temporal a la que están sometidas: mientras el aumento de los niveles de HIF-1 α ha mostrado ser agudo y transitorio en células sometidas a hipoxia, la inducción de HIF-2 α ha demostrado ser igualmente temprana, pero mucho más extensa en el tiempo bajo el mismo estímulo, o incluso, bajo hipoxia moderada (5% O₂) (Holmquist-Mengelbier *et al*, 2006; Uchida *et al*, 2004). Así, es posible que, al menos en hipoxia, las funciones antiproliferativas de HIF-1 α sean predominantes en un primer período de exposición al estímulo.

3.2.1. Papel no transcripcional de HIF-1 α

Sin desmedro de su ya ampliamente descrita actividad transcripcional, existen nuevas evidencias que apuntan hacia un papel no transcripcional de HIF-1 α , relacionándolo con una disminución de la síntesis de DNA y con un enlentecimiento de la proliferación celular (Huang, 2013). Uno de los primeros reportes que evidenció este papel de HIF-1 α fue el publicado por el grupo de Goda *et al*, donde se le atribuyó a esta proteína un papel primordial en el arresto en el ciclo celular ocurrido durante la hipoxia. Aquí, el fenómeno fue asociado a un aumento de la expresión de las proteínas p21 y p27, ambas inhibidoras de CDKs (Goda *et al*, 2003). Concordante con este hallazgo, otro grupo ha descrito que HIF-1 α promueve arresto del ciclo celular por contraponerse a la función represora de genes asociados a la inhibición de la

progresión del ciclo celular que cumple Myc, permitiendo así que se transcriba el gen que codifica para la proteína inhibidora de CDK, p21^{cip1}. Sorpresivamente, todo esto fue independiente de la unión de HIF-1 α al DNA y de su actividad transcripcional (Koshiji *et al*, 2004). Otros autores han descrito que HIF-1 α suprime la expresión de la ciclina D1, proteína importante en la transición desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular, por una unión directa al promotor del gen que la codifica, inhibiendo de este modo la proliferación celular (Wen *et al*, 2010). Finalmente, otros investigadores han reportado una interacción directa de HIF-1 α con proteínas del complejo de mantención del minicromosoma (MCM), el que tiene actividad helicasa de DNA. En esta interacción, el complejo helicasa es inactivado y, por lo tanto, se inhibe directamente la replicación del DNA (Hubbi *et al*, 2013).

La extensa literatura acerca de las funciones celulares de HIF-1 α ha establecido que esta proteína tiene también un papel dual: por un lado puede promover la expresión de genes que contribuyen a la célula a que se adapte al contexto hipóxico que enfrenta, por ejemplo, en el tumor sólido; pero impide la proliferación en ese mismo contexto, ahora de manera independiente de su actividad transcripcional, presumiblemente con la idea de disminuir el daño celular frente al estrés hipóxico. Más allá de esto, aún no existen reportes acerca de estas últimas funciones en un contexto distinto al hipóxico. En ese sentido, parece interesante averiguar si los efectos inhibidores de la progresión del ciclo celular pudiesen ocurrir bajo estímulos diferentes a la hipoxia, de nuestro interés particular, la infección con *H. pylori*.

3.3. HIF-1 α y *H. pylori*

Aunando los antecedentes previamente expuestos, a saber, el efecto dual que *H. pylori* ejerce sobre las células epiteliales gástricas (apoptosis, sobrevida y proliferación, progresión y arresto del ciclo celular) y los efectos también paradójicos promovidos por HIF-1 α (protumorigénico e inhibidor de la proliferación), nos hemos propuesto entender si existe alguna relación entre la infección con *H. pylori* y HIF-1 α en términos de esa dualidad. Actualmente existen pocos reportes que vinculen a *H. pylori* con HIF-1 α , ninguno asociándolos en su papel como inhibidores del ciclo celular. El primero de los estudios que relacionó a la bacteria con el factor transcripcional indica que la expresión de HIF-1 α en células gástricas depende de las especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por *H. pylori*, pero allí no se investigó cuál sería el efecto celular final que la bacteria promueve a través de esta proteína (Park *et al*, 2003). Trabajos más actuales asocian la inducción de HIF-1 α por *H. pylori* con un aumento de la expresión de la proteína antiapoptótica Mcl-1 (Bhattacharyya *et al*, 2010) y con un aumento del factor angiogénico VEGF (Kang *et al*, 2014). Más allá de esto, actualmente no hay mayores evidencias de las consecuencias que estos fenómeno puedan significar para el inicio o progresión del cáncer gástrico, así como tampoco se ha estudiado un posible efecto no transcripcional de HIF-1 α en el contexto de infección por *H. pylori*.

.....

En resumen, los antecedentes expuestos indican que:

- *H. pylori* promueve efectos disímiles tales como apoptosis, proliferación y sobrevida celular. Del mismo modo, los efectos promovidos por la bacteria sobre el ciclo celular muestran una dualidad concordante con lo anterior.

- Dentro de los fenómenos asociados a progresión del ciclo celular, proliferación y sobrevida, la vía PI3K/Akt ha mostrado tener una implicancia importante en la infección con *H. pylori*.
- El factor transcripcional HIF-1 α ha mostrado estar involucrado en la inducción de genes que promueven la sobrevida y la adaptación de la célula a un contexto hipóxico, sin embargo, en sus funciones no transcripcionales promueve arresto del ciclo celular.
- El factor de transcripción HIF-1 α puede ser inducido en normoxia por las vías de señalización derivadas de la activación de receptores tirosina quinasa, de nuestro interés, PI3K/Akt/mTOR.
- La infección con *H. pylori* muestra una inducción de HIF-1 α en células gástricas, sin embargo, el valor real para la viabilidad celular derivado de esto no está claramente establecido.

Debido a la dualidad de los fenómenos asociados a la infección con *H. pylori* y a HIF-1 α , pensamos que ambos pueden estar relacionados en función de esa dualidad, es decir, que HIF-1 α signifique un mediador que marque un cambio desde una primera respuesta proliferativa para una subsecuente respuesta antiproliferativa en células gástricas frente a la acción de la bacteria.

HIPÓTESIS

H. pylori aumenta la actividad de la vía PI3K/Akt/mTOR, promoviendo así la inducción de HIF-1 α para gatillar el arresto del ciclo celular en células gástricas humanas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar si la inducción de HIF-1 α por *H. pylori* depende de la vía PI3K/Akt/mTOR, y si esta inducción es necesaria para el arresto del ciclo celular promovido por la bacteria.

Objetivos Específicos

O.E.1. Caracterizar la inducción de HIF-1 α por *H. pylori* en células gástricas humanas.

O.E.2. Evaluar el papel de la vía PI3K/Akt/mTOR en la inducción de HIF-1 α por *H. pylori*.

O.E.3. Evaluar el papel de HIF-1 α inducido por *H. pylori* sobre el arresto del ciclo celular promovido por la infección.

O.E.4. Determinar el factor de virulencia de *H. pylori* involucrado en la inducción de HIF-1 α en células gástricas humanas.

METODOLOGÍA

1. Materiales

1.1. Reactivos

Para cultivo celular, el medio de cultivo RPMI 1640, tripsina y antibióticos Penicilina/Estreptomicina fueron adquiridos en Gibco BRL (Paisley, Scotland, UK), el Suero Fetal Bovino en Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel) y el antibiótico de selección Puromicina en Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el reactivo BCA de Pierce (Rockford, IL, USA). Los reactivos para Western Blot e inmunofluorescencia, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y el sustrato de quimioluminiscencia EZ-ECL de Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel). El kit para ensayos de viabilidad CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (#G5421) fue adquirido en Promega (Madison, WI, USA). El kit para determinar apoptosis FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II (#556570) fue adquirido en BD Bioscience (CA, USA). El reactivo yoduro de propidio (#P3566) fue obtenido de Invitrogen, Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Los reactivos para ensayo de gen reportero, Luciferina (#L6007) y 2 nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) (#84054330) fueron adquiridos de US Biological (Swampscott, MA, USA) y Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania), respectivamente.

El kit de extracción de DNA Midi Kit (#12145) y el kit QIAquick® Gel Extraction (#28704) fueron obtenidos de Qiagen (Valencia, CA, USA). El reactivo para extracción de RNA TriZOL® (#15596-018) fue adquirido en Invitrogen, Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). El reactivo de transfección Eugene® 6 (#E2693) fue obtenido de Promega (Madison, WI, USA). La enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase (#M8291), la enzima M-MLV Reverse

Transcriptase (#M170A), tampones y reactivos para RT-PCR fueron de Promega (Madison, WI, USA). El reactivo para qPCR Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (#600828) fue adquirido en Agilent Technologies (La Jolla, CA, USA).

Para el cultivo de *H. pylori*, el Agar Tripticasa de Soya (TSA) fue obtenido de Becton-Dickinson (Sparks, MD, USA), el suero equino de HyClone Laboratories (South Logan, UT, USA), el suplemento de medio de cultivo Vitox y el suplemento antibiótico Dent fueron de Oxoid (Basingstone, Hampshire, England). El antibiótico de selección Cloranfenicol fue obtenido de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

1.2. Inhibidores farmacológicos

El inhibidor de PI3K LY294002 (#BML-ST420-005) fue adquirido en Enzo Life Science (Farmingdale, NY, USA), el inhibidor de Akt VIII (#124018) en Calbiochem (La Jolla, CA, USA) y el inhibidor de mTOR, Rapamicina (#R8781) en Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

1.3. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios anti-HIF1 α (#610958), anti-Lap2 (#611000) fueron obtenidos de BD Bioscience (CA, USA). El anticuerpo anti- β -Actina (#A5316) fue adquirido en Sigma (St. Louis, MO, USA). Los anticuerpos anti-HSP90 (# SC7947), anti-ciclina D1 (DCS6) (#SC20044) y anti-CagA (A-10) (#SC28368) fueron obtenidos en Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Los anticuerpos anti-phospho(Ser 473) Akt (D9E) XP (# 4060), anti-Akt (#9272),

anti-phospho(Ser 235/236) S6 Ribosomal Protein (#48585) y anti-S6 Ribosomal Protein (54D2) (#2317) fueron adquiridos en Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA).

Los anticuerpos secundarios acoplados a la peroxidasa de rábano anti-IgG de conejo (# 214-1516) y anti-IgG de ratón (#214-1806) fueron adquiridos en Kirkegaard and Perry Laboratories (Gaithersburg, MD, USA). El anticuerpo secundario caprino anti-IgG de ratón conjugado a Cy3TM (#115-165-068) fue obtenido de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA).

1.4. Plasmidios

El plasmidio pGL3-HRE, utilizado para medir actividad transcripcional de HIF-1 a través de ensayo de reportero de luciferasa, fue gentilmente donado por la Dra. Kaye Williams (University of Manchester, Reino Unido). El plasmidio pON, utilizado para sobreexpresar la enzima β -galactosidasa, fue generosamente donado por el Dr. Sergio Lavandero (Universidad de Chile, Chile). El plasmidio que codifica para el RNA *short hairpin* contra HIF-1 α (HIF-1 α shRNA Plasmid (h) #sc-35561-SH) y su respectivo plasmidio control (Control shRNA Plasmid-B #sc-108065), utilizados para la obtención de líneas establemente transfectadas, fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA).

2. Cultivo celular y condiciones experimentales

2.1. Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares humanas derivadas de cáncer gástrico MKN45 y AGS fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y con antibióticos (penicilina 10000 U/ml, estreptomicina 10 µg/ml) a 37 °C en incubador humidificado (80%) y 5% de CO₂. Las células fueron subcultivadas cada 2 ó 3 días. Para ambas líneas celulares, los experimentos fueron realizados entre los pasajes 10 y 40 de cultivo.

2.2. Cepas y condiciones de cultivo bacteriano

Las cepas de *H. pylori* utilizadas en este estudio fueron las cepas de referencia 26695 (ATCC 700392), sus respectivas mutantes isogénicas $\Delta cagA$, $\Delta vacA$, Δlps y Δggt , la cepa de referencia 84-183 (ATCC 53726) y su respectiva mutante isogénica $\Delta cagA$. La bacteria fue crecida en placas de TSA suplementado con 5% de suero equino, con el suplemento de cultivo Vitox y con el suplemento antibiótico Dent, a 37 °C en incubador humidificado (80%) y 5% de CO₂. La bacteria fue subcultivada cada 24 h. Para los experimentos, la bacteria fue utilizada entre los pasajes 2 y 4 de cultivo.

2.3. Infección de células gástricas con *H. pylori*

Las células fueron sembradas en placas de cultivo con medio completo e incubadas por 24 h. Luego de transcurrido este tiempo, el medio fue cambiado por medio fresco sin antibióticos suplementado con 10% de SFB. Las células fueron incubadas en estas condiciones al menos 4 h antes de la infección con la bacteria. Las cepas de *H. pylori* fueron cultivadas 16-24 h previo a la infección. Luego de este tiempo, fueron recogidas desde las placas de TSA y resuspendidas en PBS pH 7,2. La concentración de la bacteria fue determinada por medición de la densidad óptica a 560 nm (OD_{560}), considerando que una OD_{560} de 0,4 equivale a $3,0 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colonia (UFC)/ml. Se agregaron a las células alícuotas de la suspensión de bacterias para obtener la multiplicidad de infección (MOI) indicada en cada experimento.

3. Generación de líneas estables transfectadas.

Para obtener líneas celulares que presentaran una menor expresión de la proteína HIF-1 α , células MKN45 fueron transfectadas con el plasmidio shRNA-HIF-1 α y con su respectivo control (shRNA-Scr). Para esto, se utilizó el agente de transfección Fugene 6 ®, formando el complejo de transfección utilizando una proporción de DNA plasmidial : Agente de transfección : Medio sin suero de 1:3:90. Luego, $8,0 \times 10^5$ células fueron transfectadas con 2 μ g de plasmidio incluidos en el complejo de transfección. Después de 16 h, el medio fue cambiado por medio completo fresco. 24 h posterior a esto, las células fueron seleccionadas con puromicina (2 μ g/ml) por 2 semanas. Dada la baja eficiencia de silenciamiento de HIF-1 α en la población celular obtenida luego de la selección, se generaron poblaciones clonales a partir de la misma, y se

eligieron las más eficientes en el silenciamiento de HIF-1 α para los experimentos. Como control, también se generaron poblaciones clonales a partir de las células transfectadas con el plasmidio control sh-RNA Scr.

4. Generación de la mutante de *H. pylori* 26695 Δ cagA

4.1. Interrupción del gen *cagA*

La metodología utilizada para obtener el gen *cagA* interrumpido hp0547::*cat* (Δ cagA) fue descrita previamente por Zeng *et al*, 2005. Primero, se amplificó el gen del cassette de resistencia a cloranfenicol (*cat*) desde el plasmidio pBSC103 usando los partidores CamF y CamR descritos en la Tabla 1. Además, se diseñaron dos pares de partidores específicos para el gen de CagA, CagAF y CagCam5, que amplifican en la región río arriba del gen *cagA*; y CagAR y CagCam3, que amplifican en la región río abajo del mismo. (Figura 5A). Los partidores CagCam5 y CagCam3 fueron diseñados de tal modo que las secuencias del extremo 5' terminal sean complementarias a las secuencias en CamF y CamR, respectivamente (Tabla 1, Figura 5). Cada producto de PCR (CamF-CamR, CagAF-CagCam5 y CagAR-CagCam3) fue purificado. Luego, se hizo la mezcla de 1 μ g de cada uno de estos templados para ser amplificados usando los partidores CagAF y CagAR, con el fin de generar el producto lineal que contenga inserto el cassette *cat* (Figura 5B). La reacción de PCR siguió el siguiente programa: la mezcla de templados fue amplificado 5 ciclos sin los partidores CagAF y CagAR a 94 °C por 1 min, 45 °C por 1 min y 72 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos con los partidores CagAF y CagAR, a 94 °C por 45 s, 40 °C por 1 min y 72 °C por 3 min. El producto final de PCR fue purificado y utilizado para transformar *H. pylori* 26695.

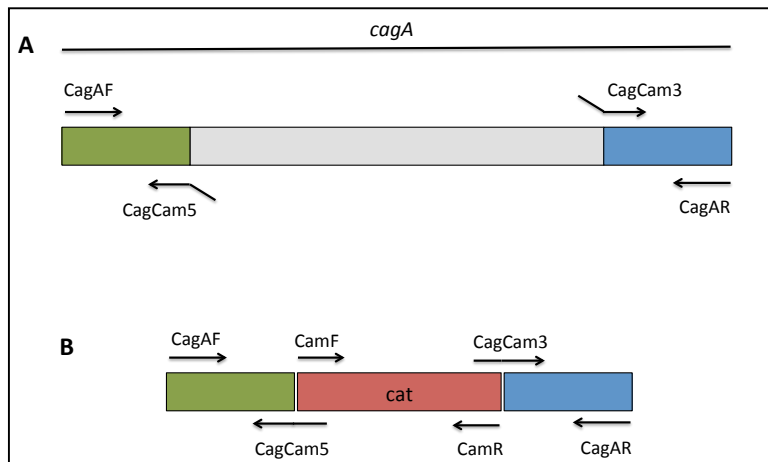


Figura 5. Esquema del método de interrupción del gen *cagA*

(A) Representación esquemática del gen *cagA*, indicando los partidores utilizados para la amplificación de los extremos 5' (verde) y 3' (azul) del gen. (B) Los productos de reacción obtenidos en A fueron utilizados para generar un producto lineal junto al cassette *cat* (rojo), de resistencia a cloranfenicol. Para este efecto, se usaron los partidores CagAF y CagAR.

Partidor	Secuencia (5' → 3')
CamF	CGGTATCGTCTGCAGCGGACAACGA
CamR	GGGAATGAAGCTCTGCAGGACGCACT
CagAF	CGGGATCCGCAATGACTAACGAAACTATTGA
CagAR	CCGCTCGAGTCAAGATTTTTGGAAACCAC
CagCam5	GTCCGCTGCAGACGATACCGCTTTGACATCGGAAGATTGT
CagCam3	TCCTGCAGAGCTTCATTCCCGACCGACTCAATCAAATAGC

Tabla 1. Partidores utilizados en la construcción del alelo interrumpido hp0547::*cat*

4.2. Transformación de *H. pylori*

Para la transformación, se utilizó la cepa de *H. pylori* 26695. Luego de 24 h de cultivo, la bacteria fue resuspendida en 1 ml de glicerol 10% frío. Las bacterias fueron lavadas dos veces con glicerol 10% frío, centrifugadas a 3200 xg por 5 min entre lavados, y resuspendida en un volumen final de 400 μ l de glicerol 10%. A la suspensión se le agregó 1 μ g del DNA correspondiente al producto de PCR obtenido y purificado en 4.1 (*hp0547::cat*). Esta mezcla se incubó por 15 min en hielo, y el total de la suspensión fue sembrada en una placa de TSA sin cloranfenicol. Luego de 12-24 h, la bacteria fue cosechada y se procedió a sembrar en placas de TSA suplementadas con cloranfenicol (20 μ g/ml). Luego de 72-96 h, las colonias resistentes al antibiótico fueron seleccionadas. Se evaluó la mutación por PCR y por western blot.

5. Obtención de concentrado de sobrenadante de cultivo

Se cultivó la cepa 26695 de *H. pylori* por 48 h en caldo Trypticase de Soja suplementado con 5% de suero fetal bovino, suplemento de cultivo Vitox® y suplemento antibiótico Dent®, hasta alcanzar aproximadamente 1,2 U de absorbancia a 600 nm. Las bacterias fueron removidas por centrifugación (3000 xg por 15 min) y el sobrenadante fue filtrado (tamaño de poro de 0,2 μ m) y concentrado (20 veces) por filtración (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit 10 KDa) a 3000 xg por 45 min. El concentrado de sobrenadante de cultivo fue incubado con las células gástricas en una dilución final de 1:25.

6. Extracción de proteínas y análisis por western blot

6.1. Obtención de extractos totales de proteínas

Para obtener extractos totales de proteínas destinados a western blot, $8,0 \times 10^5$ células fueron sembradas en placas de 60 mm. Luego de 24 h se les cambió el medio por medio completo fresco sin antibióticos y fueron expuestas a los estímulos indicados en cada experimento. Una vez cumplido el período de incubación, se prepararon los extractos totales de proteínas en tampón de lisis (HEPES 20 mM pH 7,4, leupeptina 12,5 $\mu\text{g/ml}$, antipaina 10 $\mu\text{g/ml}$, benzamidina 100 $\mu\text{g/ml}$, fenilmetanosulfonilfluoruro 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM y fluoruro de sodio 10 mM, SDS 0,1%, NP-40 (IGEPAL) 0,05%), se sonicaron y fueron centrifugados a 16000 xg por 10 min, rescatándose el sobrenadante.

6.2. Obtención de extractos de proteínas nucleares y citoplasmáticas

Para obtención de extractos nucleares y citoplasmáticos de proteínas destinados a western blot, $2,2 \times 10^6$ células fueron sembradas en placas de 100 mm. Luego de 24 h, se les cambió el medio por medio completo fresco sin antibióticos y fueron expuestas a los estímulos indicados en cada experimento. Una vez cumplido el tiempo de incubación, las células fueron recolectadas en PBS y centrifugadas a 1000 xg por 5 min. Con la finalidad de lisar las células y obtener el extracto citoplasmático de proteínas, el pellet celular fue resuspendido en tampón de lisis hipotónico (Hepes-KOH 10 mM pH 7,9, MgCl_2 2 mM, EDTA 0,1 mM, KCl 10 mM, NP-40 (IGEPAL) 0,5%) suplementado con DTT 1 mM y con inhibidores de fosfatasa y proteasas según se indica en 5.1. Luego de incubar en hielo por 10 min y vortexear vigorosamente, la suspensión

fue centrifugada por 1 min a 16000 xg, obteniéndose en el sobrenadante el extracto de proteínas citoplasmáticas. Luego, el pellet resultante fue resuspendido en tampón de lisis hipertónico (Hepes-KOH 50 mM pH 7,9, MgCl₂ 2mM, EDTA 0,1 mM, KCl 50 mM, NaCl 400 mM, glicerol 10%) suplementado con DTT 1 mM y con inhibidores de fosfatasa y proteasas según 5.1. El extracto fue incubado por 30 min en hielo, vortexeándolo vigorosamente cada 10 min. Luego de este período, el lisado fue centrifugado a 16000 xg por 15 min a 4°C, rescatándose el sobrenadante que contiene el extracto de proteínas nucleares.

6.3. Análisis por western blot

La concentración de proteínas de los extractos celulares totales, de los citoplasmáticos y de los nucleares fue determinada por el ensayo de BCA. El total de proteínas (50-75 µg) fue separado por SDS-PAGE en geles al 10% ó al 12% y transferido a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% en TBS-tween 0,1%. En caso de analizar proteínas fosforiladas, las membranas fueron bloqueadas con BSA al 5% en TBS-tween 0,1%. Luego del bloqueo, las membranas fueron incubadas a 4°C toda la noche con anticuerpo anti-HIF-1 α humano (dilución 1:500, ratón), anti-p-(Ser473) Akt (1:1000, conejo), anti-Akt (1:1000, conejo), anti-p-(Ser 235/236) S6 (1:1000, conejo), anti-S6 (1:1000, ratón), anti-LAP2 (1:2000, ratón), anti-HSP90 (1:3000, conejo), anti-ciclina D1 (1:1000, ratón), anti-CagA (1:3000, ratón) o anti- β -actina (1:20000, ratón). Luego, las membranas fueron lavadas e incubadas con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o de ratón conjugado a peroxidasa de rabanita (1:5000) por 90 min a temperatura ambiente. Se detectó la presencia de peroxidasa de rabanita mediante el reactivo quimioluminiscente EZ-ECL. La

determinación de los niveles proteicos fue realizada por análisis densitométricos de los blots utilizando el programa Un-Scan It versión 6.1.

7. Inmunofluorescencia indirecta

Se sembraron $2,0 \times 10^5$ células en placas de 35 mm con cubreobjetos de 12 mm. Luego de 24 h se les cambió el medio por medio completo fresco sin antibióticos y fueron expuestas a los estímulos indicados para cada experimento. Una vez terminado el tiempo de estímulo, las células fueron lavadas con PBS frío y fijadas por 20 min con paraformaldehído al 4% en Tampón PIPES 100 mM pH 6,8, con KOH 0,04 M, EGTA 2 mM y $MgCl_2$ 2 mM. Después de esto, las células fueron lavadas con PBS frío y permeabilizadas a temperatura ambiente por 10 min con Tritón X-100 0,1% en PBS. Luego de permeabilizar, las células fueron nuevamente lavadas con PBS frío y posteriormente fueron bloqueadas con BSA al 2% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las células fueron incubadas a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo anti-HIF1 α (1:150), seguido de una incubación por 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario caprino anti-IgG de ratón acoplado a Cy3 (1:200) preparado en BSA 2%. Luego, los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (0,4 μ g/ml) por 10 min. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS y una vez con agua nanopura previo a su montaje sobre portaobjetos con la solución de montaje Mowiol. Las muestras se visualizaron con el microscopio confocal Carl Zeiss LSM-5 Pascal 5 modelo Axiovert 200, utilizando el objetivo 63x 1.4 NA oil DIC Plan APOCHROMAT.

Las imágenes fueron analizadas con el programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA). Utilizando la imagen correspondiente

a la tinción con DAPI se definió el área nuclear como la región de interés óptico (ROI). Luego, se definió el ROI para la imagen correspondiente a la tinción para HIF-1 α y se cuantificó el área y el promedio de fluorescencia para el ROI definido. Los resultados obtenidos fueron normalizados por el área nuclear, siendo expresados como Intensidad de Fluorescencia HIF-1 α /Área nuclear.

8. Ensayo de reportero de luciferasa

Para determinar la actividad transcripcional de HIF-1 se realizó el ensayo de gen reportero de luciferasa, utilizando para ello los plasmidios pGL3-HRE, para medir la actividad transcripcional de HIF-1, y pON, para sobreexpresar la enzima β -galactosidasa, actividad que se utilizó para normalizar los resultados del gen reportero de HIF-1.

Se transfectaron $2,0 \times 10^5$ células con 0,25 μ g de plasmidio pGL3-HRE y 0,25 μ g de plasmidio pON. Para ello, las células fueron incubadas con un complejo previamente formado compuesto por DNA plasmidial: Fugene 6: Medio de cultivo sin suero en una razón 1:3:120. Luego de 16 h, el medio fue cambiado por medio fresco sin antibióticos suplementado con 10% de SFB. Las células fueron expuestas a los estímulos indicados en cada experimento y luego fueron lisadas con tampón de lisis (KH₂PO₄ 0,1 M pH 7,9, 0,5% Tritón X-100 y DTT 1mM). El lisado fue mantenido en hielo por 10 min y luego centrifugado por 5 min a 16000 xg, rescatándose el sobrenadante.

El sobrenadante obtenido fue utilizado para medir actividad luciferasa y para medir actividad β -galactosidasa. Se determinó la actividad luciferasa en un luminómetro, al incubar 50 μ l del extracto celular con 50 μ l de solución KTME (Tris HCl 100 mM pH 7,8, MgSO₄ 10 mM y EDTA 2 mM), luciferina 0,073 mM y

ATP 5,5 μ M en placas blancas de 96 pocillos. La actividad de la β -galactosidasa fue determinada mediante el uso del sustrato 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) a 37°C por 1 h, cuya metabolización se registró por espectrofotometría a 410 nm en un lector de ELISA. Los valores reportados para la actividad luciferasa fueron estandarizados a su respectiva actividad β -galactosidasa.

9. Determinación de la expresión de genes blancos de HIF-1 α mediante RT-qPCR

9.1. Extracción de RNA

Para la obtención de RNA destinado a la posterior reacción de transcripción reversa, $8,0 \times 10^5$ células fueron sembradas en placas de 60 mm. Después de 24 h, se les cambió el medio por un medio fresco sin antibióticos suplementado con 10% de SFB para luego ser tratadas según se indica en el experimento. Una vez cumplido el período de estímulo, las células fueron recolectadas con Trizol® (800 μ l por placa) y se realizó una extracción de las proteínas y DNA con cloroformo (200 μ l). Luego, se centrifugó a 16000 xg por 20 min a 4°C, fue tomada la fase acuosa y se precipitó con isopropanol a -20°C por 30 min. El precipitado fue recolectado por centrifugación a 16000 xg por 20 min a 4 °C. Una vez descartado el sobrenadante, el pellet fue lavado dos veces con etanol al 80%, centrifugando a 16000 xg por 5 min a 4°C. El precipitado fue secado y el pellet resuspendido en agua nanopura. Finalmente, el RNA fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm y su integridad se verificó en geles de agarosa al 2%+Paraformaldehído con Gel Red®.

9.2. Obtención de cDNA

A 1 μg de RNA se le agregó los partidores Oligo-d(T)₁₆ (5 μM) y se incubaron a 70°C por 5 min. Luego de esto, la mezcla se incubó en hielo por 10 min. A continuación, se agregó la enzima transcriptasa reversa M-MLV 5 U/ μL en un tampón de Tris-HCl 50 mM pH 8,3 con KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM y DTT 10 mM, 25 U/ μl del Inhibidor de Ribonucleasa (RNasin) y dNTPs 0,5 mM. Las muestras se incubaron por 2 h a 42°C y la enzima fue inactivada a 95°C por 5 min. Como controles se agregaron muestras sin templado (NTC) para descartar contaminación de los reactivos y muestras sin la transcriptasa reversa (NRT) para descartar contaminación con DNA genómico.

9.3. Análisis por PCR en tiempo real (qPCR)

Mediante PCR en tiempo real se amplificó los cDNA correspondientes a algunos genes blancos de HIF-1 α : VEGF-A, GLUT-1, LDH-A, GAPDH, Bcl-xL y Snail. Además, se amplificó el cDNA correspondiente a HIF1- α . Se amplificó el cDNA para RPS13 con el fin de estandarizar los valores de expresión de cada uno de los genes descritos anteriormente. La secuencia de partidores utilizados para la amplificación de cDNA, así como la concentración a los que se usaron se muestra en la Tabla 2.

Para la reacción, se utilizó la mezcla consistente en 5 μL de Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix, 0,5 μl de cDNA, partidores sentido y antisentido necesarios para obtener la concentración indicada en la tabla (a partir de una concentración de 5 μM) y agua nanopura necesaria para completar 10 μl finales. La reacción se llevó a cabo en el equipo Stratagene Mx3000P, siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. La expresión

relativa de VEGF-A, GLUT-1, LDH-A, GAPDH, Bcl-xL, Snail y HIF-1 α se calculó con el método del $2^{\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Gen blanco	Partidor	Secuencia (5' \rightarrow 3')	Concentración utilizada
VEGFA	Sentido	ATCCGGGTTTTATCCCTCTTC	250 nM
	Antisentido	TCTCTCTGGAGCTCTTGCTA	250 nM
GLUT-1	Sentido	AAGGAAGAGAGTCGGCAGAT	500 nM
	Antisentido	TCGAAGATGCTCGTGGAGTA	500 nM
LDH-A	Sentido	ACGTCAGCAAGAGGGAGAA	500 nM
	Antisentido	TCTTCCAAGCCACGTAGGT	500 nM
GAPDH	Sentido	GCGAGATCCCTCCAAAATCA	500 nM
	Antisentido	ATGGTTCACACCCATGACGA	500 nM
Bcl-xL	Sentido	CACTAACCAGAGACGAGACT	500 nM
	Antisentido	GTCCTGTTCTCTTCCACATC	500 nM
Snail	Sentido	ATCGGAAGCCTAACTACAGC	500 nM
	Antisentido	CAGAGTCCCAGATGAGCATT	500 nM
HIF-1α	Sentido	CACAGGCCACATTCACGTAT	250 nM
	Antisentido	TCGACTGAGGAAAGTCTTGCC	250 nM
RPS13	Sentido	CTCTCCTTTTCGTTGCCTGAT	375 nM
	Antisentido	TGAAGGAGTAAGGCCCTTCT	375 nM

Tabla 2. Partidores utilizados para la determinación de la expresión de genes blancos de HIF-1 α

Se detalla los genes blancos analizados, así como la secuencia para cada uno de sus partidores (sentido 5' \rightarrow 3') y la concentración a las que fueron utilizadas en la reacción de PCR en tiempo real.

10. Ensayos de viabilidad

10.1. Exclusión de azul de tripán

Se sembraron $1,5 \times 10^5$ células en placas de 24 pocillos. Luego de 24 h se les cambió el medio por un medio fresco sin antibióticos suplementado con 10% de SFB para luego ser tratadas según se indica en el experimento. Concluido el tiempo de estímulo, las células fueron lavadas para posteriormente ser recolectadas en 500 μ l de medio completo. 20 μ l de la suspensión fueron mezcladas con 20 μ l de azul de tripán, el que es permeable sólo a las células no viables. Mediante una cámara de Neubauer se contabilizó el número de células que excluyen el colorante. Se realizó el cálculo respectivo para obtener el porcentaje de viabilidad para cada condición, asumiendo la condición control como 100% de viabilidad.

10.2. Ensayo de MTS

Se sembraron $1,0 \times 10^4$ células en placas de 96 pocillos. Luego de 24 h se les cambió el medio por un medio fresco sin antibióticos suplementado con 10% de SFB para luego ser tratadas según se indica en el experimento. Finalizado el estímulo, las células fueron lavadas y se les agregó el reactivo del kit CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) según indicación del fabricante. El avance de la reacción se midió por espectrofotometría a 490 nM a 1 h y 2 h de reacción. Los valores de absorbancia del blanco fueron restados a los valores obtenidos para cada condición. Los valores obtenidos para la condición control fueron considerados como un 100% de viabilidad.

10.3. Determinación de apoptosis

Células MKN45 o AGS fueron tratadas con Etopósido (50 μ M) como control positivo o fueron infectadas con *H. pylori* 26695 o con la mutante isogénica Δ ggt a una MOI de 100 por 24 h. Luego se evaluó la muerte celular a través de citometría de flujo (BD FACSCanto instrument) utilizando el reactivo Annexin V–FITC Apoptosis Detection Kit II (BD Bioscience). Se determinó como apoptóticas las células positivas para la marca Anexina V.

11. Ciclo Celular

Se sembraron $4,0 \times 10^5$ células en placas de 35 mm. Después de 24 h, se les cambió el medio por medio fresco sin antibióticos y suplementado con 10% de SFB para luego ser infectadas con *H. pylori* a una MOI de 100 por 24 h. Una vez terminado el estímulo, las células fueron lavadas e incubadas con medio completo suplementado con gentamicina (200 μ g/ml) por 1 h a 37°C, para eliminar las bacterias adheridas a las células. Luego de esto, las células fueron nuevamente lavadas y recolectadas. El pellet celular obtenido por centrifugación (1000 xg por 5 min a 4 °C) fue resuspendido en 500 μ l de metanol frío e incubado a -20 °C por 5 min. Luego, la suspensión fue centrifugada a 1000 xg por 5 min a 4 °C y el pellet obtenido fue resuspendido en 500 μ l de PBS para el citómetro. A esta suspensión se agregó 5 μ l de RNAsa A (10 mg/ml) y las células fueron disgregadas cuidadosamente 3-5 veces con una jeringa de insulina. Luego, las células tratadas con RNAsa A fueron incubadas por 30 min a 37 °C, tiempo después del cual se agregó 5 μ l de solución de yoduro de propidio (1,0 mg/ml). Las células fueron analizadas en citómetro de flujo FACS Canto (Beckton Dickinson, USA). Para cuantificar el contenido de DNA de las muestras, se analizaron histogramas para la intensidad de fluorescencia del

yoduro de propidio con el programa FACSDiva versión 6.1.3. Se determinó el porcentaje de células en cada etapa del ciclo celular.

12. Determinación de adhesión de *H. pylori* a células gástricas

Se sembraron células MKN45 ($1,5 \times 10^5$) en placas de 24 pocillos. Luego de 24 h se les cambió el medio por un medio fresco sin antibióticos suplementado con 10% de SFB, se les agregó el inhibidor farmacológico indicado en cada experimento y se infectó con *H. pylori* a una MOI de 100. Luego de 4 u 8 h, las células fueron lavadas 4 veces con PBS a 37 °C para remover las bacterias no adheridas. Posterior a esto, las células fueron lisadas con 1 ml de saponina 0,1% en PBS a 37 °C por 10 min. Luego de la incubación, las células lisadas fueron resuspendidas, diluidas de forma seriada y plaqueadas en placas de TSA. Luego de 72-96 h las colonias formadas fueron contadas y se determinó la cantidad de bacterias adheridas/célula para cada condición.

13. Análisis bioinformático de expresión de genes en tejido gástrico infectado con *H. pylori*

Para este estudio se analizó la librería GSE27411, una plataforma del tipo Array Illumina de transcriptoma (mRNA). Esta librería contiene 9 muestras pareadas de cuerpo gástrico y de antro, 3 correspondientes a sujetos normales (N), 3 a pacientes infectados con *H. pylori* que presentan una gastritis no

atrófica (NAG) y 3 a pacientes con gastritis atrófica (AG). El microarreglo tiene 20.689 sondas, las que reconocen 17.189 genes y controles internos.

La matriz de datos no normalizados fue obtenida del repositorio *Gene Expression Omnibus* (GEO) y fue analizada con un software de R estadístico. El análisis de expresión diferencial entre N y NAG fue realizado usando el R *package* LIMMA (*Lineal Models for Microarrays*). Para determinar los genes diferencialmente expresados, se tomaron aquellos que presentaron “veces de cambio de expresión” distinto de 0 y un valor $p < 0,05$. Los valores de veces de cambio de expresión están en base logarítmica 2. El valor p no pudo ser corregido debido al pequeño número de muestras que contiene esta librería.

14. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos corresponden al promedio \pm SEM de al menos tres experimentos independientes (a menos que se indique un número menor de experimentos). Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism versión 5.01 (GraphPad Software, San Diego, USA, www.graphpad.com). Las diferencias estadísticas fueron determinadas utilizando prueba t de student no pareada.

RESULTADOS

O.E.1. Caracterizar la inducción de HIF-1 α por *H. pylori* en células gástricas humanas.

Para comprobar si la infección con *H. pylori* es capaz de inducir y activar a HIF-1 α bajo nuestras condiciones experimentales, primero se propuso estudiar la inducción de la proteína en el tiempo, tomando una MOI de 100 como condición de infección. Los resultados muestran que, bajo nuestras condiciones experimentales, la inducción de HIF-1 α es transitoria en el tiempo, presentando un aumento significativo a las 4 y 8 h de infección, pero disminuyendo bajo los niveles basales a las 16 y 24 h, esto tanto en células MKN45 como en AGS (Figuras 6A y 6B). Para evaluar si el aumento en los niveles de HIF-1 α por *H. pylori* se debe a un aumento de su transcripción, efecto asociado a la activación de la vía de NF- κ B que, por lo demás, se ha demostrado tener relación con la infección con *H. pylori*, se midió los niveles relativos del mRNA de HIF-1 α por RT-qPCR. Los resultados indican que el mRNA de HIF-1 α no está aumentado a las 8 h de infección, que es cuando se obtuvo los mayores niveles de la proteína en nuestras condiciones experimentales, pero, sorpresivamente, los niveles del transcrito de HIF-1 α aumentaron significativamente a las 24 h de infección, cuando ya no se observa la proteína en nuestro sistema (Figura 6C). Estos resultados sugieren que la inducción de HIF-1 α por *H. pylori* bajo nuestras condiciones experimentales no estaría asociado a un aumento de la transcripción del gen que lo codifica.

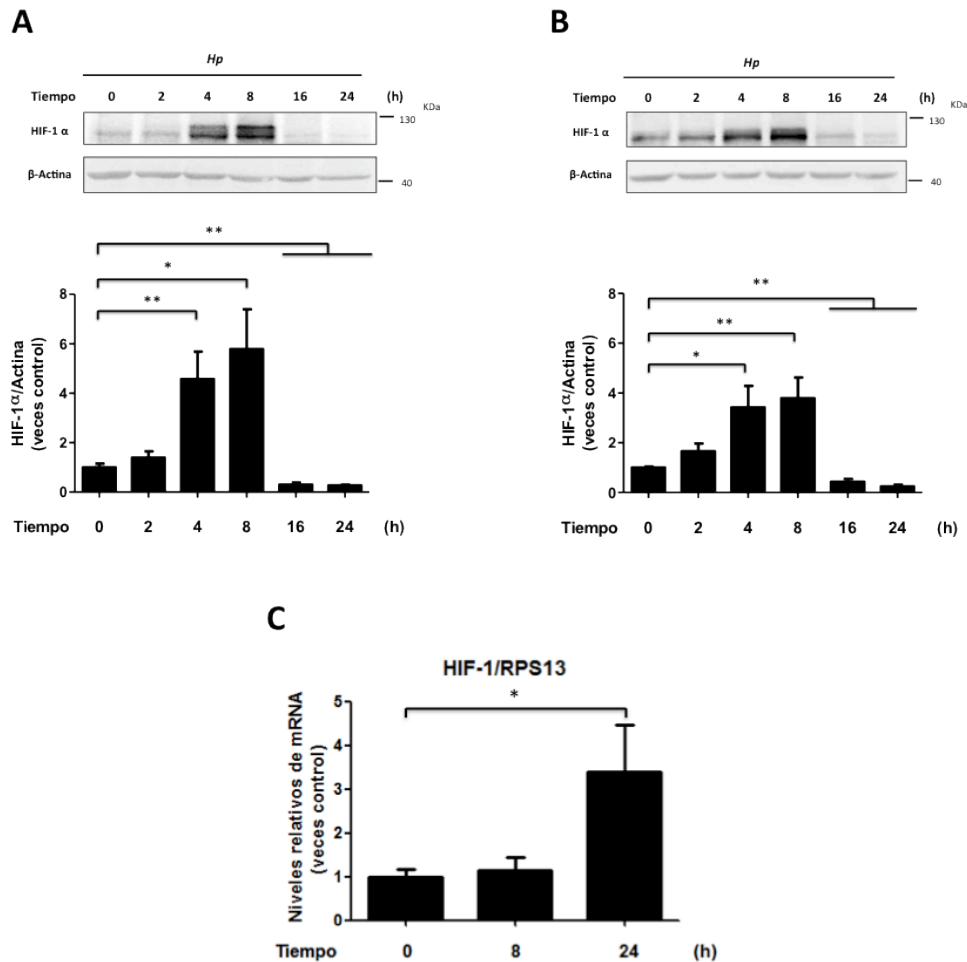


Figura 6. Efecto de *H. pylori* sobre los niveles proteicos y del mRNA de HIF-1 α

Células MKN45 (**A**) y AGS (**B**) fueron infectadas con *H. pylori* 26695 a una MOI de 100 por los tiempos indicados. Se evaluaron los niveles proteicos de HIF-1 α y β -actina por western blot. Se determinaron los niveles relativos de HIF-1 α (n=4; promedio \pm SEM; * $<$ 0,05, ** $<$ 0,01, *** $<$ 0,001). (**C**) Células MKN45 fueron infectadas con *H. pylori* (MOI 100) por 8 y 24 h. Se evaluaron los niveles del mRNA de HIF-1 α y de RPS13 por RT-qPCR. Se determinaron los niveles relativos del mRNA de HIF-1 α (n=4; promedio \pm SEM; * $<$ 0,05).

Para estudiar en mayor profundidad el fenómeno de inducción de HIF-1 α por *H. pylori*, se evaluó la localización celular del factor transcripcional a distintos tiempos de infección. A través de inmunofluorescencia indirecta de

HIF-1 α y por fraccionamiento nuclear se puede observar que la localización de la proteína es principalmente nuclear, y que esta localización es significativamente mayor a la condición control sólo a las 8 h de infección (Figura 7B y 7D), corroborando los datos anteriores que muestran un aumento transitorio de la proteína.

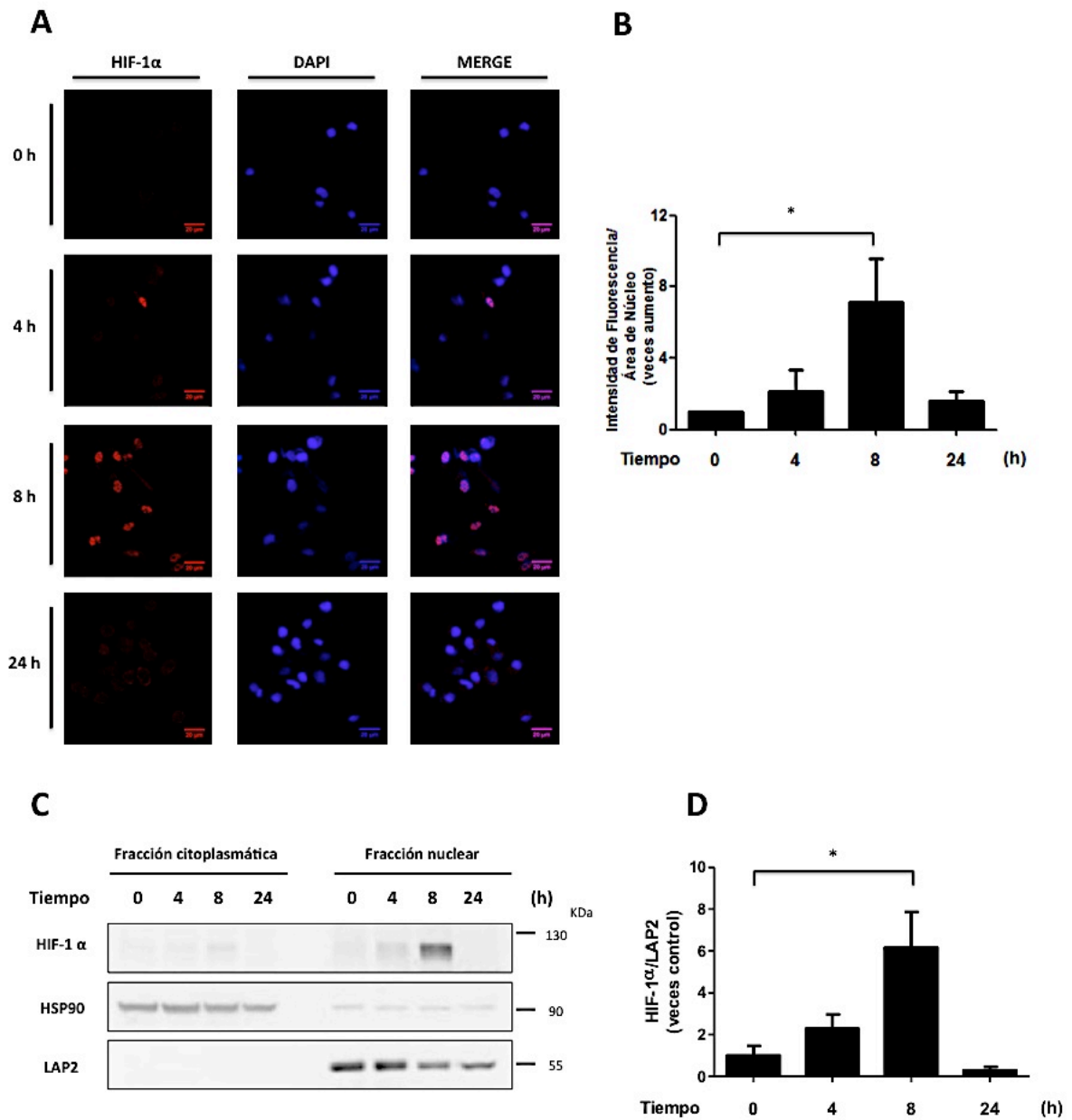


Figura 7. Localización de HIF-1 α en células gástricas infectadas con *H. pylori*

(A) Células MKN45 fueron infectadas con *H. pylori* (MOI 100) por 0, 4, 8 y 24 h. Luego, las células fijadas y permeabilizadas fueron marcadas con anticuerpo contra HIF-1 α (rojo) y con reactivo DAPI para detectar el núcleo (azul). Barra=20 μ m. **(B)** Se determinó la relación de intensidad de fluorescencia roja/área nuclear (n=3, promedio \pm SEM, *p<0,05). **(C)** Células MKN45 fueron infectadas con *H. pylori* (MOI 100) por 0, 4, 8 y 24 h. Se aisló la fracción nuclear y se evaluaron los niveles proteicos de HIF-1 α , HSP90 (marcador citoplasmático) y LAP2 (marcador nuclear) por western blot. **(D)** Se determinaron los niveles relativos de HIF-1 α respecto al marcador nuclear LAP2 (n=3; promedio \pm SEM; *p<0,05).

Entendiendo que la localización nuclear de HIF-1 α podría dar cuenta de una efectiva acción como factor transcripcional, luego se procedió a determinar la funcionalidad transcripcional de la proteína a través del ensayo de reportero de luciferasa. Habiendo definido en los ensayos anteriores el tiempo óptimo de inducción de la proteína bajo nuestras condiciones experimentales, se evaluó la actividad transcripcional de HIF-1 a esa temporalidad en función de la infección. Para esto, las células gástricas fueron infectadas por 8 h a distintas MOI. Como se puede observar, la actividad luciferasa derivada de la actividad transcripcional de HIF-1 aumentó conforme se aumentó la MOI en células MKN45 y AGS (Figuras 8A y 8B).

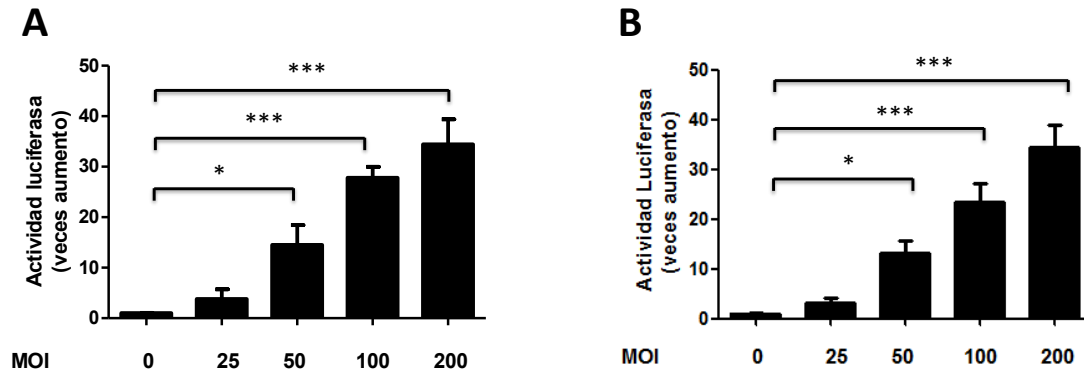


Figura 8. Efecto de la infección con *H. pylori* sobre la actividad transcripcional de HIF-1

Células MKN45 (**A**) o AGS (**B**) fueron co-transfectadas con el plasmidio reportero pGL3-HRE (luciferasa) y con el control pON (β -galactosidasa). 16 h post-transfección, las células fueron infectadas con *H. pylori* 26695 por 8 h a las MOI indicadas. Los valores de actividad luciferasa se relativizaron a los respectivos valores de actividad β -galactosidasa (n=3; promedio \pm SEM; * p <0,05; *** p <0,001).

Posterior a esto, se estudió el efecto temporal de la infección en la respuesta transcripcional de HIF-1, esperando observar un comportamiento similar al observado para la proteína, es decir, un aumento transitorio de la actividad que decae a tiempos mayores de infección. Para esto, células MKN45 fueron infectadas a una MOI de 100 por distintos tiempos. Contrario a lo esperado, los datos obtenidos muestran que la actividad luciferasa dependiente de HIF-1 α aumentó significativamente a las 8 h, pero ésta siguió aumentando a las 16 y 24 h de infección (Figura 9).

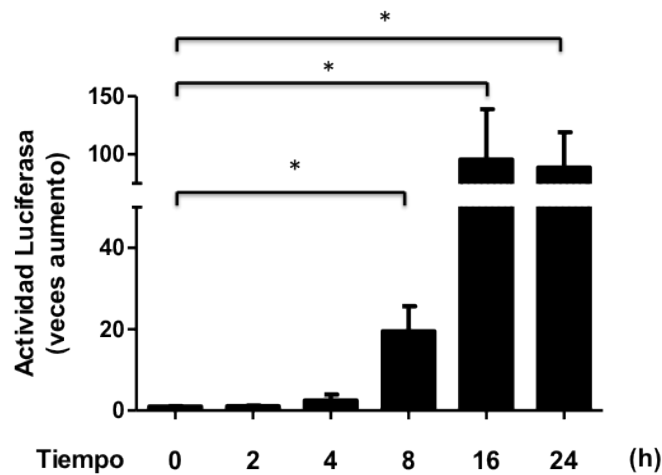


Figura 9. Efecto temporal de *H. pylori* sobre la actividad transcripcional de HIF-1

Células MKN45 fueron co-transfectadas con el plasmidio reportero pGL3-HRE (luciferasa) y con el control pON (β -galactosidasa). 16 h post-transfección, las células fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100) por los tiempos indicados. Los valores de actividad luciferasa se relativizaron a los respectivos valores de actividad β -galactosidasa (n=3; promedio \pm SEM; *p<0,05).

Debido a la discordancia entre la temporalidad a la que se observa la inducción de HIF-1 α y la actividad transcripcional obtenida bajo las mismas condiciones experimentales, se propuso evaluar, de manera alternativa, la actividad de este factor transcripcional indirectamente a través de la evaluación de la expresión de genes clásicamente descritos como blancos de HIF-1 α , para lo que medimos los niveles de mRNA correspondientes por RT-qPCR. Los resultados indican que sólo el mRNA de GLUT-1 aumenta significativamente a las 8 h de infección, sin embargo, este aumento parece sostenerse, aunque no significativamente, hasta las 24 h, temporalidad a la que ya no observamos HIF-1 α bajo nuestras condiciones experimentales (Figura 10A). Por otro lado, el mRNA de VEGF-A, clásicamente sindicado como blanco de HIF-1 α , tiende a

aumentar, aunque no significativamente, a las 8 h de infección, volviéndose significativo sólo a las 24 h (Figura 10D). En cuanto al mRNA de la proteína antiapoptótica Bcl-xL, éste mostró una tendencia a aumentar a las 24 h de infección, aunque no de manera significativa (Figura 10E). Los niveles de mRNA de otros blancos de HIF-1 α relacionados con el metabolismo glicolítico, LDH-A y GAPDH, no se afectaron por la infección a las temporalidades evaluadas (Figura 10B y 10C). Finalmente, los niveles de mRNA de la proteína relacionada con la transición epitelio-mesénquima Snail, disminuyó sus niveles a las 8 y 24 h de infección (Figura 10F). En su conjunto, todos estos datos demuestran poca claridad acerca de la efectiva activación transcripcional de HIF-1 α en nuestro modelo de estudio.

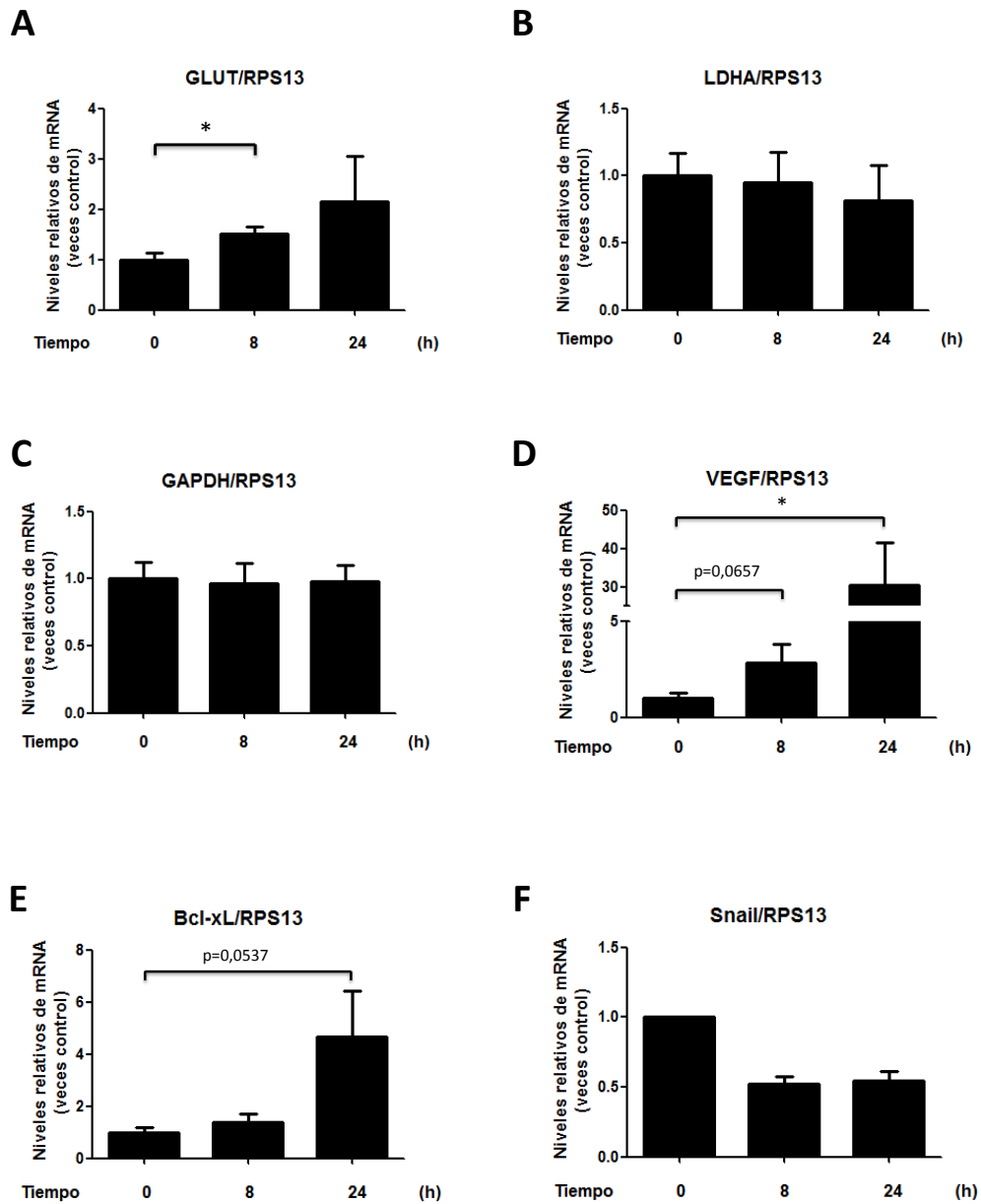


Figura 10. Efecto de *H. pylori* sobre la expresión de genes blancos de HIF-1 α

Células MKN45 fueron infectadas con *H. pylori* (MOI 100) por 8 y 24 h. Se evaluaron los niveles del mRNA de GLUT-1 (A), LDHA (B), GAPDH (C), VEGF-A (D), Bcl-xL (E), Snail (F) y de RPS13. Se determinaron los niveles relativos de cada uno de los mRNA indicados (promedio \pm SEM; n=3-4, *p<0,05; excepto (F) donde n=2 y promedio \pm SD).

Sin desmedro de su acción como factor de transcripción, en los últimos años se le ha asociado a HIF-1 α un papel no canónico, independiente de su actividad transcripcional, que tiene como consecuencia un arresto en la fase G1 del ciclo celular. Todos estos fenómenos también se basan en la localización nuclear de la proteína, por lo tanto, en nuestro modelo no podemos descartar un evento de esta naturaleza. Para evaluar si ocurre un fenómeno similar al previamente descrito para HIF-1 α sobre el ciclo celular, se propuso estudiar el efecto de *H. pylori* sobre el ciclo de células gástricas. Para esto, células MKN45 fueron infectadas con *H. pylori* (MOI 100) por 24 h. Los resultados muestran que la infección, tal como el papel no canónico de HIF-1 α , induce un arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 con una proporcional disminución del porcentaje de células en la fase G2/M (Figura 11).

En resumen, los experimentos realizados en el Objetivo Específico 1 han demostrado que, efectivamente, *H. pylori* induce un incremento de los niveles de la proteína HIF-1 α , aparentemente por un mecanismo no transcripcional. Es importante destacar que este incremento es transitorio bajo nuestras condiciones experimentales. A pesar de esto, cuando fue evaluada la actividad transcripcional de HIF-1 α , se observó que las técnicas aquí utilizadas no otorgaron un reflejo fiel de lo que ocurre con la proteína, puesto que las temporalidades a las que se mostró una mayor activación transcripcional de la proteína, ya sea por ensayo de reportero de luciferasa o por niveles de mRNA de blancos de HIF-1 α , los niveles proteicos del factor transcripcional se encuentran disminuidos, incluso, bajo los niveles basales. Finalmente, la infección fue capaz de reproducir el efecto no canónico de HIF-1 α asociado al arresto del ciclo celular en la fase G0/G1.

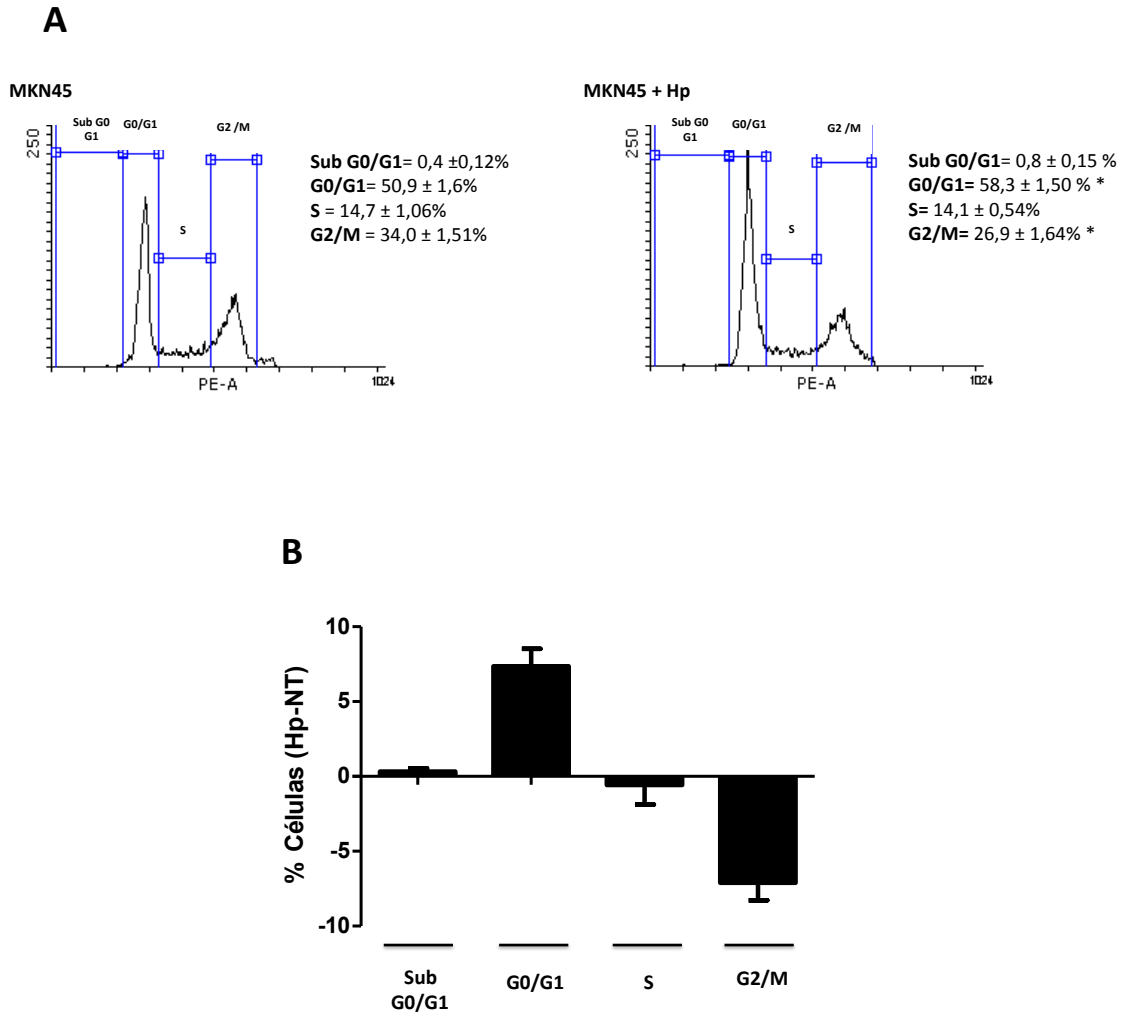


Figura 11. Efecto de la infección con *H. pylori* sobre el ciclo celular

Células MKN45 fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100) por 24 h. Luego, las células fueron analizadas para ciclo celular mediante citometría de flujo **(A)** Perfiles de citometría para células MKN45 y MKN45 infectadas (MKN45 + Hp) con sus respectivos valores porcentuales de células en cada etapa del ciclo (promedio \pm SEM; n=4; *p<0,05) **(B)** Cuantificación de la diferencia entre el (% de células infectadas - % de células no tratadas) en cada etapa de ciclo.

O.E.2. Evaluar el papel de la vía PI3K/Akt/mTOR en la inducción de HIF-1 α por *H. pylori*.

Para definir si la vía PI3K/Akt es encendida bajo nuestras condiciones experimentales, primero se analizó su actividad través de la medición de la fosforilación de Akt (p-S473-Akt) en células gástricas tratadas con *H. pylori*. Con este fin, células AGS y MKN45 fueron infectadas a una MOI de 100 por distintos tiempos. Como se puede observar, ambas líneas celulares respondieron con un aumento de la fosforilación de Akt a las 4 y 8 h de infección, pero a tiempos mayores se observó una disminución de la misma (Figura 12A y 12B), comportándose de manera similar a lo anteriormente descrito para HIF-1 α bajo las mismas condiciones experimentales (Figura 6A y 6B).

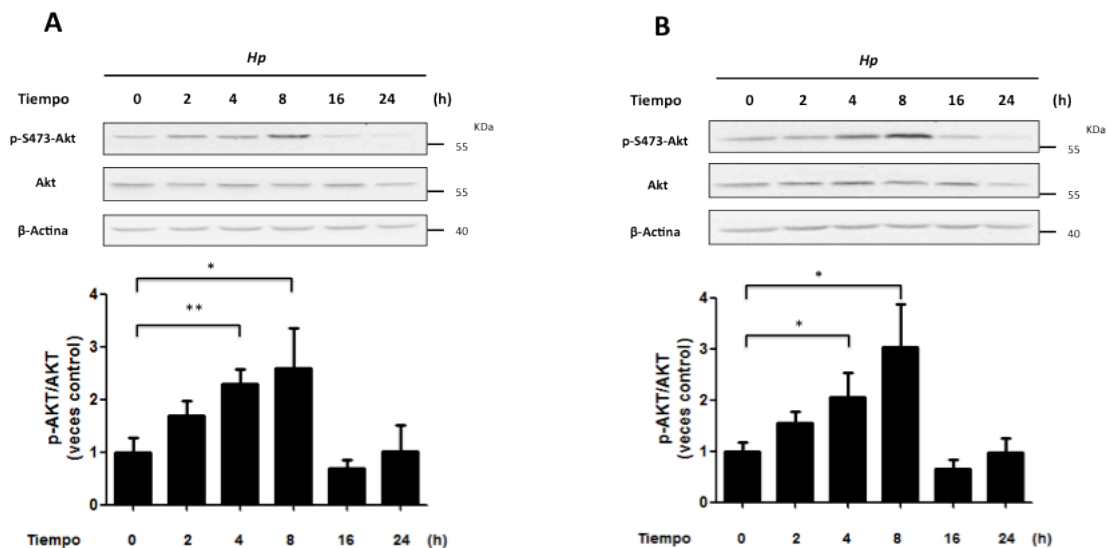


Figura 12. Efecto temporal de *H. pylori* sobre la actividad de PI3K

Células MKN45 (**A**) y AGS (**B**) fueron infectadas con *H. pylori* 26695 a una MOI de 100 por los tiempos indicados. Se evaluaron los niveles proteicos de p-S473-Akt, Akt total y β -actina por western blot. Se determinaron los niveles relativos de p-S473-Akt (n=4-5; promedio \pm SEM; * $<$ 0,05, ** $<$ 0,01).

A partir de este resultado se propuso evaluar si la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR es necesaria para la inducción de HIF-1 α en nuestro modelo. Esto, ya que dicha vía de señalización se ha relacionado con un aumento de los niveles HIF-1 α por promover un aumento de la traducción de su transcrito. Este objetivo se desarrolló utilizando una aproximación farmacológica con el fin de alterar la ruta en cuestión.

Primero se evaluó el efecto de la inhibición de PI3K, usando para ello el inhibidor selectivo de PI3K LY294002. Como se puede observar, la inhibición de PI3K disminuyó la inducción de HIF-1 α promovida por *H. pylori* en una manera dependiente de la dosis, siendo el efecto significativo a las concentraciones de 5 y 10 μ M. Este fenómeno se observó a las 4 h de infección y, siguiendo la misma tendencia, a las 8 h de estímulo (Figura 13B y 13E). Para controlar la acción del inhibidor, se evaluó los niveles de fosforilación de Akt (p-S473-Akt), blanco de PDK1 que se activa de manera dependiente de PI3K. A través de este parámetro se obtuvo que a los 5 y 10 μ M hay una inhibición significativa de la fosforilación de Akt a las 4 h de infección, efecto que también se repite a las 8 h (Figura 13C y 13F).

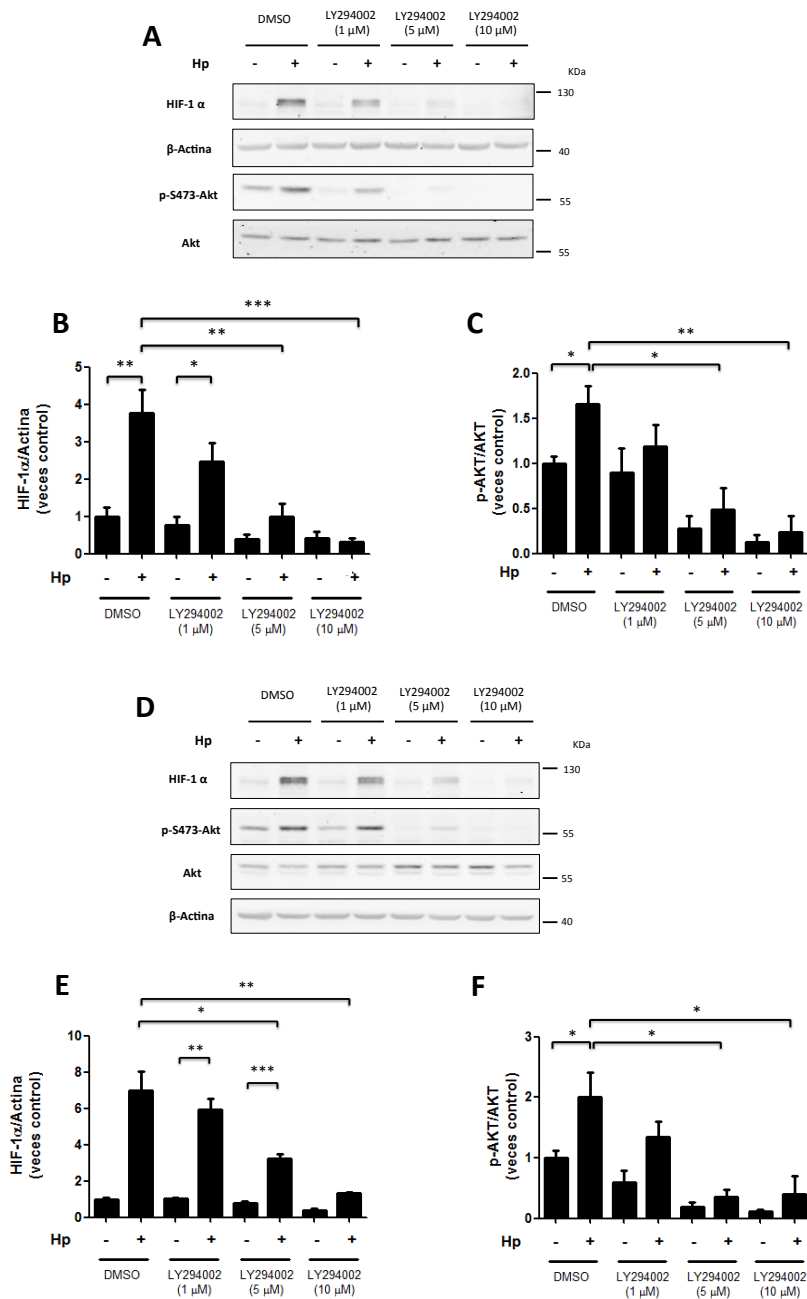


Figura 13. Efecto de la inhibición de PI3K sobre los niveles de HIF-1 α inducidos por *H. pylori*

Células MKN45 fueron pre-tratadas con LY294002 (1, 5 y 10 μ M) por 30 min y luego fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100) por 4 h (A-C) u 8 h (D-F). Se evaluaron los niveles proteicos de HIF-1 α , p-S473-Akt, Akt y β -actina por western blot. Se determinaron los niveles relativos de HIF-1 α (B y E) y de p-S473-Akt (C y F) (A-C: n=4; D-F: n=3; promedio \pm SEM; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Utilizando las mismas concentraciones del inhibidor de PI3K, se evaluó a las 8 h de infección la actividad transcripcional de HIF-1 a través del ensayo de reportero de luciferasa y a través de la medición de los niveles de mRNA de los GLUT-1 y de VEGF-A, blancos clásicos del factor transcripcional. Por ensayo de reportero de luciferasa se puede apreciar que el inhibidor LY294004 decrece los niveles de actividad transcripcional de HIF-1 promovida por la bacteria a las concentraciones de 5 y 10 μ M (Figura 14A), sin embargo, *H. pylori* fue capaz de aumentar la actividad luciferasa respecto a su propia condición control en todas las concentraciones del inhibidor utilizadas, fenómeno que no se observó previamente en el caso de la proteína. Por otro lado, la infección con *H. pylori* aumentó los niveles de mRNA de GLUT-1 y de VEGF en la condición control, sin embargo, la sola presencia del inhibidor aumentó los niveles de mRNA para ambos casos. La infección, en presencia del inhibidor, fue incapaz de aumentar los niveles de mRNA de GLUT-1 y de VEGF-A respecto a los niveles obtenidos para el inhibidor solo (Figura 14B y 14C). Finalmente, para descartar que el inhibidor afecte de manera inespecífica a la bacteria, más allá de su acción farmacológica principal, se evaluó la capacidad de adhesión de la bacteria a la célula gástrica en presencia de LY294002. Los resultados muestran que LY294002, según las concentraciones y tiempos de estímulo utilizados en cada experimento, no disminuyó la adhesión celular de *H. pylori* a las células MKN45 (Figura 15A y 15B).

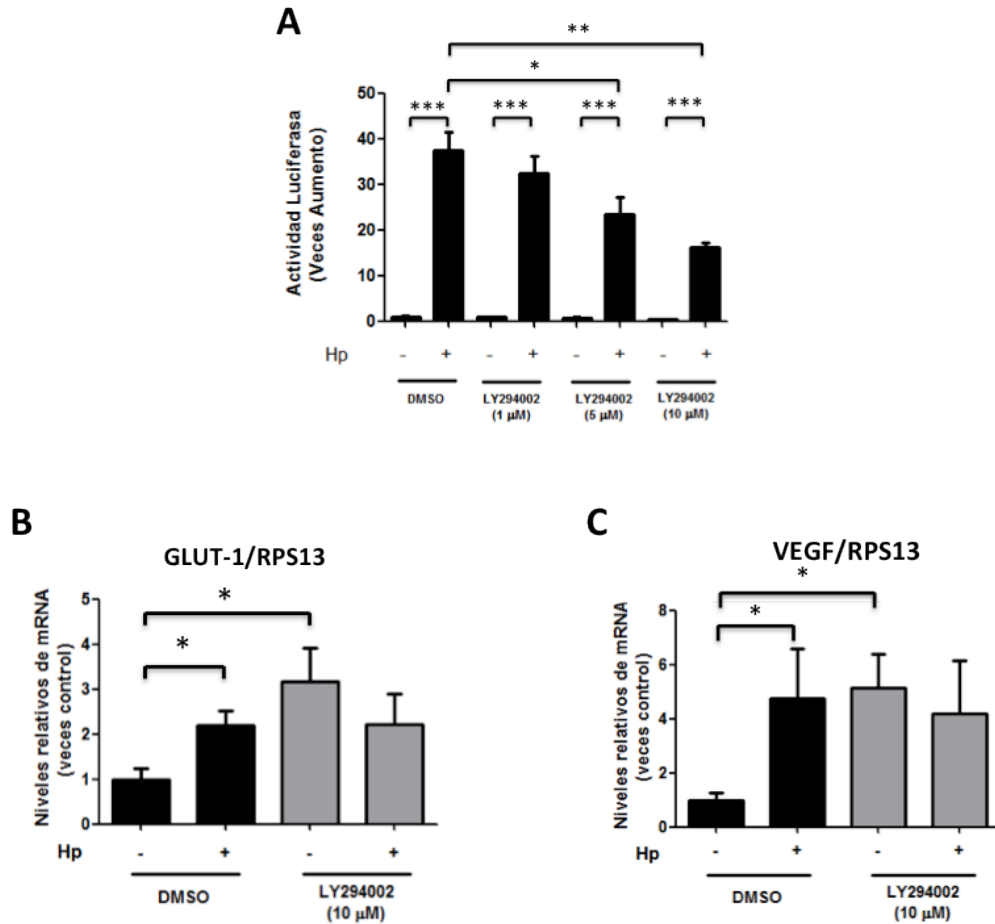


Figura 14. Efecto de la inhibición de PI3K sobre la actividad transcripcional de HIF-1 inducida por *H. pylori*

(A) Células MKN45 fueron co-transfectadas con el plasmidio reportero pGL3-HRE (luciferasa) y con el control pON (β -galactosidasa). 16 h post-transfección, las células fueron pre-tratadas con LY294002 (1, 5 y 10 μ M) por 30 min y luego fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100) por 8 h. Los valores de actividad luciferasa se relativizaron a los respectivos valores de actividad β -galactosidasa (n=4; promedio \pm SEM; *p<0,05, **p<0,01, ***<0,001). **(B y C)** Células MKN45 fueron pre-tratadas con LY294002 (10 μ M) por 30 min y luego fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100) por 8 h. Se evaluaron los niveles del mRNA de GLUT-1, VEGF-A y de RPS13. Se determinaron los niveles relativos de mRNA de GLUT-1 **(B)** y de VEGF-A **(C)** (promedio \pm SEM; n=3, *p<0,05)

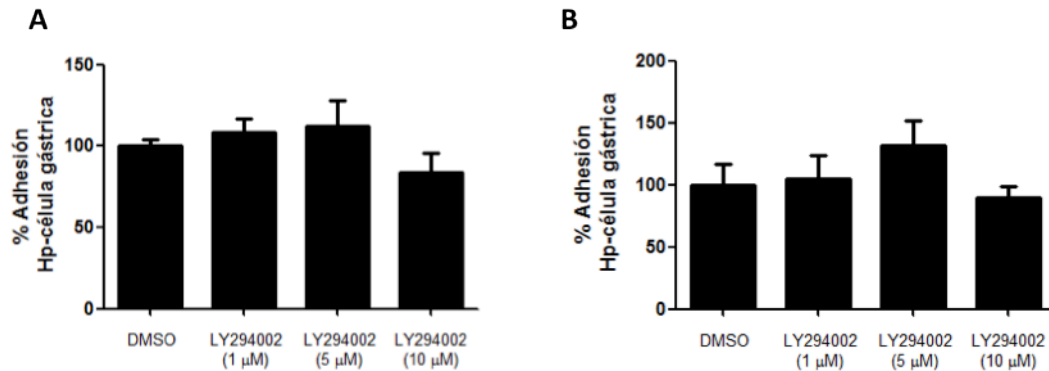


Figura 15. Efecto del inhibidor LY294002 sobre la adhesión de *H. pylori* a células gástricas

Células MKN45 fueron pre-tratadas con LY294002 (1, 5 y 10 μ M) por 30 min y luego fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100) por 4 h (A) u 8 h (B). Después de esto, fueron lavadas y lisadas con saponina 0,1%. El lisado obtenido fue diluido de manera seriada y sembrado en placas de TSA para luego hacer conteo de Unidades Formadoras de Colonias. La cantidad de bacteria adherida en la condición control (DMSO) fue considerada como un 100% de adhesión (n=3; promedio \pm SEM)

Luego, se evaluó el papel de Akt sobre la inducción de HIF-1 α por *H. pylori*. Para esto, se utilizó un inhibidor de las isoformas 1 y 2 de Akt, Akti. Los resultados muestran que Akti previno sólo parcialmente la inducción de la proteína promovida por la bacteria, efecto que fue significativo a las 4 h de infección y que siguió la misma tendencia a las 8 h (Figura 16B y 16E). Mediante la medición de los niveles de p-S473-Akt se controló la acción del fármaco, demostrando que Akt es efectivamente inhibida a la concentración de 1 μ M utilizada en nuestro estudio (Figura 16C y 16F). Midiendo la actividad transcripcional de HIF-1 inducida por *H. pylori* a través del ensayo de reportero de luciferasa, se obtuvo que Akti no afectó la actividad luciferasa derivada de la inducción de HIF-1 α por 8 h de infección (Figura 17). Por lo demás, Akti demostró no afectar significativamente la adhesión de la bacteria a las células a la concentración de 1 μ M a las 4 y 8 h de infección (Figura 18)

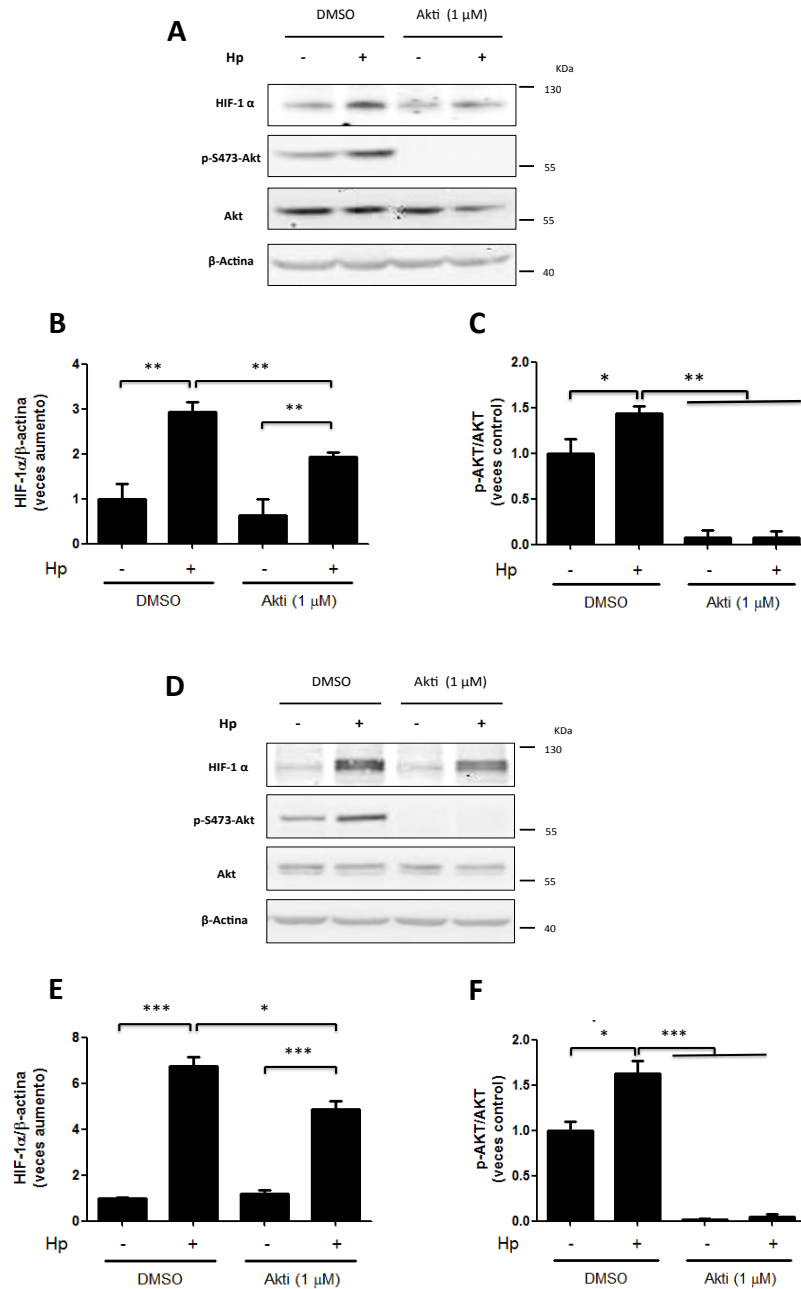


Figura 16. Efecto de la inhibición de Akt sobre los niveles de HIF-1 α inducidos por *H. pylori*

Células MKN45 fueron pre-tratadas con Akti (1 μ M) por 30 min y luego fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100) por 4 h (A-C) u 8 h (D-F). Se evaluaron los niveles proteicos de HIF-1 α , p-S473-Akt, Akt y β -actina por western blot. Se determinaron los niveles relativos de HIF-1 α (B y E) y de p-S473-Akt (C y F) (A-C: n=4; D-F: n=3; promedio \pm SEM; *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001).

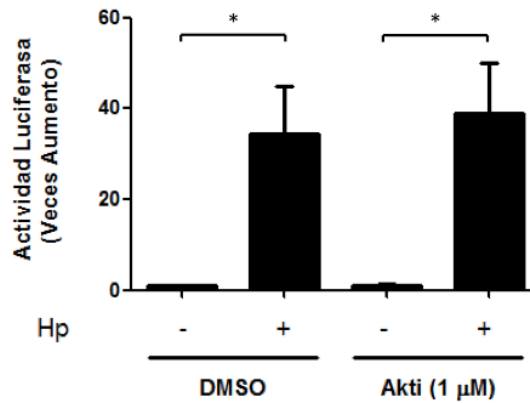


Figura 17. Efecto de la inhibición de Akt sobre la actividad transcripcional de HIF-1 inducida por *H. pylori*

Células MKN45 fueron co-transfectadas con el plasmidio reportero pGL3-HRE (luciferasa) y con el control pON (β -galactosidasa). 16 h post-transfección, las células fueron pre-tratadas con Akti (1 μ M) por 30 min y luego fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100) por 8 h. Los valores de actividad luciferasa se relativizaron a los respectivos valores de actividad β -galactosidasa (n=3; promedio \pm SEM; *p<0,05).

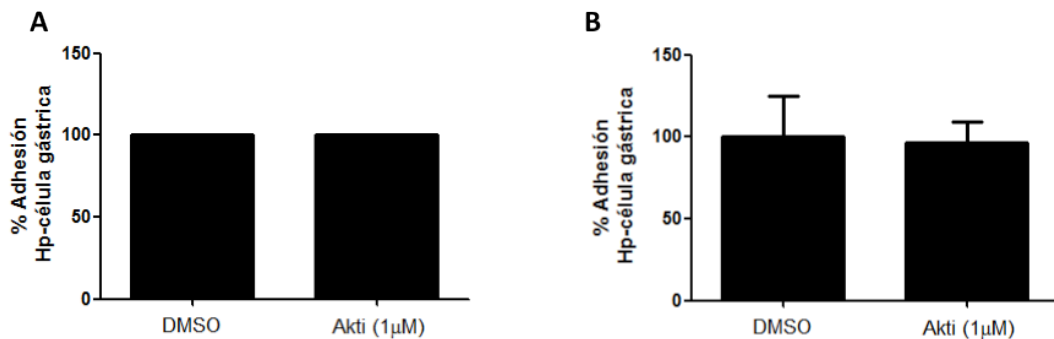


Figura 18. Efecto del inhibidor Akti sobre la adhesión de *H. pylori* a células gástricas

Células MKN45 fueron pre-tratadas con Akti (1 μ M) por 30 min y luego fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100) por 4 h (A) u 8 h (B). Después de esto, fueron lavadas y lisadas con saponina 0,1%. El lisado obtenido fue diluido de manera seriada y sembrado en placas de TSA para luego hacer conteo de Unidades Formadoras de Colonias. La cantidad de bacteria adherida en la condición control (DMSO) fue considerada como un 100% de adhesión (A: n=1; B: n=3; promedio \pm SEM).

Finalmente, se evaluó el papel de mTOR en la inducción de HIF-1 α por *H. pylori*. Para esto, se utilizó el inhibidor de mTOR, Rapamicina. Los resultados muestran que Rapamicina a una concentración de 50 nM fue capaz de prevenir la inducción de HIF-1 α promovida por la bacteria, tanto a las 4 como a las 8 h de infección (Figura 19B y 19E). Ahora, si se compara sólo las condiciones en presencia del inhibidor de mTOR, se puede observar que la bacteria aún es capaz de aumentar, aunque mínimamente, los niveles de la proteína (Figura 19B y 19E). Para controlar la acción del inhibidor, se midió los niveles de fosforilación de la proteína ribosomal S6 como un blanco río abajo de la quinasa de S6 (S6K), que, a su vez, es blanco directo de mTOR. Se obtuvo que Rapamicina (50 nM) fue capaz de prevenir la fosforilación de S6 (S235/236) a las 4 y 8 h de infección (Figura 19C y 19F). Al evaluar la actividad transcripcional de HIF-1 por ensayo de reportero de luciferasa se observó que Rapamicina, a las 8 h de infección, fue incapaz de prevenir la inducción de la actividad luciferasa derivada de la inducción de HIF-1 α promovida por *H. pylori* (Figura 20A). Por otro lado, los niveles de mRNA de GLUT-1 y de VEGF-A aumentaron con 8 h de infección, sin embargo, en presencia de Rapamicina, los niveles basales de dichos mRNA aumentaron. La infección, en presencia de este inhibidor, fue incapaz de incrementar los niveles de mRNA de GLUT-1 ni de VEGF-A por sobre los niveles obtenidos sólo con Rapamicina (Figura 20B y 20C). Por último, para descartar que Rapamicina afecte a *H. pylori* de manera inespecífica, y que a eso se deban los resultados obtenidos, se midió la adhesión de la bacteria a las células MKN45 en presencia del inhibidor a una concentración de 50 nM por 4 y 8 h de infección. Los resultados indican que Rapamicina 50 nM no afectó la adhesión de *H. pylori*, al menos a los tiempos de infección aquí evaluados (Figura 21).

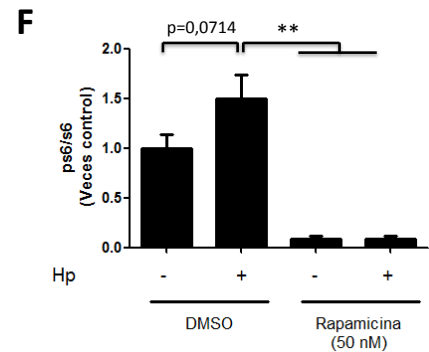
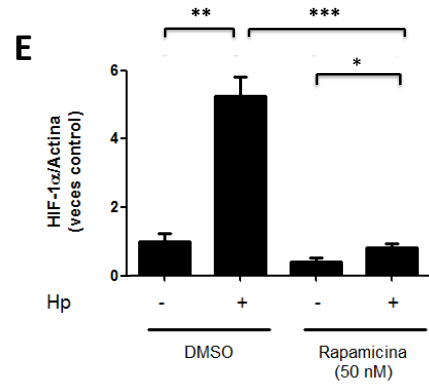
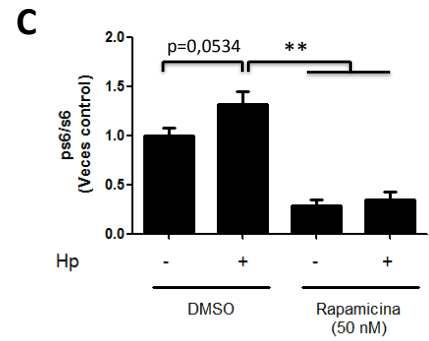
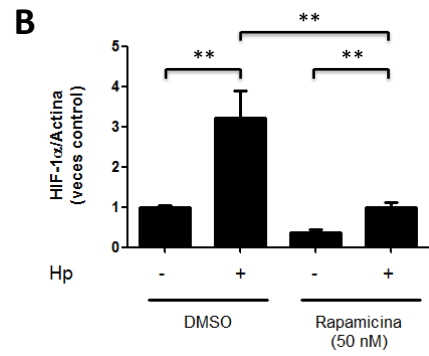
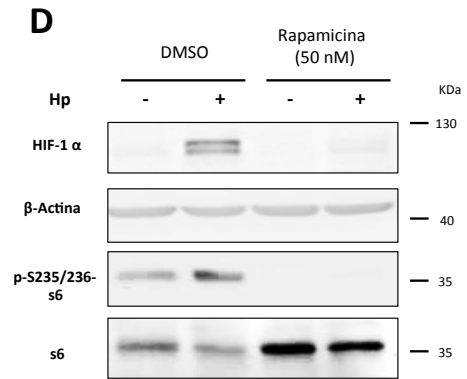
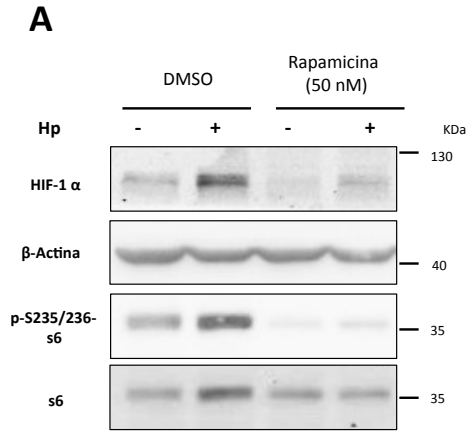


Figura 19. Efecto de la inhibición de mTOR sobre los niveles de HIF-1 α inducidos por *H. pylori*

Células MKN45 fueron pre-tratadas con Rapamicina (50 nM) por 30 min y luego fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100) por 4 h (A-C) u 8 h (D-F). Se evaluaron los niveles proteicos de HIF-1 α , p-S235/236-S6, S6 total y β -actina por western blot. Se determinaron los niveles relativos de HIF-1 α (B y E) y de p-S235/236-S6 (C y F) (A-C: n=3; promedio \pm SEM; **p<0,01; D-F: n=5; promedio \pm SEM; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

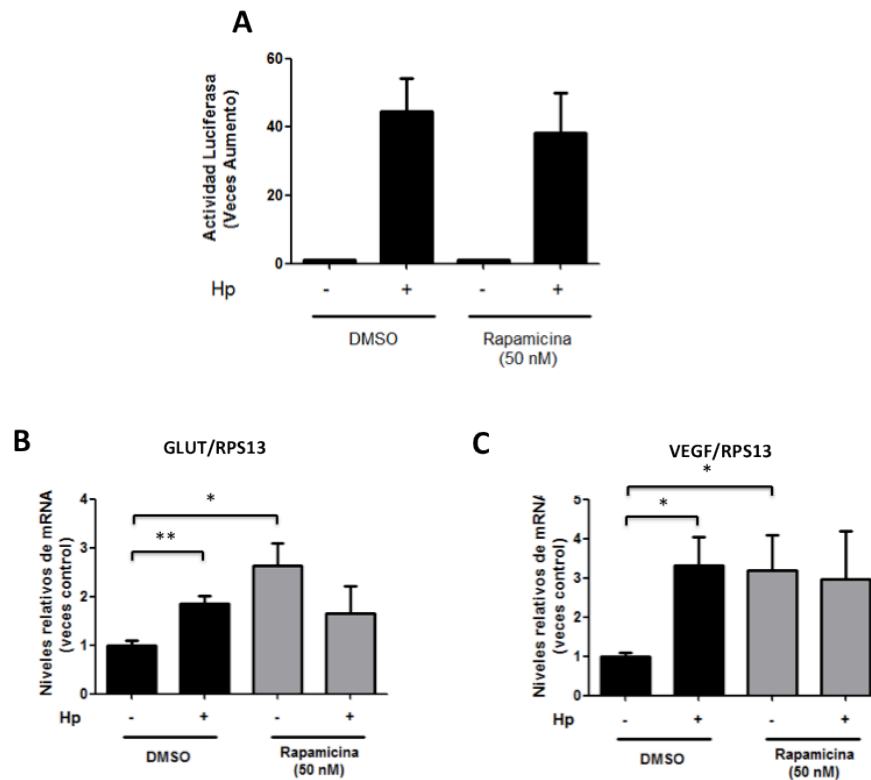


Figura 20. Efecto de la inhibición de mTOR sobre la actividad transcripcional de HIF-1 inducida por *H. pylori*

(A) Células MKN45 fueron co-transfectadas con el plasmidio reportero pGL3-HRE (luciferasa) y con el control pON (β -galactosidasa). 16 h post-transfección, las células fueron pre-tratadas con Rapamicina (50 nM) por 30 min y luego fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100) por 8 h. Los valores de actividad luciferasa se relativizaron a los respectivos valores de actividad β -galactosidasa (n=2; promedio \pm SD). (B y C) Células MKN45 fueron pretratadas con Rapamicina (50 nM) por 30 min y luego fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100) por 8 h. Se evaluaron los niveles del mRNA de GLUT-1, VEGF-A y de RPS13. Se determinaron los niveles relativos de mRNA de GLUT-1 (B) y de VEGF-A (C) (promedio \pm SEM; n=3, *p<0,05; **p<0,01).

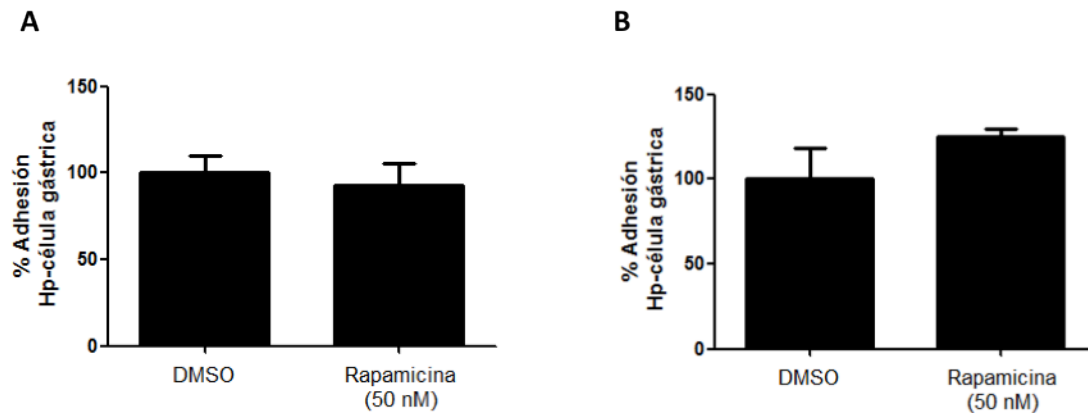


Figura 21. Efecto del inhibidor Rapamicina sobre la adhesión de *H. pylori* a células gástricas

Células MKN45 fueron pre-tratadas con Rapamicina (50 nM) por 30 min y luego fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100) por 4 h (**A**) u 8 h (**B**). Después de esto, fueron lavadas y lisadas con saponina 0,1%. El lisado obtenido fue diluido de manera seriada y sembrado en placas de TSA para luego hacer conteo de Unidades Formadoras de Colonias. La cantidad de bacteria adherida en la condición control (DMSO) fue considerada como un 100% de adhesión (n=3; promedio±SEM)

Como se mencionó anteriormente, la activación de la vía de PI3K/Akt/mTOR induce un aumento de los niveles HIF-1 α por promover un aumento de la traducción de su transcrito, sin embargo, esta no es la única vía de señalización asociada a dicho efecto: se acepta que la vía de Ras-MEK-ERK también participa en el incremento de la traducción de HIF-1 α . Aún cuando se observó un aumento de la fosforilación de ERK por la infección en nuestro modelo, el uso del inhibidor de MEK PD98059 permitió descartar la participación de esta vía en la inducción de HIF-1 α en nuestras condiciones experimentales, ya que su acción farmacológica no afectó ni el aumento de HIF-1 α ni la actividad transcripcional promovidos por *H. pylori* (Figura 22A y 22B).

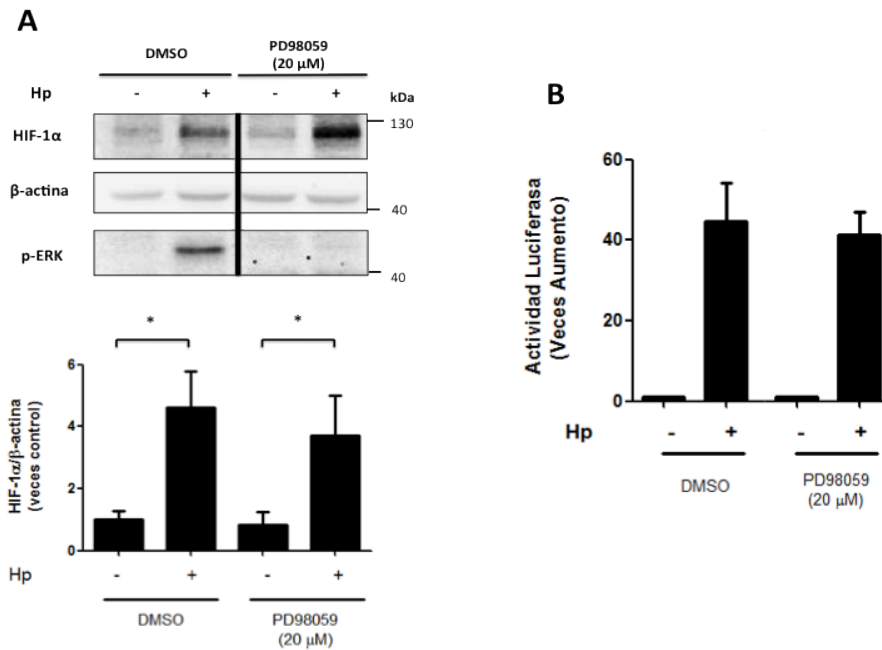


Figura 22. Efecto de la inhibición de MEK sobre los niveles de HIF-1 α y la actividad transcripcional de HIF-1 inducidos por *H. pylori*

(A) Células MKN45 fueron pre-tratadas con PD98059 (20 μ M) por 30 min y luego fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100) por 4 h. Se evaluaron los niveles proteicos de HIF-1 α , p-ERK y β -actina por western blot. Se determinaron los niveles relativos de HIF-1 α (n=3; promedio \pm SEM; * $<$ 0,05). **(B)** Células MKN45 fueron co-transfectadas con el plasmidio reportero pGL3-HRE (luciferasa) y con el control pON (β -galactosidasa). 16 h post-transfección, las células fueron pretratadas con PD98059 (20 μ M) por 30 min y luego fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100) por 8 h. Los valores de actividad luciferasa se relativizaron a los respectivos valores de actividad β -galactosidasa (n=2; promedio \pm SD).

Los resultados obtenidos en el Objetivo Especifico 2 sugieren que *H. pylori* induce los niveles de la proteína HIF-1 α en una forma dependiente de PI3-K y de mTOR, pero sólo parcialmente de Akt. Además, se descartó que la activación de ERK pudiese estar involucrada en esta respuesta. Al igual que en el objetivo anterior, la medición de la actividad transcripcional del HIF-1 no siempre correlacionó con los niveles de la proteína, obteniéndose activación incluso en condiciones a las que no se observaba el factor transcripcional.

O.E.3. Evaluar el papel de HIF-1 α inducido por *H. pylori* sobre el arresto del ciclo celular promovido por la infección

Para realizar los experimentos correspondientes a este objetivo específico, primero se generó, a partir de la línea celular MKN45, una sublínea celular *knockdown* para HIF-1 α (MKN45 sh-HIF-1 α) y su respectiva sublínea control (MKN45 sh-Scr). Las sublíneas celulares obtenidas luego de la selección con puromicina fueron tratadas con el inductor químico de HIF-1 α , Deferroxamina (DFO) (200 μ M), para evaluar la eficiencia del silenciamiento de dicha proteína (Figura 23A). Debido a la baja eficiencia en el silenciamiento del factor transcripcional obtenida luego de la selección con antibiótico, se procedió a aislar sublíneas celulares clonales. Una vez obtenidas las sublíneas clonales, se evaluó el silenciamiento de HIF-1 α con un tratamiento con DFO (200 μ M) para inducir un aumento en los niveles de la proteína y se eligieron aquellas que presentaron mayor eficiencia para silenciar el factor transcripcional. También se generaron sublíneas clonales a partir de las células control MKN45 sh-Scr (Figura 23B).

Para evaluar la respuesta de estas sublíneas celulares clonales a *H. pylori*, se midió la actividad transcripcional de HIF-1 inducida por la bacteria a través del ensayo de reportero, obteniéndose que el clon MKN45 sh-HIF-1 α C7 fue el que presentó menor respuesta a la actividad luciferasa derivada de la inducción de HIF-1 α promovida por la infección (Figura 23C). Cuando evaluamos los niveles proteicos de HIF-1 α inducidos por la bacteria, obtuvimos que, efectivamente, este clon no aumentaba los niveles de la proteína frente a la infección con *H. pylori*, comparada con la línea celular clonal control MKN45 sh-Scr C2 (Figura 23D).

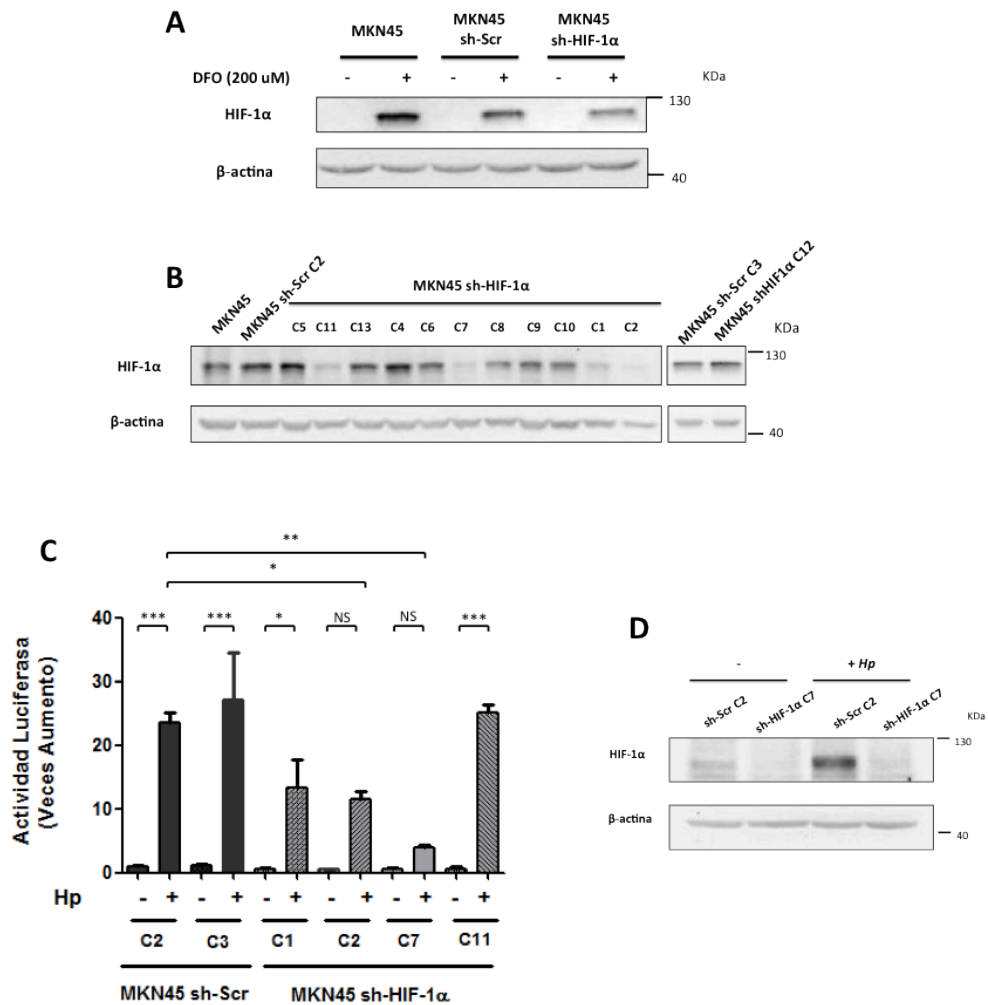


Figura 23. Caracterización de células MKN45 sh-HIF-1α

Células MKN45 fueron transfectadas con los plasmidios que contienen la construcción control sh-Scr o la construcción sh-HIF-1α y fueron seleccionadas con puromicina (2 μg/ml) por 2 semanas. **(A)** Las células MKN45 sh-Scr y MKN45 sh-HIF-1α obtenidas después de la selección con puromicina fueron tratadas con Deferroxicina (DFO) (200 μM) por 4 h para inducir la estabilización de HIF-1α. **(B)** A partir de los *batch* de células MKN45 sh-Scr y MKN45 sh-HIF-1α se seleccionaron poblaciones clonales. Cada una de las poblaciones clonales fue tratada con DFO (200 μM) por 4 h para inducir la estabilización de HIF-1α. **(C)** Las poblaciones clonales MKN45 sh-Scr C2 y C3 y las MKN45 sh-HIF-1α C1, C2, C7 y C11 fueron co-transfectadas con el plasmidio reportero pGL3-HRE (luciferasa) y con el control pON (β-galactosidasa). 16 h post-transfección, las células fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100) por 8 h. Los valores de actividad luciferasa se relativizaron a los respectivos valores de actividad β-galactosidasa. (n=3; promedio±SEM; NS = no significativo; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). **(D)** Las poblaciones clonales MKN45 sh-Scr C2 y MKN45 sh-HIF-1α C7 fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100) por 4 h. Se evaluaron los niveles proteicos de HIF-1α y β-actina por western blot (n=1).

Una vez obtenidas y caracterizadas las líneas celulares a utilizar, se procedió a desarrollar los experimentos diseñados para evidenciar un posible papel de HIF-1 α en los efectos de arresto del ciclo celular promovidos por *H. pylori* mostrados previamente en la Figura 11. Para esto, células MKN45 sh-Scr (C2) y MKN45 sh-HIF-1 α (C7) fueron infectadas a una MOI de 100 por 24 h. Como se puede observar, ambas líneas celulares presentaron un aumento del porcentaje de células en fase G0/G1 al ser infectadas con *H. pylori*, sin embargo, las células MKN45 sh-HIF-1 α (C7) mostraron un notorio menor efecto (Figuras 24A, 24B y 24C). Este menor aumento de células en la fase G0/G1 fue acompañado por un mayor porcentaje de células en la fase S, donde se diferenció significativamente del porcentaje de células MKN45 sh-Scr (C2) en esta misma fase (Figuras 24A, 24B y 24C). Finalmente, ambas líneas presentaron una disminución similar en la fase G2/M luego de la infección, así como un leve aumento de la proporción de células en la población subG0/G1, considerada apoptótica (Figuras 24A, 24B y 24C).

Para evaluar si la diferencia en la distribución del ciclo celular podría estar acompañada por cambios en los niveles de proteínas del ciclo celular, evaluamos los niveles de ciclina D1, importante para la progresión desde la fase G1 hacia la fase S. Para ello, las células MKN45 sh-Scr (C2) y MKN45 sh-HIF-1 α (C7) fueron infectadas a una MOI de 100 por 8 y 24 h. Los resultados muestran que a las 24 h de infección, los niveles de ciclina D1 decaen en ambas líneas celulares, pero dicha caída es menos dramática en aquellas que carecen de HIF-1 α . Además, las células MKN45 sh-HIF-1 α (C7) muestran un aparente mayor nivel basal de dicha ciclina comparado con las células control (Figura 24D). Ambos resultados, a saber, cambios en el ciclo celular y niveles de ciclina D1, sugieren que el silenciamiento de HIF-1 α facilita el progreso hacia la fase S del ciclo en células gástricas infectadas con *H. pylori*.

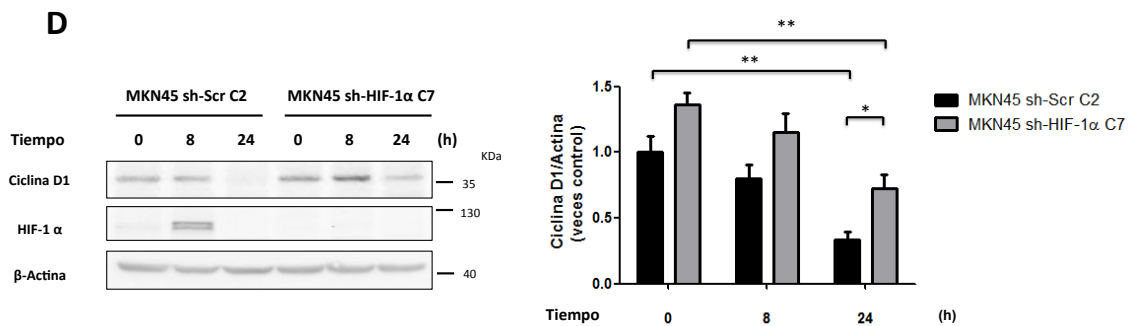
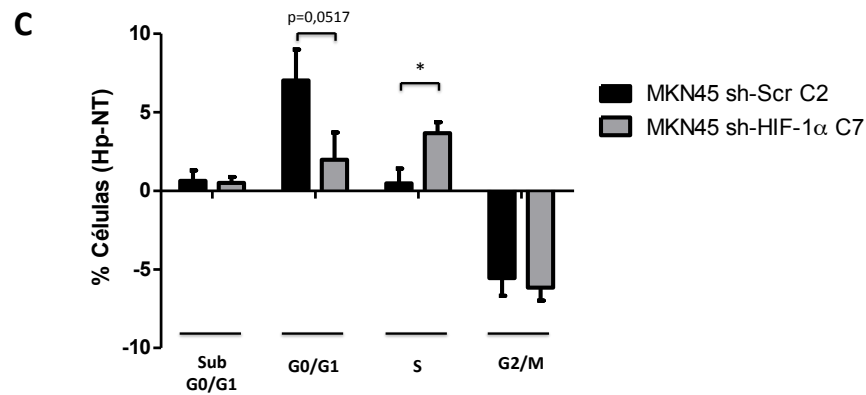
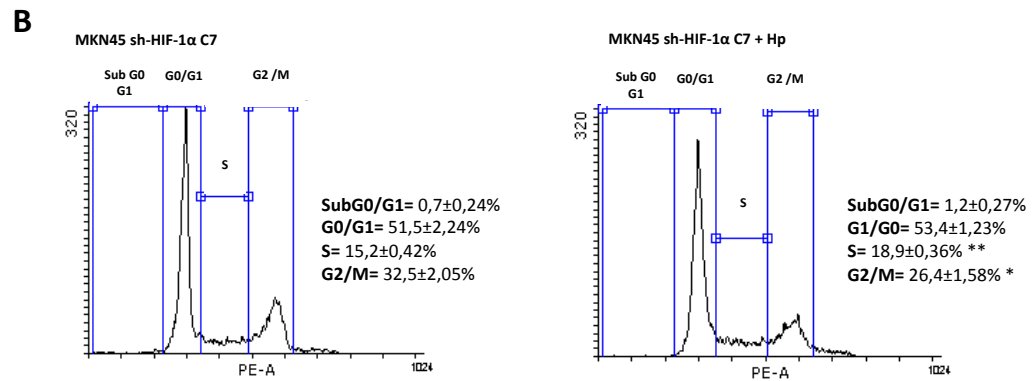
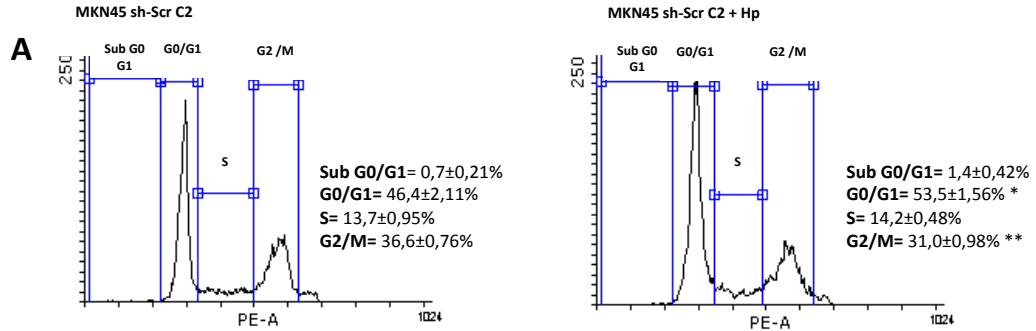


Figura 24. Papel de HIF-1 α en el arresto del ciclo celular promovido por *H. pylori*

Células MKN45 sh-Scr (C2) o MKN45 sh-HIF-1 α (C7) fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100) por 24 h y analizadas para ciclo celular mediante citometría de flujo. **(A y B)** Perfiles de citometría para células MKN45 sh-Scr (C2) y MKN45 sh-HIF-1 α (C7) no tratadas e infectadas (+Hp), con sus respectivos valores porcentuales de células en cada etapa del ciclo (n=4; promedio \pm SEM; *p<0,05; **p<0,01). **(C)** Para cada línea celular se representó la diferencia entre el (% de células infectadas - % de células no tratadas) en cada etapa de ciclo (promedio \pm SEM; n=4; *p<0,05). **(D)** Células MKN45 sh-Scr (C2) o MKN45 sh-HIF-1 α (C7) fueron infectadas con *H. pylori* a una MOI de 100 por 8 y 24 h. Se evaluaron los niveles proteicos de ciclina D1, HIF-1 α , y β -actina por western blot. Se determinaron los niveles relativos de ciclina D1 (n=4; promedio \pm SEM; *p<0,05; **p<0,01).

Para darles mayor perspectiva a los efectos observados en el ciclo celular, se propuso evaluar si estos cambios se reflejan en la viabilidad celular luego de la infección con *H. pylori*. Para esto, se midió viabilidad celular por ensayo de MTS, que estima la viabilidad de las células a partir de la medición de la capacidad reductora derivada de su metabolismo celular, y a través de conteo celular por exclusión de azul de tripán en células MKN45 sh-Scr (C2 y C3) y MKN45 sh- HIF-1 α (C7 y C11) infectadas con *H. pylori* a una MOI de 100 por 24 h. Los resultados indican que la infección, en términos de viabilidad, afecta a todas las sublíneas celulares por igual, sin haber diferencias significativas entre células que expresan o no HIF-1 α (Figura 25A y 25B). Un fenómeno similar se observó a través del ensayo de MTS a las 8 h de infección (Figura Anexa 1).

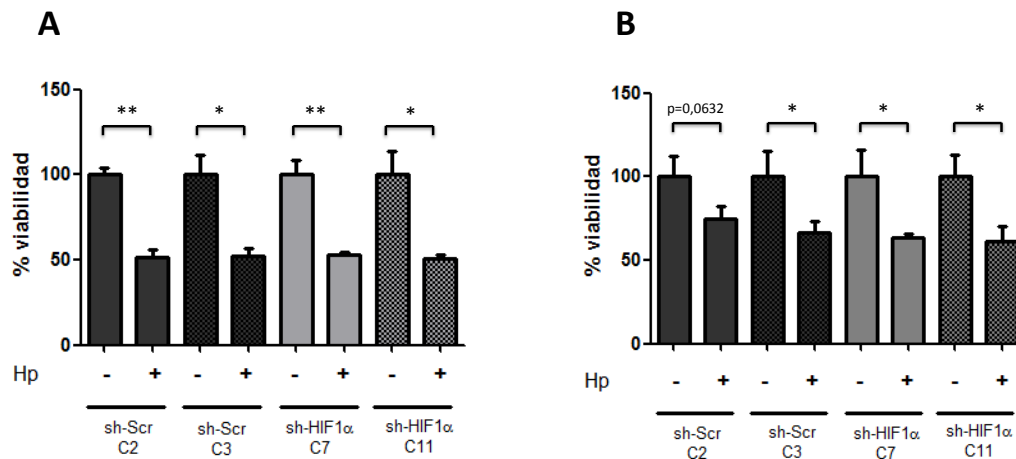


Figura 25. Papel de HIF-1 α en la viabilidad de células gástricas infectadas con *H. pylori*

Las líneas celulares establemente transfectadas MKN45 sh-Scr (C2 y C3) o MKN45 sh-HIF-1 α (C7 y C11) fueron infectadas con *H. pylori* 26695 a una MOI de 100 por 24 h. Se determinó viabilidad celular mediante el reactivo MTS (**A**) o por conteo celular por exclusión de azul de tripán (**B**) (n=3; promedio \pm SEM; *p<0,05; **p<0,01).

Debido a que los efectos de HIF-1 α sobre el ciclo celular son derivados de una acción no canónica descrita para la proteína, independiente de su papel como factor transcripcional, se prosiguió a determinar si, además de su acción no transcripcional, en nuestro modelo de estudio HIF-1 α cumple con su funcionalidad clásica. Con esta finalidad, se evaluó el efecto de la proteína sobre la expresión de genes que clásicamente se han sindicado como blancos de ella. Para estudiar esto, se recurrió a los genes cuyos mRNA se vieron afectados por la infección con *H. pylori* en los experimentos anteriores, estos son, el mRNA de GLUT-1 y el de VEGF-A. Así, se procedió a evaluar los niveles de dichos mRNA en células MKN45 sh-Scr (C2) y MKN45 sh-HIF-1 α (C7) infectadas con *H. pylori* a una MOI 100 por 8 y 24 h (Figura 26A y 26B). Como indican los resultados, el aumento del mRNA de GLUT-1 promovido por

H. pylori se vio disminuido en las células en que se ha silenciado HIF-1 α sólo a las 8 h de infección. Por su parte, los niveles del mRNA de VEGF-A tienden a disminuir en células *knockdown* para HIF-1 α al mismo tiempo de infección, pero no de forma significativa. Para ambos mRNA se obtuvo que a las 24 h de infección sus niveles relativos fueron estadísticamente equivalentes, independiente de la expresión de HIF-1 α (Figura 26A y 26B). Esto sugiere que, si bien HIF-1 α tiene incidencia en la inducción temprana del mRNA de GLUT-1 por *H. pylori*, a mayores tiempos parece no afectar los niveles del mensajero. Por su parte, aunque el mRNA de VEGF-A pareciera presentar un comportamiento similar, en términos estrictos sus cambios a los distintos tiempos de infección no son afectados por HIF-1 α .

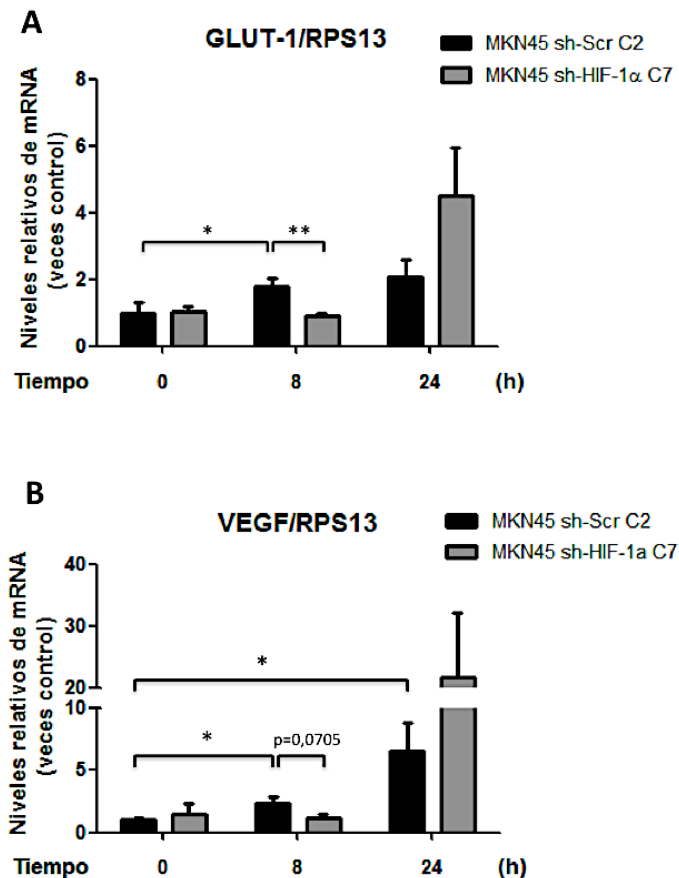


Figura 26. Papel de HIF-1 α en la promoción de la expresión de GLUT-1 y VEGF-A inducida por *H. pylori*

Células MKN45, MKN45 sh-Scr (C2) y MKN45 sh-HIF-1 α (C7) fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100) por 8 y 24 h. Se evaluaron los niveles del mRNA de GLUT-1, de VEGF-A y de RPS13. Se determinaron los niveles relativos de los mRNA de GLUT-1 (A) y de VEGF-A (B) (promedio \pm SEM; n=3, *p<0,05; **p<0,01).

Para complementar este resultado *in vitro*, se hizo un análisis bioinformático con el fin de evaluar si la infección con *H. pylori* induce la expresión de algunos genes descritos como blancos de HIF-1 α en la mucosa gástrica. Para esto, se utilizó la librería GSE27411 que contiene datos de mRNA de diversos genes en 9 muestras antrales, 3 correspondientes a sujetos normales (N), 3 a pacientes infectados con *H. pylori* que presentan una gastritis no atrófica (NAG) y 3 a pacientes con gastritis atrófica (AG). En esta ocasión, se comparó solamente las muestras NAG con las N. Como se puede observar en los datos obtenidos, algunos de los genes estudiados aumentaron y otros disminuyeron su expresión en pacientes que presentan infección con *H. pylori*, pero ninguno de ellos fue afectado de manera significativa (Tabla 3).

En conjunto, los datos de mRNA de GLUT-1 y VEGF-A *in vitro* y el análisis bioinformático de muestras de pacientes sugieren que la acción transcripcional de HIF-1 α no sería especialmente relevante en la infección con *H. pylori*.

En resumen, los datos obtenidos en el Objetivo Específico 3 muestran que *H. pylori* promueve un arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 de manera parcialmente dependiente de HIF-1 α , pero que esta acción no se refleja en un cambio sustancial de la viabilidad luego de 24 h de infección. Respecto a la función transcripcional de la proteína, los niveles de mRNA de la GLUT-1 nos muestran que, en este caso particular, pareciera tener relevancia en su aumento sólo a tiempos temprano de infección con la bacteria, pero que los niveles observados a tiempos mayores de estímulo no dependen de HIF-1 α . Un efecto similar se observó para los niveles de mRNA de VEGF-A. Por lo demás, muestras antrales de paciente muestran que la expresión de genes relacionados con la acción de HIF-1 α no presentan un cambio significativos en sujetos infectados con *H. pylori*.

Función biológica	Gen	Proteína	Veces de cambio (log2)	Valor p
Angiogénesis	CXCL12	Factor 1 derivado del estroma	0,606	0,105
	ANGPT1	Angiopietina-1	-0,164	0,618
	VEGFA	Factor de crecimiento endotelial A	-0,360	0,188
Metabolismo glicolítico	LDHA	Lactato deshidrogenasa A	0,380	0,296
	PGK1	Quinasa 1 de fosfoglicerato	0,357	0,165
	SLC2A1	Transportador de glucosa 1	0,435	0,107
	PDK1	Quinasa 1 de la deshidrogenasa de piruvato	0,354	0,193
Sobrevida	BCL2L1	Bcl-xL	-0,189	0,402
	BIRC5	Survivina	0,472	0,081
	BCL2	Bcl-2	-0,055	0,804
Transición epitelio-mesénquima	CDH1	E-cadherina	-0,099	0,723
	ZEB2	ZEB2	0,346	0,222
	ZEB1	ZEB1	-0,143	0,496
	TWIST1	Twist	-0,096	0,696
	SNAI1	Snail	0,435	0,107
Adquisición fenotipo célula troncal	NANOG	Nanog	0,196	0,408
	POU5F1	Oct-4	-0,196	0,331
	SOX2	Sox2	-0,206	0,381

Tabla 3. Expresión de genes blancos de HIF-1 α en muestras antrales de pacientes infectados con *H. pylori*

Análisis de expresión diferencial de genes partir de los datos contenidos en la librería GSE27411. Se clasificó los genes según su función biológica. Para cada gen se indica las veces de cambio en la expresión (en escala logarítmica 2) de las muestras de pacientes infectados respecto a voluntario sano, así como el valor p correspondiente a esa diferencia. Se consideró estadísticamente significativo una valor p<0,05.

O.E.4. Determinar el factor de virulencia de *H. pylori* involucrado en la inducción de HIF-1 α en células gástricas humanas

Para lograr identificar el factor de virulencia de *H. pylori* responsable de la inducción de HIF-1 α , primero se evaluó el efecto de la bacteria y de sus componentes bacterianos aislados para definir cuál de ellos sería necesario para inducir la proteína. Así, para evaluar el efecto de los componentes de la superficie bacteriana se utilizó la bacteria muerta por calor (HK), y para evaluar el efecto de los factores solubles que la bacteria libera al medio se utilizó el sobrenadante del medio de cultivo bacteriano (SN). De este modo, células MKN45 fueron tratadas con *H. pylori* a una MOI de 100, con una cantidad equivalente de HK, o con una cantidad equivalente de SN por 8 h. Como control del SN, se utilizó medio de cultivo bacteriano sin inóculo de bacteria. Como muestran los resultados, sólo la infección directa con *H. pylori* fue capaz de inducir HIF-1 α , en cambio HK fue incapaz de lograrlo. De manera interesante, SN no sólo no indujo un aumento de la proteína, sino que disminuyó sus niveles por bajo los niveles basales, a la vez que aumentó relevantemente los niveles de p-S473-Akt (Figura 27A). Se observó el mismo comportamiento para HIF-1 α frente a los distintos componentes bacterianos en un experimento preliminar a las 4 h de infección (Figura Anexa 2). Además, se analizó la actividad transcripcional de HIF-1 mediante ensayo de reportero de luciferasa en células MKN45 sometidas a los mismos estímulos por 8 h. Como se puede observar, sólo la infección directa con *H. pylori* fue capaz de promover la actividad luciferasa derivada de la inducción de HIF-1 α : ni HK ni SN promovieron su actividad transcripcional (Figura 27B).

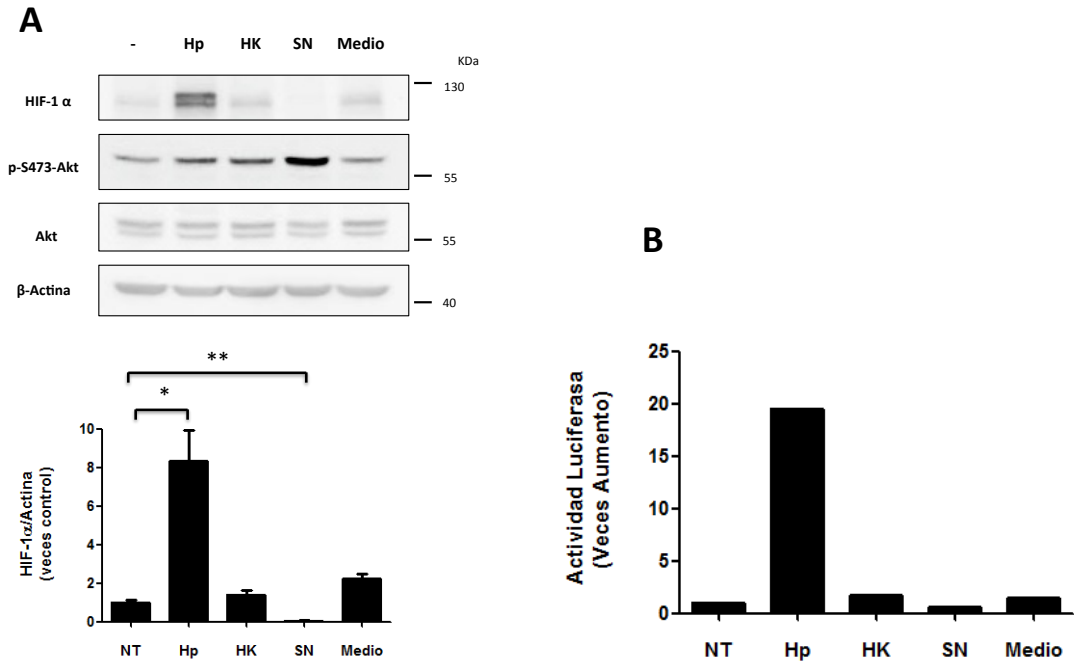


Figura 27. Efecto de los componentes bacterianos de *H. pylori* sobre los niveles de HIF-1 α y la actividad transcripcional de HIF-1

(A) Células MKN45 fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100), tratadas con la bacteria muerta por calor (HK) o con el sobrenadante del cultivo bacteriano (SN) por 8 h. Se utilizó el medio de cultivo bacteriano sin *H. pylori* como control para SN. Se evaluaron los niveles proteicos de HIF-1 α , p-S473-Akt, Akt total y β -actina por western blot (promedio \pm SEM; n=3; *p<0,05; **p<0,01). **(B)** Células MKN45 fueron co-transfectadas con el plasmidio reportero pGL3-HRE (luciferasa) y con el control pON (β -galactosidasa). 16 h post-transfección, las células fueron tratadas con la bacteria muerta por calor (HK) o con el sobrenadante del cultivo bacteriano (SN) por 8 h. Se utilizó el medio de cultivo bacteriano sin *H. pylori* como control para SN. Los valores de actividad luciferasa se relativizaron a los respectivos valores de actividad β -galactosidasa (n=1).

Posteriormente, se procedió a detectar el factor de virulencia de *H. pylori* involucrado en la inducción de HIF-1 α . Considerando el resultado anterior, donde se observó que es necesaria la interacción directa entre la bacteria y la célula gástrica para que HIF-1 α sea inducida, se determinó estudiar la acción de algún factor de virulencia que efectivamente requiera de esa interacción para ejercer su función sobre la célula hospedera. Dentro de aquellos que cumplen dicho requisito, la citotoxina CagA es la más ampliamente descrita para la infección con *H. pylori*, y para cuya actividad requiere, primero que todo, ser inyectada directamente en la célula a través del T4SS de la bacteria.

Para probar si el factor de virulencia CagA está involucrado en la inducción de HIF-1 α por *H. pylori*, se utilizaron dos cepas de la bacteria y sus respectivas mutantes isogénicas $\Delta cagA$: la cepa 84-183, cuya mutante fue generada y descrita por Tummuru *et al*; y la cepa 26695, cuya mutante fue generada en este estudio (ver Materiales y Métodos). Ambas cepas y sus respectivas mutantes isogénicas fueron caracterizadas en términos de la expresión de CagA en la Figura 28.

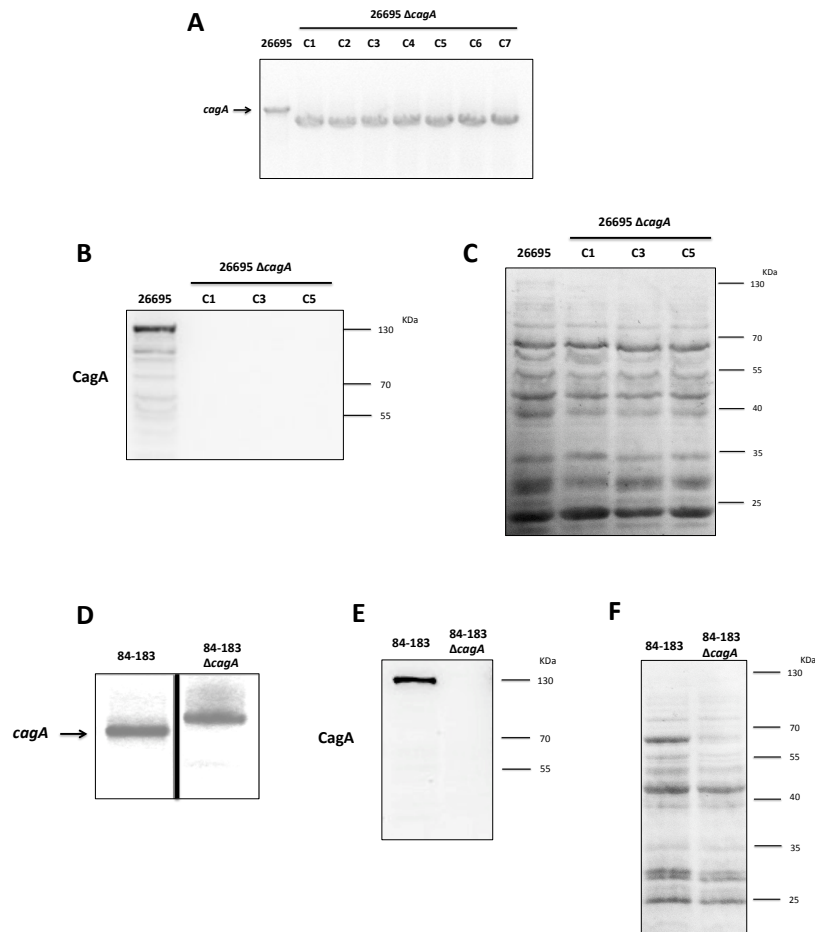


Figura 28. Caracterización de cepas de *H. pylori* mutantes para el factor de virulencia CagA

(A) La cepa 26695 de *H. pylori* fue mutada según se indica en Materiales y Métodos 4.1. obteniéndose 7 clones de la mutante isogénica, que fueron sembrados y cosechados desde placas de cultivo después de 24 h de crecimiento para extraer el DNA genómico. A partir de éste, se amplificó la secuencia *cagA* utilizando los partidores CagAF y CagAR descritos en la Tabla 1. (B y C) La cepa 26695 de *H. pylori* y su mutante isogénica $\Delta cagA$ (clones C1, C3 y C5) fueron cosechadas desde placas de cultivo después de 24 h de crecimiento y luego fueron lisadas para obtener el extracto total de proteínas. Se analizó por western blot la presencia de la proteína CagA y por tinción con Rojo Ponceau el total de proteínas. (D) La cepa 84-183 de *H. pylori* y su mutante isogénica $\Delta cagA$ fueron cosechadas desde placas de cultivo después de 24 h de crecimiento y luego se extrajo el DNA genómico. A partir de éste, se amplificó la secuencia *cagA* utilizando los partidores CagAF y CagAR descritos en la Tabla 1. (E y F) *H. pylori* 84-183 y su mutante isogénica $\Delta cagA$ fueron cosechadas desde placas de cultivo después de 24 h de crecimiento y luego fueron lisadas para obtener el extracto total de proteínas. Se analizó por western blot la presencia de la proteína CagA y por tinción con Rojo Ponceau el total de proteínas.

Una vez caracterizadas las cepas bacterianas y sus mutantes isogénicas $\Delta cagA$, se procedió a analizar, en primera instancia, el efecto de CagA sobre la actividad transcripcional de HIF-1 α , utilizando para esto la cepa 84-183 de *H. pylori* y su mutante isogénica $\Delta cagA$. Como se puede apreciar en los resultados, para esta cepa, sólo la bacteria nativa fue capaz de aumentar la actividad luciferasa derivada de la inducción de HIF-1 α , no así la bacteria carente de CagA (Figura 29A y 29B).

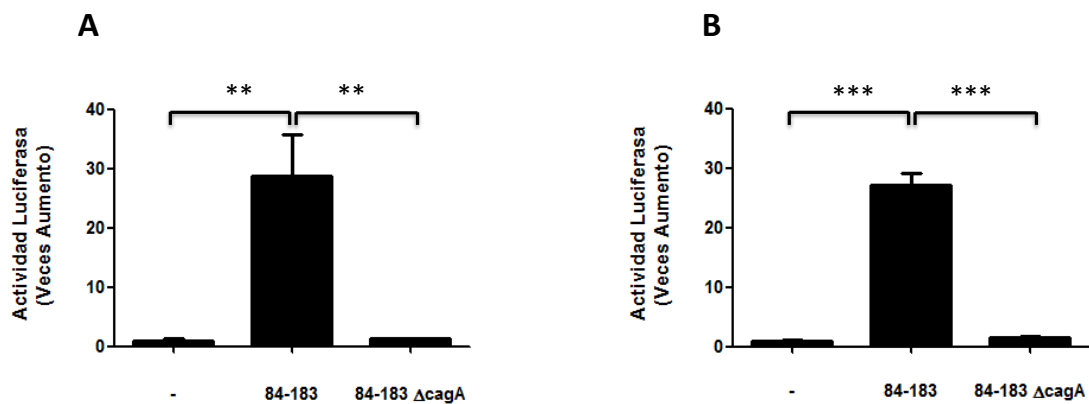


Figura 29. Efecto de *H. pylori* 84-183 y su mutante isogénica $\Delta cagA$ sobre la actividad transcripcional de HIF-1

Células MKN45 (**A**) o AGS (**B**) fueron co-transfectadas con el plasmidio reportero pGL3-HRE (luciferasa) y con el control pON (β -galactosidasa). 16 h post-transfección, las células fueron infectadas con *H. pylori* 84-183 o con su mutante isogénica $\Delta cagA$ (MOI 100) por 8 h. Los valores de actividad luciferasa se relativizaron a los respectivos valores de actividad β -galactosidasa (n=3; promedio \pm SEM; **p<0,01; ***p<0,001).

A partir de este resultados, se prosiguió a analizar el efecto de la mutante $\Delta cagA$ isogénica para la cepa 26695 de *H. pylori*, mutante generada en nuestro laboratorio durante el transcurso de este trabajo. Como se ve en un experimento preliminar, ninguno de los clones elegidos para la mutante fue capaz de prevenir la inducción de HIF-1 α promovida por *H. pylori* nativa, así

como tampoco fue capaz de prevenir la actividad transcripcional evaluada por ensayo de reportero (Figura 30A y 30B).

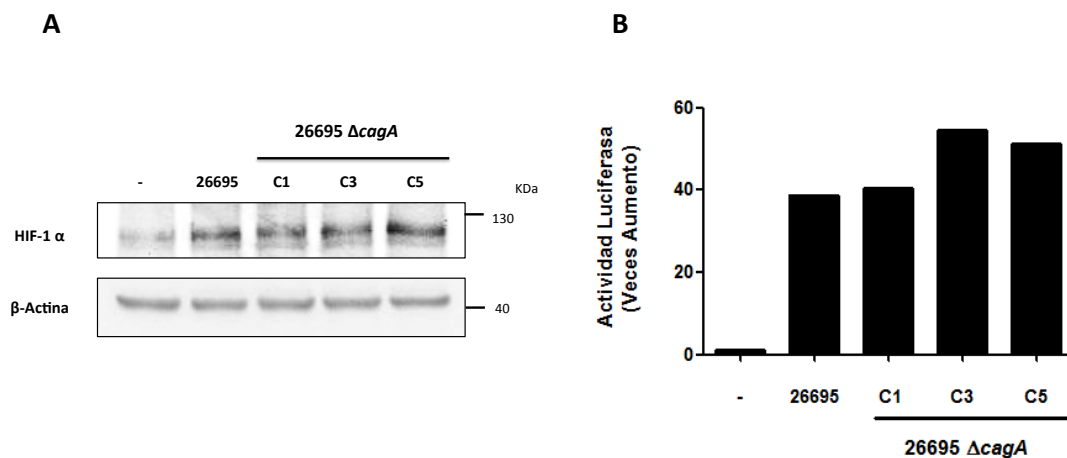


Figura 30. Efecto de *H. pylori* 26695 $\Delta cagA$ sobre los niveles de HIF-1 α y la actividad transcripcional de HIF-1

(A) Células MKN45 fueron infectadas con *H. pylori* 26695 o con su mutante isogénica $\Delta cagA$ (C1, C3 y C5) (MOI 100) por 4 h. Se evaluaron los niveles proteicos de HIF-1 α y β -actina por western blot. (n=1). **(B)** Células MKN45 fueron co-transfectadas con el plasmidio reportero pGL3-HRE (luciferasa) y con el control pON (β -galactosidasa). 16 h post-transfección, las células fueron infectadas con *H. pylori* 26695 o con su mutante isogénica $\Delta cagA$ (C1, C3 y C5) (MOI 100) por 8 h. Los valores de actividad luciferasa se relativizaron a los respectivos valores de actividad β -galactosidasa (n=1).

Finalmente, en busca de otros factores de virulencia que podrían estar asociados a la inducción de HIF-1 α , las células fueron infectadas con *H. pylori* 26695 nativa y con las mutantes isogénicas $\Delta vacA$, Δggt y Δlps por 4 h para medir la inducción de HIF-1 α y por 8 h para medir su actividad transcripcional a través del ensayo de reportero (Figura 31A y 31B). Los resultados indican que ninguno de los factores de virulencia analizados tiene incidencia sobre la inducción de HIF-1 α por *H. pylori*, lo que concuerda con los datos obtenidos a

partir de los componentes bacterianos, ya que VacA y GGT son proteínas solubles, por lo tanto, contenidas en SN, y LPS es un glicolípido que se encuentra en la mayor parte de la superficie de la bacteria, por lo tanto, se encuentra en los extractos de HK.

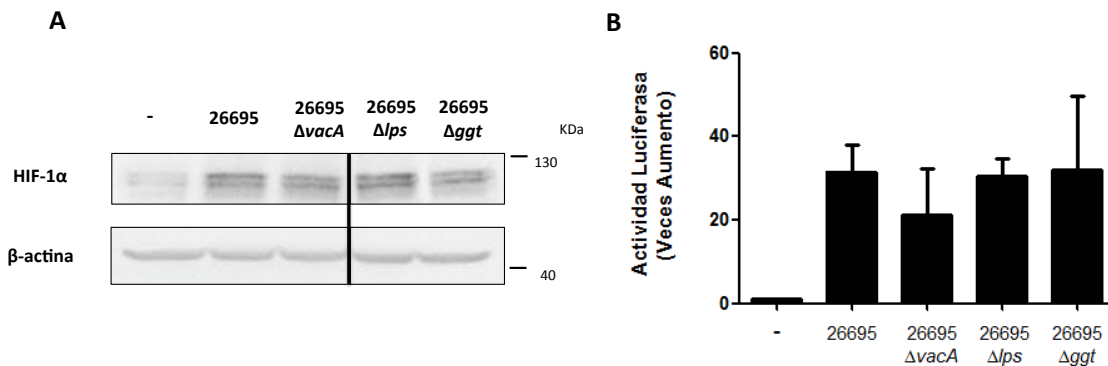


Figura 31. Efecto de los factores de virulencia de *H. pylori* sobre los niveles de HIF-1 α y la actividad transcripcional de HIF-1

(A) Células MKN45 fueron infectadas con *H. pylori* 26695 o con sus mutantes isogénicas $\Delta vacA$, Δlps o Δggt (MOI 100) por 4 h. Se evaluaron los niveles proteicos de HIF-1 α y β -actina por western blot. (n=1). **(B)** Células MKN45 fueron co-transfectadas con el plasmidio reportero pGL3-HRE (luciferasa) y con el control pON (β -galactosidasa). 16 h post-transfección, las células fueron infectadas con *H. pylori* 26695 o con sus mutantes isogénicas $\Delta vacA$, Δlps o Δggt (MOI 100) por 8 h. Los valores de actividad luciferasa se relativizaron a los respectivos valores de actividad β -galactosidasa (n=2; promedio \pm SD).

Aún cuando no se observó diferencias entre la inducción de HIF-1 α gatillada por la bacteria nativa y la obtenida por la mutante Δggt , gran interés genera el factor de virulencia GGT, puesto que es una de las enzimas de *H. pylori* asociadas a la generación de ROS, los que hasta ahora han sido sindicados como los principales responsables de inducción de HIF-1 α por la infección. En este sentido, caracterizamos los efectos que produce GGT en las células gástricas y éstos tratamos de asociarlos a una posible acción de HIF-1 α luego de la infección. Para esto, se evaluó la muerte celular apoptótica inducida

por *H. pylori* nativa y Δggt , obteniéndose que la mutante indujo menor apoptosis en las células gástricas respecto a lo logrado con la bacteria nativa, tanto en células MKN45 como en AGS (Figura 32A y 32B, incluidas en Valenzuela *et al*, 2013). Debido a esta diferencia, se postuló que la proteína GGT bacteriana tendría relación con la disminución inducida por *H. pylori* de la proteína antiapoptótica survivina. Se obtuvo que el sobrenadante de cultivo de *H. pylori* nativa promovió la disminución de los niveles de survivina, no así el sobrenadante de cultivo de la mutante *H. pylori* Δggt , sugiriendo que la proteína soluble GGT estaría involucrada en la disminución de esta proteína antiapoptótica (Figura 32C, incluida en Valenzuela *et al*, 2013). Finalmente, la proteína recombinante GGT de *H. pylori* confirmó la premisa, puesto que por sí sola fue capaz de reducir los niveles de survivina (Figura 32D, incluida en Valenzuela *et al*, 2013). Debido a este claro efecto de la enzima GGT de *H. pylori* sobre las células epiteliales gástricas, se procedió a investigar si HIF-1 α , al igual que GGT, podría participar en la caída de survivina por la infección. En este caso, se obtuvo que no hubo diferencias en la disminución de survivina promovida por la bacteria entre células MKN45 que expresan o no HIF-1 α (Figura 33). Cabe destacar que esto concuerda con las nulas diferencias observadas en la pérdida de viabilidad promovida por la infección entre células MKN45 sh-Scr y MKN45 sh-HIF-1 α , descartándose de este modo que HIF-1 α sea un efector río abajo de GGT de *H. pylori*, al menos en lo que respecta a sus efectos proapoptóticos.

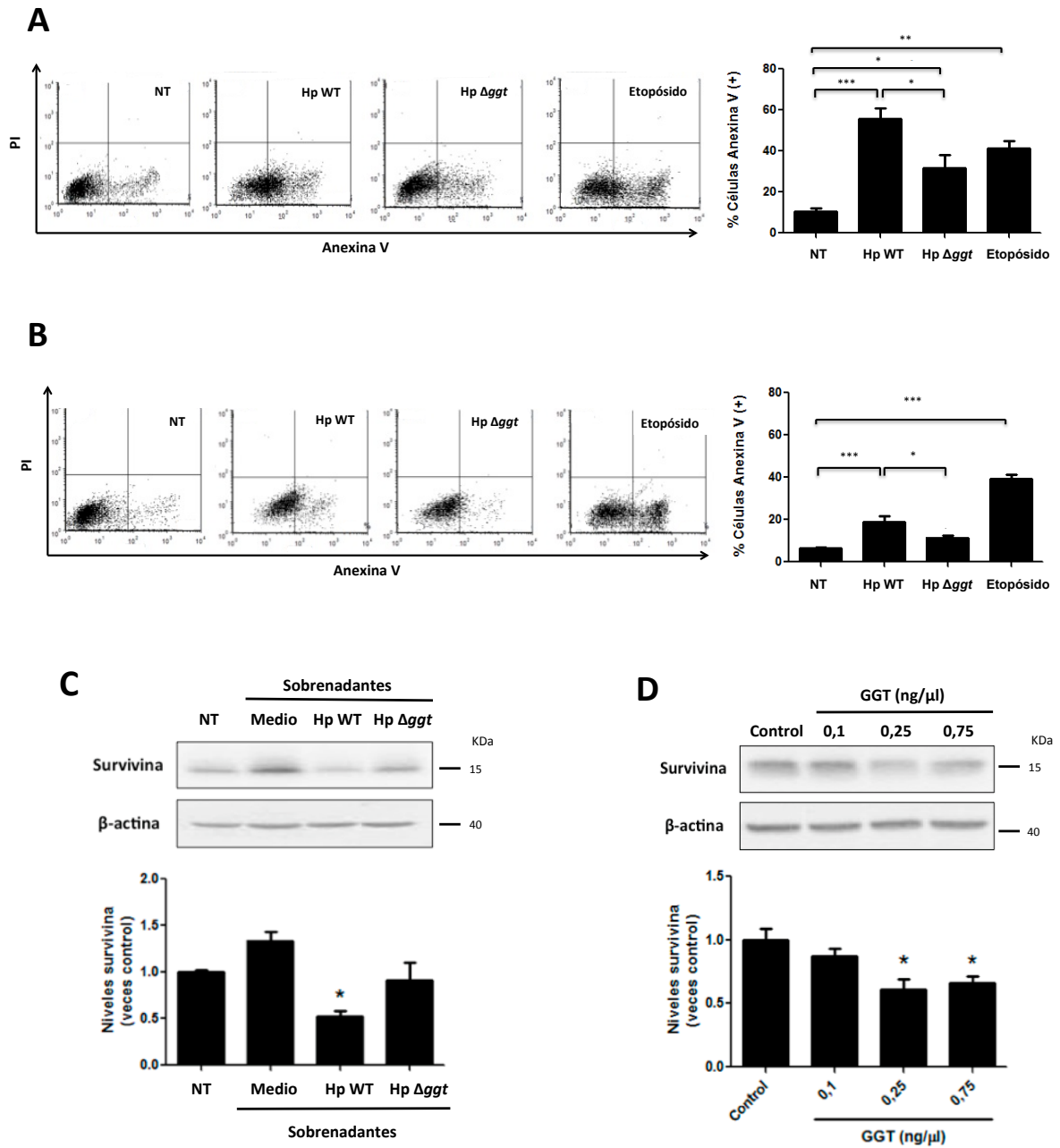


Figura 32. Efecto del factor de virulencia γ -glutamil transpeptidasa (GGT) de *H. pylori* en la apoptosis y la caída de survivina promovidas por la infección

Células MKN45 (A) y AGS (B) fueron infectadas con *H. pylori* 26695 nativa (Hp) o con su mutante isogénica Δggt (Hp Δggt) a una MOI de 100 por 24 h. Etopósido (50 μ M) por 24 h fue

utilizado como control positivo de apoptosis. Las células fueron analizadas por citometría de flujo. Se determinó el porcentaje de células positivas para Anexina V (promedio±SEM; n=4; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). **(C)** Células AGS fueron incubadas con sobrenadantes provenientes de Hp WT o de Hp Δ ggf (1:25) por 24 h. Como control, se utilizó medio no inoculado concentrado. Los niveles de survivina y de β -actina fueron analizados por Western blot. Se determinaron los niveles relativos de survivina (promedio±SEM; n=3; p<0,05). **(D)** Células MKN45 fueron tratadas con la enzima GGT recombinante de *H. pylori* en concentraciones de 0,1, 0,25 y 0,75 ng/ μ l por 24 h. Los niveles de survivina y de β -actina fueron analizados por Western blot. Se determinaron los niveles relativos de survivina (promedio±SEM; n=3; p<0,05).

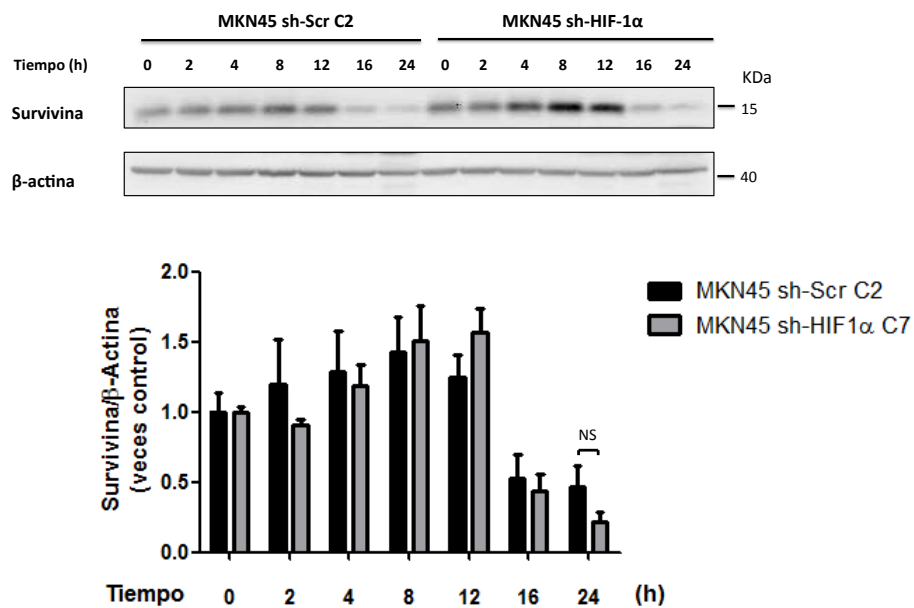


Figura 33. Efecto del silenciamiento de HIF-1 α sobre los niveles de survivina en células gástricas infectadas con *H. pylori*

Las líneas celulares establemente transfectadas MKN45 sh-Scr (C2) o MKN45 sh-HIF-1 α (C7) fueron infectadas con *H. pylori* 26695 a una MOI de 100 por los tiempos indicados. Se evaluaron los niveles proteicos de survivina y β -actina por western blot. Se determinaron los niveles relativos de survivina (n=3; promedio±SEM; NS= no significativo).

En resumen, los resultados obtenidos en el Objetivo Específico 4 indican que para la inducción de HIF-1 α promovida por *H. pylori* es necesaria la interacción directa entre células gástrica y bacteria, puesto que ni los componentes solubles liberados al medio ni los componentes contenidos en la superficie celular fueron capaces de aumentar los los niveles de esta proteína. Los resultados obtenidos con la mutante 84-183 Δ cagA apoyan la idea de la participación de la citotoxina inyectada en la inducción de HIF-1 α , sin embargo, los resultados obtenidos con 26695 Δ cagA la refutan, por lo tanto, estos datos no nos permiten concluir cuál es el papel que juega CagA en el incremento de los niveles de HIF-1 α por la infección con *H. pylori*.

DISCUSIÓN

H. pylori es el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico y esto puede ser explicado, en parte, por la acción que la bacteria ejerce directamente sobre las células epiteliales gástricas (Polk y Peek, 2010). De acuerdo con esta premisa, se ha descrito, tanto en modelos *in vitro* como en epitelio gástrico humano, que *H. pylori* es capaz de aumentar los niveles y/o la actividad de numerosas proteínas relevantes para la carcinogénesis, entre ellas, HIF-1 α (Park *et al*, 2003; Griffiths *et al*, 2007; Battacharayya *et al*, 2010; Kang *et al*, 2014). Tal como en esos reportes, en el presente trabajo se obtuvo que *H. pylori* promueve un aumento en los niveles de la proteína HIF-1 α , sin embargo, la respuesta celular que fue asociada a su inducción dista de lo que clásicamente se entiende como una respuesta procarcinogénica: en nuestro sistema, *H. pylori* impidió un normal desarrollo del ciclo celular de las células gástricas, con probables repercusiones en su proliferación, por restringir la transición desde la fase G1 a la fase S del ciclo de una manera parcialmente dependiente de HIF-1 α . El fenómeno de arresto celular en G1 por HIF-1 α ha sido recientemente descrito como un fenómeno no canónico ejercido por la proteína, independiente de su actividad transcripcional, aunque sólo ha sido reportado en el contexto hipóxico (Goda *et al*, 2003; Koshiji *et al*, 2004; Wen *et al*, 2010; Hubbi *et al*, 2013). Por esto, establecer una relación entre la acción no canónica de HIF-1 α y la infección de células gástricas por *H. pylori* es, sin duda, un mecanismo novedoso por el cual entender los efectos ejercidos por el patógeno sobre las células epiteliales gástricas. Así, el presente trabajo se enfocó en entender no sólo si esta relación ocurre bajo nuestras condiciones experimentales, sino también en estudiar los mecanismos celulares activados por la infección precedentes a la inducción de HIF-1 α y vislumbrar el o los

factor(es) de virulencia que pudiese(n) estar involucrado(s) en el aumento de la proteína.

1. Caracterización de la inducción de HIF-1 α por *H. pylori* en células gástricas humanas

Inicialmente, en esta investigación se caracterizó la respuesta de células gástricas a la infección en base a la inducción de HIF-1 α . Los resultados indican que *H. pylori* induce un incremento de los niveles de HIF-1 α , que la proteína se sitúa principalmente en el núcleo, y, más interesante aún, que este fenómeno ocurre de forma transitoria en el tiempo bajo nuestras condiciones experimentales, decayendo incluso bajo los niveles basales a tiempos prolongados de infección (Figuras 6 y 7). Este efecto temporal nunca antes se ha descrito en el contexto de la infección *in vitro* e, innegablemente, puede cambiar la manera de entender el valor real que la inducción de HIF-1 α tiene para el destino final de la célula infectada. En otras palabras, cualquiera que sea el papel que juegue HIF-1 α en la infección de células epiteliales gástricas con *H. pylori* sería limitado en el tiempo, por lo tanto, es necesario tomar precaución, en términos de temporalidad, respecto a las respuestas celulares que se le asocian al factor transcripcional, al menos en los ensayos *in vitro*.

El hecho que el aumento de los niveles de HIF-1 α en nuestro modelo sea transitorio no es un fenómeno aislado, puesto que en el contexto de hipoxia también se ha observado este mismo comportamiento para la proteína y se ha asociado a mecanismos de retroalimentación negativa. Así, se ha descrito que HIF-1 α , en su papel como factor transcripcional, es capaz de promover la transcripción de elementos que promueven su propia degradación, tal como ocurre con la enzima PHD, la que permite su hidroxilación y consecuente

ubiquitinación para ser degradada por el proteosoma (Henze y Acker, 2010), o como con RDD3, una proteína que es capaz de inactivar a mTOR, llevando a una menor traducción del transcrito de la proteína (Brocato *et al*, 2014). De esta forma, podría ser factible que, en el contexto de infección con *H. pylori*, la inducción temprana de HIF-1 α lleve posteriormente a una disminución de sus niveles por un mecanismo de retroalimentación negativa.

Relacionado con la inducción transitoria de HIF-1 α en nuestro sistema, sorprendentes resultaron los datos obtenidos al analizar la actividad transcripcional de HIF-1 mediante el ensayo de reportero de luciferasa: se observó un incremento de la actividad luciferasa de forma dependiente de la MOI y dependiente del tiempo (Figuras 8 y 9), aún cuando a tiempos mayores de infección HIF-1 α no estaba presente ni en la fracción nuclear ni el lisado celular completo (Figuras 6 y 7). Para esta aparente incongruencia, es necesario entender que el ensayo de reportero de luciferasa resulta acumulativo en el tiempo, ya que la vida media de la enzima en células mamíferas ha sido estimada en 3-4 h, lo que dificulta el análisis de la actividad del factor transcripcional frente a sus variaciones temporales (Leclerc *et al*, 2000). En busca de otra alternativa para evaluar la actividad transcripcional, se analizó la expresión de genes blancos de HIF-1 α en células infectadas con *H. pylori*, obteniéndose que, de los transcritos analizados, sólo los mRNA de GLUT-1 y VEGF-A aumentaron significativamente bajo nuestras condiciones experimentales, sin observarse, nuevamente, el decaimiento esperado a tiempos largos de infección conforme a lo ocurrido con HIF-1 α (Figura 10). En ese sentido, especial interés genera VEGF-A, ya que se observó un considerable incremento de los niveles de su transcrito a las 24 h de infección. Esto puede entenderse desde la lógica que la expresión de dicho gen no es únicamente dependiente de la acción del factor HIF-1, si no que hay otros que pueden contribuir a ello. De acuerdo con esto, en la literatura se ha reportado que la expresión de VEGF-A también puede ser comandada por la acción de β -

catenina, STAT3 y COX-2 (Easwaran *et al*, 2003; Hoben *et al*, 2004; Fernández *et al*, 2014), proteínas que, por lo demás, pueden ser activadas o inducidas por *H. pylori* (Suzuki *et al*, 2009; Tabassam *et al*, 2009; Xiong *et al*, 2014). Por otro lado, no hay antecedentes en la literatura que vinculen la infección con *H. pylori* y la inducción de la expresión de GLUT-1, o de otras enzimas glicolíticas, en células gástricas, de modo que este dato es, sin duda, una novedosa observación.

Finalmente, al evaluar los efectos de *H. pylori* sobre el ciclo de las células gástricas infectadas por 24 h, se observó un arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 (Figura 11), fenómeno anteriormente reportado por el grupo Shirin *et al* en células AGS infectadas (Shirin *et al*, 1999). Aunque otros han asociado la respuesta de *H. pylori* a un fenómeno contrario, es decir, progresión celular, es necesario destacar que en esas publicaciones se han utilizado factores de virulencia aislados del patógeno y no la bacteria completa (De Luca *et al*, 2003; Tavares y Pathak, 2015). Por tanto, nuestro resultado emula de mejor manera lo que ocurriría en las células gástricas frente a la infección con *H. pylori*.

En definitiva, la caracterización de HIF-1 α en el contexto de la infección con *H. pylori* nos indica que el aumento de los niveles de esta proteína es transitorio en el tiempo y de localización principalmente nuclear, sin embargo, al analizar su actividad transcripcional, las técnicas utilizadas, aunque sugieren una transcripción asociada a HIF-1 α , no lograron reproducir la temporalidad de los niveles de la proteína. Además, se observó que la infección produce una inhibición de la transición G1/S del ciclo celular, efecto que podría asociarse a la acción no transcripcional de HIF-1 α .

2. Papel de la vía PI3K/Akt/mTOR en la inducción de HIF-1 α por *H. pylori*

El hecho que HIF-1 α aumente frente a la infección en un primer período, pero luego decaiga a niveles sub-basales es congruente con la idea que la infección con *H. pylori* también es dual respecto a las respuestas que ejerce sobre las células epiteliales gástricas, a saber, aumento de la apoptosis, por un lado, y aumento de la proliferación y sobrevida celular, por otro (Jang y Kim, 2000; Mimuro *et al*, 2007). En ese sentido, los trabajos que han estudiado el efecto de *H. pylori* sobre células gástricas y que se han basado en modelos *in vitro* han demostrado que la apoptosis ocurre a largos tiempos de infección, en cambio, las respuestas de sobrevida y proliferación celular ocurren en períodos tempranos (Peek *et al*, 1999; Nagy *et al*, 2009; Valenzuela *et al*, 2010). Considerando esta información, en este trabajo se buscó asociar la inducción de HIF-1 α , temprana y transitoria en nuestro sistema, con vías de señalización tempranas descritas para la infección *in vitro*.

Como se indicó previamente, HIF-1 α es inducida clásicamente por hipoxia, sin embargo, existen otras vías independientes de oxígeno por las que puede aumentar sus niveles proteicos, entre ellas, vías asociadas a la activación de receptores tirosina quinasa. Respecto a esto último, se buscó evaluar si en nuestro contexto la vía de PI3K/Akt/mTOR estaría involucrada en la inducción de HIF-1 α derivada de la infección, dado que en nuestras condiciones experimentales la fosforilación de Akt (Ser473), reflejo de la actividad de PI3K, siguió un comportamiento cinético similar al del factor transcripcional (Figura 12). Basados en una estrategia de inhibición farmacológica, los resultados obtenidos sugieren que HIF-1 α es inducido por una vía de señalización que involucra a PI3K y a mTOR, pero en la que Akt tendría menor trascendencia (Figuras 13, 16 y 19). Cabe destacar que en nuestros resultados la inhibición de la proteína MEK no significó una prevención en la inducción de HIF-1 α promovida por *H. pylori* (Figura 22), por lo que se

puede descartar el aporte de dicha vía, también relacionada con la activación de mTOR, en los aumentos del factor transcripcional en nuestro modelo de estudio.

En la actualidad, algunos de los reportes relacionados con la inducción de HIF-1 α por *H. pylori* sugieren que el estrés oxidativo promovido por la bacteria permite la estabilización de este factor transcripcional (Park *et al*, 2003; Kang *et al*, 2014), pero no existen estudios que propongan una vía de señalización más desarrollada para este fenómeno. Sin desmedro de lo ya publicado, nuestra propuesta más bien complementa lo estudiado hasta ahora. Esto, ya que es ampliamente aceptado que las ROS participan en la señalización celular, entre otras formas, promoviendo la activación de diversas proteínas quinasas, entre ellas, EGFR, que permite la posterior activación de PI3K (Kamata y Hirata, 1999). Nuestro laboratorio ha determinado que ROS provenientes de *H. pylori* promueven la disminución de los niveles de survivina (Valenzuela *et al*, 2013), sin embargo, esta evaluación se hizo a tiempos prolongados de infección, por lo que determinar si estos ROS tendrían relación con una activación temprana de PI3K, que es cuando ocurre este fenómeno en nuestras condiciones experimentales, sería un punto interesante a evaluar para complementar lo esperado según la literatura, y además, ponderaría a las ROS como un nuevo actor en las ya previamente mencionadas acciones duales de la bacteria: temprana inducción de señales de sobrevida y tardía inducción de la apoptosis.

Como se mencionó previamente, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que, si bien la inducción de HIF-1 α por *H. pylori* fue principalmente dependiente de PI3K y mTOR, Akt tuvo sólo una implicancia parcial en este efecto. Respecto a este punto, otros estudios han demostrado que la vía PI3K puede derivar en una activación de blancos de mTOR independientemente de Akt. Un estudio reciente demostró que en células de melanoma que presentan la mutación BRAF^{V600E}, activadora de la vía Ras/MEK/ERK, la inhibición

farmacológica de dicha vía o de la proteína PI3K impidieron la activación de blancos de mTOR y con ello, la proliferación celular, sin embargo, la inhibición de Akt no surtió el mismo efecto, demostrando que, al menos en ese modelo, la activación de mTOR depende de ERK y PI3K, pero es independiente de Akt (Silva *et al*, 2015). Otros autores han demostrado, en un modelo de glioma, que la inhibición farmacológica de EGFR inhibe la activación de mTOR de una forma independiente de Akt y dependiente de PKC α , esto sólo en células que no presentan mutaciones que lleven a una pérdida de función de la fosfatasa de PI(3,4,5),P₃, PTEN; es decir, en células que no presentan una hiperactividad de la vía derivada de PI3K independiente del grado de activación de EGFR (Fan *et al*, 2009).

Es importante recalcar que la vía PI3K/Akt/mTOR ha sido descrita como una vía que promueve el aumento de los niveles de la proteína HIF-1 α por un incremento de la traducción de su transcrito. En la presente investigación no se estudió si esta es la forma por la que la vía propuesta lleve a un aumento de los niveles de la proteína, pero existen evidencias que apoyan esta idea. Se ha reportado que la infección con *H. pylori* promueve la activación de la vía PI3K/mTOR llevando a la inhibición del represor de la traducción eIF4E, lo que aumenta la traducción en las células gástricas infectadas. Cabe destacar que en esa publicación no se estudió el efecto de la inhibición directa de Akt sobre la vía propuesta (Sokolova *et al*, 2014). Además de esto, los resultados obtenidos en nuestro trabajo muestran que el aumento de la proteína HIF-1 α no correlaciona con un aumento de su transcrito (Figura 6C), lo que sugiere que *H. pylori* no estaría actuando a un nivel transcripcional para inducir un incremento en los niveles de la proteína.

El uso de los inhibidores farmacológicos de la vía PI3K/mTOR mostraron un efecto claro sobre la inducción de HIF-1 α en términos de la proteína, sin embargo, cuando se estudió la consecuencia de la inhibición de los distintos componentes de la vía propuesta sobre su actividad transcripcional, los

resultados fueron disonantes a lo observado para la proteína, a saber, inhibidores que revirtieron la inducción HIF-1 α , no reflejaron un mismo comportamiento para la actividad transcripcional evaluada mediante el ensayo de reportero de luciferasa (Figuras 14A y 20A). Nuevamente, el ensayo de reportero de luciferasa entregó resultados que no correlacionan con lo observado para los niveles del factor transcripcional. Para estos resultados en particular, el problema podría ser atribuible a respuestas inespecíficas, ya sea a la bacteria o a los inhibidores utilizados. La construcción HRE-luciferasa usada en nuestros ensayos está contenida en el vector pGL3, del que se ha reportado poca especificidad de respuesta en algunos estudios: algunos grupos de investigación independientes han informado que células transfectadas con el vector pGL3-básico, es decir, sin ningún elemento de respuesta que lo haga específico a la acción de algún factor transcripcional, han respondido con una inducción de la actividad luciferasa frente a la acción de diversos elementos, tales como el factor de transcripción del osteoblasto Cbfa1 (Thirunavukkarasu *et al*, 2000), los factores de transcripción Hand1 y Hand2 (Hong *et al*, 2002) andrógenos (Giannakis *et al*, 2003), estrógenos y corticoides (Dougherty y Sanders, 2005). Todos estos trabajos sugieren que existen elementos de respuesta crípticos en el vector pGL3 que pueden responder a otros factores y, así, alterar los resultados, obteniéndose falsos positivos. Este tipo de respuestas inespecíficas podrían explicar la incongruencia entre lo observado para la proteína HIF-1 α frente a la acción de los inhibidores de la vía PI3K/Akt/mTOR y lo observado para la actividad luciferasa. Por lo demás, este tipo de respuestas inespecíficas también podrían dar una explicación a la discordancia observada en nuestro primer objetivo, donde el seguimiento temporal de la actividad de HIF-1 no mostró relación con los niveles de proteína observados (Figura 9). Por todo esto, sería necesario realizar los controles necesarios en nuestras condiciones experimentales, de manera de evaluar si nuestro sistema está también sujeto a este tipo de respuestas inespecíficas, y si

las hay, evaluar otras formas más adecuadas de medir la actividad transcripcional de HIF-1.

En la búsqueda de otro método para evaluar la actividad transcripcional de HIF-1 frente a la inhibición de PI3K y mTOR, se midió los niveles de mRNA de VEGF-A y GLUT-1, ambos conocidos blancos de HIF-1 α . Al hacerlo de esta manera, se encontró que *H. pylori* fue capaz de aumentar los niveles de ambos mRNA, pero se observó otra discordancia frente a los resultados obtenidos para la proteína: ambos inhibidores, LY294002 y Rapamicina, incrementaron los niveles basales del mRNA de VEGF-A y GLUT-1 (Figuras 14B-C y 20B-C). En otros modelos de estudio se ha reportado que los niveles basales del mRNA de VEGF-A son aumentados por el tratamiento con LY294002 o con Rapamicina, esta última actuando a través de la activación de ERK (Clark *et al*, 2012; Liu *et al*, 2013). En cuanto a los efectos de los inhibidores sobre los niveles basales del transcrito de GLUT-1, no se encontró literatura que apoye nuestra observación. Independiente de lo anterior, la infección con *H. pylori* en presencia de dichos inhibidores fue incapaz de aumentar los ya elevados niveles de los mRNA analizados.

En resumen, los resultados obtenidos en este objetivo específico sugieren que *H. pylori* induce un aumento de los niveles de HIF-1 α a través de un mecanismo celular que involucra a PI3K y a mTOR, pero sólo parcialmente a Akt. Las técnicas utilizadas para analizar la actividad transcripcional de HIF-1, al igual que en el primer objetivo de esta tesis, si bien sugieren un aumento de la actividad transcripcional promovida por la bacteria, no fueron precisamente útiles para definir el efecto de la inhibición de PI3K/Akt/mTOR sobre las consecuencias transcripcionales de HIF-1 α .

3. Papel de HIF-1 α inducido por *H. pylori* sobre el arresto del ciclo celular promovido por la infección

Los objetivos específicos previos de este estudio han demostrado que *H. pylori* promueve la inducción de HIF-1 α de manera dependiente de PI3K y mTOR, sin embargo, no han podido demostrar fehacientemente la actividad transcripcional de la proteína, dada las incongruencias obtenidas respecto a sus niveles proteicos bajo las mismas condiciones experimentales. Frente a esto, se propuso estudiar si HIF-1 α en nuestro contexto es capaz de promover efectos asociados a su papel no transcripcional, a saber, arresto en la fase G1 del ciclo celular.

Aún cuando la vía PI3K/mTOR es asociada a sobrevida y proliferación celular, y a ella se adjudica en este trabajo la inducción de HIF-1 α por *H. pylori*, el efecto no transcripcional de la proteína está relacionado con una respuesta que difiere de lo esperado para la ruta precedente, es decir, arresto del ciclo celular, inhibición de la proliferación. Aunque pudiese parecer contradictorio, esto es discutible desde la perspectiva que *H. pylori* es capaz de promover respuestas disímiles como apoptosis y proliferación, progresión y arresto del ciclo celular en un mismo modelo, todo dependiendo de la temporalidad en la que estas respuestas se midan (Peek *et al*, 1999; Shirin *et al*, 1999). Si bien en nuestro modelo *H. pylori* promueve una inducción transitoria de HIF-1 α , es válido tratar de entender la función que podría cumplir este factor transcripcional como un elemento de transición desde las respuestas de progresión del ciclo celular hacia las de arresto celular, conforme con sus también disímiles efectos.

En ese sentido, en este estudio se encontró que el silenciamiento de HIF-1 α generó una tendencia a disminuir el arresto en fase G0/G1 promovido por *H. pylori* y, consecuente con esto, un aumento en el porcentaje de células en la fase S del ciclo celular, todo esto evaluado a 24 h de infección. Además, células gástricas que presentan o que carecen de HIF-1 α mostraron una tendencia

similar a disminuir el porcentaje de células en la fase G2/M, lo que sugiere un efecto adicional de *H. pylori* sobre la progresión del ciclo celular que sería independiente de HIF-1 α (Figura 24A y 24B). Finalmente, al comparar la viabilidad celular a 24 h de infección, se puede observar que este parámetro disminuyó en una magnitud similar en todas las sublíneas celulares evaluadas (Figura 25). Para esto, hay que considerar que mediante estos ensayos se está midiendo sólo el número de células vivas, sin tomar en cuenta los efectos que determinan este resultado final. De acuerdo con esto, se ha definido que una exposición prolongada a *H. pylori* promueve tanto arresto celular como muerte apoptótica (Shirin *et al*, 1999), por lo tanto, ver diferencias claras en cuanto a la viabilidad por disminuir un factor que promueve arresto del ciclo celular, HIF-1 α en este caso, puede ser algo improbable, al menos con las técnicas aquí utilizadas. Por lo mismo, serían más apropiados algunos ensayos adicionales que permitan evaluar síntesis de DNA para definir diferencias derivadas de las observadas aquí en el ciclo celular.

Como se mencionó anteriormente, la infección con *H. pylori* promovió una disminución del porcentaje de células distribuidas en la fase G2/M del ciclo celular. Esto correlaciona con el hecho que survivina, proteína antiapoptótica que incrementa sus niveles en la fase G2/M del ciclo celular, decae luego de 24 h de infección con *H. pylori* (Li *et al*, 1998; Giodini *et al*, 2002, Torres *et al*, 2006; Valenzuela *et al*, 2010). Aún más, en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en la caída de los niveles de survivina promovida por la bacteria al comparar células control y células *knockdown* para HIF-1 α (Figura 33), así como tampoco en el porcentaje de células en la fase G2/M (Figura 24). Así, los resultados asociados a la caída de los niveles de survivina promovidos por *H. pylori* apoyan la idea que el patógeno promueve una disminución de la distribución celular en fase G2/M de forma independiente de HIF-1 α .

Consecuente con los efectos previamente descritos acerca de la infección con *H. pylori* sobre el ciclo celular, en este estudio se determinó que la

proteína ciclina D1, implicada en la progresión del ciclo celular desde la fase G1 a S, disminuye sus niveles de manera significativa a las 24 de infección, tanto en células control como en *knockdown* para HIF-1 α , sin embargo, los niveles finales de ciclina D1 en ésta última fueron mayores a los obtenidos para las células control (Figura 24D). Estos datos están en conformidad con el hecho que el efecto del silenciamiento de HIF-1 α sobre el ciclo celular en nuestro modelo fue sólo parcial, por tanto, no es sorprendente obtener también una disminución en los niveles de esta ciclina en células que carecen del factor transcripcional. No obstante lo observado en nuestra investigación, Shirin *et al* han descrito que el arresto celular promovido por *H. pylori* está comandado por el aumento de los niveles de la proteína inhibidora de CDK, p21^{cip1}, en cambio, ciclina D1 aumentó sus niveles a 24 h de infección. A diferencia de nuestro trabajo, la investigación citada mantuvo las células en privación de suero por 48 h para luego adicionarlo en presencia o ausencia de la bacteria. Esta sincronización, sin duda, afectaría la expresión de las proteínas del ciclo celular respecto a lo observado en un modelo de células no sincronizadas, que fue lo utilizado en nuestro trabajo. De hecho, al reproducir ese protocolo de sincronización, luego de 24 h con suero se observó un marcado aumento de células en la fase G2/M del ciclo, perfil de distribución muy distinto al obtenido para células no sincronizadas (dato no mostrado). De todas maneras, para nuestro interés, sería interesante evaluar qué ocurre con la proteína p21^{cip1} bajo nuestras condiciones experimentales, como una forma de buscar nuevos actores en la inhibición de la progresión del ciclo celular promovida por *H. pylori* y HIF-1 α .

De acuerdo con la progresión del ciclo celular, ciclina D1 es necesaria para la transición G1/S, ya que actúa como proteína reguladora de CDK4 y CDK6. Al formar los complejo ciclina D1/CDK4 y ciclina D1/CDK6 durante las etapas temprana a intermedia de la fase G1, permite la fosforilación e inactivación de la proteína Retinoblastoma (Rb), paso esencial para la

expresión de proteínas necesarias para la progresión hacia la fase S . Por esto, una disminución de los niveles de ciclina D1 afecta la transición G1/S del ciclo celular (Malumbres, 2011). Ahora, la disminución de los niveles de ciclina D1, ocurrida tanto por la entrada a la fase S del ciclo celular como por la inducida por diversos fármacos con potencial quimioterapéutico utilizados para prevenir la transición G1/S, está mediada por su ubiquitinación y posterior degradación proteosomal (Alao, 2007). Conforme con esto último, nuestro laboratorio ha determinado que *H. pylori* promueve degradación proteosomal de survivina (Valenzuela *et al*, 2013), pero no ha determinado si esto ocurre para otras proteína luego de la infección. Sería una posibilidad interesante entender si esta mayor degradación proteosomal podría afectar también a ciclina D1 y, de esa forma, explicar la disminución de esta proteína y el consecuente arresto del ciclo celular en G0/G1. Por lo demás, el daño al DNA por agentes genotóxicos ha demostrado promover la degradación proteosomal de ciclina D1 y arresto en G1 (Alao, 2007). De forma interesante, se ha reportado que *H. pylori* es capaz de causar daño al DNA (Toller *et al*, 2011), por lo que esto podría ser un gatillante para que la bacteria promueva la degradación de esta importante proteína necesaria para la transición G1/S. De la forma que sea el mecanismo por el que *H. pylori* lleve a la degradación de ciclina D1, los resultados obtenidos sugieren que HIF-1 α estaría colaborando en ese objetivo.

No obstante lo anterior, en el contexto de la hipoxia y sus efectos sobre el arresto del ciclo celular, sólo un grupo ha asociado este evento a la disminución de los niveles de ciclina D1 y, en ese caso, el arresto en la fase G1 fue promovido por HIF-1 α al intervenir directamente en el promotor del gen que codifica para ciclina D1, disminuyendo así la expresión de dicha proteína (Wen *et al*, 2010). En nuestro trabajo no se ha determinado el mecanismo por el que se obtuvo una disminución de los niveles de ciclina D1, por lo tanto, serían necesarios experimentos adicionales para definir si, tal como fue reportado para el contexto hipóxico, HIF-1 α en la infección con *H. pylori* estaría afectando

directamente la expresión de dicha proteína, o bien, como se especuló anteriormente, tendría un efecto a nivel de la degradación de la misma.

Al analizar los perfiles de ciclo celular, se evidenció que la población subG0/G1, comúnmente sindicada como población de células apoptóticas, no alcanzó los niveles esperados en las células gástricas infectadas con *H. pylori*, si se compara con la caída en la viabilidad obtenida bajo el mismo estímulo (Figuras 24 y 25). De todas maneras, es necesario destacar que los ensayos utilizados en este estudio para determinar viabilidad evalúan, en definitiva, la población celular viva, sin considerar qué fenómenos hayan contribuido al resultado final. Así, la menor viabilidad celular por *H. pylori* estará dada no sólo por la apoptosis promovida, sino también por el retardo del ciclo celular que llevará, en definitiva, a una menor proliferación de las células gástricas. No obstante esto, nuestro laboratorio ha demostrado previamente un aumento de la apoptosis inducida por la bacteria a través del marcaje de anexina V y por *laddering* de DNA (Valenzuela *et al*, 2010; Valenzuela *et al*, 2013), siendo posiblemente, técnicas más sensibles para esta determinación.

Frente a la participación de HIF-1 α en el retraso de la progresión del ciclo celular promovido por *H. pylori* descrito en este trabajo, es necesario considerar las limitaciones del modelo de estudio y, en particular, el comportamiento que sigue HIF-1 α luego de la infección. Primero, se demostró que, bajo nuestras condiciones experimentales, *H. pylori* indujo HIF-1 α de manera transitoria, por lo mismo, el efecto que puede ejercer esta proteína será transitorio en el tiempo; sin embargo, el análisis de ciclo celular se realizó a tiempos prolongados de infección, cuando ya no tenemos la proteína en el sistema. Considerando esto, podemos especular acerca de la ventana de tiempo en la que no contamos con HIF-1 α para ejercer el arresto celular, que en nuestro sistema ocurre al menos desde las 16 h de infección. Por lo mismo, cualquier efecto visualizado en los cambios de distribución del ciclo celular atribuibles a la acción de la proteína serán reflejo de lo ocurrido a tiempos tempranos de

exposición a la bacteria, pero éstos podrían ser atenuados durante la ventana en que ya no se cuenta con HIF-1 α en el sistema. Es por esto que encontrar cambios relevantes entre líneas control y sh-HIF-1 α puede ser limitado en nuestro modelo, tomando en cuenta que tiempos más tempranos de infección no serían apropiados para evaluar cambios en el ciclo celular, por la extensión de tiempo que requiere cada una de las etapas para su normal desarrollo. Por lo demás, una inducción sostenida de HIF-1 α , tal como ocurre en el epitelio gástrico infectado (Griffiths *et al*, 2007), podría ser un escenario donde se pudiese ver, efectivamente, diferencias en el número de células luego de la infección al comparar células control y células *knockdown* para la proteína, diferencia que aquí no pudo ser visualizada probablemente por la brevedad de los aumentos de HIF-1 α .

Por otro lado, la inducción transitoria de HIF-1 α por la infección con *H. pylori* tuvo un claro reflejo en su actividad transcripcional. Al evaluar el nivel de los transcritos de GLUT-1 y VEGF-A inducidos por la bacteria, se observó que en las células *knockdown* para HIF-1 α se previno la inducción temprana del primero; el segundo mostró un comportamiento similar, pero no significativo. A tiempos largos de infección, el aumento de ambos transcritos ocurrió en una magnitud similar en ambas líneas celulares, aunque con una aparente tendencia a aumentar aún más en las células carente de HIF-1 α (Figura 26). Esto último no es de extrañar, si se considera que el incremento de la expresión de GLUT-1 y de VEGF-A es comandado también por otras proteínas de las que se ha reportado ser inducidas o activadas por *H. pylori*: β -catenina, STAT-3 y COX-2 para VEGF-A (Hoeben *et al*, 2004; Suzuki *et al*, 2009; Tabassam *et al*, 2009; Xiong *et al*, 2014; Fernández *et al*, 2014); Myc para GLUT-1 (Dang *et al*, 2008; Yong *et al*, 2016). De acuerdo con esto, datos previos de nuestro laboratorio indican que *H. pylori* promueve la activación de β -catenina/Tcf-Lef, pero no se evaluó qué genes estaban siendo expresados por esta vía (datos no publicados).

Sin desmedro de lo anterior, la aparente tendencia de la prevención del aumento del mRNA de VEGF-A por el silenciamiento de HIF-1 α observado a 8 h de infección refuerza el trabajo de Kang *et al*, donde se determinó que HIF-1 α es el responsable del aumento de la producción de VEGF promovida por *H. pylori*, aunque esto sólo fue evaluado a nivel proteico (Kang *et al*, 2014). En cuanto de los niveles de mRNA de GLUT-1 promovido por la bacteria, hasta el momento no se han publicado investigaciones que se refieran a ello ni, más general aún, a un aumento del metabolismo glicolítico, por lo tanto, este hallazgo aporta un nuevo antecedente para el entendimiento de los efectos de *H. pylori* sobre las células epiteliales gástricas. El aumento de los niveles del transcrito de GLUT-1 no fue acompañado por la inducción de los otros genes de carácter glicolíticos analizados en este estudio (LDH-A y GAPDH, Figuras 10B-C), por lo tanto, serían necesarios ensayos adicionales para determinar si el incremento de este transcrito puede asociarse no necesariamente a una posible inducción del metabolismo glicolítico en la célula gástrica, sino a alguno de los efectos celulares ya conocidos derivados de la infección con *H. pylori*.

A pesar de los datos obtenidos en los experimentos *in vitro*, cuando se evaluó la expresión de genes blancos de HIF-1 a través de un análisis bioinformático basado en muestras de pacientes que presentan una gastritis no atrófica asociada a la infección con *H. pylori*, se observó que los cambios sufridos por cada uno de estos genes no cumplió con la significancia estadística determinada para el análisis, así como tampoco sus aumentos o disminuciones correlacionan con el sentido en que son modulados los transcritos analizados por ensayo *in vitro* (Tabla 3). Estos resultados sugieren una poco relevante funcionalidad de HIF-1 α en el epitelio gástrico, al menos en su papel transcripcional, aún cuando la presencia de esta proteína en muestras gástricas de pacientes infectados ha sido reportada previamente (Griffiths *et al*, 2007; Battacharayya *et al*, 2010). De todas maneras, es necesario hacer un estudio más exhaustivo de la expresión génica comandada por HIF-1 α en el epitelio de

gástrico infectado para poder aceptar o rechazar la idea que su actividad transcripcional está efectivamente disminuida. De todas maneras, habiendo o no actividad transcripcional de HIF-1 α , no es descartable que también esté ejerciendo acciones no canónicas en células epiteliales gástricas.

En resumen, los resultados obtenidos en este objetivo específico sugieren que *H. pylori* promueve el arresto de la transición G1/S de una forma parcialmente dependiente de HIF-1 α . Por lo demás, se demostró su participación en la expresión del gen blanco GLUT-1, y una tendencia similar, pero no significativa, se dio para VEGF-A. El análisis bioinformático no dio cuenta de una mayor expresión de algunos genes blancos de HIF-1 α , pero es necesario hacer un estudio más acabado para determinar si, efectivamente, existe un aporte transcripcional de esta proteína en el epitelio gástrico infectado.

4. Determinación del factor de virulencia de *H. pylori* involucrado en la inducción de HIF-1 α en células gástricas humanas

A la fecha, ninguno de las publicaciones que relacionan la infección de células gástricas con *H. pylori* y la inducción de HIF-1 α han logrado determinar certeramente cuál es el factor de virulencia de la bacteria involucrado en este fenómeno (Battacharayya *et al*, 2010; Kang *et al*, 2014). Por esto, en este estudio se buscó determinar, en primera instancia, la naturaleza del factor de virulencia posiblemente involucrado; a saber, si corresponde a uno de la superficie de la bacteria, o bien, si es un factor soluble liberado al medio de cultivo. Ninguna de dichas fracciones por separado fue capaz de inducir HIF-1 α ni su actividad transcripcional, sino sólo la interacción directa de *H. pylori* con las células gástricas (Figura 27).

Especial atención mereció el hecho que el sobrenadante del cultivo bacteriano disminuyó los niveles de la proteína respecto a la condición control, así como sorpresivo fue que en esa misma condición, la fosforilación de Akt (Ser473) fue sustancialmente mayor que la condición control y que la promovida por la bacteria. Frente a estos fenómenos, podemos especular, en primera instancia, que los elementos del sobrenadante, si bien se han agregado en una cantidad proporcional a lo que la MOI utilizada entregaría, en este caso la estamos añadiendo directamente, sin considerar el tiempo que la bacteria en co-cultivo con las células gástricas tardaría en entregar esa misma cantidad de proteínas solubles al medio. En este caso, sería interesante observar qué ocurre con HIF-1 α a tiempos más cortos de incubación con el sobrenadante. En cuanto a la alta fosforilación de Akt (Ser473), se debe considerar que en el sobrenadante está contenida la proteína VacA de *H. pylori*, y ésta, aislada de la bacteria, ha demostrado activar la vía PI3K/Akt (Nakayama *et al*, 2009), por lo que podría explicarse de esta forma la sostenida fosforilación de Akt (Ser473). Por otro lado, se ha descrito que otras proteínas son capaces de fosforilar a Akt en Ser473, independiente de PI3K, entre ellas, IKK ϵ y TBK1, ambas asociadas a la respuesta inmune del hospedero y, de forma interesante, activadas por PGN de *H. pylori* (Watanabe *et al*, 2010 Mahajan y Mahajan, 2012). Si bien se sabe que el PGN debe ser inyectado por el T4SS en la célula epitelial gástrica (Viala *et al*, 2004), nuevos antecedentes indican que éste también puede ser entregado por vesículas de membrana externa, pudiéndose así encontrar en el sobrenadante del cultivo de *H. pylori* (Kaparakis *et al*, 2010). De este modo, cabe la posibilidad que esa inusitada alta fosforilación de Akt (Ser473) sea no sólo un reflejo de la actividad de PI3K, sino de la acción de otros componentes de la bacteria que promueven vías alternativas de activación de Akt. Por lo demás, en el objetivo específico anterior se determinó que la actividad de Akt no sería trascendental en la inducción de HIF-1 α por *H. pylori*, por lo que esta

fosforilación de Akt, aunque no activadora, sino reguladora de su actividad, no necesariamente debería correlacionar con los niveles del factor transcripcional.

Los resultados obtenidos a partir de los componentes de *H. pylori* orientaron la investigación a definir un factor de virulencia que requiera de la interacción directa de la células gástrica con la bacteria para ejercer su función. Así, se eligió a CagA, ya que debe ser inyectada por la bacteria en la célula hospedera para ejercer su función y, por lo demás, algunos autores la han asociado a la activación de la vía PI3K/Akt (Suzuki *et al*, 2009; Tabbasam *et al*, 2009). Utilizando la cepa 84-183 de *H. pylori* se observó un aumento de la actividad HIF-1 mediante ensayo de reportero de luciferasa, en cambio su mutante isogénica $\Delta cagA$ fue incapaz de reproducir este efecto (Figuras 29). Sin embargo, cuando se evaluó los niveles de HIF-1 α y su actividad transcripcional al infectar las células gástricas con la mutante $\Delta cagA$ isogénica para la cepa 26695, no se observó diferencias en su capacidad de promover dichos efectos respecto a la bacteria nativa (Figura 30). Aunque ambas mutantes mostraron carecer de la expresión de *cagA* (Figura 28), los resultados respecto a la inducción de HIF-1 α indican que existe una clara diferencia entre ellas, más allá de la cepa en que fueron generadas.

La diferencia primaria entre la mutante 84-183 $\Delta cagA$ y la mutante 22695 $\Delta cagA$ es la metodología utilizada para su generación: la mutante 84-183 $\Delta cagA$ fue generada mediante inserción del cassette de resistencia a Kanamicina en el gen *cagA* contenido en plasmidio pBlueScript (Tummuru *et al*, 1994), en cambio, la mutante 22695 $\Delta cagA$ fue generada en este estudio por productos de PCR que permiten obtener un producto lineal compuesto por los extremos 3' y 5' del gen *cagA* flanqueando al cassette de resistencia a cloranfenicol (Materiales y Métodos 4.1). En la obtención de la primera mutante, los autores que la generaron describen que esta modificación no afectó la capacidad vacuolizante, la actividad ureasa, la actividad fosfolipasa C ni la adhesión de la bacteria a las células hospederas (Tummuru *et al*, 1994), sin embargo, nuestro

laboratorio ha observado una menor actividad ureasa comparada con la cepa nativa (dato no mostrado) y, sorpresivamente, al comparar los perfiles de proteínas totales correspondientes a 84-183 y 84-183 $\Delta cagA$, se puede apreciar que en la mutante hay una clara disminución de una banda abundante de un tamaño menor a 70 KDa, correlacionando con los 60,3 KDa descritos para la subunidad UreB de la ureasa de *H. pylori* (Mobley, 1996). La mutante generada en nuestro estudio no afectó la actividad ureasa ni la adhesión a las células gástricas (datos no mostrados). Tal como esta diferencia, podrían existir otras que afecten la expresión de proteínas en la mutante 84-183 $\Delta cagA$, por lo que un estudio más acucioso basado en las diferencias entre ambas mutantes podría ayudar a definir el factor de virulencia involucrado en la inducción de HIF-1 α . En ese sentido, un análisis del contexto genómico en el que está *cagA* sería de gran utilidad, puesto que no es descartable que la inserción del cassette de resistencia en la mutante podría afectar el marco de lectura de otros genes próximos.

Tal como los resultados acá obtenidos, en la literatura también existe controversia acerca del papel de CagA en la inducción de HIF-1 α por *H. pylori*. Battacharayya *et al* demostraron que tanto la cepa 26695 como su mutante isogénica que carece de la Isla de Patogenicidad ($\Delta cagPAI$), por lo tanto, que carece del gen que codifica para CagA y para T4SS, fueron capaces de inducir un aumento de los niveles del factor transcripcional (Battacharayya *et al*, 2010). Por otro lado, el grupo de Kang *et al* reportó que tanto las cepas nativas P1 y P12 de *H. pylori* fueron capaces de inducir HIF-1 α y que las mutantes P1 $\Delta cagL$ (que carece del gen que codifica para la proteína CagL, parte del T4SS) y P12 $\Delta cagPAI$ también promovieron este efecto, aunque en una menor magnitud que las respectivas bacterias nativas (Kang *et al*, 2014). Considerando estos antecedentes y los resultados obtenidos en este trabajo, CagA parece no ser el factor de virulencia principalmente implicado en la inducción de HIF-1 α , por tanto, las diferencias aquí obtenidas entre la capacidad de inducir HIF-1 α de 84-

183 $\Delta cagA$ y 26695 $\Delta cagA$ podrían entregar una oportunidad para definir el factor de la bacteria que podría estar participando de este fenómeno. Ahora, los efectos observados en el presente trabajo y en la literatura vislumbran la problemática acerca de la variabilidad de las respuestas frente a las diversidad de cepas de *H. pylori* utilizadas en los estudios *in vitro*, por lo que debería ser un punto a considerar al realizar conjeturas frente al efecto de bacterias mutantes sobre una respuesta celular. Consecuentemente, los resultados obtenidos en este trabajo muestran diferencias en cuanto a la inducción de HIF-1 α al utilizar dos cepas de *H. pylori* mutantes para el factor CagA.

Por otro lado, en este estudio se definió, mediante el uso de inhibidores farmacológicos, que PI3K/mTOR estaría involucrado en el aumento de HIF-1 α promovido por *H. pylori*, lo que también podría dar luces acerca del factor de virulencia implicado en este evento. En este sentido, el grupo de investigación de Sokolova determinó que la activación de PI3K y mTOR es independiente de CagA y de Virb7 (CagT/12, parte del T4SS) (Sokolova *et al*, 2014), y Nagy *et al* demostraron que PI3K es activada por el PGN bacteriano que es inyectado a la célula gástrica por el T4SS (Nagy *et al*, 2009). También se ha descrito que la proteína de membrana externa OipA de *H. pylori* estaría involucrada en la activación de PI3K/Akt (Tabassam *et al*, 2009), sin embargo, en nuestras condiciones, la mutante 26695 $\Delta oipA$ generada en nuestro laboratorio indujo la fosforilación de Akt (Ser473) y el aumento de HIF-1 α de manera similar a la bacteria nativa (Figura Anexa 3). Por último, Nakayama *et al* mostraron que la proteína recombinante VacA es capaz activar la vía PI3K/Akt (Nakayama *et al*, 2009), pero nuestros datos muestran que la infección con la mutante 26695 $\Delta vacA$ no previene la inducción de HIF-1 α (Figura 31).

Tal como se acaba de mencionar, la inducción de HIF-1 α por *H. pylori* 26695 fue reproducida por las mutantes isogénica $\Delta vacA$ y también por las mutantes Δlps y Δggt (Figura 31), sugiriendo que ninguno de estos factores de virulencia estaría involucrado en este evento. Esto concuerda con el hecho que

ni los elementos contenidos de la superficie de la bacteria, donde tenemos a la glicoproteína de membrana externa LPS, ni los elementos solubles, donde se encuentra VacA y GGT, fueron capaces de imitar la acción de la bacteria en contacto directo con la célula gástrica. Cabe destacar que GGT es una enzima importante en la generación de estrés oxidativo en las células gástricas y, por otro lado, que las ROS han sido implicadas en la inducción de HIF-1 α por *H. pylori* (Park *et al*, 2003; Valenzuela *et al*, 2013; Kang *et al*, 2014), por lo que parecía factible que esta proteína bacteriana estuviese involucrada en la inducción de HIF-1 α . Sin embargo, esto no ocurrió, como tampoco se pudo demostrar una asociación funcional, basada la disminución de survivina por *H. pylori*, entre GGT y HIF-1 α (Figuras 32C, 32D y 33). De este modo, descartamos alguna relación entre la acción de este factor de virulencia y la acción del factor transcripcional aquí estudiado, al menos en términos de la disminución de survivina y pérdida de la viabilidad inducidas por la infección.

En definitiva, los resultados sugieren que el factor de virulencia implicado en la inducción de HIF-1 α cumple su función a través de una interacción directa entre *H. pylori* y la célula gástrica. Por esto, estudios adicionales serían necesarios para poder determinar cuál de ellos podría estar involucrado. Por lo demás, es perentorio considerar la variabilidad genética existente entre cepas que puedan derivar en una diversidad de respuestas en el hospedero, por ello, esos estudios deberían basarse en más de una cepa, para probar la universalidad de los efectos observados.

5. Alcances fisiopatológicos

En el presente estudio se obtuvo que la inducción de HIF-1 α por *H. pylori* sería una respuesta de la célula que emerge desde una vía de señalización de supervivencia y proliferación celular, PI3K/mTOR, pero que desencadena una

respuesta de arresto del ciclo celular, como un papel no canónico del mencionado factor transcripcional. Estos antecedentes explicarían, al menos en parte, la señalización subyacente a la infección que lleva a respuestas tan disímiles ocurridas en el epitelio gástrico infectado antes de la transformación maligna: aumento de la apoptosis y de la proliferación celular (Jang y Kim, 2000).

La masiva apoptosis ocurrida en el epitelio gástrico luego de la infección con *H. pylori* puede llevar al desarrollo de atrofia gástrica, lesión precursora de la cascada preneoplásica que deriva en desarrollo de cáncer gástrico (Valenzuela *et al*, 2010). Aunque el presente estudio no se abocó a estudiar apoptosis, otro grupo indicó que el arresto del ciclo celular promovido por *H. pylori* está asociado a la apoptosis celular promovida por la infección (Shirin *et al*, 1999). De este modo, evitar el arresto celular sería una posibilidad de contrarrestar, al menos en parte, la apoptosis ocurrida y, con esto, una predisposición al desarrollo de lesiones preneoplásicas. Con los antecedentes aquí obtenidos, HIF-1 α se presenta como una proteína relevante para esta finalidad.

HIF-1 α es una proteína que no se encuentra expresada normalmente en el epitelio gástrico, sino que incrementa su expresión bajo la infección con *H. pylori* y sigue aumentando a medida que las lesiones preneoplásicas progresan hacia el cáncer gástrico, lo que sugiere que tiene un papel relevante en el desarrollo de la patología maligna desde etapas tempranas (Griffiths *et al*, 2007). Este hecho la convierte en un posible blanco farmacológico muy atractivo, además del hecho que, distinto a PI3K o mTOR, no es necesaria para el normal desarrollo y proliferación de las células epiteliales gástricas en el contexto del recambio habitual del epitelio. Por esto, modular negativamente su expresión frente a la infección con *H. pylori* podría ser una alternativa terapéutica con posibilidades menores de desencadenar efectos laterales no deseados, lo que, sin duda, es una ventaja frente a otros fármacos.

Por otro lado, la determinación del factor de virulencia de *H. pylori* que lleva a la inducción de HIF-1 α es una tarea que puede ayudar, desde otra perspectiva, a prevenir los eventos de inhibición del ciclo celular en el epitelio infectado, y con esto, generar otra alternativa terapéutica para evitar el desarrollo de lesiones preneoplásicas en pacientes infectados con la bacteria. Nuestros antecedentes indican que la interacción directa entre la bacteria y la células hospedera estarían involucrada en esto, por lo que evitar este paso sería otro modo de evitar el aumento de los niveles de HIF-1 α en el epitelio gástrico luego de la infección con *H. pylori*.

En definitiva, el trabajo aquí expuesto entrega nuevos y valiosos antecedentes acerca del papel de HIF-1 α en la infección por *H. pylori*. Entender el papel que juega esta proteína desde su papel no transcripcional abre nuevas interpretaciones acerca de lo que significa su presencia en el tejido gástrico infectado. Así, si HIF-1 α contribuye a la apoptosis a través de su arresto en el ciclo celular podría dar luces acerca de una participación en los procesos anteriores a la transformación maligna desencadenados por la bacteria, por tanto, relevante desde la perspectiva de la prevención del cáncer gástrico. Por otro lado, los antecedentes aquí expuestos han demostrado lo muy disímil que resulta la infección con *H. pylori* en términos de la señalización celular que promueve, pero ha encontrado en HIF-1 α un elemento que permite unir dos eventos que, por separado, han tratado de explicar la patogénesis derivada de la infección. Encontrar una relación entre ambas respuestas, proliferación y apoptosis, podría ser la clave para entender a cabalidad la manera en que *H. pylori* altera la dinámica normal de las células epiteliales gástricas, de modo de considerar los dos fenómenos en la ecuación que permitirá entender la carcinogénesis promovida por la infección. En ese aspecto, este trabajo aporta nuevos antecedentes que podrían cambiar la perspectiva desde la que, hasta ahora, se han estudiado los efectos de *H. pylori* sobre el epitelio gástrico.

6. Limitaciones del estudio

El trabajo expuesto se ha basado en un modelo *in vitro* utilizando células humanas derivadas de cáncer gástrico. Esta última característica limita las proyecciones que se puedan hacer a partir de los resultados obtenidos, puesto que las células son transformadas y, con esto, presentan diferencias sustanciales con células no transformadas del epitelio gástrico. No obstante esto, este tipo de aproximación ha sido ampliamente aceptada para los estudios de señalización celular involucrada en la interacción entre *H. pylori* y las células epiteliales gástricas. De todas maneras, las observaciones derivadas de las investigaciones basadas en modelos *in vitro* requieren de una validación en muestras de pacientes, o bien, en modelos *in vivo* para definir la relevancia de lo observado en estos sistemas altamente controlados.

CONCLUSIONES

- 1.- *H. pylori* 26695 promueve un aumento transitorio de los niveles de HIF-1 α en células gástricas humanas MKN45 y AGS, así como una localización principalmente nuclear en células MKN45.
- 2.- La inhibición farmacológica de las proteínas PI3K y mTOR previene la inducción de HIF-1 α promovida por *H. pylori* 26695 en células MKN45.
3. Células MKN45 infectadas con *H. pylori* 26695 presentan arresto del ciclo celular en la fase G0/G1.
- 4.- El silenciamiento de HIF-1 α en células MKN45 previene parcialmente el arresto celular en la fase G0/G1 promovido por *H. pylori* 26695 y, además, previene parcialmente la disminución de la proteína ciclina D1 promovida por la infección.
- 5.- Células MKN45 infectadas con *H. pylori* 26695 presentan un aumento de los transcritos de los genes blancos de HIF-1 α , GLUT-1 y VEGF-A.
- 6.- El silenciamiento de HIF-1 α en células MKN45 previene el aumento temprano de los niveles de mRNA de GLUT-1 promovido por *H. pylori* 26695, no así el aumento obtenido a tiempos mayores de infección.
- 7.- La inducción de HIF-1 α por *H. pylori* 26695 requiere de la interacción directa entre bacteria y células gástricas. Ni proteínas solubles ni de la superficie de la bacteria están involucradas en este fenómeno, así como tampoco el factor de virulencia inyectado CagA.

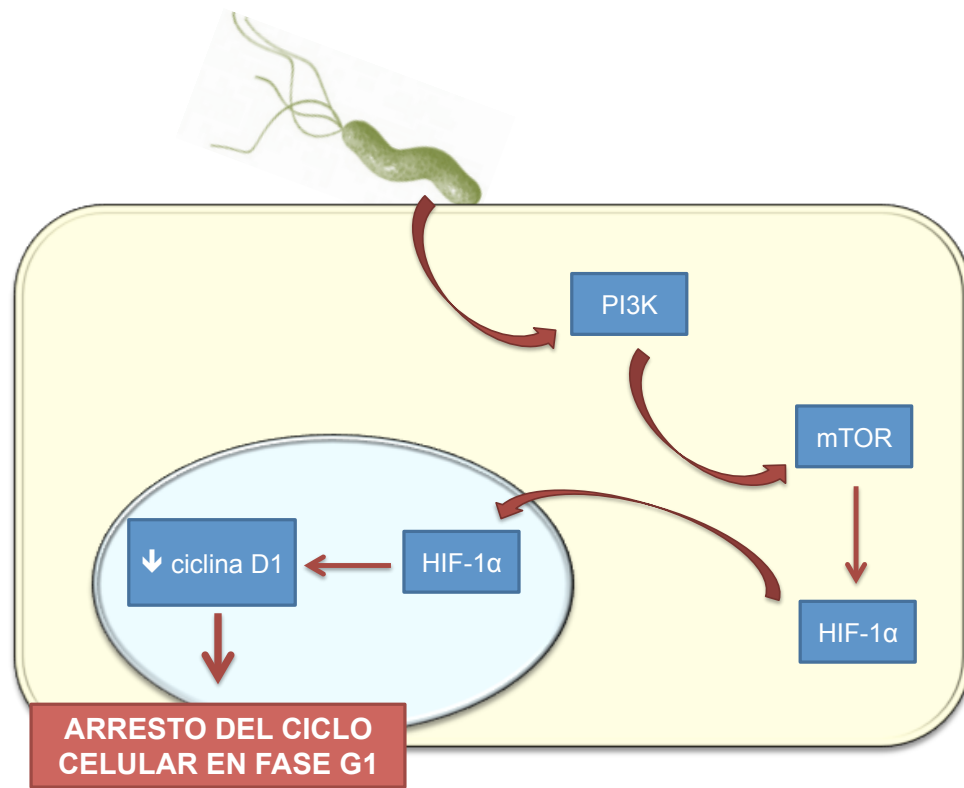


Figura 34. Modelo propuesto para la inducción de HIF-1 α por *H. pylori* y su papel durante la infección de células gástricas.

H. pylori promueve la activación de PI3K y, consecuentemente, de mTOR. La inhibición farmacológica de ambas proteínas previnieron el aumento de HIF-1 α inducido por la infección, lo que permite postular que PI3K/mTOR lleva a un aumento de los niveles de HIF-1 α , presumiblemente por aumentar la traducción del transcrito que lo codifica. Al silenciar HIF-1 α en las células gástricas, se previno parcialmente el arresto en G0/G1, así como la disminución de ciclina D1 promovida por la bacteria, sugiriendo que HIF-1 α promueve una disminución de los niveles de ciclina D1, por un mecanismo aún indeterminado, para llevar al arresto del ciclo celular en la fase G1 durante la infección con *H. pylori*. Basado en la literatura, se propone que este efecto de HIF-1 α sería independiente de su actividad como factor transcripcional.

ANEXOS

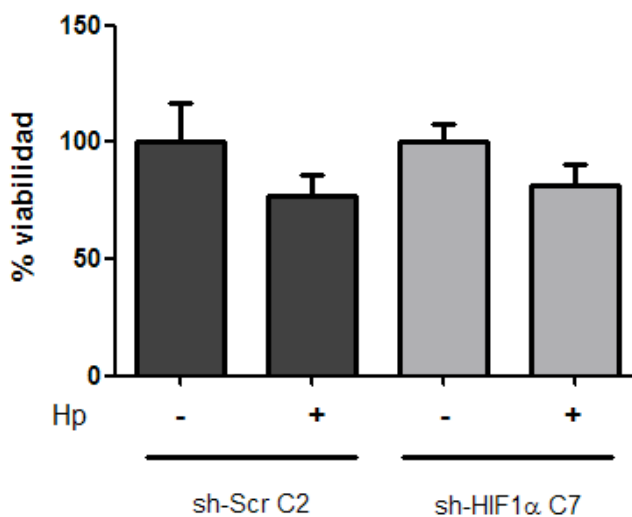


Figura Anexa 1. Papel de HIF-1 α en la viabilidad de células gástricas infectadas con *H. pylori*

Líneas celulares establemente transfectadas MKN45 sh-Scr (C2) o MKN45 sh-HIF-1 α (C7) fueron infectadas con *H. pylori* 26695 a una MOI de 100 por 8 h. Se determinó la viabilidad celular mediante el reactivo MTS (n=3; promedio \pm SEM; *p<0,05; **p<0,01).

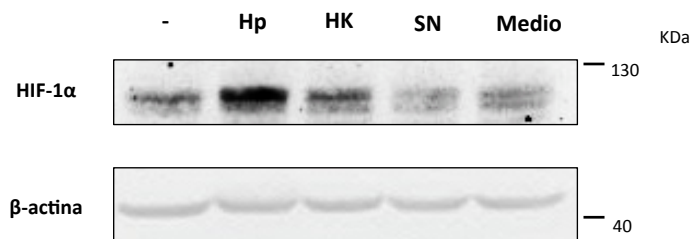


Figura Anexa 2. Efecto de los componentes bacterianos de *H. pylori* sobre los niveles de HIF-1 α

Células MKN45 fueron infectadas con *H. pylori* 26695 (MOI 100), tratadas con la bacteria muerta por calor (HK) o con el sobrenadante del cultivo bacteriano (SN) por 4 h. Se utilizó el medio de cultivo bacteriano sin *H. pylori* como control para SN. Se evaluaron los niveles proteicos de HIF-1 α y β -actina por western blot (n=1).

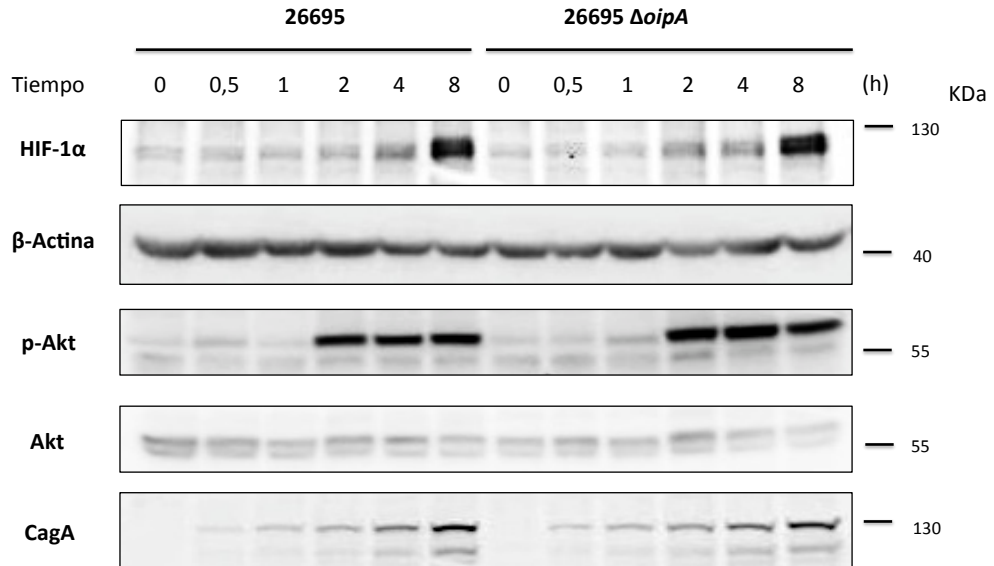


Figura Anexa 3. Efecto de *H. pylori* 26695 $\Delta oipA$ sobre la fosforilación de Akt (Ser473) y sobre los niveles de HIF-1 α

Células MKN45 fueron infectadas con *H. pylori* 26695 o con su mutante isogénica $\Delta oipA$ a una MOI 100 por los tiempos indicados. Se evaluaron los niveles proteicos de HIF-1 α , p-Ser473-Akt, Akt total, CagA y β -actina por western blot. (n=1).

REFERENCIAS

- Alao J.P. (2007)** The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer*. 6:24.
- Alzahrani S. et al (2014)** Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol*. 20(36):12767-80.
- Bhattacharyya A. et al (2010)** Mechanism of hypoxia-inducible factor 1 alpha-mediated Mcl1 regulation in *Helicobacter pylori*-infected human gastric epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 299(5):G1177-86.
- Brocato J. et al (2014)** Molecular responses to hypoxia-inducible factor 1 α and beyond. *Mol Pharmacol*. 85(5):651-7.
- Carmeliet P. et al (1998)** Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 394(6692):485-90.
- Chen N. et al (2009)** BCL-xL Is a Target Gene Regulated by Hypoxia-inducible Factor-1 α . *J Biol Chem*. 284(15): 10004-12
- Clarke D.N. et al (2012)** Perlecan Domain V induces VEGF secretion in brain endothelial cells through integrin $\alpha 5\beta 1$ and ERK-dependent signaling pathways. *PLoS One*. 7(9):e45257.
- Correa P., Houghton J. (2007)** Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 133(2):659-72.
- Cover T.L. et al (2003)** Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res*. 63, 951-7
- Dang C.V. et al (2008)** The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer*. 8(1):51-6.
- De Luca A. et al (2003)** Coexpression of *Helicobacter pylori*'s proteins CagA and HspB induces cell proliferation in AGS gastric epithelial cells, independently from the bacterial infection. *Cancer Res*. 63(19):6350-6.
- Ding S.Z. et al (2008)** *Helicobacter pylori* and mitogen-activated protein kinases regulate the cell cycle, proliferation and apoptosis in gastric epithelial cells. *J Gastroenterol Hepatol*. 23(7 Pt 2):e67-e78.
- Ding S.Z. et al (2010)** *Helicobacter pylori* infection, oncogenic pathways and epigenetic mechanisms in gastric carcinogenesis. *Future Oncol*.6(5):851-62.
- Dougherty D.C., Sanders M.M. (2005)** Comparison of the responsiveness of the pGL3 and pGL4 luciferase reporter vectors to steroid hormones. *Biotechniques*. 39(2):203-7.
- Du K., Tschlis P.N. (2005)** Regulation of the Akt kinase by interacting proteins. *Oncogene*. 14;24(50):7401-9.

Easwaran V. et al (2003) beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res.* 63(12):3145-53.

Eaton K.A. et al (2004) *Helicobacter pylori* with a truncated lipopolysaccharide O chain fails to induce gastritis in SCID mice injected with splenocytes from wild-type C57BL/6J mice. *Infect Immun.* 72(7):3925-31.

Fan Q.W. et al (2009) EGFR Signals to mTOR Through PKC and Independently of Akt in Glioma. *Sci Signal.* 2(55):ra4.

Fernández J.G et al (2014) Survivin expression promotes VEGF-induced tumor angiogenesis via PI3K/Akt enhanced β -catenin/Tcf-Lef dependent transcription. *Mol Cancer.* 13:209.

Fukuda R. et al (2002) Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem.* 277(41):38205-11.

Giannakis G. et al (2003) Aberrant cryptic responsiveness of the pCAT 3- and pGL3-promoter reporter vectors. *Biotechniques.* 35(2):332-9.

Giodini A. et al (2002) Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res.* 62(9):2462-7.

GLOBOCAN (2012) <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>

Goda N. et al (2003) Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol.* 23(1):359-69.

Gong M. et al (2010) *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase is a pathogenic factor in the development of peptic ulcer disease. *Gastroenterology.* 139:564-73.

Gordan J.D. et al (2007) HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell.* 11:335-47.

Griffiths E.A. et al (2007) Hypoxia-inducible factor-1alpha expression in the gastric carcinogenesis sequence and its prognostic role in gastric and gastro-oesophageal adenocarcinomas. *Br J Cancer.* 96(1):95-103.

Harashima H. et al (2013) Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol.* 23(7):345-56.

Henze A.T., Acker T. (2010) Feedback regulators of hypoxia-inducible factors and their role in cancer biology. *Cell Cycle.* 9(14):2749-63.

Hoeben A. et al (2004) Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 56(4):549-80.

Holmquist-Mengelbier L. et al (2006) Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell.* 10(5):413-23.

- Hong S.J. et al (2002)** Promoterless luciferase reporter gene is transactivated by basic helix-loop-helix transcription factors. *Biotechniques*. 33(6):1236-8, 1240.
- Hu C.J. et al (2003)** Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol*. 23(24):9361-74.
- Huang L.E. (2013)** How HIF-1 α Handles Stress. *Science*. 339(6125):1285-6.
- Hubbi M.E. et al (2013)** A nontranscriptional role for HIF-1 α as a direct inhibitor of DNA replication. *Sci Signal*. 6(262):ra10
- IARC (1994)** Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 61:1-241.
- Jain P. et al (2011)** *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin A (VacA) engages the mitochondrial fission machinery to induce host cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(38):16032-7
- Jang T.J., Kim J.R. (2000)** Proliferation and apoptosis in gastric antral epithelial cells of patients infected with *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol*. 35(4):265-71.
- Kamata H., Hirata H. (1999)** Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*. 11(1):1-14.
- Kang D. et al (2013)** The biological activity of *H. pylori* SlyD in vitro. *Helicobacter*. 18(5):347-55.
- Kang M.J. et al (2014)** *Helicobacter pylori* induces vascular endothelial growth factor production in gastric epithelial cells through hypoxia-inducible factor-1 α -dependent pathway. *Helicobacter*. 19(6):476-83.
- Kaparakis M. et al (2010)** Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. *Cell Microbiol*. 12(3):372-85.
- Keith B. et al (2011)** HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer*. 12(1):9-22.
- Kim K.M. et al (2007)** Gamma-glutamyltranspeptidase of *Helicobacter pylori* induces mitochondria-mediated apoptosis in AGS cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 355(2):562-7
- Koshiji M. et al (2004)** HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J*. 23(9):1949-56.
- Laughner E. et al (2001)** HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol*. 21(12):3995-4004.
- Leclerc G.M. et al (2000)** Development of a destabilized firefly luciferase enzyme for measurement of gene expression. *Biotechniques*. 29(3):590-1, 594-6.
- Li F. et al (1998)** Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*. 396(6711):580-4.

- Liu Y. et al (2013)** Rapamycin increases pCREB, Bcl-2, and VEGF-A through ERK under normoxia. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 45(4):259-67.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001)** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 25(4):402-8.
- Mahajan K., Mahajan N.P. (2012)** PI3K-independent AKT activation in cancers: a treasure trove for novel therapeutics. *J Cell Physiol*. 227(9):3178-84.
- Malumbres M. (2011)** Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiol Rev*. 91(3):973-1007.
- Mimuro H. et al (2007)** *Helicobacter pylori* dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach. *Cell Host Microbe*. 2(4):250-63.
- MINSAL (2012)** <http://www.deis.cl/series-y-graficos-de-mortalidad>.
- Mobley H.L. (1996)** The role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. *Aliment Pharmacol Ther*. 10 Suppl 1:57-64.
- Nagy T.A. et al (2009)** *Helicobacter pylori* regulates cellular migration and apoptosis by activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J Infect Dis*. 199(5):641-51.
- Nakayama M. et al (2009)** *Helicobacter pylori* VacA-induced Inhibition of GSK3 through the PI3K/Akt Signaling Pathway. *J Biol Chem*. 284:1612-9.
- Park J.H. et al (2003)** Gastric Epithelial Reactive Oxygen Species Prevent Normoxic Degradation of Hypoxia inducible Factor-1 α in Gastric Cancer Cells. *Clin Cancer Res*. 9:433-40.
- Parkin D.M. (2006)** The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 118(12):3030-44.
- Peek R.M. Jr. et al (1999)** *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res*. 59(24):6124-31
- Peng X.H. et al (2006)** Cross-talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1 α signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression. *J Biol Chem*. 281(36):25903-14.
- Polk D.B., Peek R.M. Jr. (2010)** *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nat Rev Cancer*. 10(6):403-14.
- Rankin E.B, Giaccia A.J. (2008)** The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ*. 15(4): 678-85.
- Raval R.R. et al (2005)** Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol*. 25(13):5675-86.
- Saito Y. et al (2010)** Conversion of *Helicobacter pylori* CagA from senescence inducer to oncogenic driver through polarity-dependent regulation of p21. *J Exp Med*. 207(10):2157-74.

- Salama N.R. et al (2013)** Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol.* 11(6):385-99.
- Scotti C. et al (2010)** Cell-cycle inhibition by *Helicobacter pylori* L-asparaginase. *PLoS One.* 5(11):e13892.
- Semenza G.L. (2003)** Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 3(10):721-32.
- Semenza G.L. (2012)** Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 33(4):207-14.
- Shirin H. et al (1999)** *Helicobacter pylori* inhibits the G1 to S transition in AGS gastric epithelial cells. *Cancer Res.* 59(10):2277-81.
- Silva J.M. et al (2015)** BRAFV600E Cooperates With PI3'-Kinase Signaling, Independent of AKT, To Regulate Melanoma Cell Proliferation. *Mol Cancer Res.* 12(3):447-63.
- Sokolova O. et al (2014)** *Helicobacter pylori* promotes eukaryotic protein translation by activating phosphatidylinositol 3 kinase/mTOR. *Int J Biochem Cell Biol.* 55:157-63.
- Suerbaum S., Michetti P. (2002)** *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med.* 347(15):1175-86.
- Suzuki M. et al (2009)** *Helicobacter pylori* CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation. *Cell Host Microbe.* 22;5(1):23-34.
- Tabassam F. et al (2009)** *Helicobacter pylori* activate epidermal growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-OH kinase-dependent Akt and glycogen synthase kinase 3 β phosphorylation. *Cell Microbiol.* 11(1):70–82.
- Tavares R., Pathak S.K. (2015)** *Helicobacter pylori* protein JHP0290 exhibits proliferative and anti-apoptotic effects in gastric epithelial cells. *PLoS One.* 10(4):e0124407.
- Thirunavukkarasu K. et al (2000)** Cryptic enhancer elements in luciferase reporter vectors respond to the osteoblast-specific transcription factor Osf2/Cbfa1. *Biotechniques.* 28(3):506-10.
- Toller I.M. et al (2011)** Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 108(36):14944-9.
- Torre L. et al (2015)** Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 65:87-108.
- Torres V.A. et al (2006)** Caveolin-1 controls cell proliferation and cell death by suppressing expression of the inhibitor of apoptosis protein survivin. *J Cell Sci.* 119(Pt 9):1812-23.
- Tummuru M.K. et al (1994)** Mutation of the cytotoxin-associated cagA gene does not affect the vacuolating cytotoxin activity of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 62(6):2609-13.
- Uchida T. et al (2004)** Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 α . *J Bio Chem.* 279:14871–8.

- Valenzuela M. et al (2010)** *Helicobacter pylori*-induced loss of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin is linked to gastritis and death of human gastric cells. *J Infect Dis.* 202(7):1021-30.
- Valenzuela M. et al (2013)** *Helicobacter pylori*-Induced Loss of Survivin and Gastric Cell Viability Is Attributable to Secreted Bacterial Gamma-Glutamyl Transpeptidase Activity. *J Infect Dis.* 208(7):1131-41
- Vanhaesebroeck B. et al (2012)** PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13(3):195-203.
- Viala J. et al (2004)** Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol.* 5(11):1166-74
- Watanabe T. et al (2010)** NOD1 contributes to mouse host defense against *Helicobacter pylori* via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. *J Clin Invest.* 120(5):1645-62.
- Wen W. et al (2010)** Suppression of cyclin D1 by hypoxia-inducible factor-1 via direct mechanism inhibits the proliferation and 5-fluorouracil-induced apoptosis of A549 cells. *Cancer Res.* 70(5):2010-9.
- Xia H.H., Talley N.J. (2001)** Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol.* 96(1):16-26.
- Xiong H. et al (2014)** A positive feedback loop between STAT3 and cyclooxygenase-2 gene may contribute to *Helicobacter pylori*-associated human gastric tumorigenesis. *Int J Cancer.* 134(9):2030-40.
- Yamaoka Y. et al (2002)** *Helicobacter pylori* infection in mice: Role of outer membrane proteins in colonization and inflammation. *Gastroenterology.* 123(6):1992-2004.
- Yamaoka Y. (2010)** Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 7(11):629-41.
- Yang Z. et al (2015)** Phosphorylation and inactivation of PTEN at residues Ser380/Thr382/383 induced by *Helicobacter pylori* promotes gastric epithelial cell survival through PI3K/Akt pathway. *Oncotarget.* 6(31):31916-26.
- Yokota S. et al (2010)** *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides upregulate toll-like receptor 4 expression and proliferation of gastric epithelial cells via the MEK1/2-ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway. *Infect Immun.* 78(1):468-76.
- Yong X. et al (2016)** *Helicobacter pylori* upregulates Nanog and Oct4 via Wnt/ β -catenin signaling pathway to promote cancer stem cell-like properties in human gastric cancer. *Cancer Lett.* 374(2):292-303.
- Yu C. et al (2013)** VCP Phosphorylation-Dependent Interaction Partners Prevent Apoptosis in *Helicobacter pylori*-Infected Gastric Epithelial Cells. *PLoS One.* 8(1):e55724.
- Zeng X. et al (2005)** Deletion of *cagA* gene of *Helicobacter pylori* by PCR products. *World J Gastroenterol.* 11(21):3255-9.